

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. Черноус

**ЗВІТ**

ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

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

(остаточний)

Керівник НДР,

д-р.мед.наук, професор

А.М. Лобода

2020

Рукопис закінчено 20 грудня 2020 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від 23 грудня 2020 р. № 6

**СПИСОК АВТОРІВ**

Керівник НДР, директор МІ СумДУ

д.мед.н., професор

А.М. Лобода

(20.12.2020) (реферат, вступ, висновки)

Відповідальний виконавець

Заступник директора МІ СумДУ

к.мед.н., доцент

В.М. Голубнича

(20.12.2020) (реферат, вступ, розділ  
1, 2, 3, висновки)

Старший науковий співробітник

к.мед.н.

В.В. Корнієнко

(20.12.2020) (розділ 1,2, 3)

Науковий співробітник

Р.В. Вітер

(20.12.2020) (розділ 1, 2, 3)

Науковий співробітник

О.М. Калінкевич

(20.12.2020) (розділ 2, 3)

Науковий співробітник

Є.В. Гусак

(20.12.2020) (розділ 2, 3)

Студент

А.В. Савченко

(20.12.2020) (розділ 2, 3)

Студентка

Ю.В. Варава  
(розділ 2, 3)

(20.12.2020)

## РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 119 с. 7 табл., 67 рис., 123 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 було встановлено основні тренди у розвитку антибіотикорезистентності у північно-східному регіоні України. Сформовано колекцію полірезистентних мікроорганізмів.

Здійснено синтез наночасточок Ag, Cu, та ZnO із застосуванням різних видів синтезу та створено їх основні комплекси з хітозаном. Вивчено фізико-хімічні характеристики отриманих сполук, їх антимікробну активність, стабільність у часовому проміжку та за умов впливу фізичних факторів. Встановлено концентрації, які викликають інгібування планктонних та плівкових форм мікроорганізмів, та досліджено особливості впливу нанокompatитів на різні структури бактеріальної клітини та на культури соматичних клітин. Вивчено можливість їх застосування для лікування гнійних ран на прикладі застосування наночастинок срібла у топічній моно- та комбінованій терапії експериментальної ранової інфекції у щурів.

## ЗМІСТ

	С.
Скорочення та умовні позначки	7
Вступ	8
1 Огляд літератури	9
2 Об'єкти і методи дослідження	18
2.1 Матеріали	23
2.2 Моніторинг антибіотикорезистентності серед мікроорганізмів ізольованих у північно-східному регіоні України	23
2.3 Синтез наночастинок срібла	24
2.4 Синтез наночастинок міді	26
2.5 Синтез наночастинок ZnO	27
2.6 Приготування хітозану та його композитів із наночастинками	28
2.7 Вивчення фізико-хімічних параметрів отриманих НЧ, хітозану та їх композитів	31
2.8 Обробка ультразвуковими хвилями	34
2.9 Оцінка антибактеріальної активності наночастинок Ag, Cu, ZnO, хітозану та їх композитів проти полірезистентних клінічних ізолятів	35
2.10 Дослідження цитотоксичності зразків	38
2.11 Дослідження ефективності та безпечності наночастинок під час лікування експериментальної інфекції на тваринах	39
2.12 Статистичний аналіз	40
3.1 Особливості мікробіоти виділеної від пацієнтів та її чутливість до антибіотиків	41
3.2 Характеристика НЧ Ag, Cu, ZnO	46
3.3 Характеристика хітозану та його композитів з наночастинками	52
3.4 Антибактеріальна активність НЧ Ag, Cu, ZnO, хітозану та їх композитів	65
3.5 Дослідження in-vitro впливу НЧ, хітозану та їх композитів на соматичні клітини	86

3.6	Дослідження впливу НЧ срібла на перебіг гнійної ранової інфекції під час проведення експериментальної топічної терапії	89
	Висновки	101
	Перелік джерел посилання	103

## СКОРОЧЕННЯ ТА УМОВНІ ПОЗНАЧКИ

НЧ– наночастинки

НС – наноструктури

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

SEM – скануюча електронна мікроскопія

ПАГ – поліамід гідрохлорид

TEM – трансмісивна електронна мікроскопія

Cu-НЧ– наночастинки міді

MRSA – метицелін резистентний золотистий стафілокок

CLSI – інститут клініко-лабораторних стандартів

EUCAST – Європейське товариство клінічної мікробіології та інфекційних хвороб

## ВСТУП

До середини минулого століття інфекції були однією із головних причин захворюваності та смертності. Винахід антибіотиків призвів до зміни цієї парадигми, зниження смертності та частоти ускладнень спричинених інфекційними патогенами [1]. Неконтрольоване застосування цих препаратів призвело до появи антибіотикорезистентності [2] та драматичної зміни положення антибіотиків [3].

Одним із перспективних шляхів у боротьбі зі зростаючою полірезистентністю є пошук нових засобів з антимікробною активністю [4]. Метали та їх оксиди використовували у якості антимікробних засобів з давніх давен, однак, винахід антибіотиків призвів до їх витіснення із медичної практики. Розвиток нанотехнологій надав нового поштовху до використання металів у якості антимікробних засобів [5]. Численні дослідження свідчать про наявність антимікробних властивостей у нанометалів [6], тому їх вважають альтернативою для антимікробних засобів і передбачають їх широке біомедичне використання. Однак суттєвим фактом, яким обмежує клінічне використання нанометалів є їх токсичність та незадавільна біодеградабельність [7].

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 [8]. З огляду на все перераховане, метою нашого дослідження було встановлення механізму дії та ефективності нанокompatитів складу «хітозан-нанометали» стосовно найрозповсюдженіших антибіотикорезистентних клінічних ізолятів.

## 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Винахід антибіотиків був одним із найважливіших відкриттів в історії людства, яке дозволило різко знизити рівень смертності від інфекцій, значно покращити якість життя та суттєво збільшити його тривалість. З часів відкриття антибіотиків уявлення людства про них перетворилося з "чарівної таблетки" на "ліки призначення яких потребує особливої уваги". Основною причиною таких кардинальних змін є поява стійких до антибіотиків штамів мікроорганізмів [9]. Поширення антибіотико-резистентності призводить до звуження переліку ефективних препаратів та збільшення смертності серед населення від інфекційних захворювань. Згідно даних британських дослідників щороку через неефективність антибактеріальної терапії у світі гине близько 700 тисяч осіб [10]. Прогнозовано в 2050 році смертність від інфекційних захворювань буде перевищувати смертність від онкологічної патології та становитиме до 10 млн смертей у рік [10].

Експерти вважають, що є два варіанти вирішення проблеми: оптимізація заходів спрямованих на гальмування розповсюдження антибіотико-резистентності серед мікроорганізмів та інтенсифікація розробки нових препаратів із антимікробними властивостями [11,12].

Для подолання цієї проблеми у 2014 році ВООЗ розробило стратегічний план та ініціювало декілька міжнародних проектів спрямованих на проведення моніторингу виникнення та поширення антибіотикорезистентних мікроорганізмів у всьому світі [13]. Дослідження чутливості основних збудників до широко використовуваних антибіотиків є необхідним у зв'язку зі специфічністю профілів антибіотикорезистентності мікроорганізмів [14]. Особливості профілів антибіотикорезистентності мікроорганізмів залежать від медичних та немедичних чинників, а тому моніторинг антибіотикорезистентності у кожному регіоні повинен проводитись систематично, з постійним оновленням актуальної інформації стосовно ефективності антибактеріальних препаратів [15].



Згідно з останніми висновками дослідників [16] інфекції верхніх та нижніх дихальних шляхів мають найбільший внесок в структуру смертності та захворюваності від інфекційної патології. Лідуючу позицію серед патогенів, які уражують респіраторний тракт, займають віруси. Однак, бактерії, як самостійно, так і у якості чинників вторинних бактеріальних ускладнень на тлі вірусних інфекцій, відіграють суттєву роль у виникненні тяжких станів та хронізації процесів [17]. Серед факторів, що підсилюють згубну дію бактерій, провідним є антибіотикорезистентність.

Наявні дані, щодо стану антибіотикорезистентності серед збудників респіраторних інфекцій є неповними та значно відрізняються в різних країнах. У Європі відмічають прогресивне зростання кількості антибіотирезистентних представників у мікробіоті респіраторного тракту. У 2008 р стійкість *S. pneumoniae* до антибактеріальних препаратів коливалась від 25% у Болгарії і Польщі до 50% в Угорщині і перевищувала 50% у Румунії [18]. У той же час масштабне дослідження чутливості пневмококів до антибіотиків, яке проводилось у 2014 - 2016 рр. в Україні, показало, що 97% штамів *S. pneumoniae* були чутливими до внутрішньовенного пеніциліну (згідно з контрольними точками CLSI), 83% – до перорального пеніциліну (відповідно до CLSI та EUCAST). Для порівняння: чутливість штамів *S. pneumoniae*, виділених у Словаччині, була значно нижчою в порівнянні з Україною [19].

Інший відомий респіраторний патоген (*H. Influenzae*), виділений в країнах Європи в період 2002—2008 рр., був чутливим до ампіциліну в межах від 11,8 до 45,5%. [12]. Дослідження чутливості *H. influenzae* до цефтриаксону, левофлоксацину та моксифлоксацину в Україні в 2014-2016 рр. показало 100% чутливість. Вивчення чутливості до антибіотиків *M. catarrhalis* встановило, що більше 95% штамів були стійкими до ампіциліну [19].

Під час вивчення супутньої мікрофлори у важкохворих з COVID-19, було виявлено у 85,5% грам-негативні бактерії, серед яких лідуючі позиції

належали *A. baumannii* (35,8%), *K. pneumoniae* (30,8%), які були в 91,2 and 75,5% випадків карбапенемрезистентними, а 100% штамів *Staphylococcus aureus* були метицилінрезистентними [20].

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 [21]. Дані стосовно поширення мікроорганізмів цієї групи та їх чутливість до наявних антибактеріальних препаратів в Україні дуже обмежені. Відомо, що мікроорганізми цієї групи мають високу здатність до колонізації різних поверхонь та формування біоплівки на імплантатах, медичних апаратах, обладнанні для надання першої медичної допомоги [22].

Біоплівка – це організована сукупність мікроорганізмів, яка вважається одним із найбільш широко розповсюджених та успішних способів життя на Землі [23]. Ці властивості біоплівки сприяють розвитку ускладненого перебігу інфекційних захворювань та зростанню стійкості мікробів до протимікробної терапії [24]. Кілька авторів продемонстрували, що мікроорганізми в біоплівках більш стійкі до антимікробних препаратів, ніж планктонні клітини [25]. Ефективність існуючих антимікробних сполук у пригніченні або знищенні біоплівкових мікробів недостатня [25].

З огляду на все перераховане, пошук нових ефективних протимікробних препаратів, які володіють множинними механізмами дії, є перспективним напрямком у боротьбі зі зростаючою полірезистентністю. У той же час, на тлі зростаючого попиту, відмічається втрата зацікавленості до розробки нових препаратів у більшості фармацевтичних компаній [2]. Вимоги до антибактеріальних засобів зростають, оскільки використання різних протимікробних засобів у медицині та фармації обмежене їх безпекою. Розробка нових препаратів є фінансово невігодною через довготривалість

процесу та швидкість формування резистентності у мікроорганізмів до нових препаратів [26].

Органічні та неорганічні речовини з антимікробними властивостями привертають увагу багатьох дослідників у якості потенційних замінників антибіотиків [27]. Серед біологічних матеріалів з антимікробними властивостями пріоритетним напрямком для багатьох наукових груп стало дослідження хітозану [28]. Завдяки поширеності в природі, біосумісності, здатності до біологічного розкладання, антимікробній активності, нетоксичності, різнобічним хімічним та фізичним властивостям хітозан (Ch) став одним із найбільш часто вживаним полімером у біомедичних дослідженнях [29]. Фізична форма хітозану - гель, смола, мікросфера, мембрана, губка, волокно – значно впливає на його біомедичні властивості та є визначальною у його практичному застосуванні [30]. Полімер отримують із хітину, що міститься в екзоскелеті комах в процесі деацетилювання. Вважають, що властивості хітозану залежать від особливостей розчинника, який використовується, структурної організації вихідного розчину полімеру [31] та від способу виготовлення матеріалів на основі хітозану [32]. Багато органічних [33] та неорганічних кислот перевіряли у якості розчинника для хітозану [34] і було доведено вплив типу розчинника на фізико-хімічні властивості хітозану. Згідно з останніми дослідженнями [35] волокнисті мати на основі хітозану демонструють вищу ефективність, ніж плівки, губки або гелі. Відповідно до даних Соломона Менгісту [36] дихлорметан (DCM) та трифтороцтова кислота (TFA) є найбільш підходящими розчинниками для виробництва електроспінованих волокон хітозану.

Молекула хітозану складається із двох типів мономерів *N*-ацетиламіноглюкози і аміноглюкози, та має позитивний заряд, що забезпечує такі особливості хітозану, як здатність взаємодіяти з сіловою кислотою [37], підсилювати проникність клітинних мембран [38], виражена протимікробна активність [39]. Хоча результати перших досліджень антимікробної активності хітозану були наведені майже пів-століття тому [40] низка питань

залишається нерозв'язаними. Особливості антимікробного впливу хітозану залежать від ряду факторів, які можуть бути поділені на чотири групи: мікробні фактори, внутрішні фактори хітозану, фактори фізичного стану та фактори навколишнього середовища.

Дані наявні у літературі щодо антибактеріальної активності хітозану є неоднорідними і стосуються переважно двох стандартних референтних мікроорганізмів – *E.coli* та *S.aureus*. Деякі дослідники зазначають, що полісахарид демонструє кращу бактерицидну та бактеріостатичну дію відносно *E.coli* [41]. Тоді як інші демонструють більшу активність хітозану стосовно *S. aureus* [42] та пояснюють це відмінностями у будові клітинної стінки, силою заряду клітинної стінки та її товщиною.

Молекулярна вага та ступінь деацетилювання хітозану є визначальними у його антимікробній активності. Встановлено, що високомолекулярний хітозан більш має більшу антибактеріальну активність порівняно з низькомолекулярним [43]. З іншого боку, хітозан із низькою молекулярною вагою був більш ефективним, щодо гальмування росту грибів, у порівнянні з хітозаном з високою молекулярною вагою [44].

Механізми антимікробної дії хітозану залишається недокінця зрозумілими [45]. Існує припущення, що хітозан діє на клітинну стінку мікроорганізму, шляхом модифікації електричного потенціалу клітинної мембрани. Деякі автори стверджують, що аміногрупи хітозану під час контакту із фізіологічними рідинами, протонізуються і зв'язуються з аніонними групами мікроорганізмів, що приводить до аглютинації мікробних клітин та гальмування росту [46]. З іншого боку, коли хітозан взаємодіє з бактеріальною клітиною він сприяє витісненню іонів  $Ca^{++}$  з аніонних ділянок мембрани, що призводить до пошкодження клітин. Іншим постулатом є взаємодія між позитивно зарядженим хітозаном та негативно зарядженою клітинною стінкою мікроорганізмів, що спричиняє її розрив та втрату цілісності внутрішньоклітинного складу мікроорганізмів [47].

Іншим важливим напрямком пошуку альтернативи антибіотикам для боротьби з бактеріальними інфекціями є дослідження неорганічних речовин, серед яких провідну роль займають наночастинки [48] (НЧ) металів. 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. Наноматеріали мають надзвичайно велику площу активної поверхні наночасточок відносно їх розміру, що забезпечує високу активність препаратів при низькій токсичності [22]. Синтез НЧ здійснюється із використанням хімічного, фізичного або біологічного підходів [49, 50] та використанням різних стабілізуючих агентів [51], що також певним чином впливає на їх функціональні характеристики.

Застосування наноматеріалів відбувається у різних галузях – від космічної до біомедичної [52]. Спроби практичного застосування НЧ у медицині проводиться у напрямках створення діагностичних, профілактичних та терапевтичних засобів [53, 54]. Завдяки антимікробним властивостям та здатності ефективно запобігати формуванню стійкості до протимікробних препаратів, наночастинки металів та їх оксиди (Ag, Cu, ZnO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, TiO<sub>2</sub>, MgO тощо) розглядаються, як альтернатива антибіотикам [55].

Фізико-хімічні властивості частинок (розмір, форма), хімічна модифікація і покриття, а також змішування НЧ у різних співвідношеннях з іншими речовинами та розчинниками, сильно впливають на їх антибактеріальну активність [56]. Запорукою успішного застосування НЧ в медичній практиці є використання біосумісних матеріалів із стабільними фізико-хімічними характеристиками [57]. Контрольованість синтезу НЧ є важливою, оскільки антибактеріальна активність НЧ може знижуватися після модифікації їх поверхні [58]. Відомо, що на вихідні параметри НЧ впливає спосіб їх отримання. Згідно з [59] 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 дороговартісним [60], та не запобігає виникненню побічних ефектів у біологічних об'єктах [61]. Багато робіт присвячено дослідженню зеленого синтезу через його дешевизну та екологічність. Іншою істотною перевагою зеленого синтезу є гарна відтворюваність та стабільність синтезованих наночастинок [62].

На тлі існуючого різномаяття НЧ особливо гостро постає питання вивчення інтенсивності антимікробного впливу та механізмів дії наночастинок у комбінації одна з одною та з іншими сполуками [63]. Мішенями для наночастинок є зовнішні та внутрішні бактеріальні структури: клітинна стінка, плазматична мембрана, білки та ДНК [64]. Дія наночастинок (НЧ) базується на їх безпосередньому контакті із стінкою бактеріальної клітини, без подальшого проникнення в клітину.

Серед широкого різномаяття неорганічних наночастинок, про які повідомляється в літературі, наночастинок срібла здаються найбільш перспективними завдяки їх ефективності та широкому використанню в різних галузях [65]. Антимікробні властивості срібла використовували у боротьбі проти інфекцій упродовж багатьох століть. Проте після відкриття антибіотиків, від срібла (Ag), як і від інших не-антибіотичних препаратів з протимікробною активністю, практично відмовилися. Сьогодні, з появою антибіотикорезистентних штамів, срібло набуло нового, але досі суперечливого значення [53]. У невеликій кількості, срібло не шкідливе для клітин людини, але є біоцидним відносно мікробних клітин. Антимікробна ефективність срібла залежить від розміру частинок [66]. Згідно з доповіддю [51] AgNP, що містять PVP, є більш стабільними, менш токсичними, а також мають кращу антимікробну активність, ніж інші AgNP, що мають обмеження. Проте контрольований синтез наночастинок дуже важливий,

оскільки антибактеріальна активність НЧ може бути знижена після модифікації поверхні [67]. Більше того, хімічні методи оцінюються як більш дорогі [68], і це може призвести до побічних ефектів у біологічних об'єктах [69]

З іншого боку, багато робіт присвячено дослідженню зеленого синтезу через його дешевизну та екологічність. Іншою істотною перевагою зеленого синтезу є хороша відтворюваність та стабільність синтезованих наночастинок [70].

. Висока поверхнева енергія може поставити під загрозу їх ефективність через схильність до агрегації у великі частки, що може призвести до втрати їх антибактеріальної активності. З огляду на це, правильний вибір методу синтезу та стабілізуючого агенту є вирішальними у можливості біомедичного застосування наночастинок срібла [71]. Встановлено ефективність антибактеріальної дії срібла проти різних патогенів *in vitro* та *in vivo* [72].

Антибактеріальний механізм дії НЧ срібла вивчений найкраще. Розглядається два ймовірні механізми дії НЧ сріба – шляхом контактного 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 [73]. Однак, залишається ряд невирішених питань: визначення мінімальної інгібуючої концентрації срібла (МІК), з'ясування можливості виникнення резистентних до наносрібла штамів [63], чи здійснює срібло згубний вплив на біоплівки, чи тільки на планктонні клітини, а також побічні ефекти Ag на людину.

Одним із проблемних питань при застосуванні наночастинок срібла в медицині є складність виведення наночастинок із організму через видільні системи, як наслідок накопичення в організмі та можливий токсичний вплив. Для усунення цього побічного ефекту були запропоновані срібні нано-архітектури форми, які є біологічно розчинними наноплатформами [74] та складаються з ультрамалих наночастинок срібла вмонтованих в полімерну

функціональну матрицю з кремнію [75]. Кремнеземна оболонка одночасно захищає матеріал у внутрішній порожнині від навколишнього середовища і забезпечує можливість легкої модифікації поверхні необхідними молекулами (ліки, пептиди, інше). НЧ срібла в таких наноархітектурних формах легко біодеградуються та виводяться з організму вирішуючи питання токсичності [74].

Іншим вваріантом вирішення означеної проблеми – поєднане застосування НЧ срібла з традиційними антибактеріальними засобами (наприклад, хлоргексидином) [76]. В даний час деякі дослідження показали ефективність комбінування AgNP з колагеном, целюлозою, тощо, які демонструють значну антибактеріальну активність, забезпечуючи безпеку *in vitro* та *in vivo* для клітин або навколишніх тканин [77].

Наночастинка міді є ще одним типом перспективних антимікробних речовин. Добре відомо, що мідь з валентністю нуль та оксид міді демонструють антимікробну дію на віруси, гриби, грампозитивні та грамнегативні бактерії [78]. Щодо наночастинок Cu, то поєднання їх унікальних біологічних, фізико-хімічних та фармакологічних властивостей із антибактеріальною, протигрибковою та противірусною дією металу визначають важливість їх оцінки як протимікробних препаратів нового класу. Сьогодні спостерігається інтенсифікація досліджень біоцидних властивостей наночастинок міді. Описані вище дослідження проводилися на бактеріальних та грибових пробних штаммах і не містять жодних даних про вплив наночастинок Cu на клінічні ізоляти мікроорганізмів. Наукове дослідження останнього має велике значення, оскільки такі патогенні мікроорганізми часто виявляють стійкість до традиційних антибіотиків. Існує також відсутність даних про біологічну безпеку наночастинок Cu у згаданих вище дослідженнях [79].

Наночастинки міді приваблюють науковців завдяки їх поширеності у природі, низькій вартості отримання та приналежності до есенціальних



мікроелементів людського організму [80]. Антибактеріальна ефективність наночастинок оксиду міді (CuO) дещо поступається Ag або ZnO [81], а тому для досягнення тих самих результатів необхідна порівняно більша концентрація. Активність наночастинок CuO залежить від розміру, форми наночастинок та виду бактерій [82]. Зазначається, що наночастинки міді демонстрували антибактеріальну активність, як проти грампозитивних, так і проти грамнегативних мікроорганізмів (*E. coli*, *K. pneumonia*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*). Більшу активність НЧ відносно грамнегативних мікроорганізмів пов'язують із відносно більшим негативним зарядом клітинної стінки у них [83]. Оскільки виробництво наночастинок міді є фінансово вигіднішим, порівняно з іншими нанометалами, її застосування у складі нанокомпозитів є доволі привабливим. Наночастинки Cu мають високу здатність до окиснення, що примушує до пошуку нових методів синтезу та стабілізації цих часточок [84]. Раніше було оптимізовано синтез Cu НЧ, використовуючи крохмаль та аскорбінову кислоту, як більш біосумісні хімічні агенти [85].

Деякі дослідження повідомили про механізм бактерицидної активності НЧ Cu, які полягають в тому, що іони Cu, 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 [86].

Оксид цинку є джерелом з високим потенціалом для виробництва інноваційних мікро- та наноструктур для різноманітного застосування у зв'язку з низькою вартістю, відносним надлишком матеріалу, хімічною стабільністю, легкістю у отриманні та відсутністю токсичності [87]. Використання наночастинок ZnO сприяє загоєнню ран, запобігає виникненню запалення, свербіжу [88], посилює проліферацію та диференціацію клітин [89]. Наночастинки ZnO демонструють

антибактеріальну активність щодо грамнегативних та грампозитивних мікроорганізмів.

Серед усіх різноманітних форм, саме тетраподи оксиду цинку нещодавно привернули широку увагу внаслідок унікальної форми та структури, виключних оптичних якостей порівняно з іншими формами [90]. Тетрапод оксиду цинку складається з ядра оксиду цинку, від якого чотири відростки в однаковій мірі тягнуться до навколишнього простору, що дозволяє їм формувати сітку з бажаною пористістю та механічною стійкістю, поєднуючи відгалуження один з одним [91]. Унікальна форма тетраподів надає їм різноманітних функціональних властивостей та сприяє їх широкому використанню у сфері самозаповнюючихся матеріалів [92], поверхонь, які не обростають, [93], агентів генної інженерії [94] та антивірусних матеріалів [95].

Є деякі суперечливі дані про протимікробну дію T-ZnO та вплив розміру наночастинок та їх концентрації на антибактеріальну активність [96]. Іншими факторами, які впливають на антимікробну активність, є наявність поверхневих дефектів [97], реактогенність та тип стабілізуючої речовини, що додається під час виготовлення частинок ZnO [98]. Існує припущення, що продукція  $H_2O_2$  є одним із основних антибактеріальних механізмів наночастинок ZnO [99]. В іншому випадку, нанорозмір T-ZnO має кращі антибактеріальні властивості завдяки великій міжфазовій площі [100] та властивість пошкоджувати клітинну стінку через локальну взаємодію ZnO та посилену проникність мембрани [99]. 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 [101].

Пошук способів підвищення антибактеріальної активності та зниження токсичності наночастинок металів проводиться у різних напрямках та стимулює чисельні спроби до застосування речовин різного походження. 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 [102]. Є багато даних про вивчення антибактеріального ефекту комбінацій різних металів: чистого цинку з залізом та магнієм [94], оксиду цинку зі сріблом [98], золотом [103] та міддю [104]. 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*) [105]. Запропонована гіпотеза, щодо механізму взаємного підсилення наночасточок, припускає, що при цьому відбувається зміна фізичних характеристик часточок (структури, поверхні, розміру).

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. Najer Rokbani зазначив, що ультразвукова обробка може підсилювати антибактеріальний ефект наночасточок оксиду цинку відносно *E. coli* за рахунок дисоціації часточок та підсилення їх пенетраційної здатності [106]. Однак дуже незначна кількість досліджень висвітлює вплив ультразвуку на антимікробну активність наночасточок міді та срібла, як поодиночі так і під час їх поєднання.

Поєднання мікро- та наночастинок з різними полімерами може також стабілізувати структуру нанометалів, запобігаючи їх спонтанній агрегації, та підвищити їх 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 [107]. Зокрема, гібридні матриці деяких полімерів можуть знижувати ефективну антимікробну концентрацію наночастинок тетраподів-

ZnO [108]. Численні дослідження свідчать про підсилення ефекту антибіотиків при їх поєднаному застосуванні з НЧ [109]. У літературі наявна інформація щодо дослідження активності різних комбінацій хітозану та срібла [77], де зазначається можливість використання наночастинок у вигляді суспензії з молекулами хітозану або плівок для перорального або нашкірного використання. У деяких роботах відображається, що композити хітозан-ZnO, у деякій концентраціях, посилюють антибактеріальний ефект [110], але відсутня інформація про композити та розчини з ZnO як у нано-, так і у мікророзмірах.

У наш час електропрядіння стало одним із найпопулярніших методів отримання нановолокна з різних синтетичних та природних полімерів [111]. Однак спінінг розчину хітозану є дуже складним процесом завдяки його високій в'язкості та наявності вільних аміногруп, що утворює позитивно заряджений поліелектроліт у кислих умовах. У той же час збільшення концентрації кислоти в розчині хітозану може зменшити поверхневий натяг та полегшити процес електропрядіння [112]. Біомедичне застосування препаратів хітозану неможливе без етапу нейтралізації, яка проводиться із застосуванням спирту, водних розчинів NaOH або Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> [113] і дозволяє зробити хітозан нерозчинним та зменшити його токсичність [114]. Тим не менше, інформації про те, як ці розчинники та їх співвідношення впливають на антибактеріальні та біосумісні властивості нановолокна хітозану, все ще мало.

Через слабкі механічні властивості хітозану та його похідних було запропоновано його поєднання з полімерами, такими як альгінат [115]. Включення альгінату в скафолди на основі хітозану може збільшити пористість структури, одночасно покращуючи механічні властивості хітозану [116].

Хітозан володіє антибактеріальною здатністю та інгібує широкий спектр бактерій, грибів та вірусів [117]. Уявлення про можливі антибактеріальні

механізмів базується на взаємодії між електростатичними силами груп  $\text{NH}_3^+$  хітозану та негативним зарядом клітинної мембрани мікроорганізмів. Окрім того хітозан зв'язується з мікробною ДНК і пригнічує синтез РНК та білку в мікроорганізмах. Деякі автори також припускають, що хелатування металів молекулами хітозану обмежує надходження необхідних поживних речовин для росту мікробів у бактеріальну клітину [118].

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. Необхідні також подальших досліджень присвячених вивченню протимікробної активності наночастинок та їх комбінацій з іншими класами антимікробних агентів проти полірезистентних мікроорганізмів.

## 2 ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1 Матеріали

Нітрат срібла ( $\text{AgNO}_3$ ) (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. Поживні середовища (поживний бульйон, поживний агар, жовтково-сольовий агар, середовище Ендо та середовище Сабуро були придбані у компанії Hi Media India).

### 2.2 Моніторинг антибіотикорезистентності серед мікроорганізмів ізольованих у північно-східному регіоні України

Упродовж 2016–2018 рр. нами було обстежено 517 пацієнтів із гострими запальними процесами носоглотки. Хворим проводили комплексне обстеження згідно стандартів надання медичної допомоги. Процедура обстеження даних осіб відповідає стандартам етичного комітету. Збір від хворих досліджуваного матеріалу виконували під час першого звернення до лікаря, до призначення та здійснення етіопатогенетичної терапії. Після отримання зразки негайно транспортували в лабораторію в транспортному середовищі.

Для встановлення етіологічної структури збудників запальних процесів було проведено мікробіологічне дослідження змивів із носоглотки на базі мікробіологічної лабораторії Сумського державного університету. Посів змивів із носоглотки здійснювали на 5 % кров'яний, жовтково-сольовий агарі, середовище Ендо та середовище Сабуро, з подальшим виділенням

чистої культури та визначенням кількості мікроорганізмів. Ідентифікацією збудників проводили на підставі морфологічних, тинкторіальних та біохімічних властивостей збудників.

Вивчення чутливості виділених мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів проводилось диско-дифузійним методом (паперові диски виробництва ТОВ «Фармактив» (м. Київ, Україна) та Himedia (Індія). Досліджувані мікроорганізми інкубували у присутності антибіотиків в аеробних умовах при 37 ° С протягом 24 годин. По закінченню вимірювали діаметр кожної зони затримки росту (в міліметрах) та порівнювали із нормативними показниками. У разі, якщо зона затримки росту була меншою за норму, мікроорганізм розцінювався, як резистентний. Стандартний штам *S. aureus* ATCC 25923 був використаний у якості контролю.

### **2.3 Синтез наночастинок срібла**

Під час дослідження нами було використано наночастинок синтезовані чотирма різними способами.

Класичний метод отримання наночастинок срібла передбачав розчинення 6,8 г PVP в 40 мл етиленгліколю з подальшим нагріванням до 160° С на масляній бані з постійною магнітною мішалкою. Потім 0,68 г AgNO<sub>3</sub> 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. Наночастинок обробляли низькочастотним ультразвуком (22 ± 1,65 кГц) протягом 1 хвилини.

Синтез наночастинок срібла методом хімічного відновлення, із використанням підходів, що застосовується у «зеленій хімії». Використовували екстракт імбиру (*Zingiber officinale*), як поверхнево-активну речовину, та аскорбінову кислоту (вітамін С), як відновник. Спочатку 250 г кореневища імбиру ретельно промивають дистильованою водою, а потім нарізали невеликими шматочками. Різане кореневище імбиру витримували у водно-етанольному розчині (250 мл, співвідношення 1:1) протягом 5 днів (при кімнатній температурі у темному місці). Потім супернатант фільтрували через вакуумний фільтр та зберігали в холодильнику при 4 °С. Нітрат срібла (840 мг) розчиняли у воді (20 мл) та додавали екстракт кореневища імбиру (20 мл). Потім до розчину нітрату срібла додавали суміш розчину L-аскорбінової кислоти (10%, 10 мл) та екстракту імбиру (20 мл) при постійному перемішуванні у магнітній мішалці. Реакційна суміш набувала темного кольору. Отриманий розчин нагрівали (60 °С, 1,5 год). Свіжосинтезовані НЧ срібла промивали водою, поки рН досягала 7, наприкінці використовували центрифугування (4000 об/хв., 30 хв).

Синтез наночастинок срібла проводили в УФ-реакторі з нержавіючої сталі (Nanowave). На кожні 200 мл деіонізованої води додавали та інтенсивно перемішували 400 мг полівінілпіролідону К30 та 120 мг нітрату срібла. Після отримання однорідної суміші додавали 150 мкл 20% гіпохлориту натрію. Реакцію проводили при ретельному перемішуванні протягом 1 години. На наступному етапі отриманий колоїд срібла фільтрували за допомогою мембрани зворотного осмосу (Osmotec M300-O) до отримання концентрації срібла 3 г / л. Наночастинки використовували як є без подальшого очищення.

Синтез срібних наноархітектур (AgNA).

НЧ срібла розміром близько 1 нм готують згідно з наступною процедурою. 200 мкл відновленого глутатіону (100 мМ) і 200 мкл водного розчину AgNO<sub>3</sub> (25 мМ) додають до 20 мл води MilliQ, занурюючи в крижану ванну. Під час інтенсивного перемішування швидко додають 200



мкл борогідриду натрію (8 мг/мл у 1 мл води MilliQ) і суміш інтенсивно перемішують протягом 30 хв. Після додавання  $\text{NaBH}_4$  спостерігали зміну кольору розчину на блискуче-червоний. Після видалення крижаної бані додають 10 мкл полі (натрію-4-стиролсульфонату) (70 кДа, 30% водний розчин). Розчин перемішують 15 хвилин при кімнатній температурі.

Синтез масивів наночастинок срібла: 75 мкл водного розчину полі (1-лізину) гідроброміду, 15–30 кДа (PL, 40 мг мл – 1) додають до 20 мл попередньо підготовленого розчину кластерів срібла, суміш обережно перемішували протягом 20 хв при кімнатній температурі. Синтезовані срібні масиви наночастинок срібла збирають центрифугуванням (13 400 об / хв протягом 3 хв), суспендують у 4 мл milliQ води та обробляють ультразвуком протягом максимум 4 хв.

Синтез наноархітектур срібла: 70 мл абсолютного етанолу з подальшим додаванням 30 мкл тетра-етил-ортосилікату (98%) вносили у дві пластикові пробірки Falcon по 50 мл. Розчин перемішувати протягом 1 хв при кімнатній температурі. 4 мл попередньо підготовлених масивів наночастинок срібла додавали до Falcon (по 2 мл), потім через 10 хвилин до кожної пробірки додають 70,5 мкл диметил-аміну (40%, 428 мг / мл) і розчин акуратно струшувати ще 3 год. Синтезовані НС збирають 30-хвилинним центрифугуванням при 4000 об / хв, двічі промивають етанолом для видалення непрореагувавших попередників і суспендують в 1 мл етанолу. Використовували коротке спінове центрифугування, щоб відокремити структури розміром понад 200 нм від надосадової рідини. AgNA зазвичай залишається стабільним протягом щонайменше 1 року.

## 2.4 Синтез наночастинок міді

Синтез наночастинок міді проводили із застосуванням різних підходів.

Класичний синтез НЧ міді: 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<sup>-1</sup>. 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 ± 1,65 кГц) протягом 1 хвилини (ультразвуковий диспергатор UZDN-A (SELMІ, Україна).

Синтез НЧ Cu методом хімічного відновлення із використанням імбиру (*Zingiber officinale*) та L-аскорбінової кислоти, так звана «зелена хімія». 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 °С, 1 год).

## 2.5 Синтез наночастинок оксиду цинку

Тетраподальні мікрочастинки ZnO були отримані синтезом транспорту полум'я 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 °С усередині муфельної печі зі швидкістю нагрівання 60 °С хв<sup>-1</sup>. 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 (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O та 10 мл етиленгліколю поміщали в двошийкову колбу об'ємом 50 мл із зворотним конденсатором у центральній горловині та термопарою, з'єднаною з терморегулятором нагрівання колби правої горловини. Отриману суміш нагрівали в колбі нагрівачем із перемішуванням (3000 об / хв) за допомогою тefлонового змішувача. Суміш витримували 60 хвилин при 160 °С. 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 етиленгліколю промивали етанолом при інтенсивному перемішуванні з наступним центрифугуванням. Відмиті зразки ZnO сушили протягом 24 годин при 60 °С. Схематично цей процес показано нарис. 2.1

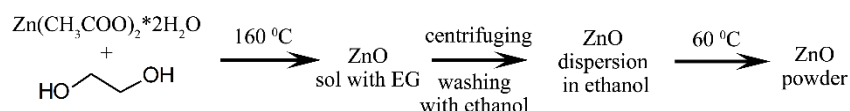


Рисунок 2.1– Схема синтезу наночастинок ZnO

Синтез паличкоподібних наночастинок ZnO проводили із використанням газоподібної дисперсії. 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 металу в 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-НЧ. Зразки сушили при кімнатній температурі та відпалювали в муфельній пічі при температурі 450 °С на повітрі протягом 3 год.

## 2.6 Приготування хітозану та його композитів із наночастинками

Для отримання хітозанового гелю хітозан (Ch) з молекулярною масою 200 та 500 кДа розчиняли у 2% розчині оцтової кислоти (інкубували протягом 24 годин при кімнатній температурі до повного розчинення хітозану), ступінь деацетилювання –85%.

Для отримання гелю хітозану, що містить наночастинки Ag: (0,24 мкг / мл), 1 мг / мл розчину глюкози (глюкоза використовувалась як додатковий відновник), що містить необхідну кількість нітрату Ag (1 мг / мл), додавали до 3% розчину 500 кДа хітозану або 1% розчині 200 кДа хітозану. Суміші перемішували протягом 15 хв і інкубували 24 години при кімнатній температурі. Через 24 години інкубації хітозану 500 кДа з глюкозою нітрат срібла відновлювався до наночастинок срібла, що було продемонстровано зміною кольору з жовтого на коричневий.

Для отримання гелю хітозану, що містить наночастинки ZnO: до розчину хітозану в кислоті додавали порошок ZnO у кількості 10% від маси хітозану (3% суспензія в хітозані) з подальшою обробкою УЗД протягом 25 хвилин та додаванням гідроксиду натрію.

Для отримання гелю хітозану, що містить наночастинки Cu: до розчину аскорбінової кислоти (10%) додавали розчин хітозану в кислотах, щоб досягти кінцевої концентрації 0,1% (ChCuНЧ 1, 3, 4) або 1% (ChCuНЧ 2). Потім додавали розчин сульфату міді (50 мМ), кінцева концентрація міді становила 150 мкг / мл (ChCuНЧ 4), 300 мкг / мл (ChCuНЧ3) та 600 мкг / мл (ChCuНЧ 1, 2, 5). Отриману суміш спочатку інкубували протягом 3 годин (60 °С), а потім 24 години при 37°С для повного відновлення міді. Для приготування зразків ChCuНЧ 1, 2, 3, 4 використовували оцтову кислоту як розчинник хітозану, а молочну - для ChCuНЧ5. Також ми використовували в експериментах розчин сульфату міді (концентрація міді 600 мкг / мл), 3% розчин хітозану в оцтовій та молочній кислотах (Ch і ChLA).

Для отримання аерогелів хітозану було використано мікрохвильову піч відповідно до принципів зеленої хімії. Попередньо 0,5 г хітозану з 90% або 95% ступеня деацетилювання розчиняли у водних розчинах L-аспарагінової, L-глутамінової амінокислот, або їх сумішей. 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.

Виготовлення хітозанових мембран проводили із використанням технологій електроспінінгу. Попередньо розчин хітозану (3,5%, мас. / об.) готували шляхом змішування порошку хітозану (MB 50-190 кДа, DD 75-85%, в'язкість 20-300 сП Glentham Life Sciences, Коршам, Великобританія) із найчастіше вживаними розчинниками: сумішшю трифтористої кислоти/DCM (Honeywell Fluka (Loughborough, Wiltshire, UK), у співвідношенні 9:1 або ПЕО у співвідношеннях 2: 3. Потім НЧ срібла додавали до розчину Ch-TFA/DCM і перемішували протягом ночі при кімнатній температурі.

Концентрацію НЧ срібла, які додавали до розчину Ch, розраховували у відповідності до МІК, вимірної для *S. aureus* та *E. coli* (2,5 та 1,25 мкг / мл, відповідно). Розчини Ch-TFA/DCM містили таку кількість наночастинок: 0,625 мкг / мл, 1,25 мкг / мл, 2,5 мкг / мл і 5 мкг / мл, що відповідало від ½ до 2 МІС AgНЧ. Електропрядіння Ch-PEO мембран було проведене в апараті для електропрядіння (Electrospining RT-Advanced, Linari Engineering, Піза, Італія).

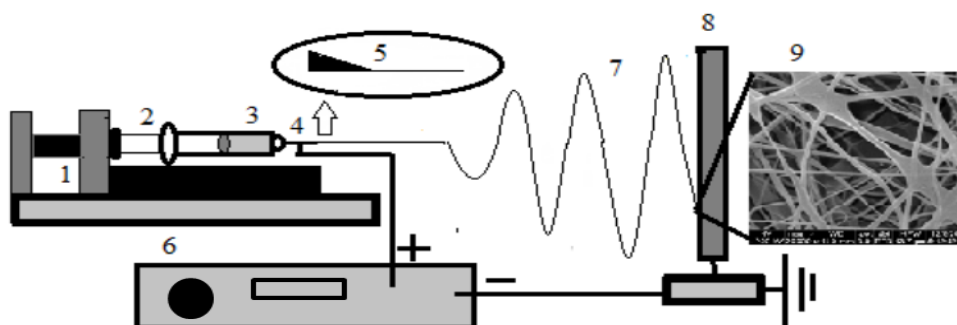


Рисунок 2.2 – Схема електроспінінгу, 1 – помпа, 2 – шприц; 3 – розчин; 4 – голка; 5 – носик; 6 – джерело енергії; 7 – нитка; 8 – колектор; 9 – нановолокно

Параметри електропрядіння залежали від типу розчину та контролювалися за допомогою програмного забезпечення RT-Advanced. Відстань між голкою та колектором становила 12-15 см, швидкість потоку від 0,1 до 1,0 мл / год, напруга 21 кВ (рисунок 2.2). Швидкість обертання колектора (10 см у діаметрі) становила 800 об / хв. Нановолокнисті мембрани хітозану сушили у вакуумній печі при 30 ° С протягом 12-24 години для видалення залишкових розчинників.

Губки з композиту хітозан/альгінат готували шляхом змішування розчинів та ліофільної сушки композиту. 2 г хітозану розчиняли у 100 мл 1% розчині оцтової кислоти при механічному перемішуванні до повного розчинення. Розчин альгінату (Alg) готували шляхом розчинення 1 г альгінату натрію в дистильованій воді. 5% розчин соди змішували з розчином хітозану до утворення бульбашок газу, потім для зшивання

додавали розчин альгінату при перемішуванні. Отримані суміші містили алгінат/хітозан/соду у різних об'ємних співвідношеннях: Alg/NaHCO<sub>3</sub> (4:1), Alg/Ch/NaHCO<sub>3</sub> (2:2:1), (1:3:1), (1:2:1), (1:1:1), Ch/NaHCO<sub>3</sub> (1:1). Потім одну або дві краплі розчину наночастинок срібла в концентрації 3 г / л додавали до зразків композиційних матеріалів. Зрештою, композит виливали в тарілки і витримували при -80 °С у холодильнику протягом 12 годин для висушування.

## **2.7 Вивчення фізико-хімічних параметрів отриманих НЧ, хітозану та їх композитів**

SEM дослідження наночастинок виконувалось із застосуванням JOEL JSM-7800F обладнаного аналізатором рентгенівської енергетичної дисперсійної спектроскопії (EDS). Для цього був підготовлений зразок з хромованої сталі у формі циліндра діаметром 10 мм і висотою 10 мм. Перед мікроскопічним дослідженням плоску поверхню зразка шліфували та полірували, щоб отримати надгладку поверхню. Потім кілька крапель колоїдної суміші наносили на поліровану поверхню зразка і давали висохнути при 20 °С. Мікроскопічні спостереження проводили за допомогою електронного пучка з прискорювальною напругою 5 кВ із використанням вторинних електронів. Для вимірювання хімічного складу використовували електронний пучок з вищою прискорювальною напругою 15 кВ.

SEM хітозанових губок проводили після попередньо проведеного зневоднення в 2% глутаральдегіді та етанолі. Щоб уникнути накопичення поверхневого заряду в електронному зонді, зразки покривали тонким (30–50 нм) шаром срібла у вакуумній установці VUP-5M (SELMI, Суми, Україна). SEM-зображення губок спостерігали за допомогою FEI Inspect S50B (FEI, Брно, Чеська Республіка) за допомогою вторинного електронного детектора Everhart – Thornley.

ТЕМ-спостереження за наночастинками проводились на ZEISS Libra 120 TEM, з прискорювальною напругою 120 кВ, оснащеному омега-фільтром у колонці. Колоїдні розчини осідали на мідних сітках з вуглецевим покриттям із 300 сітками і спостерігались принаймні через 5 годин.

Мас-спектрометрія з індуктивно-зв'язаною плазмою (ICP-MS) проводилась з попередньо обробленими наночастинками, які розчиняли в 1 мл  $\text{HNO}_3$  у посудинах з боросилікатного скла та розщеплюють мікрохвильовим опроміненням (SEM, Matthews, NC, USA) (200 °C / 15 хвилин). Отриманий розчин розбавляли в 10 мл дистильованої води та визначали вміст срібла аналізатором ICP-MS Agilent 7700 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія, США) на основі стандартної калібрувальної кривої.

Рамановський спектрометр ALFA 300 R від Witek (Ульм, Німеччина) із лазерним джерелом збудження 532 нм було використано для вимірювання спектрів у діапазон 50–2000  $\text{cm}^{-1}$ .

Дифрактометрію синтезованих порошків наночастинок проводили за допомогою рентгенівського порошкового дифрактометру (DRON-3М, Росія), обладнаного 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.

Інфрачервону спектроскопію Фур'є (FTIR) проводили за допомогою ІЧ-термомеханічного спектрометра (Thermo Nicolet Nexus 470, Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)). Діапазон був від 400 до 4000  $\text{cm}^{-1}$  з 32 сканування і 4  $\text{cm}^{-1}$  дозволу.

Дослідження пористості та щільності отриманих хітозанових матеріалів визначали за рахунок переміщення ізопропанолу, оскільки він не змочує



зразок. Досліджувані біоматеріали розміщували у раніше вимірний об'єм ізопропанолу. Після фіксованого часу (5 хв) вимірювали зміни обсягу спирту поглинутого аерогелем. Потім вивчений хітозановий каркас був видалений із 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, г / см<sup>3</sup>,  $p$  - пористість, %  $W$  - маса досліджуваного зразка, г  $V_1$  - початковий обсяг ізопропанолу, см<sup>3</sup>,  $V_2$  - об'єм ізопропанолу з зануреним зразком, см<sup>3</sup>,  $V_3$  - обсяг ізопропанолу після видалення зразка, см<sup>3</sup>

Швидкість пропускання водяної пари (ШПВП) визначали після фіксації зразків на отвір (1 см<sup>2</sup>) із 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 рівняння (3):

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

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. З цією метою готували розчин ДФПГ в метанолі, оптична щільність розчину становила 1,0 при 517 нм (Aligent 8453 спектрофотометр). 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 хітозану проводили в імітаційній рідині тіла (СБФ). Попередньо біоматеріали стерилізували автоклавуванням. Для цього наважки зразків хітозану занурювали в 50 мл стерильного розчину СБФ. Аерогелі виймали, промивали дистильованою водою з наступним висушуванням і зважуванням через визначені проміжки часу.

Дослідження біодеградації *in vitro* проводилися протягом семи днів за допомогою лізоциму людини. Стерильні наважки аерогелів хітозану 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 (5):

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

де: (B) D - ступінь деградації (біо), %  $W_0$  - появткова вага аналізованого зразка, г  $W_t$  — вага зразка після часу = t, хв

## 2.8 Обробка 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.

Для лікування експериментальних інфекцій застосовували хірургічний апарат США URSK 7 N – 22 (Україна) з резонансною частотою - 26,5 кГц, потужність - 0,2 Вт / см<sup>2</sup>, амплітудні коливання хвилеводу - 0,05 мм, струм міцність - 10–12 мА.

## **2.9 Оцінка антибактеріальної активності наночастинок Ag, Cu, ZnO, хітозану та їх композитів проти полірезистентних клінічних ізолятів.**

Протимікробну активність НЧ, гелю хітозану та їх композитів вивчали методом серійних розведень із визначенням мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) відповідно до міжнародних рекомендацій, наданих Клініко-лабораторним інститутом стандартів. Використовувались полірезистентні клінічні ізоляти та референтні штами *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* та *E.coli*. Із добових культур мікроорганізмів готували суспензію бактерій 10<sup>5</sup> КУО/мл. Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) визначалася, як найнижча концентрація, при якій був відсутній видимий ріст мікроорганізмів (середовище залишалось прозорим). Всі дослідження повторювали тричі.

Антибактеріальну активність хітозанових губок оцінювали щодо грампозитивних (*S.aureus*) та грамнегативних (*E.coli*) бактерій. Перед тестом губки нарізали невеликими шматочками (4 мг) і стерилізували УФ-опроміненням. У якості інокуляту використовували добові культури мікроорганізмів 10<sup>4</sup> КУО/мл. В асептичних умовах кожен зразок поміщали в пробірки з 2 мл поживного середовища з мікроорганізмами та інкубували протягом 2, 4, 6, 8, 10 та 24 год при 37 °С. Після цього 100 мкл суспензії з пробірки поміщали на чашу з твердим середовищем та інкубували при 37 °С протягом 24 год. Життєздатні організми підраховувались та виражали їх кількість у log<sub>10</sub>. Всі дослідження проводилися тричі.

Антибактеріальну активність хітозанових плівок та хітозан-НЧ композитів оцінювали щодо грампозитивних (*S.aureus*) та грамнегативних (*E.coli*) бактерій. Зразки мембран розміром 0,5 см<sup>2</sup> готували в асептичних умовах і поміщали в стерильну 24-лункову пластикову пластинку з 2 мл попередньо приготованої добової бактеріальної суспензії (10<sup>5</sup> КУО / мл). Після інкубації протягом 2, 4, 6 та 8 год забирали по 10 мкл з кожної лунки та висівали на щільне поживне середовище з наступною інкубацією при 37 ° С протягом ночі. Антибактеріальну ефективність оцінювали, обчислюючи швидкість зниження (R) загальної кількості бактерій, використовуючи наступне рівняння :  $R = (C-T) / C \times 100$  (3) де, C (КУО / мл) та T (КУО / мл) - це кількість живих бактерій у контрольних та досліджуваних зразках відповідно.

Час-залежна антибактеріальна активність НЧ, хітозану та їх композитів визначалась на мікроорганізмах групи ESKAPE. Добові інокуляти мікроорганізмів  $5 \times 10^5$  КУО / мл додавали до 2 мл середовища Мюллера-Хінтона із різними концентраціями досліджуваних речовин та інкубували при 37 ° С в термостаті. Через 0,5, 1, 3, 6 і 24 год інкубації 10 мкл аліквот із кожної пробірки висівали на поверхню щільного поживного середовища та інкубували при 37 °С протягом 24 годин. В подальшому обчислювали кількість видимих колоній, а потім робили перерахунок колонієутворюючих одиниць (КУО) в логарифмах. Всі дослідження робились трикратно.

Для визначення життєздатності клітин у складі біоплівки в полістироловому планшеті інкубували мікроорганізми протягом 24, 72 та 168 годин в поживному бульйоні. Потім видаляли поживне середовище з планктонними формами бактерій та промивали кожну лунку тричі PBS. Після цього AgНЧ розводили бульйоном Мюллера-Хінтона в концентрації 2,5, 5, 10 і 20 МІС і додавали в лунки зі сформованими біоплівками. Після 24 год інкубації з НЧ біоплівки промивали PBS і додавали 0,05% розчин резазурину (200 мкл). Потім планшети інкубували протягом 4 год при 37 ° С. Після інкубації оптичну щільність зразків визначали при 590 нм (Multiskan

FC Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Відсоток життєздатності клітин розраховували за формулою:

$$\frac{\text{Значення ОД оброблених клітин}}{\text{Значення ОД необроблених клітин (контроль)}} \times 100$$

Для оцінка біомаси біоплівки використовували фарбування сформованих плівок генціан-віолетовим барвником.

Розраховували значення відсотка життєздатності клітин і відсоток інгібування визначали, порівнюючи це середнє значення з OD540 необроблених лунок.

Дослідження механізмів антибактеріального впливу НЧ на клінічні полірезистентні ізоляти здійснювали шляхом оцінки морфологічних змін в клітинах бакткрій за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM). Розміри клітин вимірювали безпосередньо на зображенні SEM та обчислювали об'єм клітин з використанням формули:

$$V (\text{мкм}^3) = \pi W^2 L / 4 + \pi W^2 R / 3,$$

де W і L - ширина і довжина центральної частини бактеріальної клітини, R - екваторіальний радіус кришок сфероїдів на обох кінцях бактеріальної клітини

Середні об'єм клітин розраховували, використовуючи 30 окремих бактерій на популяцію.

Мікробіологічний аналіз вмісту ран під час проведення експериментального лікування проводили до початку лікування (день 0) та на дні 1, 3, 5, 7, 10, 14 після лікування рановий ексудат із центральної та периферичної частин ран (перед наступною щоденною обробкою) збирали стерильним ватним тампоном і поміщали у стерильні пробірки. Досліджуваний матеріал інокулювали на агар Ендо, жовтково-сольовий та цетримідний агари методом секторних посівів. Чашки Петрі інкубували в 37 °C протягом 24 год, з подальшою ідентифікацією мікроорганізмів, що вирости та їх кількісним обліком. Кількість мікроорганізмів відображалась у log КУО/мл ранового вмісту.

## 2.10 Дослідження цитотоксичності зразків

Клітинні лінії U2OS були отримані від Університету Умео (Швеція) та культивовані у модифікованому середовищі Дульбекко / поживній суміші Eagle F-12 (DMEM, Gibco, США), доповненій 10% фетальною бичачою сироваткою, 100 одиниць / мл пеніциліну, 100 мкг / мл стрептоміцину, 2,5 мкг / мл амфотерицину В (Gibco, США) при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub>. Зразки досліджуваних речовин у відповідній кількості та концентрації додавали в планшет з 24 лунками. Клітини  $2 \times 10^4$  клітини / зразок висівали в лунки. Через 24 години в кожному лунку додавали 100 мкл (10% обсягу середовища) розчину резазурину та інкубували протягом 4 год при 37 °С у темряві. 100 мкл середовища з кожної лунки переносили на інший 96-лунковий планшет вимірювали оптичну щільність зразків за допомогою Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) при довжинах хвиль 570 і 600 нм. Тест повторювали на 3-й та 7-й день інкубації трикратно для кожного зразка.

## 2.11 Дослідження ефективності та безпечності наночасточок під час лікування експериментальної інфекції на тваринах

Для вивчення впливу НЧ срібла, синтезованих із використанням поліольного методу, на перебіг процесу заживлення експериментальної гнійної інфекції, використовували 96 щурів. Тваринам за допомогою гострого скальпеля робили прямокутний рановий дефект розміром  $1,0 \times 1,5$  см ( $S = 1,5$  см<sup>2</sup>), глибиною до підшкірного шару. Інфікування рани здійснювали при внесенні в рану ватно-марлевого тампона зрошеного сумішню бактерій *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, у кількості  $5 \times 10^9$  КУО / мл для кожної бактерії. Через 72 год марлевий тампон видаляли та реєстрували ознаки гнійного запалення: набряк, гіперемія шкіри, набряки, гній. Всі тварини були випадковим чином розподілені на чотири групи:

- «AgНЧ» (24 щури) – лікували рани шляхом обробки 0,01% розчином AgНЧ з подальшим застосуванням стерильної пов'язки з 0,02% розчином AgНЧ.
- «УЗ» (24 щури) - рани обробляли УЗ низької частоти з наступним застосуванням стерильного пов'язки.
- «AgНЧ / УЗ» (24 щури) - після обробки рани 0,01% розчином AgНЧ, застосовували низькочастотний УЗ, з подальшим накладанням стерильної пов'язки з 0,02% розчин AgНЧ.
- «контрольна група» (24 щури) - рани промивали 0,05% розчином хлоргексидину, з подальшим застосуванням стерильної пов'язки з 0,05% розчином хлоргексидином.

Лікування ран УЗ здійснювали лише на першій фазі ранового процесу (до 5-го дня). Час обробки залежав від розміру рани та в середньому становив 1 хв / 1 см<sup>2</sup>.

Гістолого-морфометричне дослідження впливу НЧ на піддослідних тварин проводили після виведення тварин з експерименту (по 6 щурів з кожної групи для кожного періоду дослідження) шляхом передозуванням кетаміну (70 мг на 1 кг ваги тварини) через 1, 3, 7 та 14 днів від початку лікування. Для гістологічного дослідження забирали біоптати з дна та країв рани та фарбували приготовані препарати гематоксиліном та еозином. Гістологічне та морфометричне дослідження були проведені за допомогою мікроскопа «Carl Zeiss Primo Star» (Німеччина) (біноккуляр × 10, лінзи × 20, × 40) з цифровою камерою «Zeiss Axio Cam ERs 5 s» (Німеччина) та програмне забезпечення з виходом зображення система «ZEN 2» (Німеччина). Швидкість очищення рани від некротичної тканини, інтенсивність запального процесу, порушення кровообігу, особливості ангіонеогенезу, терміни появи грануляційної тканини та граничної епітелізації, клітинний склад тканин, інтенсивність гострої запальної інфільтрації оцінювали напівкількісно: 1 - легка, 2 - помірна і 3 - значна інфільтрація нейтрофілами. Розраховані наступні морфометричні показники: відносна площа набряку

строми (RASE,%), відносна площа шкірних судин (RADV,%), відносна площа грануляційної тканини (RAGT,%).

## **2. 12 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 Особливості мікробіоти виділеної від пацієнтів та її чутливість до антибіотиків

Загалом було ізольовано та ідентифіковано 401 штамп мікроорганізмів із зіву та 167 - із носа. Частота виділення мікроорганізмів у монокультурі із зіву становила 90,9 % (318 ізолятів), із носа – 100 % (167 штамів). Мікробні асоціації були виділені у 32 пацієнтів (9,1 % обстежених) із зіву. Видова структура збудників гнійно-запальних процесів представлена у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Видова структура збудників гнійно-запальних процесів пацієнтів хворих із гострими запальними процесами носоглотки

Вид мікроорганізму	Кількість виділених мікроорганізмів					
	із зіву (n = 401)		із носа (n =167)		Загалом (n=568 )	
	абс	%	абс	%	абс	%
<i>S. aureus</i>	98	24,5	100	59,9	198	34,9
<i>S. pyogenes</i>	129	32,2	54	32,3	183	32,2
<i>Candida spp.</i>	64	15,9	-	0	64	11,3
<i>K. pneumoniae</i>	57	14,2	-	0	57	10,0
<i>S. haemolyticus</i>	43	10,7	13	7,8	56	9,9
<i>K. ozaenae</i>	7	1,7	-	0	7	1,2
<i>Moraxella spp.</i>	3	0,8	-	0	3	0,5

При вивченні частоти виділення різних таксонів мікроорганізмів у клінічно значущій кількості ( $\geq 10^6$  КУО/мл змиву з тампону) у досліджуваних біотопах було встановлено, що мікроорганізми виділені зі слизової зіву були представлені 5 родами, зі слизової носа – 3 родами (табл. 3.1).

У загальній структурі видового спектру перше місце посів *S. aureus* (34,9 %) та був домінантним у матеріалі із носа (59,9 %). Слід звернути увагу, що *S. aureus* вважають транзиторним представником мікрофлори носа і даний результат свідчить про значне поширення в популяції носійства патогенного стафілокока. За частотою виділення зі слизової зіву перше місце посів представник роду *Streptococcus* – *S. pyogenes* (32,2 %). Отриманий результат змушує по новому оцінити патогенний потенціал даного мікроорганізму, оскільки він є представником нормальної мікрофлори дихальних шляхів і за певних умов може викликати гнійно-запальні процеси в респіраторному тракті. На третьому місці за частотою виділення знаходились гриби роду *Candida* (15,9 %), які при цьому виділялись лише зі слизової оболонки зіву. На четвертому була *Klebsiella pneumoniae* (14,2 %). Аналізуючи результати мікробіологічного дослідження матеріалу із зіву від пацієнтів з ЛОР-патологією, слід зазначити, що у всіх випадках виділення асоціацій мікроорганізмів спостерігались 2-х або 3-х компонентні грибово-бактеріальні комплекси. У 13 (3,7 %) пацієнтів виділялися *S. aureus* та *Candida spp.*; у 16 (4,6 %) – *S. aureus*, *K. pneumoniae* та *Candida spp.*, у 3 (0,85 %) – *S. pyogenes* та *Candida spp.*

Наші результати відрізняються від даних Красій Н. І. [12], яка із ротоглотки хворих із відділення анестезіології та інтенсивної терапії виділяла переважно представників родини Enterobacteriaceae (59,7±2,2) %, а стафілококи при цьому становили лише (10,6±1,4) %. Дана відмінність, ймовірно, зумовлена тим, що слизові оболонки ротоглотки пацієнтів реанімаційного відділення колонізувались нозокоміальними штамми, а в нашому дослідженні від пацієнтів виділяли переважно умовно-патогенних представників автохтонної мікрофлори носа та зіву.

Результати, отримані нами, свідчать про знане поширення серед пацієнтів із запальними процесами носоглотки деяких представників із групи ESKAPE, що додатково підтверджує необхідність ретельного вивчення їх антибіотикограм. При вивченні чутливості до антибіотиків нами було

відібрано антибіотики з різними механізмами дії, а тому при формуванні резистентності до них, як правило, задіяні різні генетичні механізми. Результати дослідження чутливості виділених мікроорганізмів до антибіотиків відображено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Чутливість виділених мікроорганізмів до антибіотиків

Вид мікроорганізму	Відносна кількість штамів (%) чутливих до антибіотиків							
	ципрофлоксацин	оксацилін	цефтриаксон	амоксцилін	цефазолін	азитроміцин	кларитроміцин	еритроміцин
<i>S. aureus</i> <i>n=198</i>	56,0± 0,3	56,1± 0,3	72,2± 0,3	45,9± 0,6	62,6± 0,4	42,9± 0,6	54,1± 0,3	45,9 ±0,3
<i>S. haemoliticus</i> <i>n=43</i>	58,7± 1,1	53,5± 1,1	84,0± 0,9	80,0± 0,9	65,1± 1,1	66,7± 1,1	76,7± 1,0	27,9 ±1,0
<i>S. pyogenes</i> <i>n=183</i>	74,9± 0,3	46,4± 0,6	63,4± 0,4	33,3± 0,8	49,2± 0,6	78,7± 0,3	48,6± 0,6	42,1 ±0,6
<i>K. pneumoniae</i> , <i>n=57</i>	37,9± 0,9	10,0± 0,5	11,6± 0,6	9,3±0, 5	41,9± 0,9	8,5±0, 5	5,4±0, 4	7,0± 0,4
<i>K. ozaenae</i> , <i>n=7</i>	14,3±5 ,8	-	0	28,6± 7,5	71,4± 7,5	57,1± 8,2	-	-
<i>Moraxella spp.</i> , <i>n=3</i>	33,3± 23,6	33,3± 23,6	33,3± 23,6	0	66,7± 23,6	0	-	-

Найбільш активним антибіотиком відносно всіх досліджуваних мікроорганізмів є цефазолін, до якого були чутливими від 41,9 % до 71,4 % мікроорганізмів. Серед бактерій штами *K. pneumoniae* були найчастіше резистентними до різних за механізмом дії антибіотиків (від 95,6 до 58,2 % резистентних ізолятів). Особливу увагу привертає виділення значної кількості штамів з множинною стійкістю до антибіотиків – 49,1 % ізолятів *K. pneumoniae*, 32,6 % ізолятів *S. haemoliticus*, 36,9 % ізолятів *S. aureus*, 30,6 % ізолятів *S. pyogenes*.

За результатами досліджень встановлено, що у 6,2 % випадків зі слизової оболонки зіву пацієнтів з ЛОР-патологією виявляються

бактеріально-грибкові асоціації. При чому *Candida spp.* виділені у асоціації з бактеріями проявляли високий рівень резистентності до антимікотичних препаратів: 96,9 % штамів були резистентними до ністатину, 56,3 % - до ітраконазолу, 46,9 % - клотримазолу, 34,4 % - кетоконазолу, 21,9 % - флуконазолу.

Для повного розуміння тенденцій у формуванні антибіотикорезистентності нами було сформовано профілі резистентності бактерій, які відображують набір притаманних і набутих генів резистентності конкретної клональної популяції. Профілі антибіотикорезистентності є маркерами ізолятів, які можуть бути використані для епідеміологічного аналізу збудників та визначення закономірностей їх циркуляції. Сформований профіль резистентності виглядав таким чином: Z (азитроміцин), С (цефтриаксон), І (ципрофлоксацин), О (оксицилін), А (амоксицилін), К (кларитроміцин), Е (еритроміцин), F (цефазолін). При інтерпретації профілю велика літера означає резистентність штаму до антибіотика або помірну чутливість, □ – чутливість мікроорганізма до антибіотика. Отримані нами дані представлені у таблиці 3.3.

Як видно з таблиці, серед мікроорганізмів з множинною резистентністю було виявлено 24 профілі. Сто п'ятнадцять (23,9 %) штамів біли резистентними до 4 та більше антибіотиків. Серед стафілококів 10,3 % штамів були резистентними до всіх антибіотиків, в тому числі і до оксациліну. Серед клебсієл 29,8 % ізолятів були резистентними до 5 антибіотиків, в тому числі до цефалоспоринів 3 покоління. П'ять штамів стрептококів були резистентними до всіх антибіотиків.

Виділення від хворих та з об'єктів оточуючого середовища мікроорганізмів із однотипними профілями антибіотикорезистентності (штами у яких діаметри зон затримки росту навколо дисків з однаковими антибіотиками однакові або відрізняються не більше ніж на 3 мм) може вказувати на їх госпітальне походження. Окрім того, вважають, що

Таблиця 3.3 – Профілі резистентності виділених мікроорганізмів

Вид мікроорганізмів, кількість	Профіль антибіотико-резистентності	Відносна кількість полірезистентних штамів, %
<i>S. aureus</i> , n=198	Z□□OА□Е□	19,1
	□C□□AK□□	6,0
	□CI□AK□□	4,0
	ZCIOAKEF	5,6
	Z□I□A□□□	3,0
	ZC□□□□□F	2,5
	□□I□A□□F	2,0
	□□□A□□□F	1,5
<i>S. haemoliticus</i> , n=43	□□ IO□□Е□	11,6
	□□□O□□EF	9,3
	□□I□AK□□	6,9
	ZCIOAKEF	4,7
<i>S. pyogenes</i> , n=183	□C□OА□Е□	10,9
	□□I□AK□□	1,1
	□C IOA□Е□	4,4
	□C□OAK□□	2,7
	□□□OAKEF	3,3
	ZCIOAKEF	2,7
	Z□I□A□□□	3,3
	□CI□A□□□	1,1
<i>K. pneumonia</i> , n=57	□C□OА□□□	14,0
	ZC□OAK□□	14,0
	□□□OAKEF	15,8
	Z□I□A□Е□	5,3

госпітальні штами мікроорганізмів мають множинну стійкість, принаймні до 5 антибіотиків. Маркерними для стафілококів є стійкість до метициліну (оксациліну) та/або ванкоміцину, а для ентеробактерій - до гентаміцину і/або до цефалоспоринових антибіотиків III-IV поколінь. З огляду на отримані нами результати, можна припустити циркуляцію госпітальних штамів у пацієнтів, які перебували на амбулаторному лікуванні. Оскільки ймовірність інфікування в умовах стаціонару була мінімальною, то можна говорити про поширення госпітальних ізолятів за межі ЛПЗ. Це свідчить про негативні тенденції, щодо поширення госпітальних штамів, які вимагають більш

ретельного і зваженого призначення антибіотиків з урахуванням антибіотикограми.

### 3.2 Характеристика НЧ Ag, Cu, ZnO

Результати рентген-структурного аналізу, ультрафіолетової віскозиметрії, інфрачервоної спектроскопії підтвердили хімічний склад наночастинок, які було синтезовано із використанням «зеленої хімії», а також їх високу чистоту та кристалічність. При проведенні трансмісивної електронної мікроскопії (ТЕМ) з'ясували, що НЧ Ag мають округлу форму та розміри 5-9 нм.

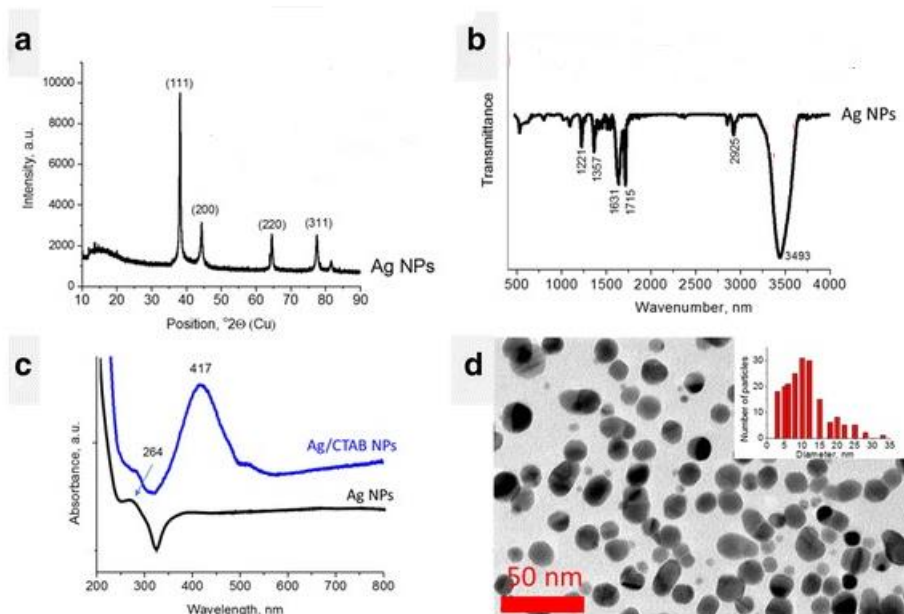


Рисунок 3.1 - Характеристика наночастинок срібла, синтезовано із використанням «зеленої хімії»: (а) рентген-структурний аналіз, (б) ультрафіолетова віскозиметрія, (с) інфрачервона спектроскопія, (д) - ТЕМ  
Фізико-хімічні характеристики наночастинок срібла, синтезованих з використанням поліольного методу, відображені на рис. 3.2. AgНЧ, що використовуються були переважно округлої форми із середнім розміром 45,2

нм та розподілом частинок за розміром 25–60 нм (рис. 3.1 а – с). Обробка УЗ не призводила до змін форми або розміру НЧ, однак, спостерігалось руйнування агломератів з НЧ (рис. 1а, б). Аналіз EDX показав присутність чистого срібла без додаткових домішок (рис. 1г). Елементи "С" та "О" показали наявність PVP, який використовувався, як стабілізатор в процесі синтезу.

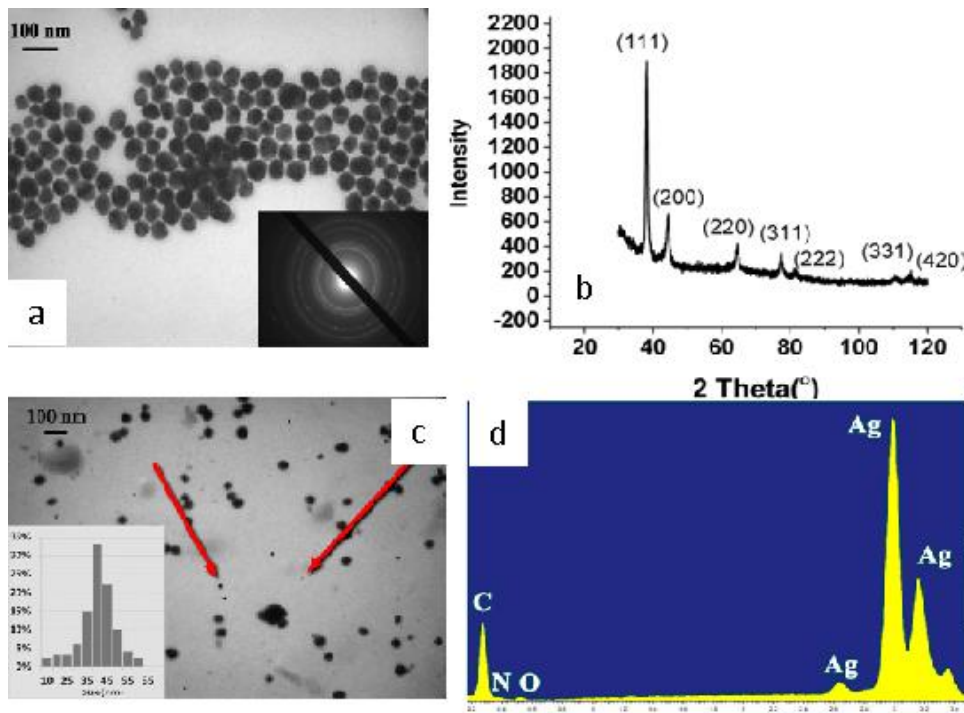


Рисунок 3.2 –Характеристика наночастинок срібла, синтезованих з використанням поліольного методу: (а) скануюча електронна мікроскопія, (б) інфрачервона спектроскопія, (с) трансмісійна електронна мікроскопія, (d) ультрафіолетова віскозиметрія

**В** результаті синтезу наночастинок срібла в UV-реакторі утворились кубоподібні наночастинки срібла з розмірами в діапазоні від 80 нм до 800 нм. Крім того, були виявлені менші наночастинки срібла сферичної форми розміром близько декількох десятків нм, приклеєні до стінок куба. (рис. 3.3 б). Спектри EDX (рис. 3.3 в) продемонстрували наявність залишків розчинників, таких як Cl та Na, в колоїдній суміші AgNP.

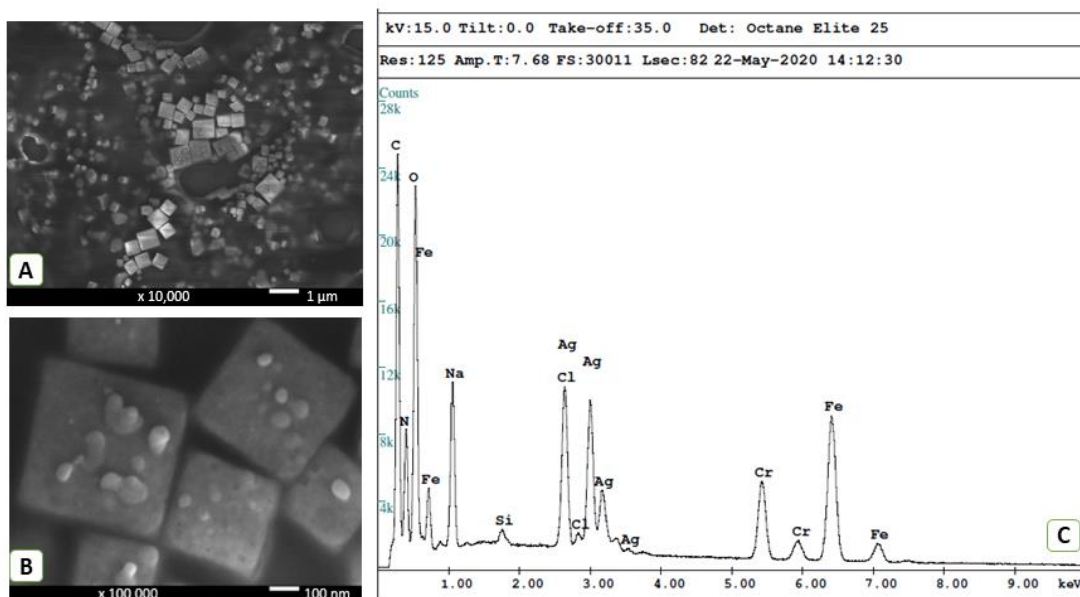


Рисунок 3.3 –Характеристика наночастинок срібла, синтезовані в УФ-реакторі: (а) скануюча електронна мікроскопія, (б) інфрачервона спектроскопія, (с) трансмісійна електронна мікроскопія, (д) ультрафіолетова віскозиметрія

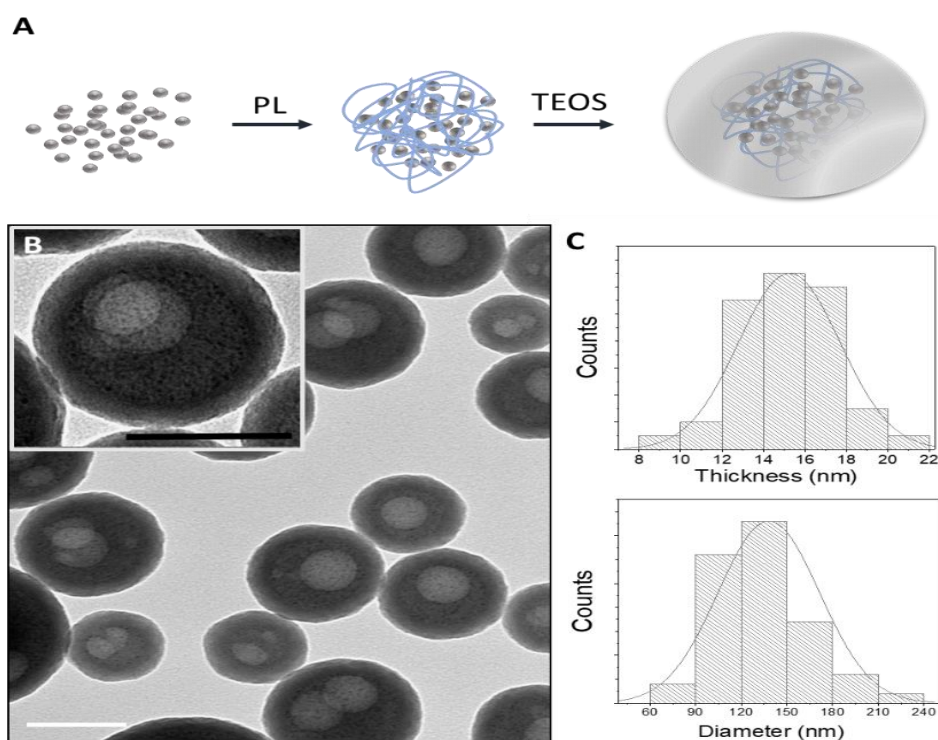


Рисунок 3.4 (а) Схема загального утворення AgNA. Силікатні оболонки - це зростання на їх поверхні за рахунок гідролізу тетраетил-ортосилікату. (б) Широкозонне TEM-зображення зразка AgNAs. (с) Розподіл товщини оболонки nanoархітектур (вгорі) та розподіл за розмірами НЧ (знизу), зроблений щонайменше на 100 частинок, зображених TEM.



Фізико-хімічна характеристика наноструктур срібла показала, що наноархітектури срібла розміром 120 нм складались з біорозчинної нанокапсули діоксиду кремнію, що містила ультрамалі наночастинки срібла розміром близько 1 нм (рис 3.4). Вміст срібла в AgNA, оцінений ICP-MS, становив 3% мас. AgNA.

Фізико-хімічні характеристики НЧ міді, які були синтезовано із використанням підходів притаманних «зеленій» хімії, вивчено із використанням рентген-структурного аналізу, ультрафіолетової віскозиметрії та інфрачервоної спектроскопії зразків міді. Було встановлено, що досліджувана речовина є наночастинкам Cu (рис.3.5). Відповідно до ТЕМ наночастинки металів були сферичної форми і мали розмір 15-20 нм.

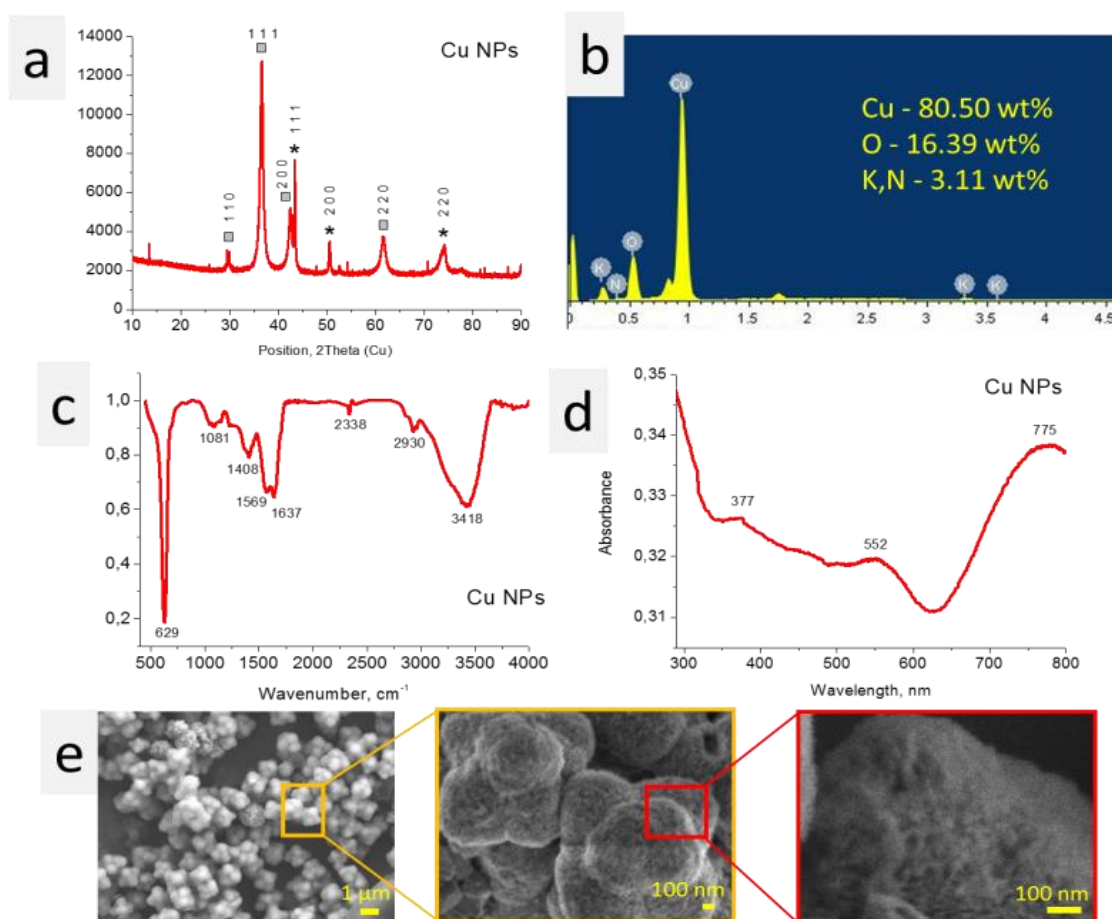


Рисунок 3.5 –Характеристика наночастинок міді, синтезованих з використанням «зеленої хімії»: (а) рентген-структурний аналіз, (b) ультрафіолетова віскозиметрія , (с, d) інфрачервона спектроскопія, (е) трансмісійна електронна мікроскопія

Фізико-хімічний аналіз наночастинок міді, отриманих поліольним методом, підтвердив їх хімічну тотожність міді. НЧ міді були переважно кубічної форми, їх розмір в середньому становив 95 нм із сильною тенденцією до агломерації. Подальша ультразвукова обробка, на жаль, не призвела до фрагментації конгломератів.

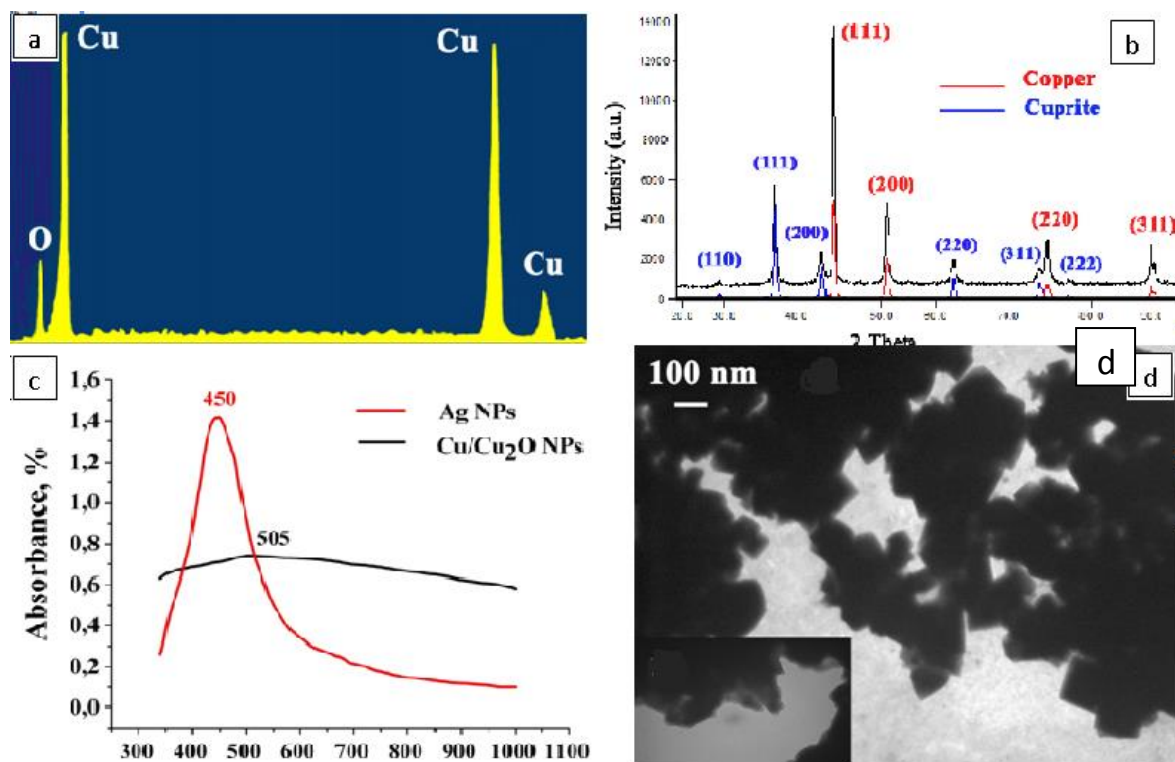


Рисунок 3.3 –Характеристика наночастинок міді, отриманих поліольним методом: (а) ультрафіолетова віскозиметрія, (б)рентген-структурний аналіз, (с) інфрачервона спектроскопія, (d)скануюча електронна мікроскопія.

ТЕМ дослідження структури наночастинок ZnO, отриманих поліольним методом, показало наявність сферичних наночастинок ZnO із середнім розміром 18 нм (від 10 до 30 нм). Рентгендіфракційний аналіз підтвердив, що синтезовано наночастинки ZnO (рис. 3.6).

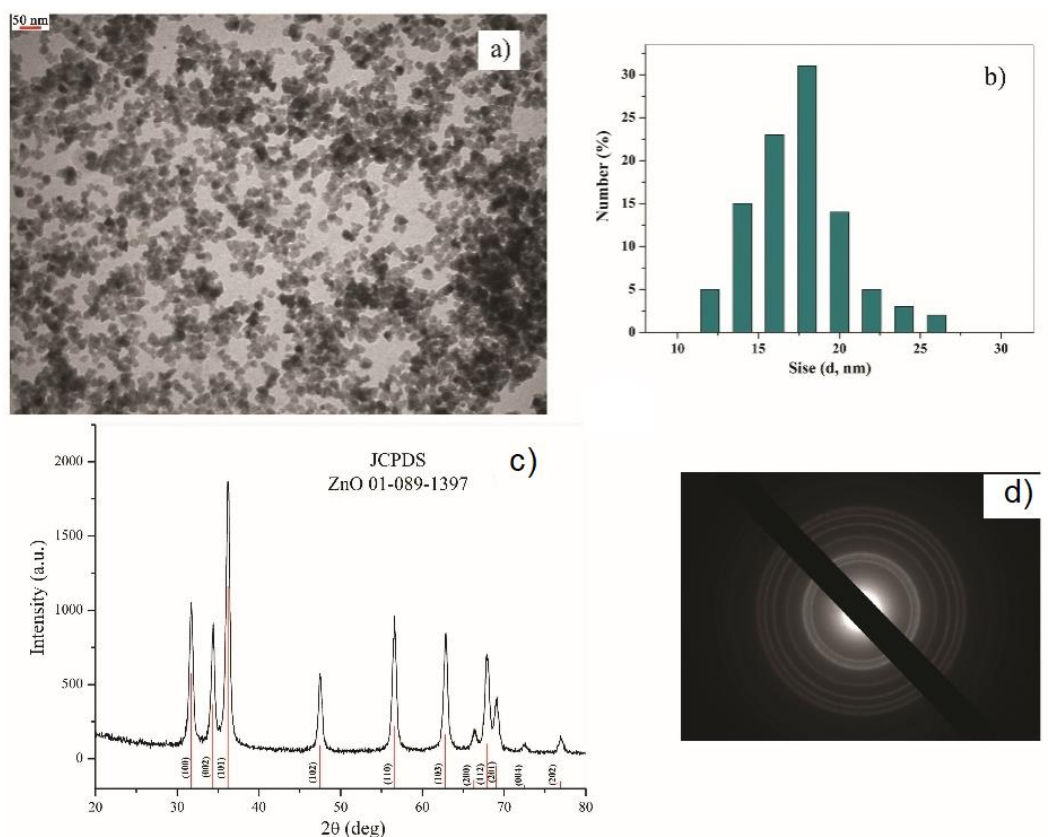


Рисунок 3.6 -Зображення трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) наночастинок ZnO, отриманих поліольним методом а) та середній розмір частинок (b), рентгендифракційний зразок ZnO (JCPDS 01-089-1397) (c) електронна дифракція ZnO (d).

Характеристика паличкоподібних частинок оксиду цинку, отриманих з використанням газоподібної дисперсії, показала, що НЧ ZnO мали рівномірний діаметр, довжину та кристалічну структуру, середній діаметр становив 50 нм, а довжина – могла сягати до 500 нм.

Рамановий спектр та фотолюмінесцентні спектри свідчили про приналежність досліджуваної речовини до ZnO.

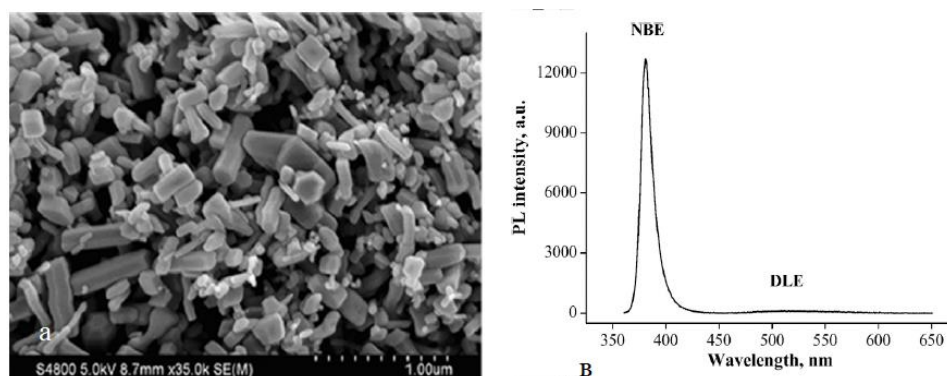


Рисунок 3.7 – Характеристика паличкоподібних частинок оксиду цинку: а) скануюча електронна мікроскопія, в) визначення флюоресцентних спектрів за допомогою оптичного волоконного спектрометра

Дослідження фізико-хімічних характеристик ZnO, синтезованих із застосуванням методу транспорту полум'я (FTS), показало наявність тетраподальних частинок цинку оксиду, як мають розмір від 15 до 20 мкм. Руки тетраподів мали діаметр 3-5 мкм проксимальний і близько 1 мкм дистальний від центру. Мікрочастинки ZnO демонстрували кристалічну структуру вюрциту і росли вздовж осі (рис. 3.8). Руки були орієнтовані один по відношенню до одного під кутом  $109,5^\circ$ .

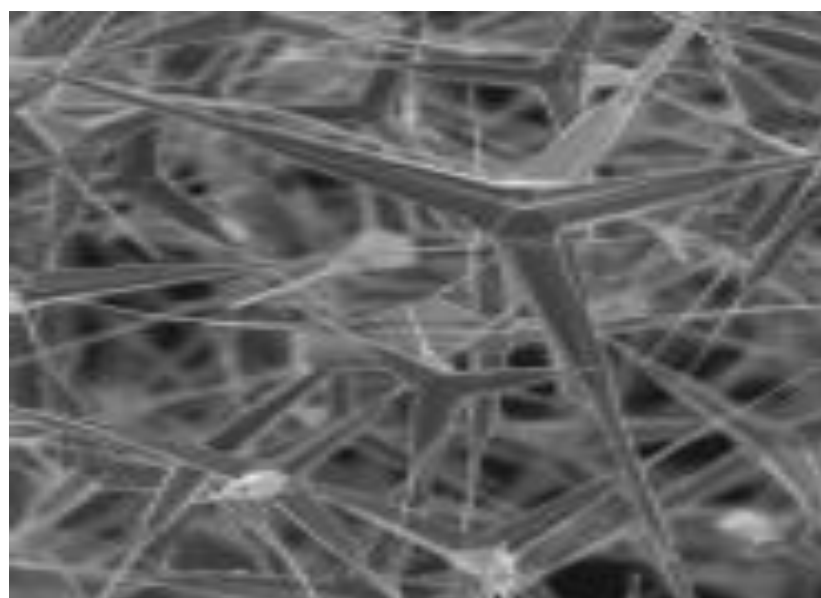


Рисунок 3.8 – СЕМ тетраподальних наночастинок ZnO

### 3.3 Характеристика хітозану та його композитів з наночастинками

Рентген-структурний аналіз та інфрачервона спектроскопія гелю та аерогелю хітозану підтвердили наявність напівкристалічного чистого хітозану. FTIR-спектри зразків хітозану (рис. 3.9), які підлягали функціоналізації, демонстрували зміни, які свідчили про зшивання молекул хітозану з одночасним збільшенням кількості вільних функціональних груп. Можна також зауважити, що мікрохвильове опромінення не спричинило суттєвої деградації полімерів.

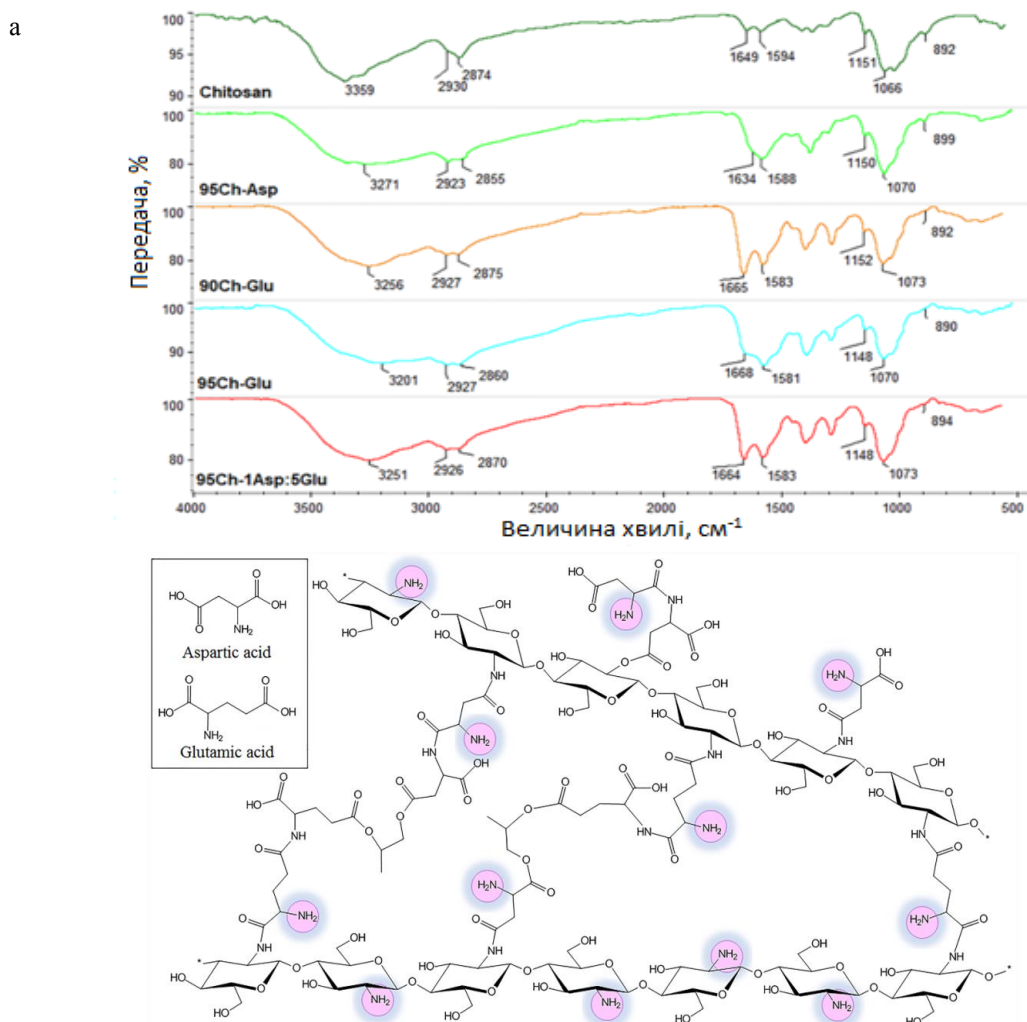


Рисунок 3.9 (а) FT-IR-спектри та (б) пропонована хімічна структура аерогелів, отриманих за допомогою хітозанового зшивання з використанням глутамінової та аспарагінової кислоти

Дослідження пористості і щільності зразків виявило відмінну пористість, яка була 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). Найвища пористість мала місце у зразках, що містять у своїй структурі обидві амінокислоти, проте лише до певного моменту. Усі зразки також мають дуже низьку щільність, характерну для аерогелів (рис. 3.10).

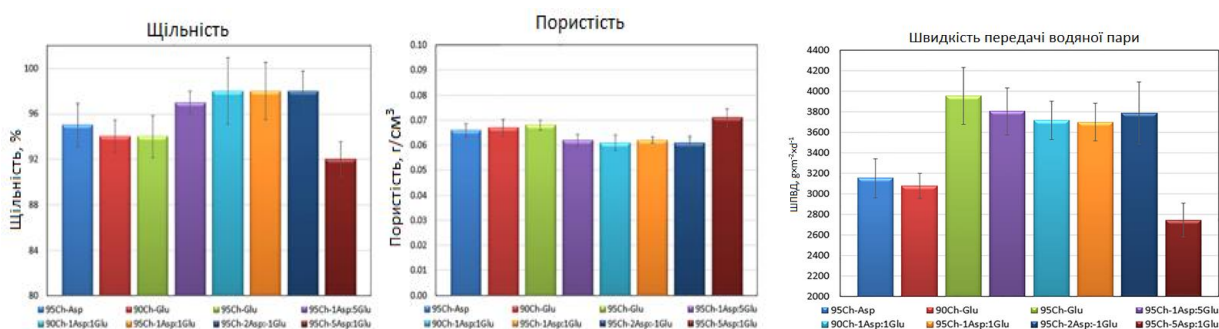


Рисунок 3.10 – Пористість, щільність та швидкість передачі водяної пари аерогелів отриманих за допомогою хітозанового зшивання з використанням глютамінової та аспарагінової кислоти

Отримані нами результати (рис. 3.10) показують, що всі підготовлені аерогелі мають дуже високий ШПВП, який у більшості випадків корелював з пористістю.

На малюнку 3.11 представлені результати дослідження антиоксидантної активності зразків модифікованого хітозану проти радикалів ДФПГ (2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилу).

Усі аерогелі мали здатність до утворення вільних радикалів, і ця властивість корелювала з типами використаних зшиваючих агентів: зразки зшиті двома амінокислотами, мали значно вищу антиоксидантну здатність.

Чистий хітозан біологічно розкладається в умовах *in vitro* та *in vivo* на ферменти, які розривають глікозидні зв'язки. На малюнку 3.12 представлено результати дослідження деградації хітозану в імітуючій рідині тіла (СБФ) та біодеградації в СБФ з лізоцимом. Усі досліджувані зразки підлягали

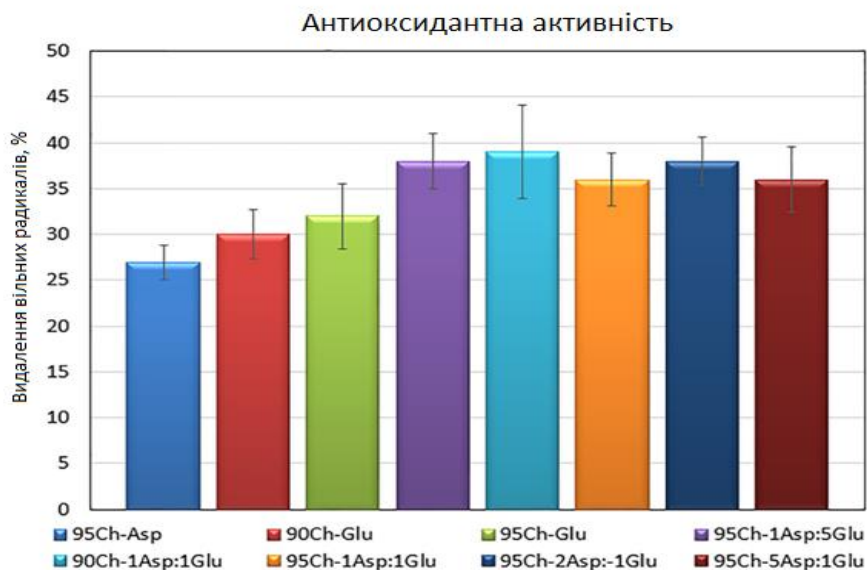


Рисунок 3.11 – Антиоксидантна активність аерогелів, отриманих за допомогою процесів поперечної зшивки з використанням глютамінової та аспарагінової кислоти проти ДФПГ вільних радикалів.

біологічному розкладанню до 80% протягом тижня, однак найшвидше біодеградація відбувається протягом перших 24 год. На першій стадії розкладання 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.

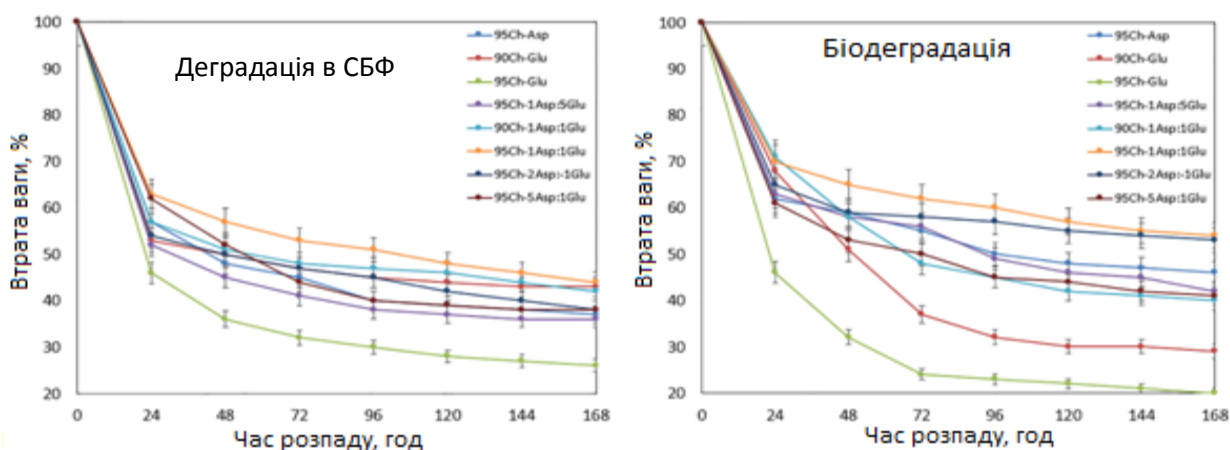


Рисунок 3.12 ( а ) – In vitro деградація аерогелів хітозану у стерильній імітованій рідині тіла (СБФ); ( б ) дослідження біодеградації in vitro в СБФ, що містить лізоцим людини

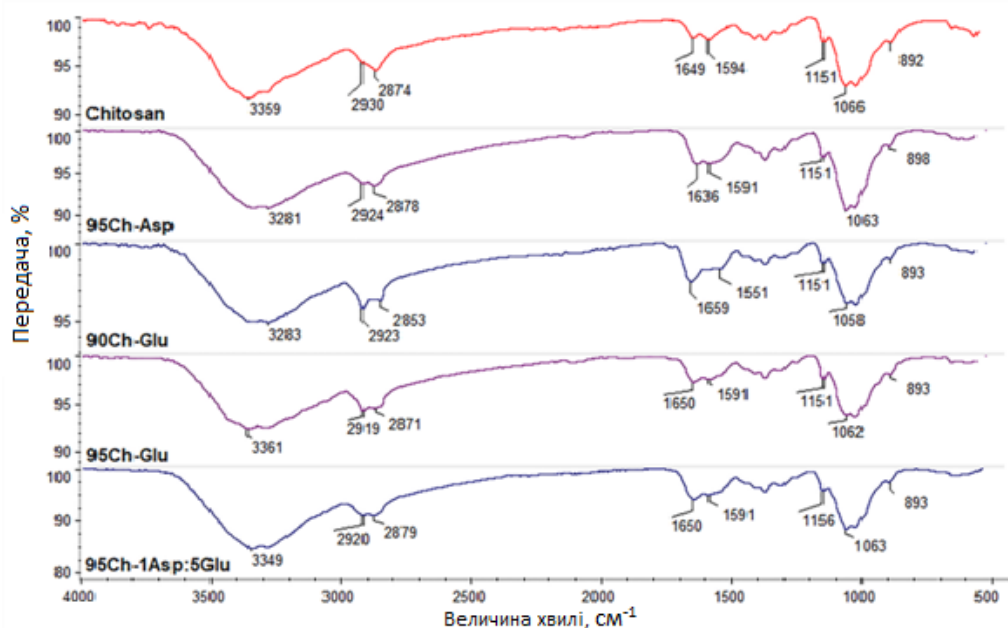


Рисунок 3.13 – FTIR-спектри зразків після біодеградації.

Величина сорбційної здатності усіх типів хітозанових губок становила від 700% до 2400% від початкової маси (рис. 3.16), однак 95Ch-1Asp: 5Glu, 90Ch-1Asp: 1Glu, 95Ch-1Asp: 1Glu і 95Ch-2Asp: 1Glu забезпечують значно кращу сорбцію.

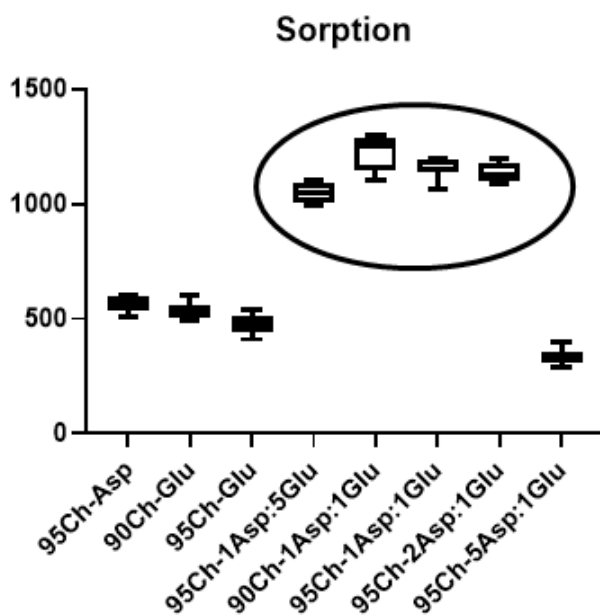


Рисунок 3.14 – Сорбція крові за допомогою хітозанових губок



Губки хітозану отримані після їх функціоналізації з використанням йоду та аскорбінової кислоти були не крихкими та майже не подрібнювались.

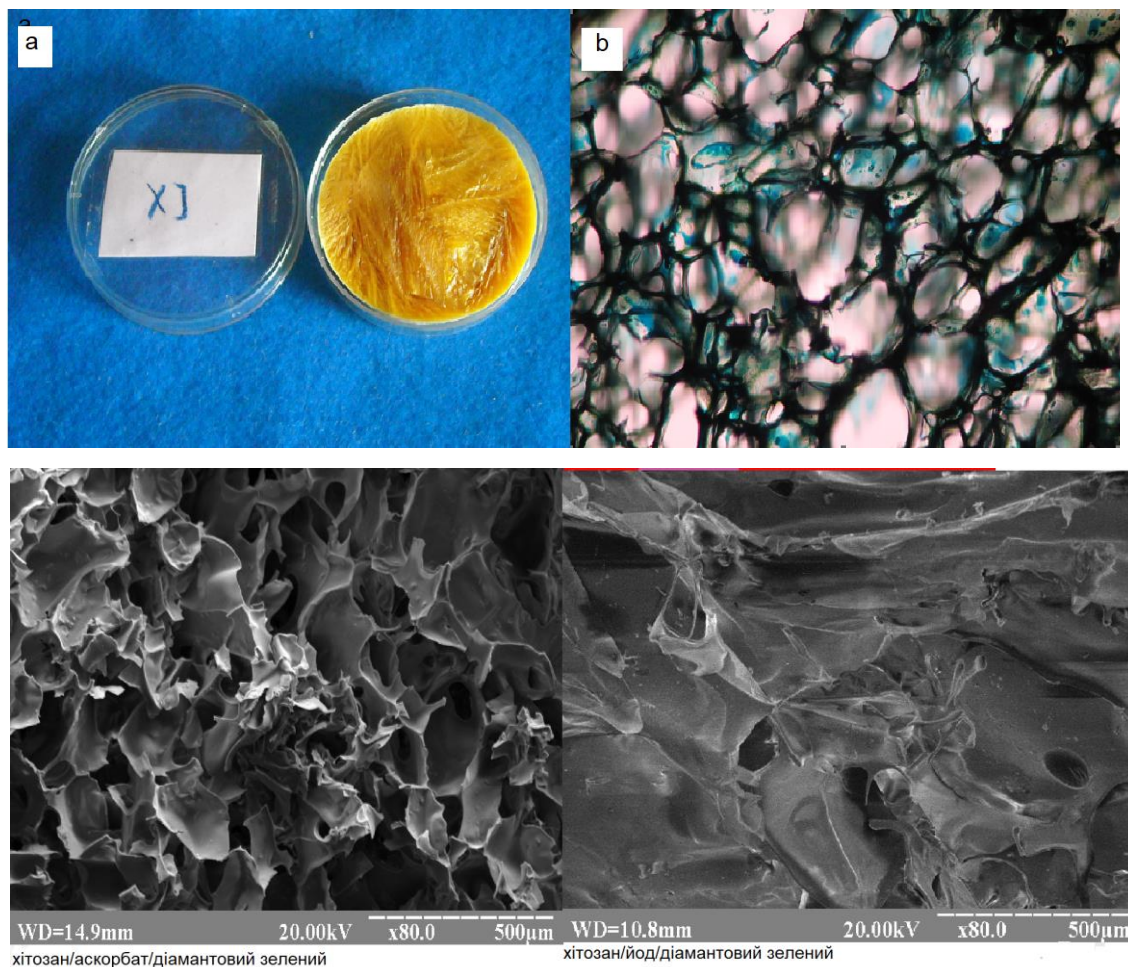


Рис. 3.15 – (а) ChAsДЗ фото губки, (б) ChAsДЗ, світлове мікроскопічне зображення, збільшення  $\times 100.$ , (с) ChAsДЗ, (д) СЕМ ChIDЗ

Губки з хітозану та діамантового зеленого навпаки були дуже крихкими, легко ламались, втрачали форму у воді та швидко розчиняється. Поперечні та поздовжні зрізи губок не відрізнялись, однак губка ChIDЗ була більш структурована і демонструвала певну асиметрію в морфології.

У композитах не виявлено кристалізованих фаз діамантового зеленого та аскорбінової кислот, що свідчить про те, що ці речовини зв'язані з матрицею хітозану та не утворюють окремих фаз. Дане припущення підтверджується результатами дослідження УФ-видимих спектрів та мас-спектрометрією матеріалів, однак наявні різні механізми взаємодії йоду з матеріалами.

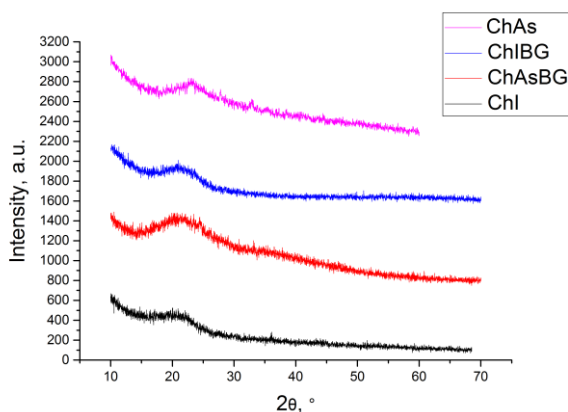


Рис. 3.16 – Рентгенівські діаграми досліджуваних композиційних матеріалів.

Спектр поглинання препарату хітозану-ДЗ, отриманий з використанням НІ як розчинника для хітозану, також характеризується наявністю 2 максимумів поглинання: широкого піку в діапазоні 400-470 нм та піку при 710 нм, що може свідчити про утворення комплексу з діамантовим зеленим або про утворення нової сполуки (йоду з діамантовим зеленим).

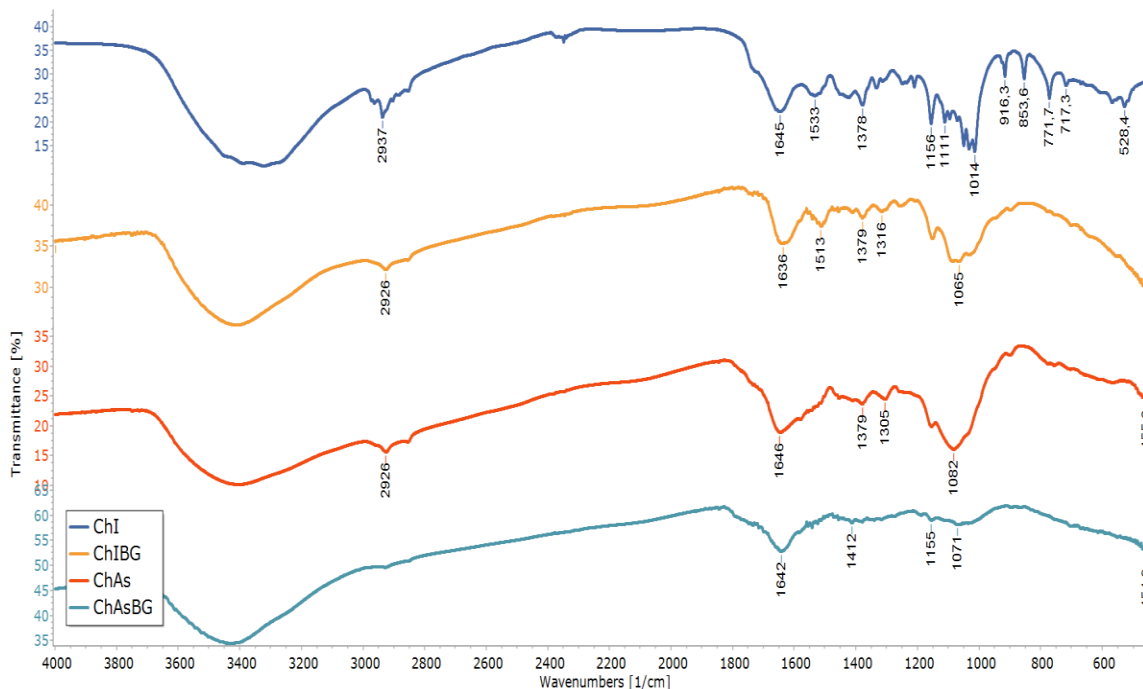


Рис. 3.17 – FTIR спектри досліджуваних композиційних матеріалів.

Дослідження здатності до набухання та деградації губок хітозан/йод та хітозан/йод/срібло встановило, що на здатність накопичувати воду впливали не лише склад губок, а й склад та рН розчинника (рис.3.18).

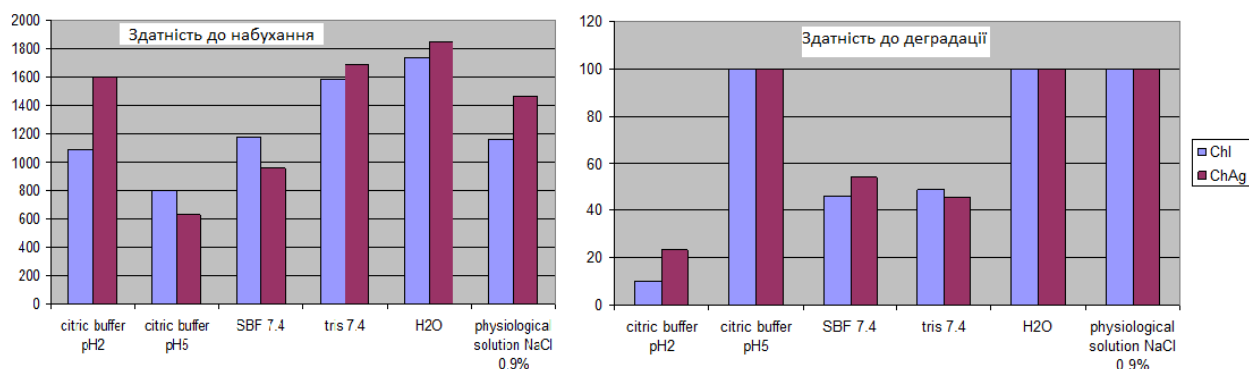


Рис. 3.18 – Дослідження in vitro здатності до набування та деградації композитів хітозану

Дослідження морфології губок хітозан/альгінат із різним співвідношенням компонентів встановили, що середній розмір комірок хітозану / альгінату становив  $0,0243 \pm 0,02129 \text{ мм}^2$ , тоді як середній розмір комірок в губках чистих хітозану та альгінату становив  $0,00459 \pm 0,00111$  та  $0,00264 \pm 0,00983 \text{ мм}^2$ , відповідно (табл 3.4).

Таблиця 3.4 – Морфометрична характеристика хітозан-альгінатних губок

Розмір комірок, $\text{мм}^2$	1	2	3	4	5	6	Середній розмір комірок хітозан/альгінатних губок
Середня	$2.64 \cdot 10^{-3}$	$2.43 \cdot 10^{-2}$	$7.0 \cdot 10^{-3}$	$5.67 \cdot 10^{-3}$	$1.01 \cdot 10^{-3}$	$4.59 \cdot 10^{-3}$	$24.3 \cdot 10^{-3}$
SD	$1.11 \cdot 10^{-3}$	$5.9 \cdot 10^{-3}$	$12.02 \cdot 10^{-3}$	$12.1 \cdot 10^{-3}$	$1.96 \cdot 10^{-3}$	$9.83 \cdot 10^{-3}$	$21.29 \cdot 10^{-3}$
Мінімальний	$1.06 \cdot 10^{-3}$	$8.0 \cdot 10^{-4}$	$0.4 \cdot 10^{-3}$	$0.7 \cdot 10^{-3}$	$2.49 \cdot 10^{-5}$	$0.12 \cdot 10^{-3}$	$2.49 \cdot 10^{-5}$
Максимальний	$5.34 \cdot 10^{-3}$	$25.0 \cdot 10^{-2}$	$6.98 \cdot 10^{-2}$	$88.2 \cdot 10^{-3}$	$14.79 \cdot 10^{-3}$	$46.7 \cdot 10^{-3}$	$25.03 \cdot 10^{-2}$

Чиста альгінатна губка (мал. 3.19 (1)) має більший розмір комірок порівняно з губками хітозан / альгінат (мал. 3.19 (2-5)) або Ch (мал. 3.19. 6).

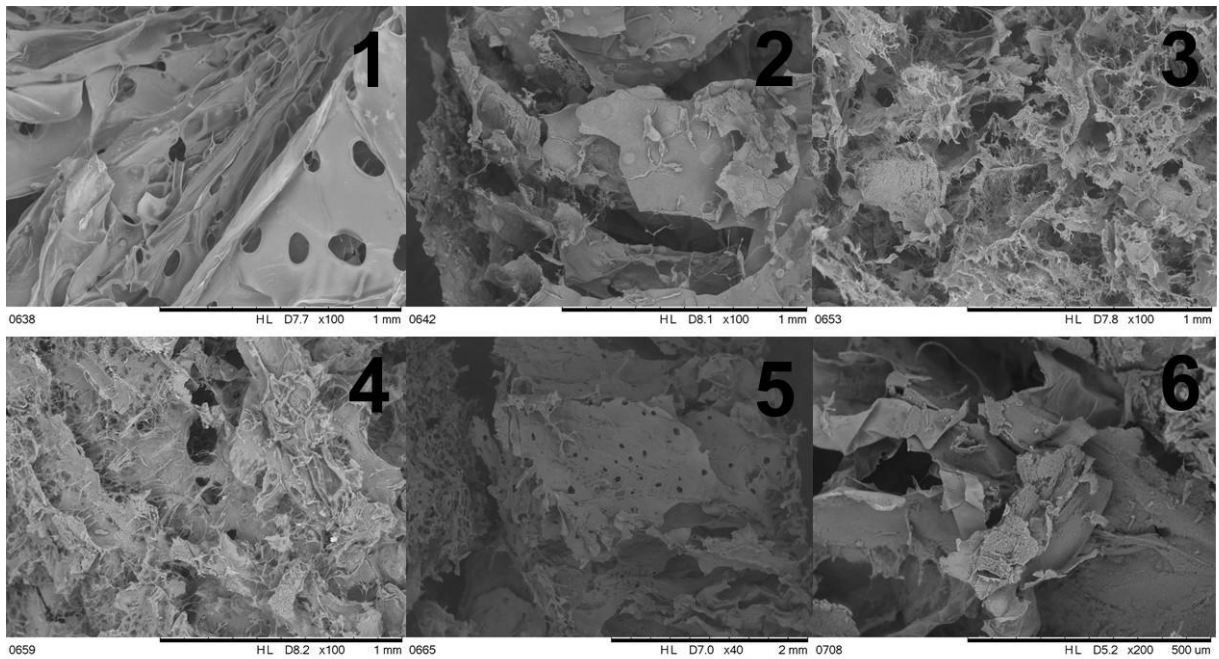


Рис. 3.19 – СЕМ зображення Ch-Alg губок

Морфологія поперечного перегляду губок показана на малюнку 3.19. Залежно від складу, існують очевидні відмінності у зовнішньому вигляді фібрилярної структури губок, як показано на малюнку 3.19. Чистий альгінат (зразок 1) мав смугоподібну структуру порівняно з хітозановою губкою з пористою сіткою. Проте зразки 2-5 показали наявність набагато більшої кількості нерегулярної морфологічної структури, подібної до смужки. Внутрішня структура зразків 3 і 4 складається з пластівчастих пластин із щільною волокнистою сіткою. Губка Ch (зразок 6) показала взаємозв'язок пор. Губка №2 мала більший розмір пор, ніж інші губки, що вказувало на те, що додавання двох об'єктів хітозану та альгінату призвело до створення структури з більшими порами.

Ці відмінності у формуванні випадкової фібрилярної мережі в композиційних матеріалах хітозан / альгінат можна пояснити наявністю взаємодії між катіонними та аніонними полімерами перед заморожуванням.

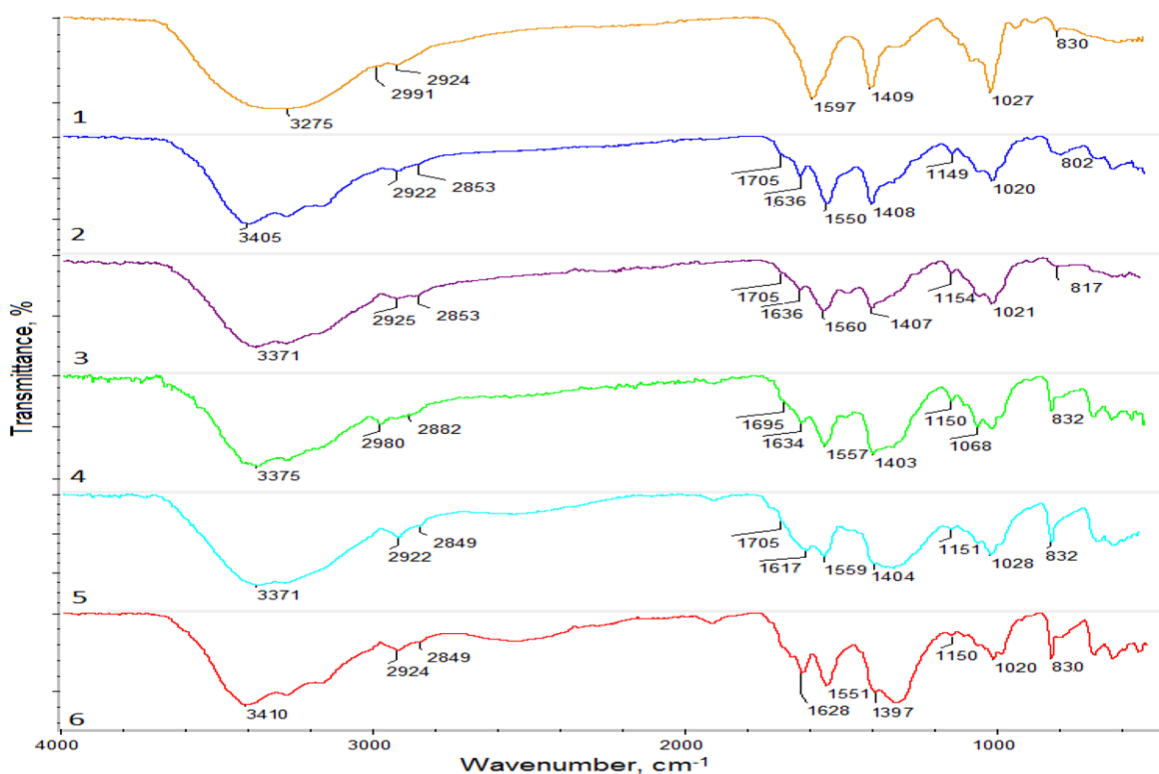


Рис. 3.20– FTIR дослідження Ch-Alg губок

FTIR зразків показав типові для складових цих полімерів смуги та збереження характерної структури хітозану. Це вказує на можливість зберегти його цінні біологічні властивості, які головним чином корелюють із наявністю вільних аміногруп, відповідальних за його взаємодію з клітинними мембранами, а також бактеріоцидними властивостями. У той же час завдяки додаванню альгінату натрію можна підвищити механічну стійкість, а також пористу морфологію зразка, що є вирішальним для застосування в культурі клітин. Використання альгінату завдяки електростатичним взаємодіям призводить до утворення матеріалу, що характеризується хорошою структурною цілісністю.

Дослідження здатності до набухання, пористість і здатність до деградації хітозан/альгінатних губок виявило, що пористість зразків зменшується зі збільшенням вмісту хітозану в композиційних матеріалах та коливалась у межах 44% – 67%. Губки хітозан / альгінату мали нижчу здатність до поглинання води порівняно з альгінатними губками завдяки електростатичним взаємодіям та зв'язку водню між їх функціональними

групами. Додавання розчину альгінату натрію до розчину хітозану збільшувало швидкість деградації зразків.

Дослідження фізико-хімічних характеристик плівок з хітозану встановило, що використання для електроспінінгу хітозану у якості розчинника суміші TFA / DCM у співвідношенні 9/1 дозволяє отримати добре структуровані дрібні нановолокна із середнім діаметром волокон (AFD)  $0,2 \pm 0,01$  мкм. Нановолокна були гладкими та безперервними (рисунок 3.21). Поверхня не мала суттєвих дефектів, нориць та заглиблень. Мембрани утворювали тривимірну мережу із випадковою розташуванням нановолокон. Додавання до розчину хітозану наночастинок срібла призводило до зміни морфології нановолокон. СЕМ-зображення електроспінових волокнистих мембран Ch-TFA / DCM, що містять AgNP, продемонстрували однорідний розподіл AgNP у волокнах. Наночастинки срібла були випадково розташовані на волокнах, без помітних ознак агломерації. Вивчення концентрації НЧ AgNP у волокнах за допомогою EDX підтвердило відкладання AgNP на поверхні плівок.

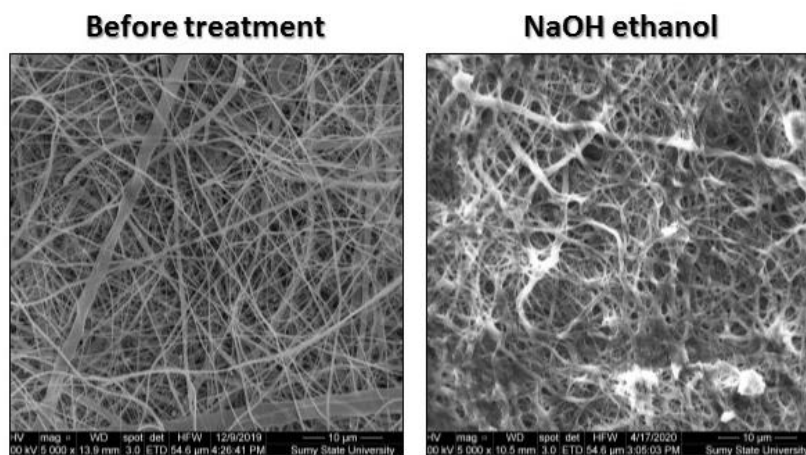


Рисунок 3.21 - СЕМ-зображення електроспінових волокнистих мембран Ch-TFA / DCM після їх обробки 1М NaOH 70%, водним розчином етилового спирту 30%

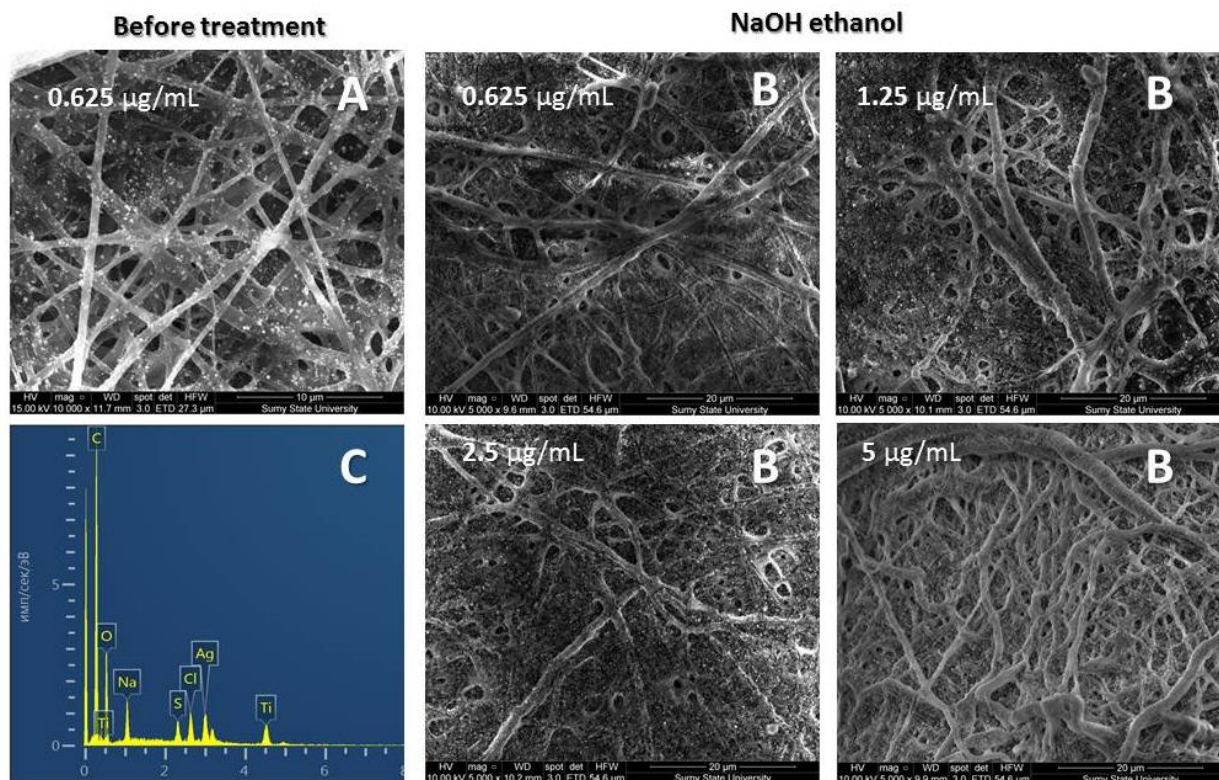


Рисунок 3.22 - СЕМ-зображення електроспінових волокнистих мембран Ch-TFA / DCM із додаванням НЧ срібла після їх обробки 1М NaOH 70%, водним розчином етилового спирту 30% (а, б), EDX спектри Ch-TFA/DCM AgNPs 0.625µm/mL композитних мембран (с).

Для стабілізації та нейтралізації отриманих мембран проводили їх обробку розчином лугу та 70% етанол / 30% водним розчином протягом 24 год для отримання стабільної форми (рисунок 3.22). Аналіз зображень за допомогою SEM підтвердив стабільність нановолокнистих структур після обробки етанолом-водним розчином (70/30), як показано на малюнку. AFD збільшився в 1,5 рази для Ch-TFA / DCM та у 2,75 для Ch-TFA / DCM AgNP порівняно з початковим розміром. Таке збільшення розміру може бути пов'язане з набряком волокон. Нейтралізація мембран хітозану етанол-водним розчином підходить для збереження структури нановолокна, як показано на малюнку.

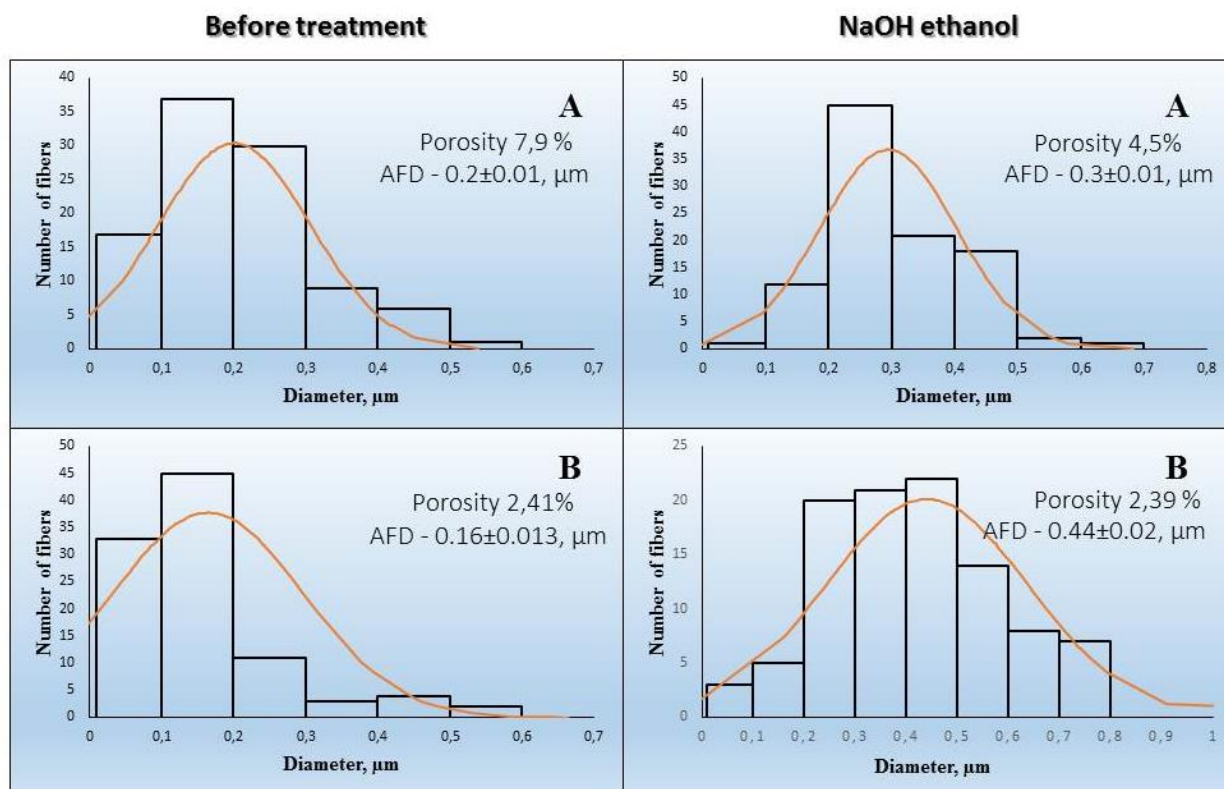


Рисунок 3.23 – Пористість волокон, AFD, розподіл по діаметру волокнистих мембран електроспіна Ch-TFA / DCM перед обробкою та після нейтралізації в NaOH / етанолі А) без AgNP і В) AgNP. AFD: середній діаметр волокна.

Набухаюча здатність волокнистих мембран була подібною через 20 хв і 60 хв занурення. Втрати маси нановолокнистих зразків під час занурення в PBS постійно збільшувались протягом перших трьох днів і помітно зростали через 1-й тиждень. В іншому випадку суттєва різниця у втраті ваги спостерігалася лише між 3-м днем та 28-м днем аналізу ( $p \leq 0,01$ ). Не було відмінностей у точках деградації серед зразків з різним вмістом AgNP. Кінетика деградації волокнистих мембран після нейтралізації сумішшю етанол-вода та після видалення надлишку розчинної солі TFA / DCM показала, що нейтралізація лугом (1M NaOH) є більш доцільною для збереження структури нановолокна (рисунок 3.24).



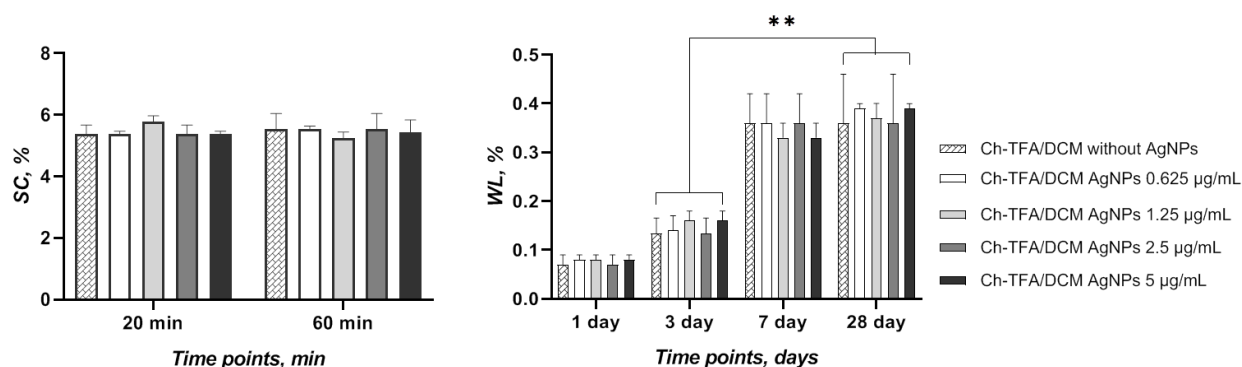


Рисунок 3.24 – Кінетика деградації Ch-TFA/DCM електроспінінгових мембран навантажених НЧ срібла.

Нановолокнисті мембрани не змогли зберегти структуру нановолокон хітозану через часткове розчинення після одностороннього занурення в PBS.

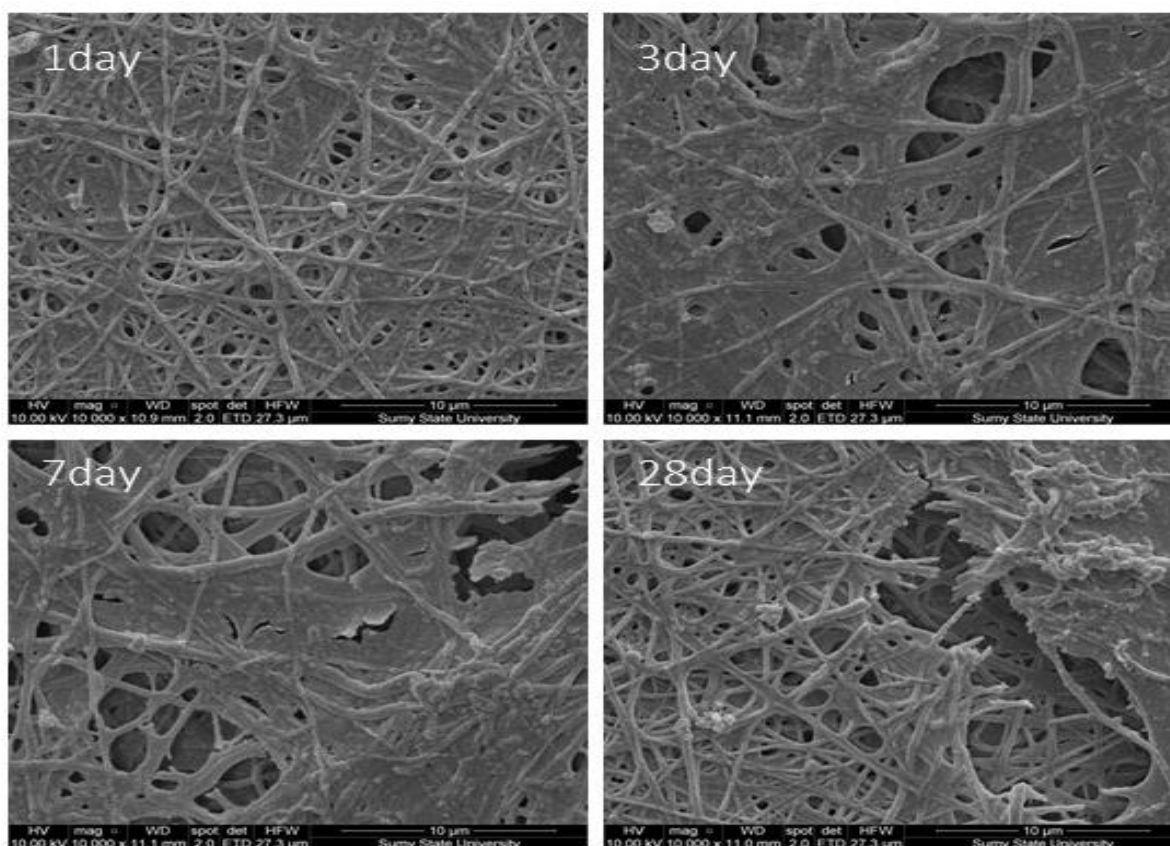


Рисунок 3.25 – SEM волокнистих мембран Ch-TFA / DCM із наночастинками срібла на різних етапах деградації

Після трьох днів занурення в PBS спостерігалось зменшення загальної пористості мембрани. Слід зазначити, що більшість волокон зберігали свої структури зі сплавленими переходами. У структурі зразків з'явилося стоншення волокон та тріщини. Кількість зазорів і витончення збільшилася до 28 днів експерименту. Результати SEM підтвердили дані про кінетику

деградації. Відбулось зменшення ваги внаслідок розчинення волокон. У кінці експерименту незначну зміну ваги можна пояснити осадженням фосфату, помітним на поверхні після 28 днів занурення.

Аналіз фізико-хімічних параметрів гідроксиапатиту показав утворення кристалів ГА середнього розміру, діаметром майже 70-80 нм (рис. 3.26). Формування фази гідроксиапатиту підтверджується рентгенограмами (рис. 3.26, б). Наявні характерні для гідроксиапатиту піки – широкий пік відбиття в діапазоні 31,8 - 32,50 від  $2\theta$  значень, що відповідає характерному піку фази апатиту (згідно картки JCPDS №9-0432).

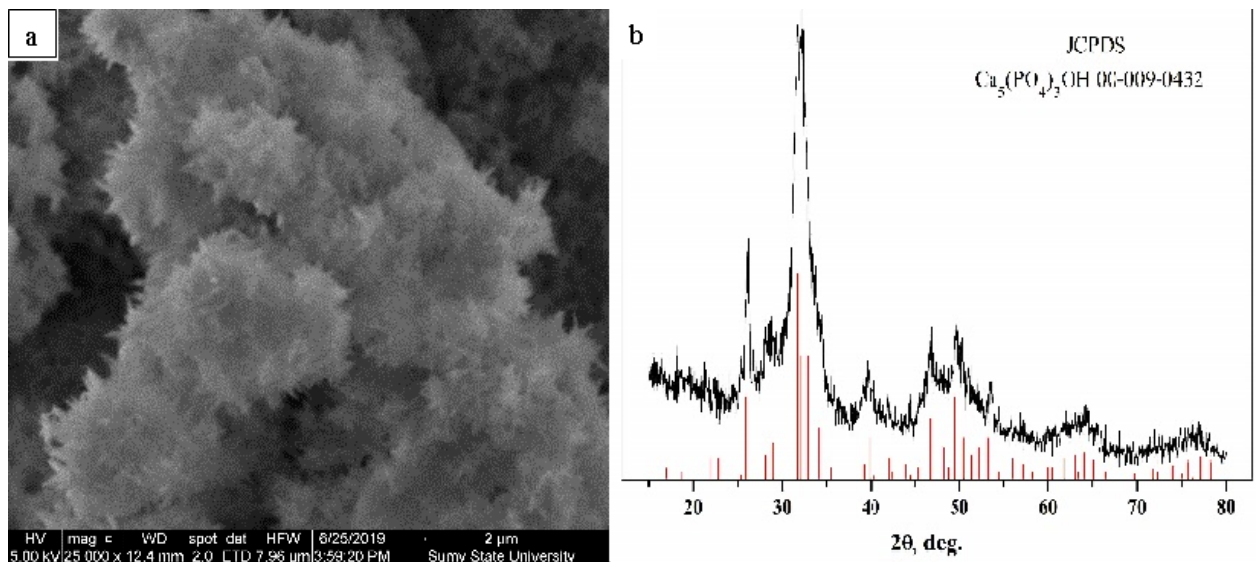


Рисунок 3.26 – СЕМ (а) та електронна дифракція (б) гідроксиапатиту

### 3.4 Антибактеріальна активність НЧ Ag, Cu, ZnO, хітозану та їх композитів

Дослідження антибактеріальної активності НЧ срібла, синтезованих з використанням «зеленої хімії», показало його ефективність проти 100 % штамів за концентрації концентрацією 9,6  $\mu\text{g} / \text{ml}$ .

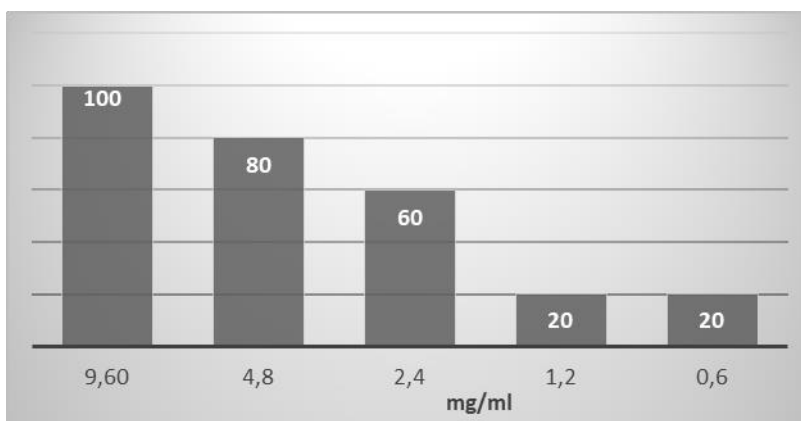


Рисунок 3.27 - Відсоток штамів MRSA чутливих до НЧ Ag

Наночастинки срібла синтезовані із використанням UV-реактора демонстрували винятково високу антибактеріальну активність з MIC для *E. coli* та *P. aeruginosa* на рівні 1,25 мкг / мл, тоді як MIC AgNPs для *S. aureus* становив 2,5 мкг / мл.

Профіль час-залежної антибактеріальної активності показав, що ці наночастинки у концентрації тотожній MIC спричиняли м'яке пригнічення розмноження *E. coli* та *P. aeruginosa* з поступовим зростанням кількості мікроорганізмів до 36 годин. Експозиція *E. coli* та *P. aeruginosa* AgNP у концентрації, що дорівнює подвійному MIC, призвела до зменшення кількості життєздатних клітин протягом перших 4 годин та 12 годин відповідно. Знешкодження клітин кишкової палички було зареєстровано через 6 годин. Однак кількість *P. aeruginosa* була відновлена до початкових рівнів за 48 год. Час-залежна активність AgNP проти *S. aureus* демонструвала пригнічення розмноження клітин бактерій протягом перших 12 годин з наступним незначним збільшенням кількості бактерій (рисунок 3.28).

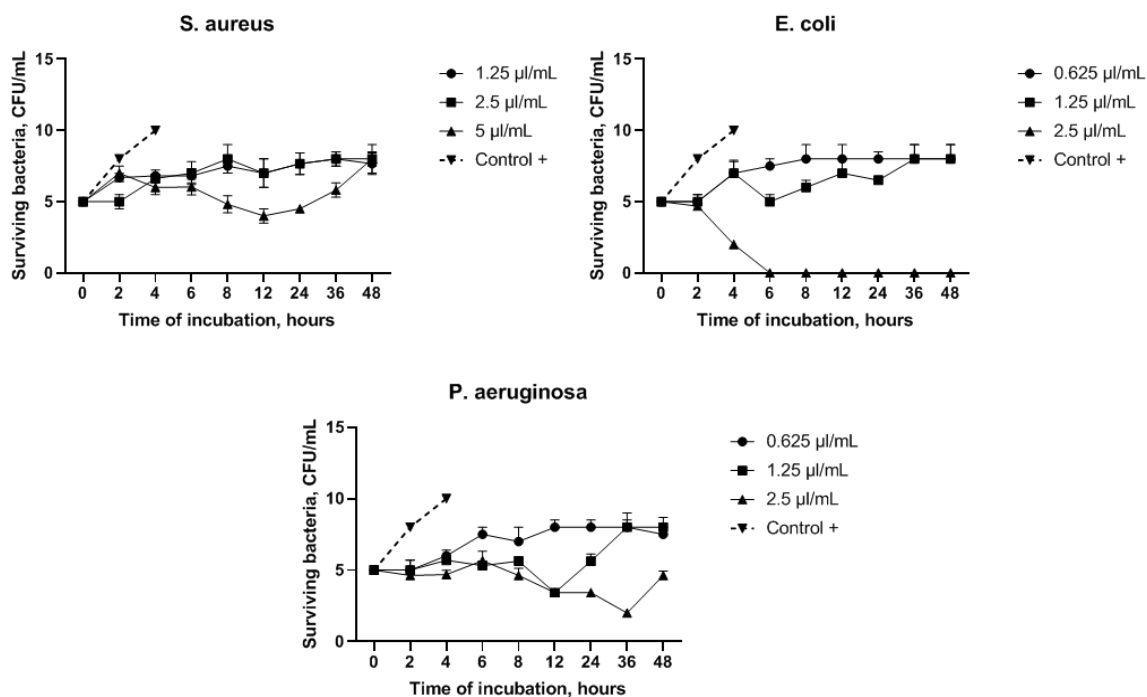


Рисунок 3.28 - Час-залежна антибактеріальна активність НЧ Ag відносно полірезистентних клінічних ізолятів

Наночастинки срібла, синтезовані із використанням поліольного методу, були ефективними проти всіх мікроорганізмів, при цьому МІК становила 25 мкг/мл, за виключенням *E. coli* (50 мкг/мл). Попередня обробка УЗ призводила до зменшення МІС.

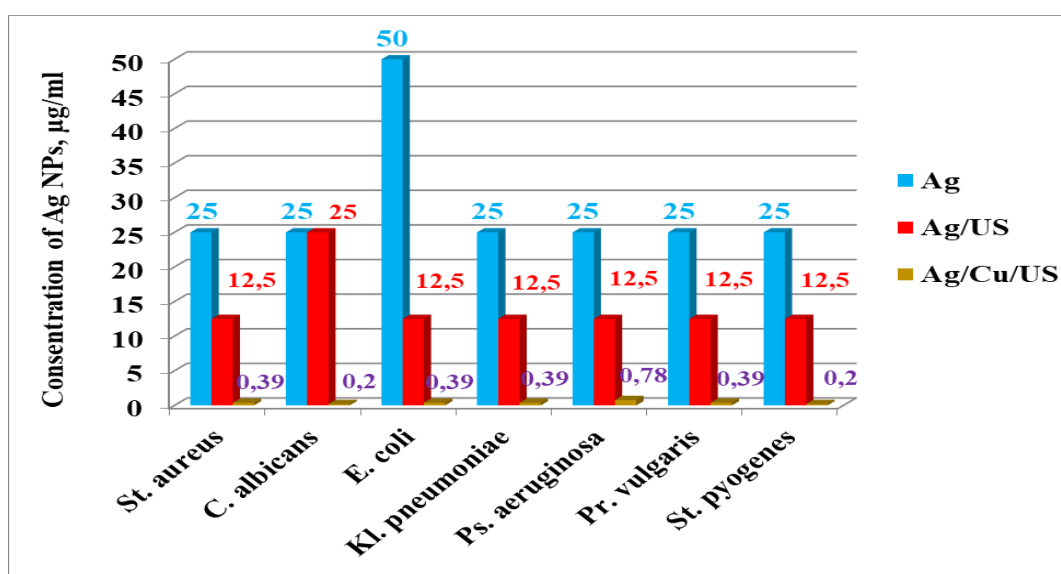


Рисунок 3.29 - Антибактеріальна активність НЧ Ag, синтезованих поліольним методом, відносно полірезистентних клінічних ізолятів

Дослідження час залежної активності НЧ срібла показало, що знешкодження мікроорганізмів при поєднаному застосуванні НЧ срібла та УЗ призводить до більш швидкого знищення всіх мікробних клітин (рисунок 3.30).

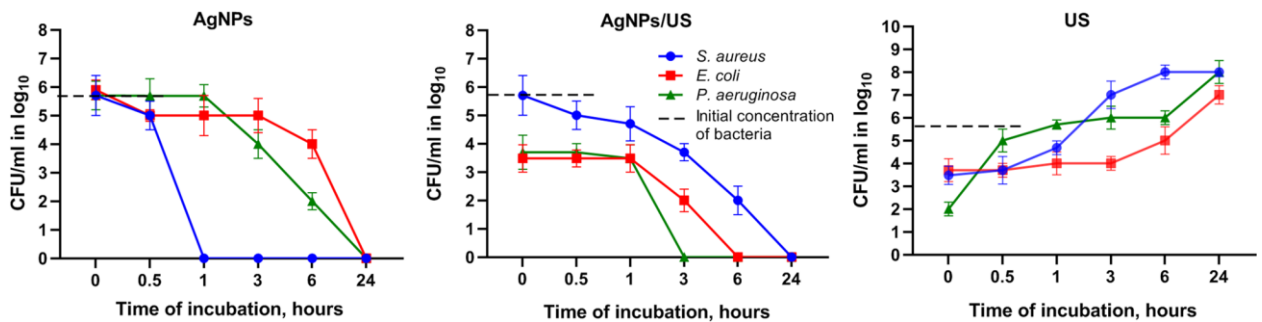


Рисунок 3.30 - Час-залежна антибактеріальна активність НЧ Ag, синтезованих поліольним методом, відносно полірезистентних клінічних ізолятів

Наноархітектури срібла продемонстрували значну антибактеріальну активність із MIC для *E. coli* та *P. aeruginosa* 1,25 мкг / мл та 2,5 мкг / мл для *S. aureus*. Дослідження час залежної активності показало, що AgNA при концентрації еквівалентній MIC викликали легке пригнічення розмноження кишкової палички та *P. aeruginosa* з поступовим збільшенням кількості бактеральних клітин до 36 годин. Експозиція *E. coli* та *P. aeruginosa* при подвійній концентрації MIC AgNA призвела до зменшення кількості життєздатних клітин протягом перших 4 год та 12 год відповідно. Повне знищення клітин кишкової палички було зареєстровано через 6 годин, тоді як *P. aeruginosa* відновився до початкових рівнів за 48 годин, а клітини *S. aureus* інгібувались протягом перших 12 годин з невеликим збільшенням кількості бактерій (рис. 3.31).

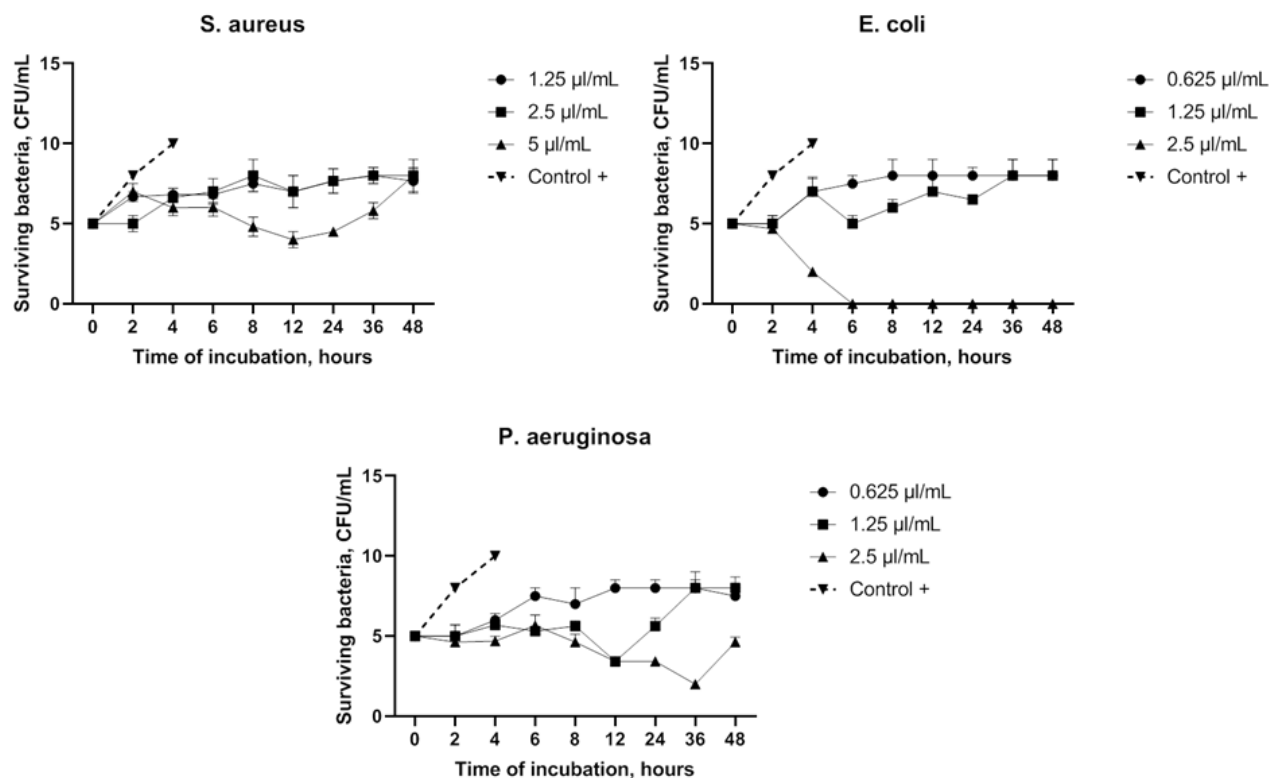


Рисунок 3.31 - Час-залежна антибактеріальна активність наноархітектур срібла відносно полірезистентних клінічних ізолятів

НЧ Cu синтезовані із використанням підходів притаманних «зеленій хімії» демонстрували антибактеріальну активність проти 100% штамів MRSA в концентрації 0,35 мкг / мл.

Антибактеріальна активність Cu / Cu<sub>2</sub>O НЧ, синтезованих із застосуванням поліольного методу, становила 1000 мкг / мл щодо *S. aureus*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*. Для інших бактерій (кишкова паличка, *S. pyogenes*) та *C. albicans* Cu / Cu<sub>2</sub>O NPs був більш активним (125, 250 та 500 мкг / мл відповідно). Обробка частинок ультразвуком покращувала їх антибактеріальну активність в середньому в 2 рази (рисунок 3.32). При змішуванні оброблених ультразвуком НЧ Cu / Cu<sub>2</sub>O та НЧ Ag відмічалось суттєве зменшення МІК срібла та міді.

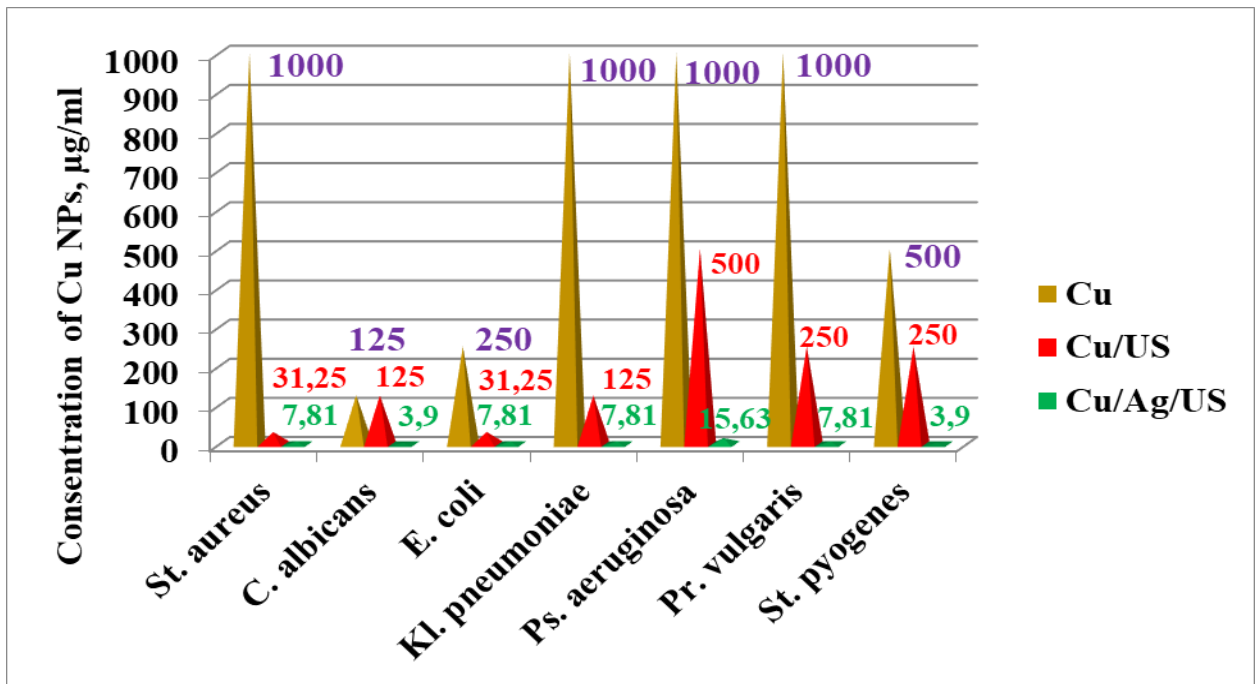


Рисунок 3.32 - Антибактеріальна активність НЧ Cu / Cu<sub>2</sub>O, синтезованих із застосуванням поліольного методу відносно полірезистентних клінічних ізолятів

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. Тетраподи-ZnO виявились більш ефективними проти *S. aureus* (MIC  $1,5 \pm 0,28$  мг/мл) у порівнянні з *E. coli* (ANOVA,  $p \leq 0,0001$ ).

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. 3.33).

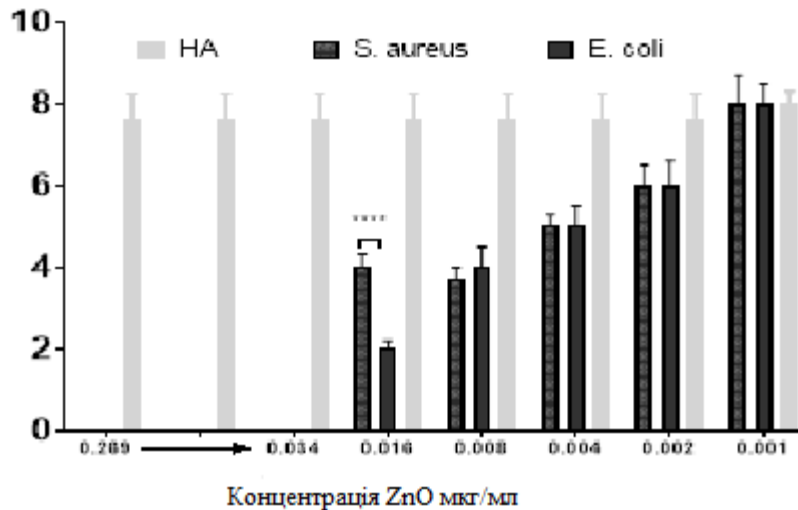


Рисунок 3.33– Антибактеріальна активність ГА-ZnO проти *S. aureus* і *E. coli*

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 ( $p < 0,0001$ ).

Протимікробна ефективність чистого хітозанового гелю та в поєднанні з НЧ срібла, отриманими з використанням «зеленої хімії», була перевірена на референтних та клінічних штаммах *S. aureus* та *E. coli*. МІС чистого хітозану становив 15 мг / мл проти кишкової палички та 20 мг / мл проти *S. aureus*. Хітозан з молекулярною масою 500 кДа експресував більшу антибактеріальну активність порівняно з хітозаном 200 кДа.

Комбінування хітозану з НЧ срібла *in situ* показало вищу антимікробну ефективність композиту порівняно з його чистими формами (табл.3.5).



Таблиця 3.5 – Антибактеріальна активність хітозан-Ag-гелів до метицилін-стійких штамів *S. aureus*

Концентрація хітозану, мкг/мл	Відсоток чутливих штамів/ концентрація Ag, мкг/мл					
	2,4	1,2	0,6	0,3	0,15	0,075
3,3	100 %	100 %	70%	50 %	-	-
5,0	100 %	100 %	90%	50%	20%	10%
6,0	100 %	100 %	100%	100%	70%	30%

Дослідження антимікробної активності суміші Cu-НЧ / хітозанового гелю встановило їх ефективність щодо клінічних штамів MRSA (рис. 3.34) порівняно з антибактеріальною активністю чистих розчинів НЧ Cu та хітозанового гелю взятих окремо.

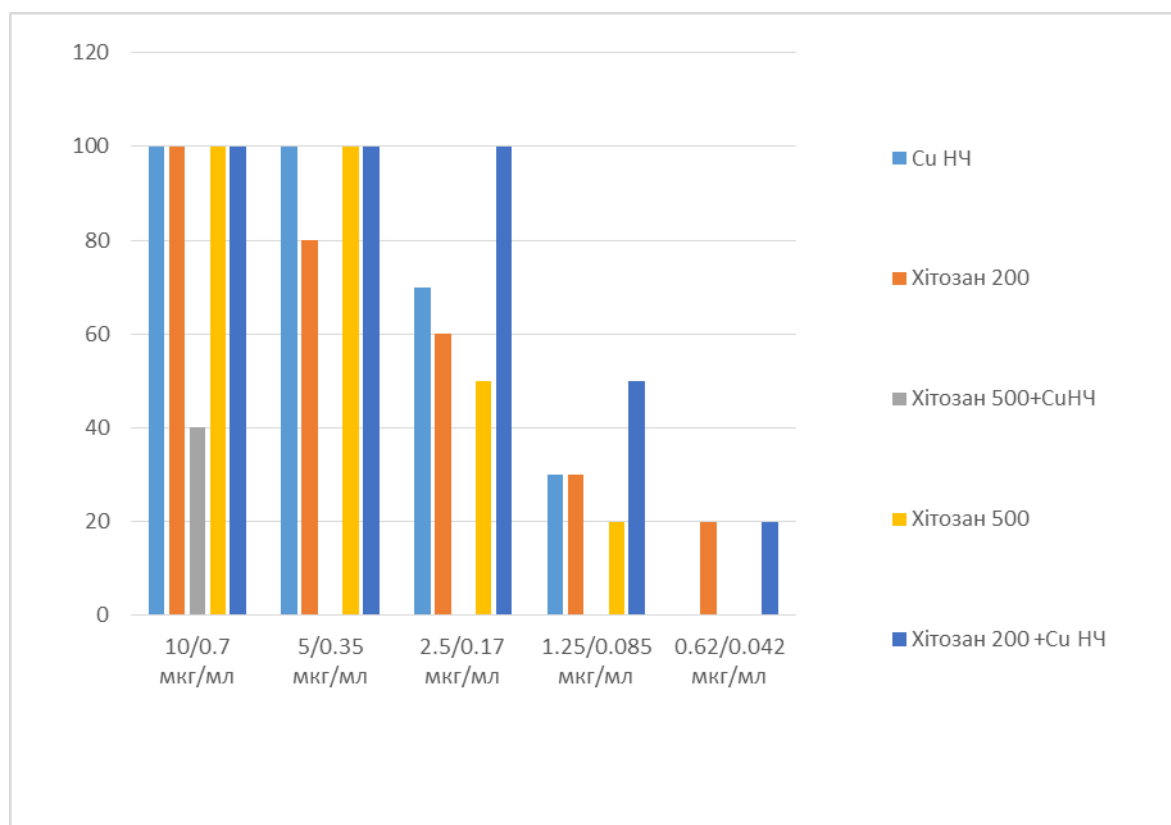


Рисунок 3.34 – Відсоток штамів MRSA чутливих до НЧ Cu, хітозанового гелю та Cu-НЧ-хітозанового гелю

Змішування наночастинок міді з хітозаном молекулярною вагою 200 кДа продемонструвало значно вищу антибактеріальну активність. Отримання таких результатів можна пояснити тим, що низькомолекулярний хітозан демонструє кращу антибактеріальну активність через блокування мРНК всередині бактеріальних клітин, і, ймовірно, Cu НЧ збільшують цей ефект.

Поєднання хітозанового гелю з мікрочастинками T-ZnO та наночастинками міді призводило до суттєвого зростання їх антибактеріальної активності (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.

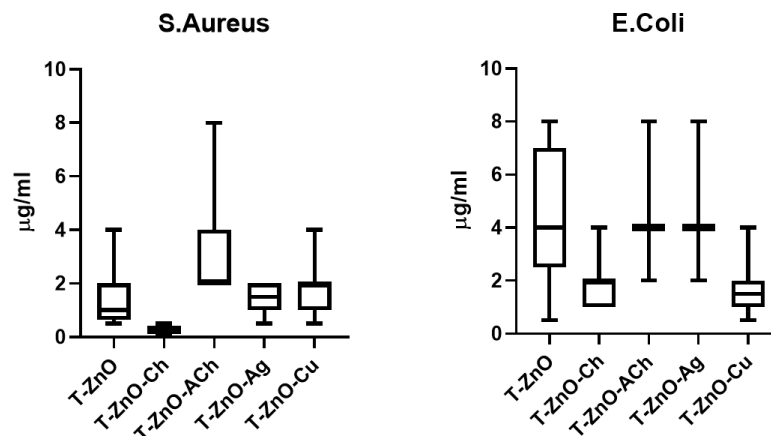


Рисунок 3.35 – MIC композитів T-ZnO і T-ZnO для *S. aureus* та *E. coli*

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.

Для оцінки антибактеріальної активності губок хітозану ми використовували референтні та клінічні мультирезистентні штами *S. aureus* та *E. coli*, *Candida spp.* Антимікробні властивості хітозанових губок, отриманих із використанням різних розчинників, досліджувались на грампозитивних (*S. aureus*) та грамнегативних (*E. coli*) мікроорганізмах. Усі

досліджувані зразки продемонстрували антибактеріальну активність щодо обох типів мікроорганізмів. Узагальнені результати представлені в рис. 3.36

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 викликало повну деконтамінацію поживного середовища вже через 2 год інкубації.

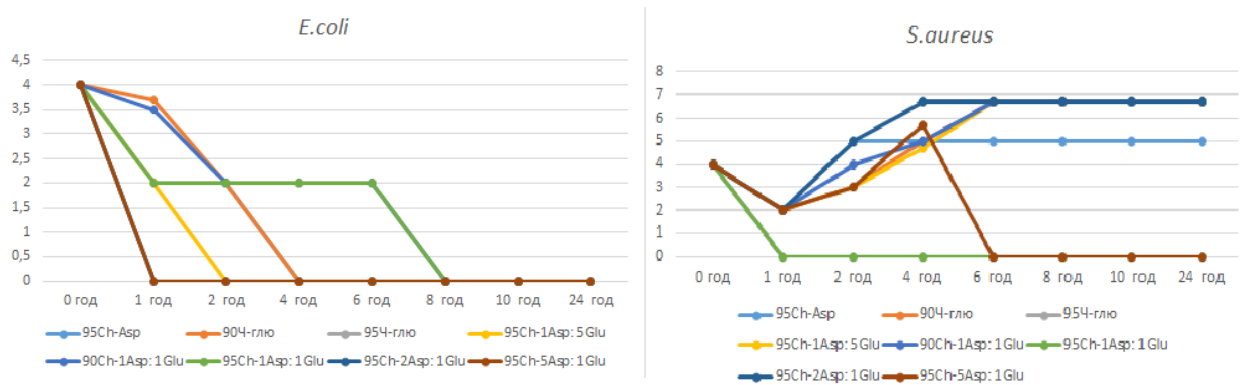


Рисунок 3.36 – Час-залежна антибактеральна активність хітозанових аерогелів відносно грамнегативних та грампозитивних мікроорганізмів

На противагу цьому антимікробна активність досліджуваних хітозанових губок проти *S. aureus* була не такою однозначною. Губки 95 Ch-Glu та 95 Ch-1Asp: 1Glu продемонстрували найкращу бактерицидну дію: відбулась повна деконтамінація 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 закінчилось 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 перші 4 год інкубації було змінено на більш різке зростанням мікробної концентрації у культуральному середовищі з максимальною концентрацією мікроорганізмів після 24 год інкубації.

Антибактеріальна активність губок з хітозан/альгінату щодо *S. aureus* та *E. coli* залежала від концентрації AgNP (рис. 3.37). Чисті зразки хітозан/альгінат губок не виявляли інгібуючої дії на ріст бактерій. Додавання AgNP у концентрації 5-10 мкг/мл (зразки (b)) значно покращує антибактеріальну дію губок Alg / Ch / NaHCO<sub>3</sub> (2: 2: 1), Alg / Ch / NaHCO<sub>3</sub> (1: 3: 1) та Ch / NaHCO<sub>3</sub> (1: 1) проти грамнегативних бактерій та губки Alg / NaHCO<sub>3</sub> (4: 1) проти грампозитивних бактерій. Губка Alg / NaHCO<sub>3</sub> (4: 1) виявляла найбільш помітну антибактеріальну активність як у композиціях (a), так і (b) проти штамів *E. coli*, але додавання хітозану в різній пропорції спричинило незначне зниження антибактеріальної активності. У той же час вплив цієї губки на *S.aureus* був меншим, ніж на грамнегативні бактерії. Включення AgNP у концентрацію зразка (b) забезпечило повне знищення *S. aureus* після культивування цим композитом. Зміна концентрації Alg у композитному матеріалі Ch / Alg призводить до зміни їх антибактеріальної активності. Збільшення концентрації хітозану в композиційному матеріалі призводить до посилення бактерицидної дії.

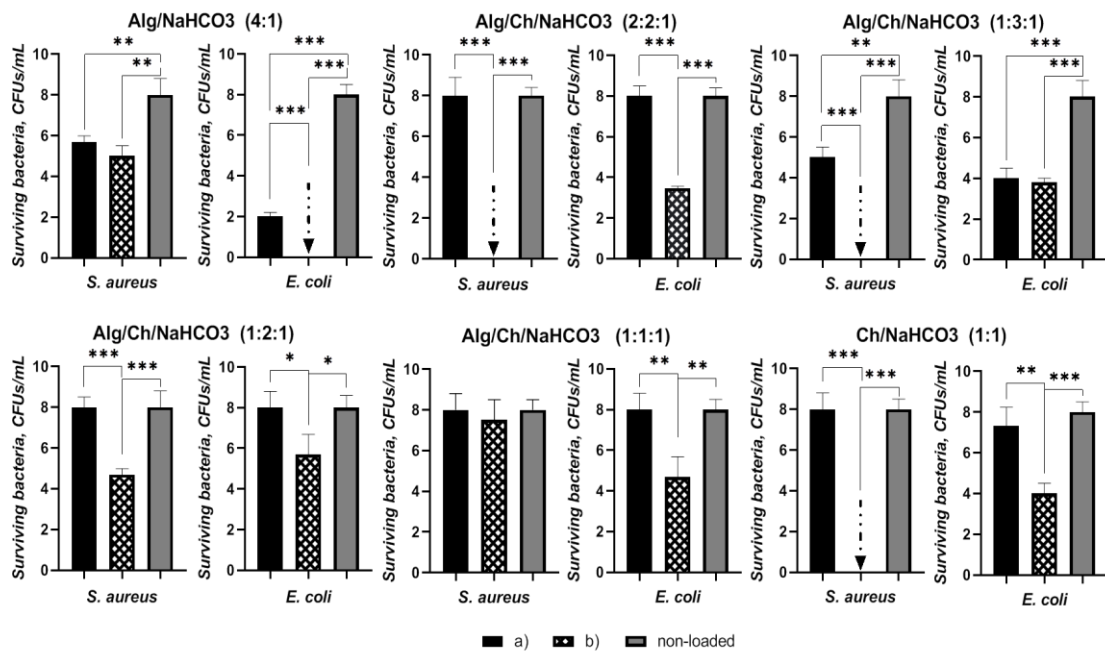


Рисунок 3.37 – Час-залежна антибактеріальна активність хітозан-альгінатних губок з додаванням НЧ срібла

Оцінка антимікробної активності губок, що містили діамантовий зелений (ДЗ), відносно грамнегативних та грампозитивних мікроорганізмів показала їх вищу ефективність порівняно з власною антибактеріальною активністю складових (рис. 3.38). Ch/НІ/ДЗ мав найбільшу ефективність проти обох типів бактерій. Кишкова паличка була більш чутливою до Ch/НІ/Дз, ніж *S. aureus*. Оскільки МІС Ch/НІ/Дз проти кишкової палички був у два-чотири рази менший, ніж проти *S. aureus*.

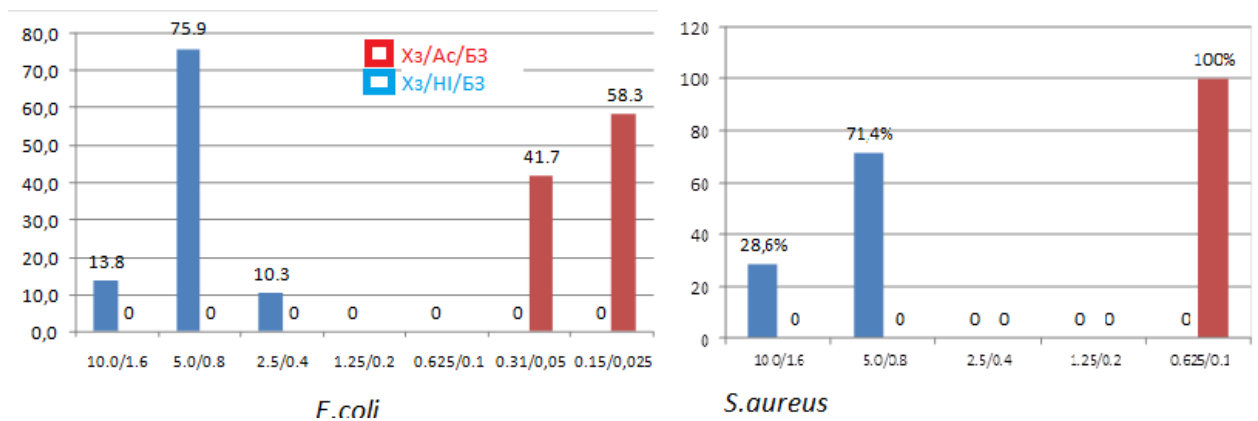


Рисунок 3.38 – Кількість чутливих до ChAsД3 and ChJд3 губок штамів полірезистентних мікроорганізмів при концентрації еквівалентній МІК

Час залежна активність Ch/As/Дз та Ch/НІ/Дз продемонструвала більш швидке зменшення кількості життєздатних клітин кишкової палички протягом однієї години інкубації. Кількість життєздатних клітин *S. aureus* була стабільною протягом перших 5 годин, а потім знизилася до нуля до 24 годин.

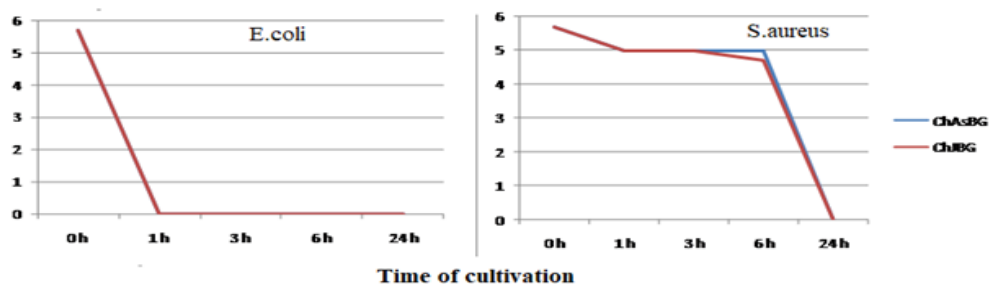


Рисунок 3.39 – Час-залежна антибактеріальна активність ChAsД3 and ChJд3 губок відносно полірезистентних мікроорганізмів при МІК

Вивчення антимікробної активності ChJ та ChJ/НЧ срібла встановило, що всі мікроорганізми були чутливими до означених речовин. Отримане значення МІК показало, що сумісне використання цих речовин призводить до синергічного підсилення їх дії. Найбільшу ефективність композиції демонстрували по відношенню до грибів. Ніяких відмінностей у протимікробній активності йодистого хітозану та йодистого хітозану з Ag не було встановлено.

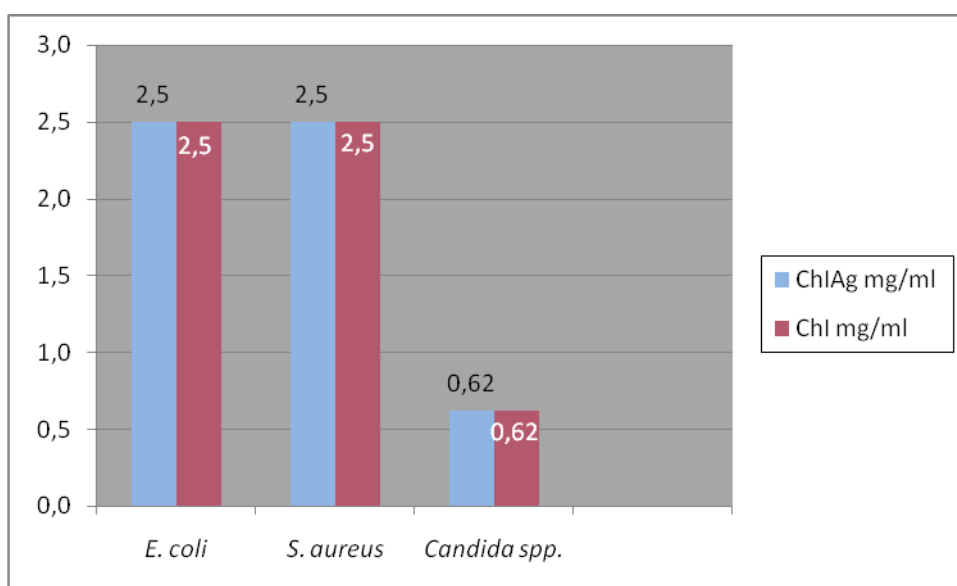


Рисунок 3.40 – МІК для ChJ та ChJ/Ag НЧ губок відносно полірезистентних мікроорганізмів

Вивчення час-залежної антимікробної активності ChJ та ChJ /НЧ срібла показало поступове зменшення кількості життєздатних клітин *E. coli* та *Candida spp.* до 0 log<sub>10</sub> КУО / мл через 1 год. У той же час, кількість *S. aureus* зменшувалася повільніше і досягала 0 log 10 КУО / мл через 3 години інкубації.

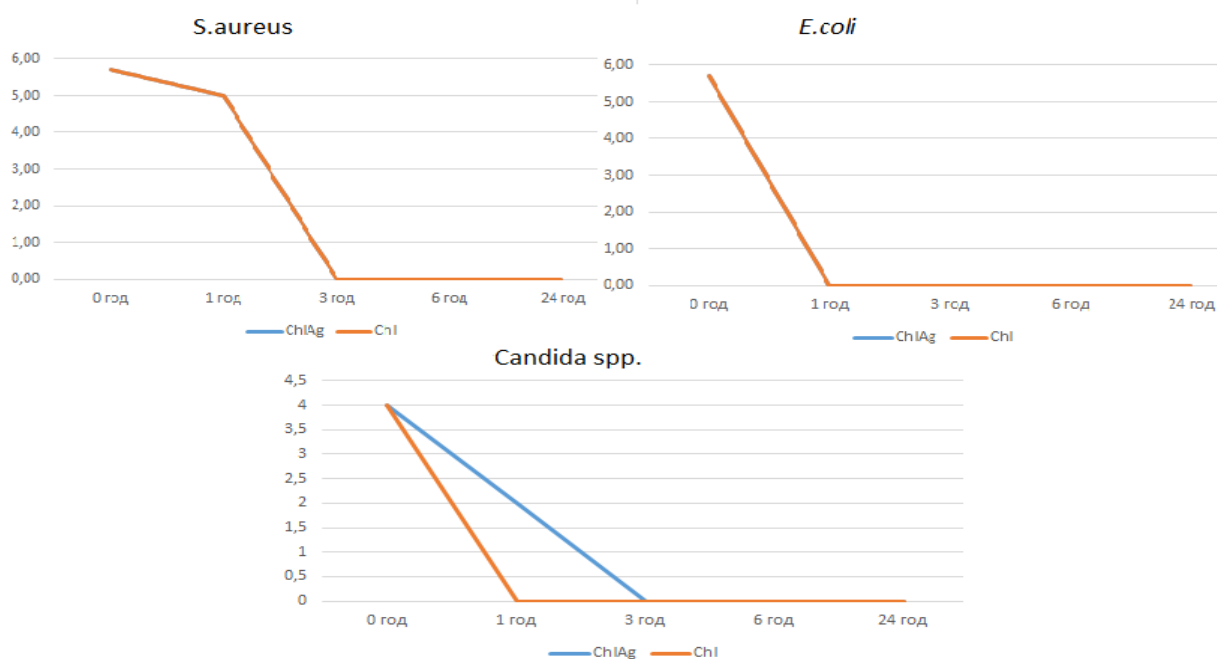


Рисунок 3.41 – Час-залежна антимікробна активність ChJ та ChJ/Ag НЧ губок відносно полірезистентних мікроорганізмів

З метою визначення впливу наночастинок срібла на антимікробну ефективність мембран хітозану проти грамнегативних (*E. coli*) та грампозитивних (*S. aureus*) бактерій ми провели дослідження антибактеріальної активності експериментальних зразків (рисунок 3.42).

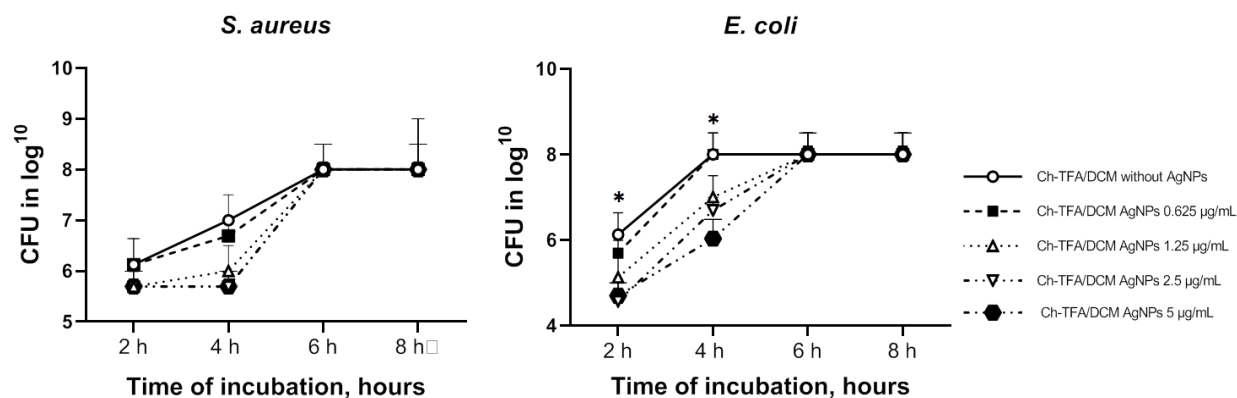


Рисунок 3.42 – Час-залежна антимікробна активність мембран хітозану відносно полірезистентних мікроорганізмів

За результатами бактеріологічного дослідження включення наночастинок срібла в мембрани Ch-TFA / DCM спричинило збільшення їх антимікробної активності щодо обох досліджуваних мікроорганізмів. Більше того, була помітна динаміка швидкості скорочення (табл. 6) загальної кількості *S. aureus* та *E. coli*, інкубованих з мембранами Ch-TFA / DCM.

Таблиця 3.6 – Швидкість зменшення загальної кількості *S. aureus* та *E. coli* залежно від часу інкубації з мембранами Ch-TFA / DCM (КУО,%.).

Склад Ch-TFA/DCM мембран	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	Час інкубації (год)			
	2	4	2	4
Ch-TFA/DCM	25.0±6.25	12.5±6.25	25±6.25	0
Ch-TFA/DCM +Ag НЧ 0.625 µg/mL	25.0±6.25	16.3±3.75	28.8±3.75	0
Ch-TFA/DCM +Ag НЧ 1.25 µg/mL	28.8±3.75	25±3.75	37.5±6.25	12.5±6.25
Ch-TFA/DCM +Ag НЧ 2.5 µg/mL	28.8±3.75	28.8±3.75	41.3±3.75	16.3±3.75
Ch-TFA/DCM +Ag НЧ 5,0 µg/mL	28.8±3.75	28.8±3.75	41.3±3.75	25±6.25

Через 4 години спільного культивування м/о з мембранами, що містять Ag НЧ, швидкість зменшення кількості *S. aureus* була порівняно вищою, ніж для *E. coli*. Тривале спільне культивування супроводжувалось втратою антимікробної активності мембран і через 6 год та 8 год культивування кількість м/о зростала до 8 log<sub>10</sub> (R = 0).

Порівняльний аналіз антимікробної активності плівок та аерогелів хітозану проти *E. coli* та *S. aureus* встановив, що хітозанові плівки мали нижчу інгібуючу здатність порівняно з аерогелями. Ми виявили, що хітозанові аерогелі проявляли тривалу антибактеріальну активність проти кишкової палички, що призводило до повного пригнічення росту через 24 години інкубації, у той же час дослідні зразки пригнічували ріст *S. aureus* лише в перші 2 години інкубації.



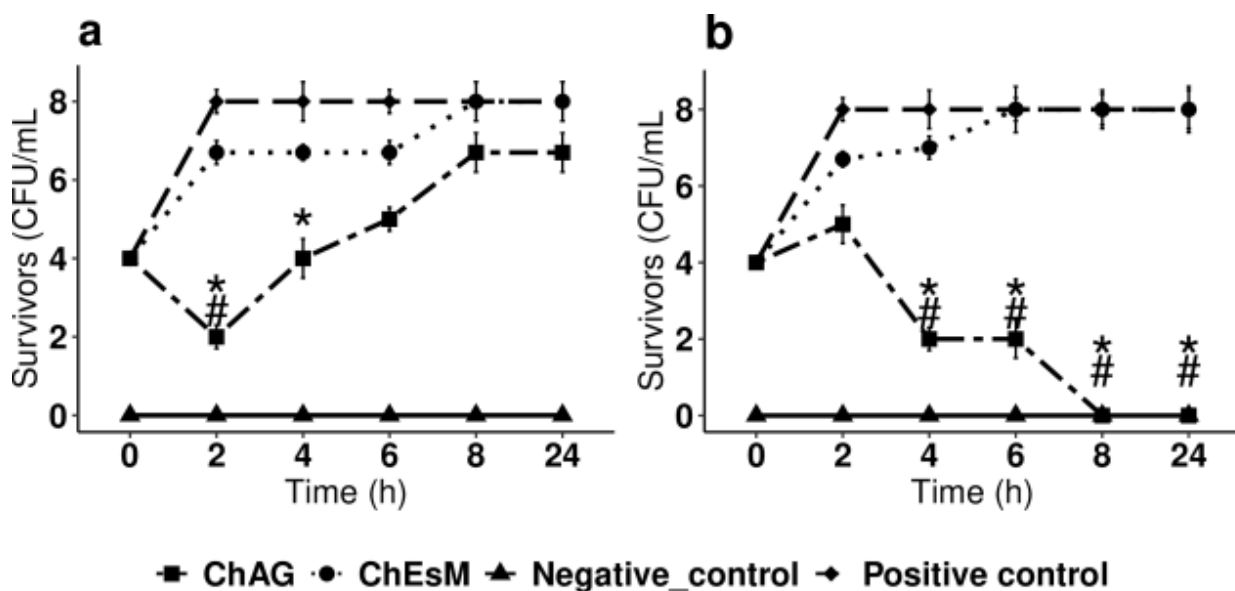


Рисунок 3.43 – Час-залежна антимікробна активність хітозанових аерогелів та хітозанових мембран відносно полірезистентних мікроорганізмів

Здатність наносрібла попереджувати утворення та руйнувати вже сформовані біоплівки було вивчено на клінічних штаммах *E. faecalis*, *S. aureus*, *Acinetobacter spp.*, *K. ozenae*. Отримані дані свідчать, що наночастинки срібла ефективно пригнічують формування біоплівок, утворених *E. faecalis* на ранніх етапах, та впливали на сформовану 3-х добову біоплівку (рис.3.44). При цьому інгібуюча дія була дозозалежна та зростала зі збільшенням концентрації.

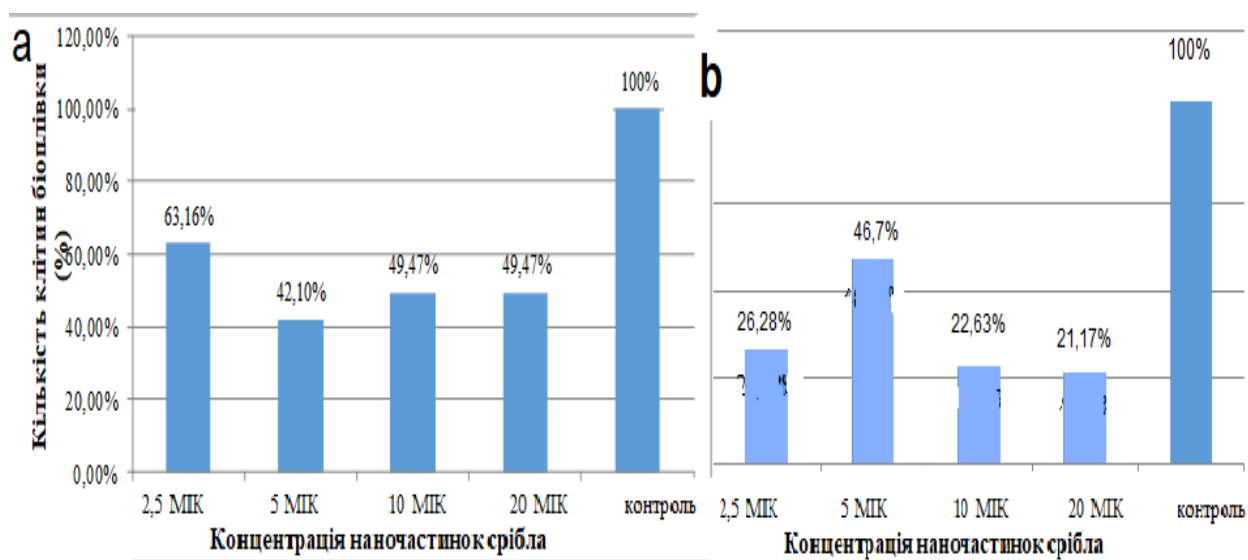


Рисунок 3.44 – Вплив НЧ срібла на об'єм біоплівки *E. faecalis* сформованої біоплівки (3 b), та біоплівки, яка формується (3a).

Дослідження антимікробної активності наносрібла показало його дієвість на ранніх етапах формування біоплівки *S. aureus*, *Acinetobacter spp.*, *K. ozenae* та дозозалежність ефекту.

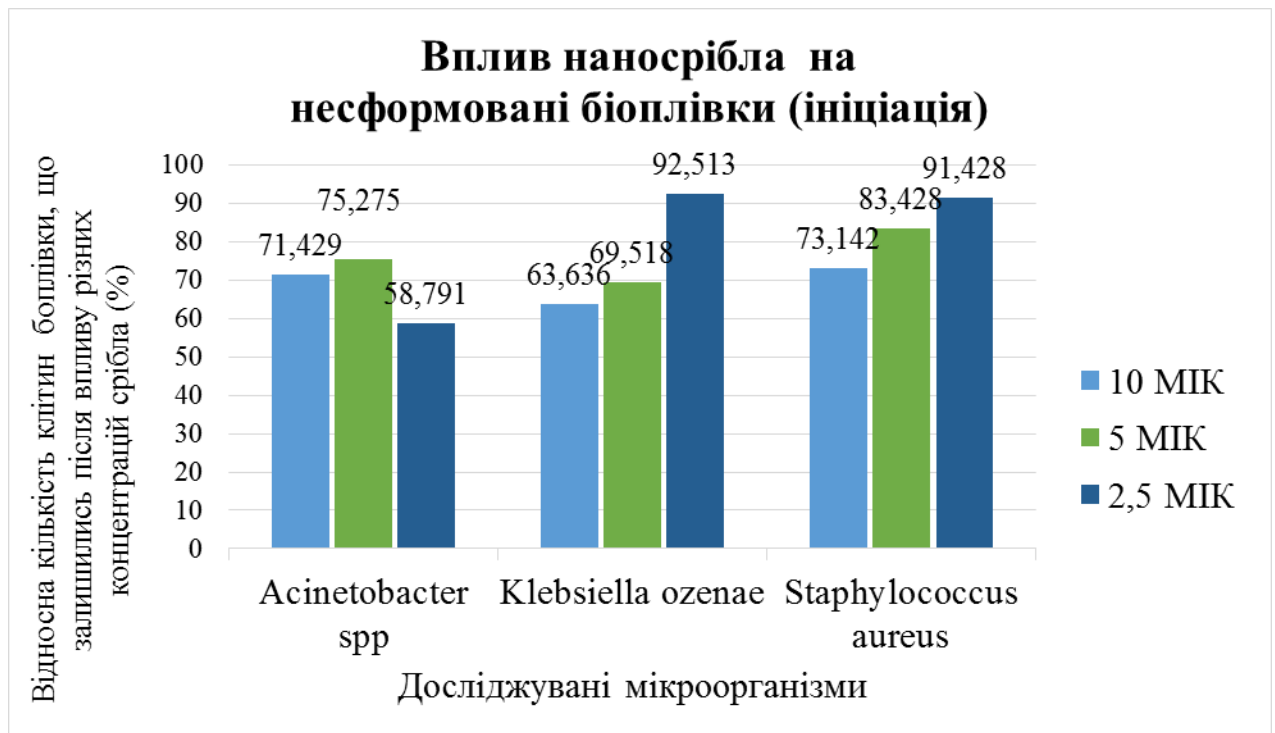


Рисунок 3.45 – Вплив НЧ срібла на об'єм біоплівки, яка формується

Дія колоїдного срібла у застосованих нами концентраціях на більш пізніх стадіях формування біоплівки (3 та 7 доба) по відношенню до *K. ozenae* є менш ефективною – відмічається зростання біомаси клітин ( $p \leq 0.05$ ), та не залежала від концентрації срібла. У той же час, дія колоїдного наносрібла на *S. aureus* та *Acinetobacter spp.* на 3 та 7 добу була ефективнішою, ніж на початковій стадії ( $p \leq 0.05$ ). Така відмінність може бути обумовлена особливостями структурного та хімічного складу біоплівки, сформованих різними видами мікроорганізмів.

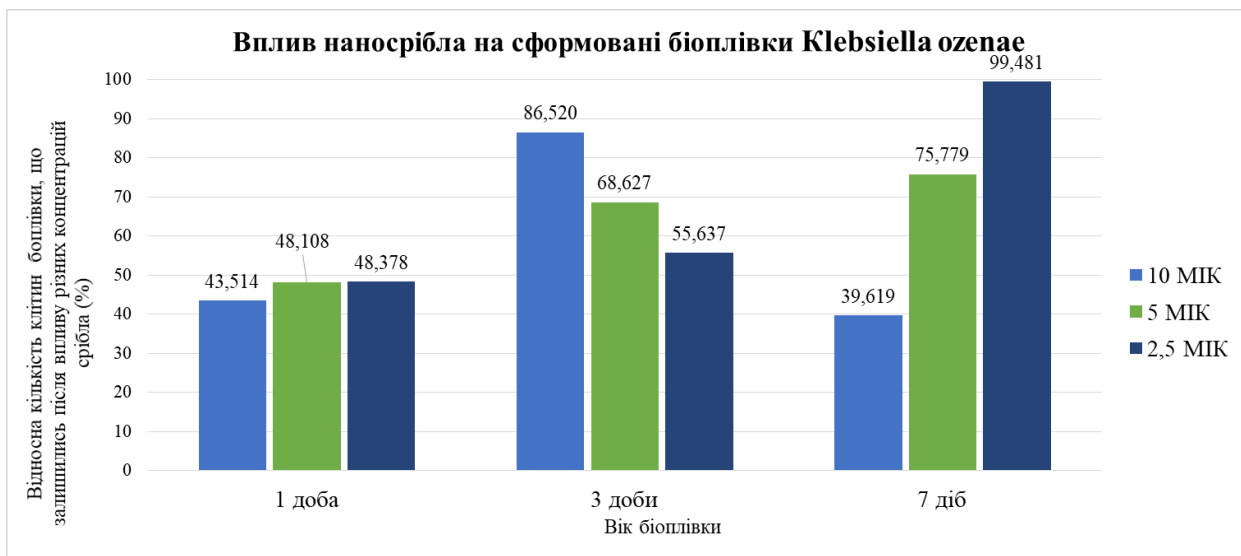
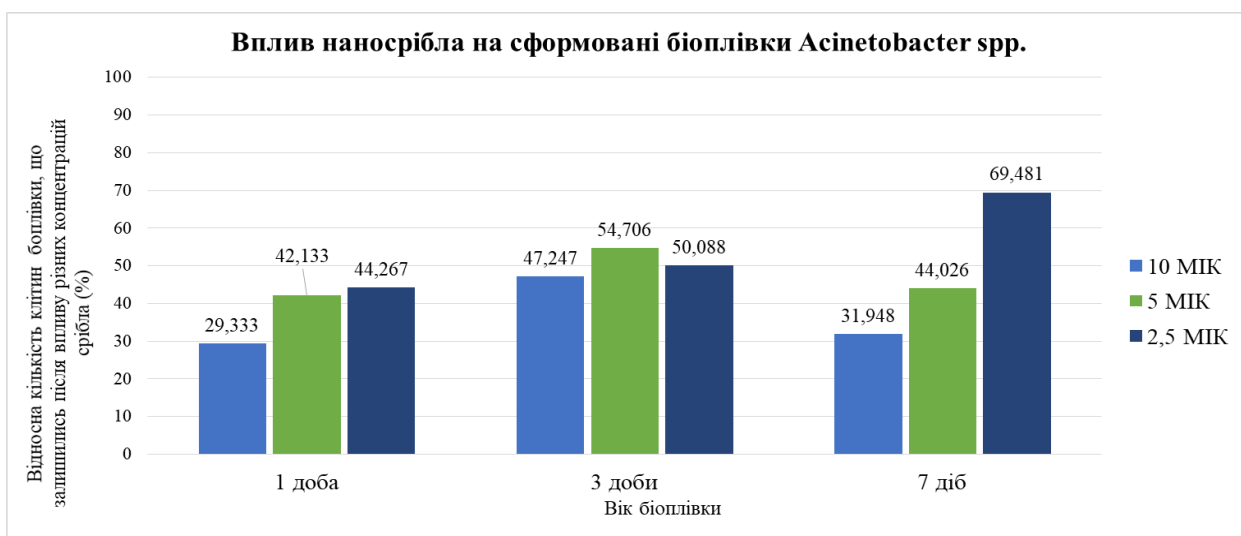
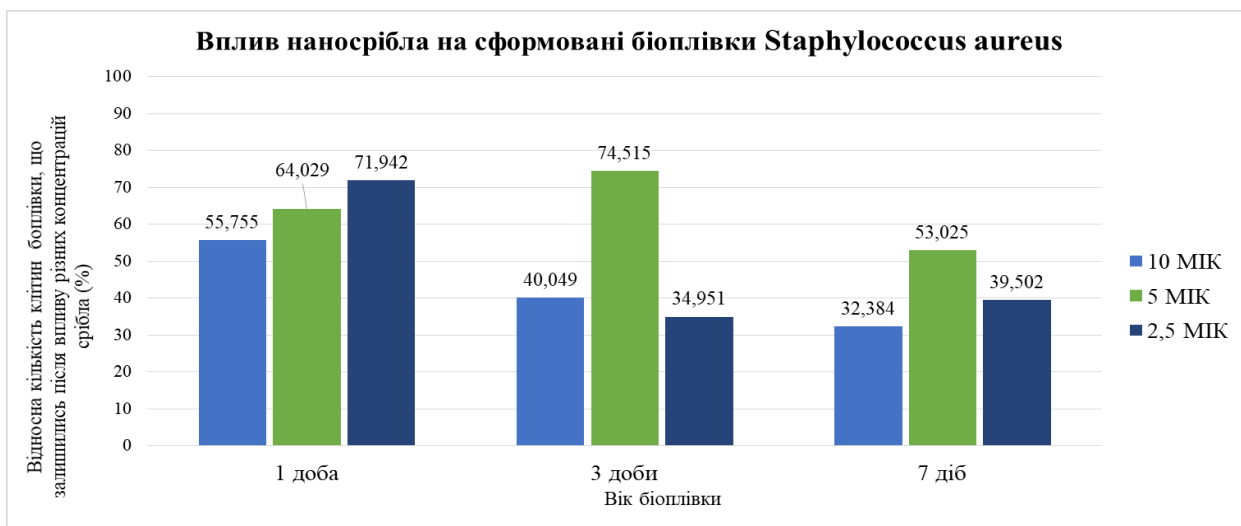


Рисунок 3.46 – Вплив НЧ срібла на об'єм біоплівки сформованої біоплівки

Особливості впливу досліджуваних наночасточок AgNPs та CuNPs на морфологію грамнегативних мікроорганізмів було досліджено із використанням скануючого електронного мікроскопа. Результати представлено на рисунках 3.47 та 3.48. Як показано на рис. 3.47, клітини групи контролю мали паличкоподібну форму, гладку поверхню та неушкоджену клітинну стінку.

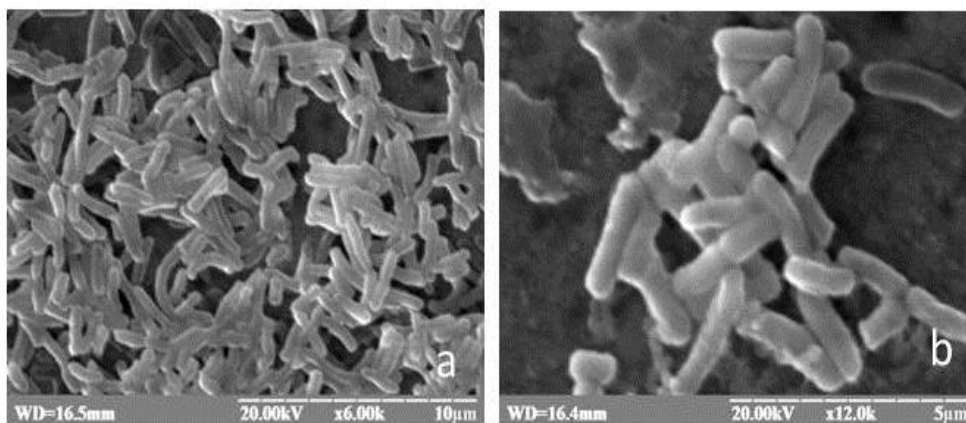


Рисунок 3.47 – Скануюча електронна мікроскопія *K. pneumoniae* (a) та *E. coli* (b)

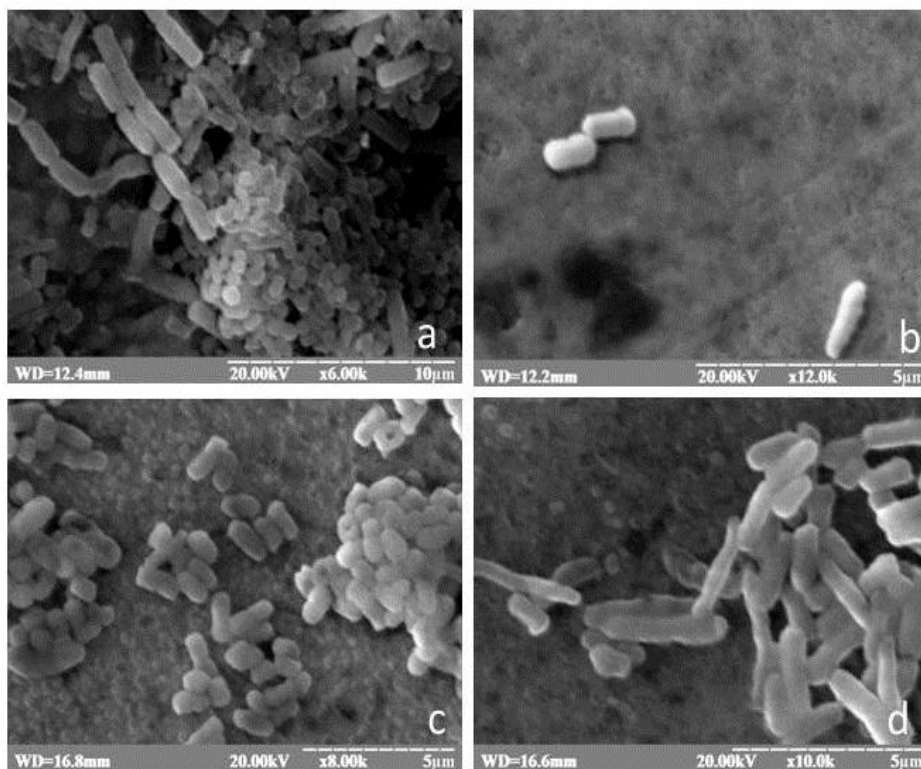


Рисунок 3.48 – Скануюча електронна мікроскопія *K. pneumoniae* за наявності Cu NPs (a), Ag NPs (b) та *E. coli* у присутності Cu NP (c), Ag NPs (d)

У той же час морфологія мікроорганізмів, оброблених НЧ (рис. 3.48), 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. 3.47) відображають особливості зміни морфології бактеріальних клітин під впливом нанометалів. Як це відображено в таблиці 3.7 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 3.7 – Зміни морфометричних показників грамнегативних мікроорганізмів під впливом наночастинок

	<i>K. pneumoniae</i>		<i>E. coli</i>	
	Товщина (мкм)	Довжина(мкм)	Товщина (мкм)	Довжина (мкм)
Контроль	0.4413±0.0571	1.9994±0.6219	0,4916±0.0708	1,9350±0,3904
NPs Cu	0.3272±0.0939	0.8028±0.1705	0,5947±0,1119	1,0665±0,3665
NPs Ag	0.5073±0.0737	1.2652±0.2665	0,5060±0,0881	1,8103±0,6829
	Радіус(мкм)	Об'єм (мкм <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>	Радіус (мкм)	Об'єм (мкм <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>
Контроль	0.2479±0.0352	0.3561±0.001712	0,2770±0,0539	0,4371±0,0018
NPs Cu	0.3272±0.0341	0.1041±0.001495	0,3292±0,0388	0,4179±0,0041
NPs Ag	0.2423±0.0407	0.3208±0.001368	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  $1,2652 \pm 0,2665$  мкм. Крім того, після інкубації *K. pneumoniae* з Ag NPs було виявлено значне зменшення кількості бактерій.

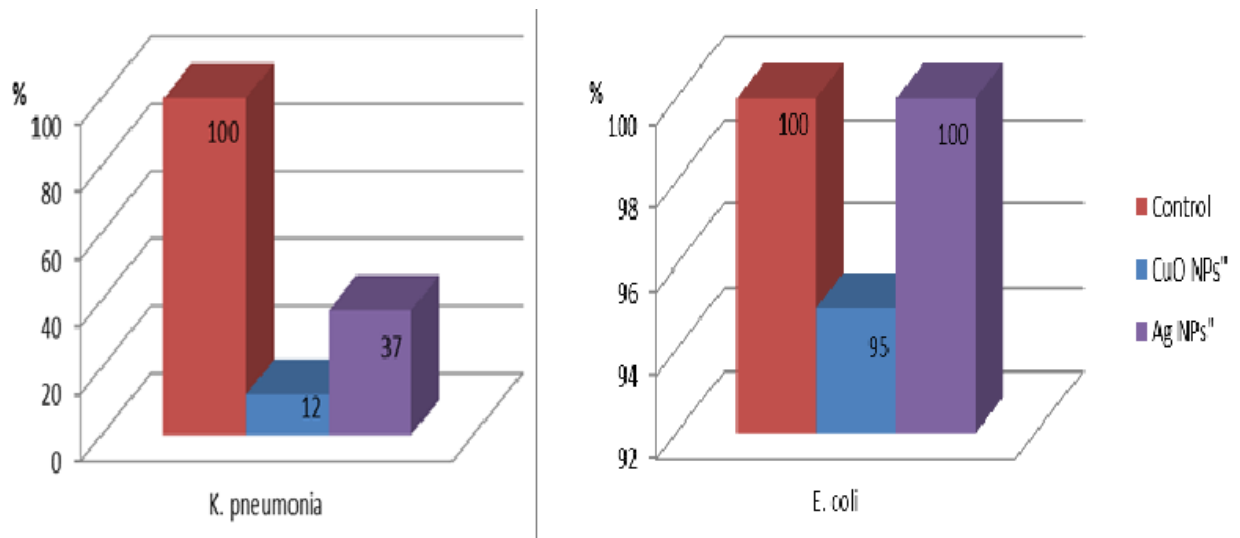


Рисунок 3.49 – Зміни об'ємів клітин бактерій експериментальних груп порівняно з контролем

Аналогічні зміни були виявлені після інкубації *E. coli* з Cu NP. Бактерії стали коротшими, ніж у контрольній групі (довжина  $1,0665 \pm 0,3665$  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. 3.48). Крім того, виявлено зменшення об'єму клітин *K. pneumoniae*.

### 3.5 Дослідження in-vitro впливу НЧ, хітозану та їх композитів на соматичні клітини

Токсичність AgНЧ, синтезованих поліольним методом, мала дозозалежний ефект – концентрації 3,2 та 6,4 мкг / мл AgНЧ були абсолютно токсичними через 24 години після посіву клітин (рис. 3.50).

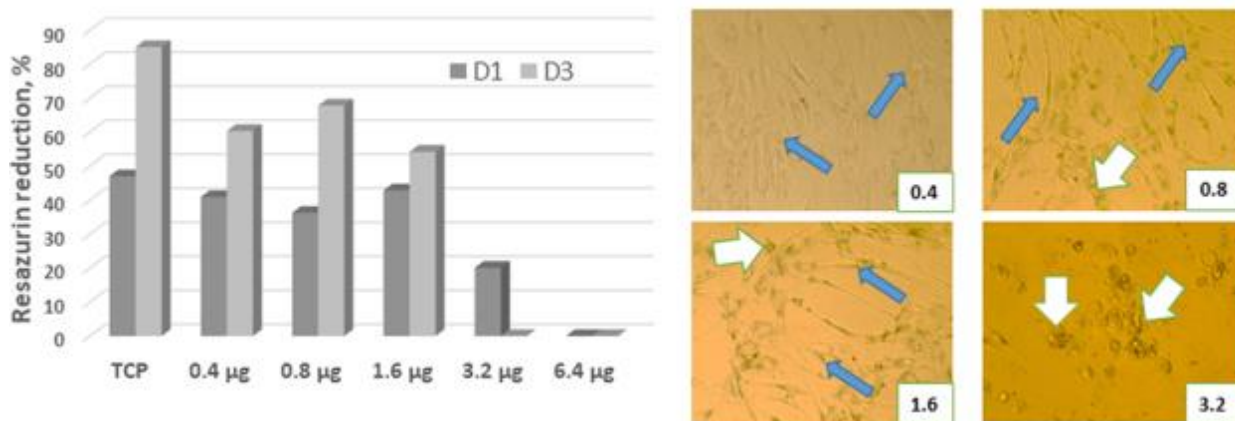


Рисунок 3.50 – Цитотоксична активність НЧ срібла, синтезованих поліольним методом.

Цитотоксичність НЧ срібла синтезованих, із застосуванням UV-реактора, також мала дозозалежний ефект (рис 3.51). За весь час спостереження (3 доби) НЧ Ag у концентрації 5 і 10 мкг / мл забезпечувався м'який цитотоксичний ефект, тоді як концентраціях 20 та 40 мкг / мл була токсичною. Це демонструє безпеку застосування НЧ Ag у концентрації, що не перевищує 10 мкг / мл.

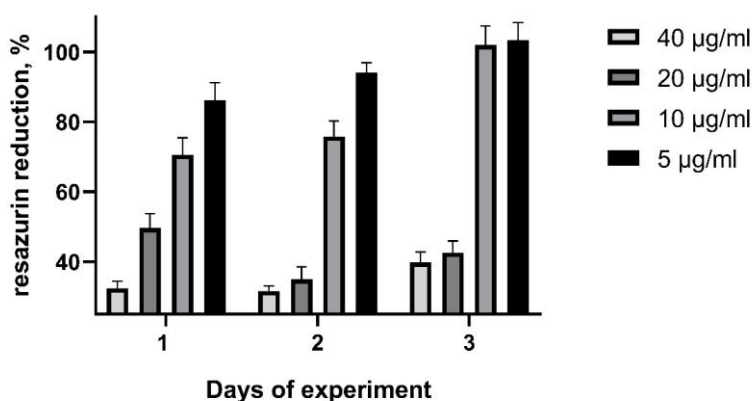


Рисунок 3.51 – Відсоток живих фібробластів упродовж 3 добового сумісного культивування з НЧ Ag в різних концентраціях ( від 5 до 40 мкг/мл)

Оцінку цитотоксичності наноархітектурних частин проводили, використовуючи концентрацію AgNA у 2-10 разів більше МІК. Концентрації AgNA від 5 до 20 мкг / мл не мали суттєвого цитотоксичного впливу на

соматичні клітини, що підтверджено як їх біохімічною активністю так і морфологією (рис. 3.52). Більшість клітин мали типову морфологію та проліферативну активність. Цитоплазма деяких клітин містила зерноподібні структури, які, ймовірно, можуть бути пов'язані з інтерналізацією AgNA.

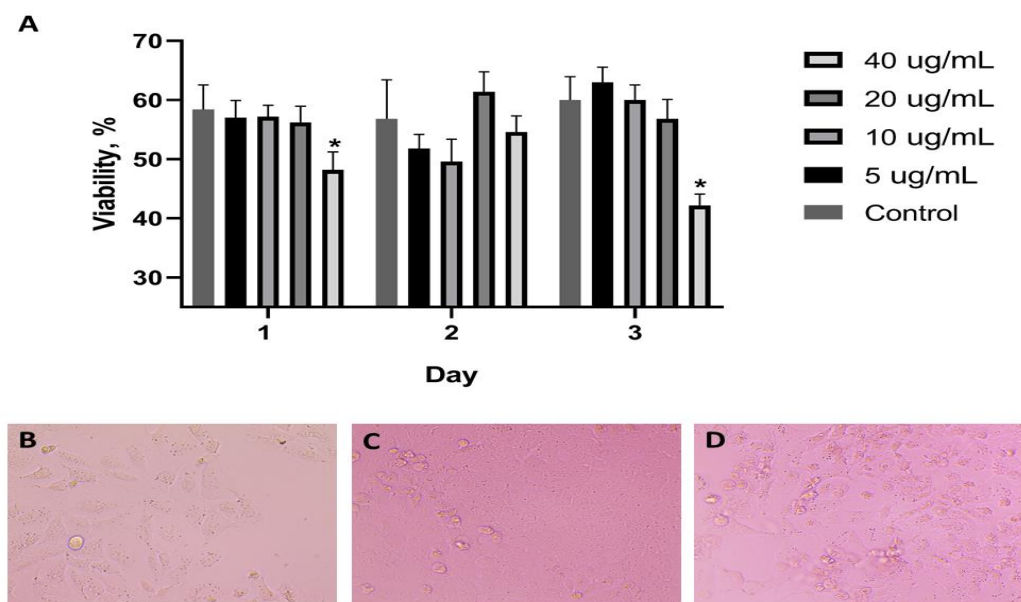


Рисунок 3.52 – Життєздатність U2OS (A), оцінена за допомогою аналізу відновлення резаурину протягом 3 днів після впливу AgNA в концентраціях від 5 до 40 мкг / мл. B-D) Оцінка морфології клітин через 1, 2 та 3 дні після впливу 20 мкг / мл AgNA.

Дослідження клітинної токсичності T-ZnO та їх комбінацій з іншими НЧ та хітозаном встановило наявність сильної залежності токсичного впливу від концентрації T-ZnO та типу хітозану (мал. 3.53). Чистий T-ZnO втратив клітинну токсичність у концентрації нижче 1 мг/мл. Додавання хітозану з оцтовим буфером збільшує токсичність клітин, і приблизно 50% клітин загинули в присутності 1 мг / мл розчину T-ZnO-Ch. У цьому ж випадку, водорозчинний хітозан підвищує життєздатність клітин протягом 72 год культивування - всі концентрації T-ZnO від 0,5 до 8,0 мг/мл не виявляють клітинної токсичності. Додавання наночастинок Ag та Cu не впливало на життєздатність клітин.



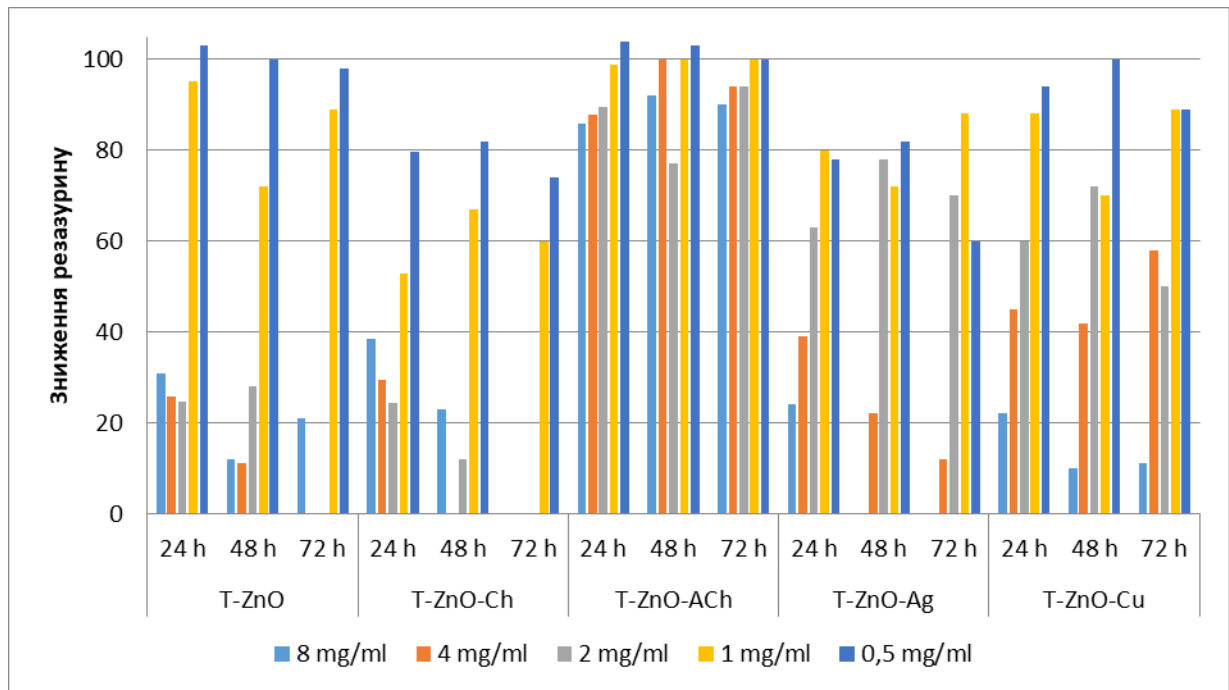


Рисунок 3.53 – Життєздатність фібробластів (аналіз зниження активності резазурину) за 24, 48 та 72 години культивування у присутності тетраподів-ZnO.

Вивчення цитотоксичності хітозан/альгінатних губок показало, що клітини активно розмножуються до 3-го дня експерименту з помірною токсичністю у зразках, завантажених НЧ Ag. Слід зазначити, що зразки з високим вмістом хітозану демонструють значно меншу токсичність порівняно з чистими альгінатом та зразками Alg / Ch / NaHCO<sub>3</sub> (2: 2: 1). Усі експериментальні зразки не продемонстрували токсичності для клітин на 7 день із задовільною швидкістю проліферації U2OS. Ми не виявили суттєвої різниці між експериментальними групами (крім незначної різниці в підгрупі Alg / Ch / NaHCO<sub>3</sub> (1: 2: 1) b). Губки Alg / NaHCO<sub>3</sub> (4: 1), переважно розчинені в середовищі DMEM до 7-го дня, але продукти розкладання не впливали на ріст клітин.

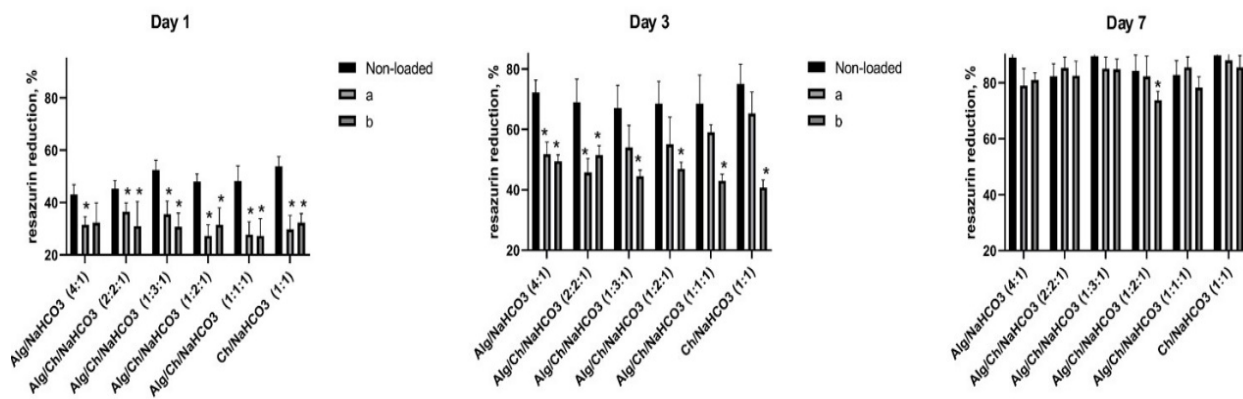


Рисунок 3.54 – Життєздатність U2OS клітин (аналіз зниження активності резазурину) за 24, 72 та 168 години культивування у присутності Alg / Ch /Ag НЧ губок

Клітини, культивовані на ненавантажених НЧ срібла мембранах хітозану протягом 7 днів, продемонстрували приблизно в 2 рази вищу життєздатність, ніж у 1 день. Однак виявлено, що життєздатність клітин на зразках, завантажених сріблом, була вищою в динаміці вирощування. Ці дані свідчать про те, що інтенсивність проліферації клітин після клітинного прикріплення корелювала із наявністю НЧ Ag, але не залежала від концентрації срібла.

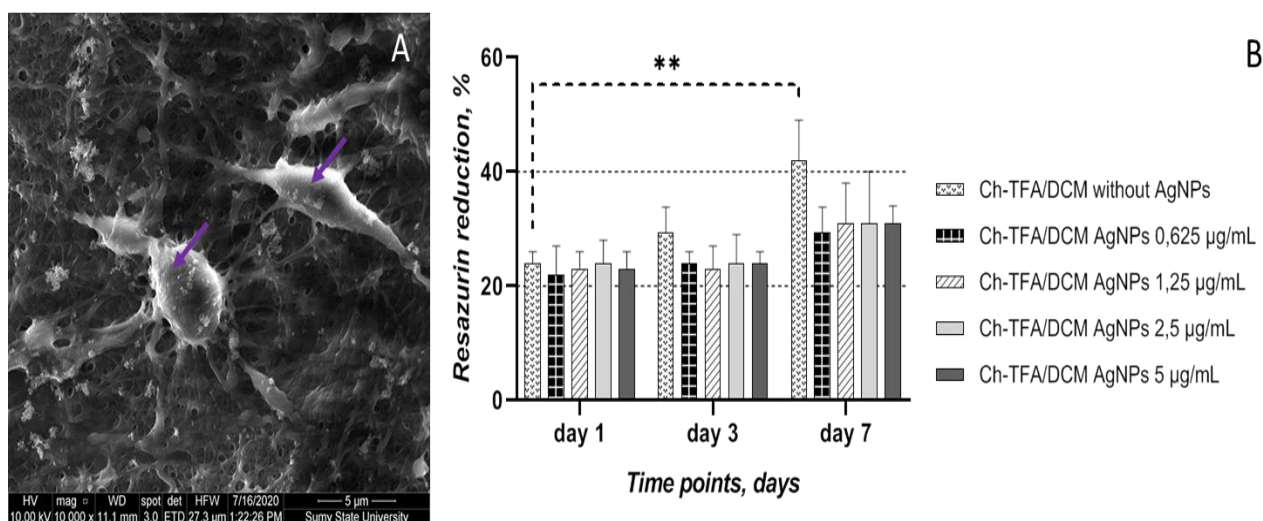


Рисунок 3.55 – SEM клітин U2OS на поверхні мембран хітозану з максимальною кількістю НЧ Ag через 7 днів після висівання клітин (A), фіолетові стрілки вказують на клітини. (B), \*\* p <0,01

**Порівняльний** аналіз цитотоксичності плівок та аерогелів хітозану продемонстрував однакову адгезію клітин до обох біоматеріалів у перший день дослідження та збільшення кількості клітин з 3-го дня культивування. Тим не менше, швидкість проліферацію клітин на хітозанових плівках була значно вищою ( $p < 0,05$ ) на 3 та 7 день.

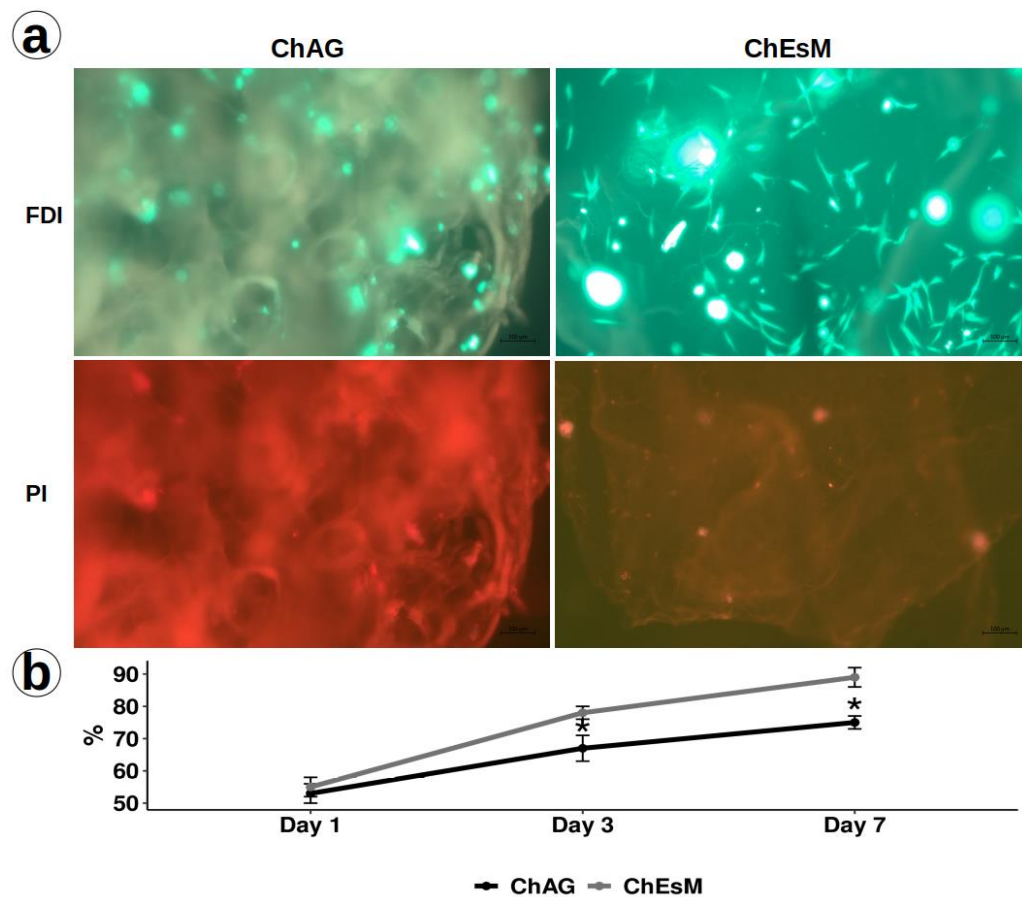


Рисунок 3.56 – SEM клітин U2OS на поверхні мембран та аерогелів хітозану упродовж 7 днів співкультивування

### 3.6 Дослідження впливу НЧ срібла на перебіг гнійної ранової інфекції під час проведення експериментальної топічної терапії

Експериментальне лікування із використанням НЧ срібла синтезованих поліоліним метолом та ультразвуку показало, що

стандартна терапія хлоргекседином призвела до повної епітелізації рани через  $21,2 \pm 0,7$  доби. В групах, де лікування ран відбувалося із застосуванням НЧ Ag, УЗ та НЧ Ag / УЗ повне заживлення відбувалося через  $15,0 \pm 0,6$ ,  $12,1 \pm 0,1$  та  $9,9 \pm 0,5$  доби. Гістологічні зміни на 1 день в області рани та навколишніх тканин були майже однаковими у всіх групах. На 3 день у контрольній групі спостерігалась некротично-запальна реакція, набряк дерми, тромбоз судин та дифузна лейкоцитарна інфільтрація (рис. 3.57).

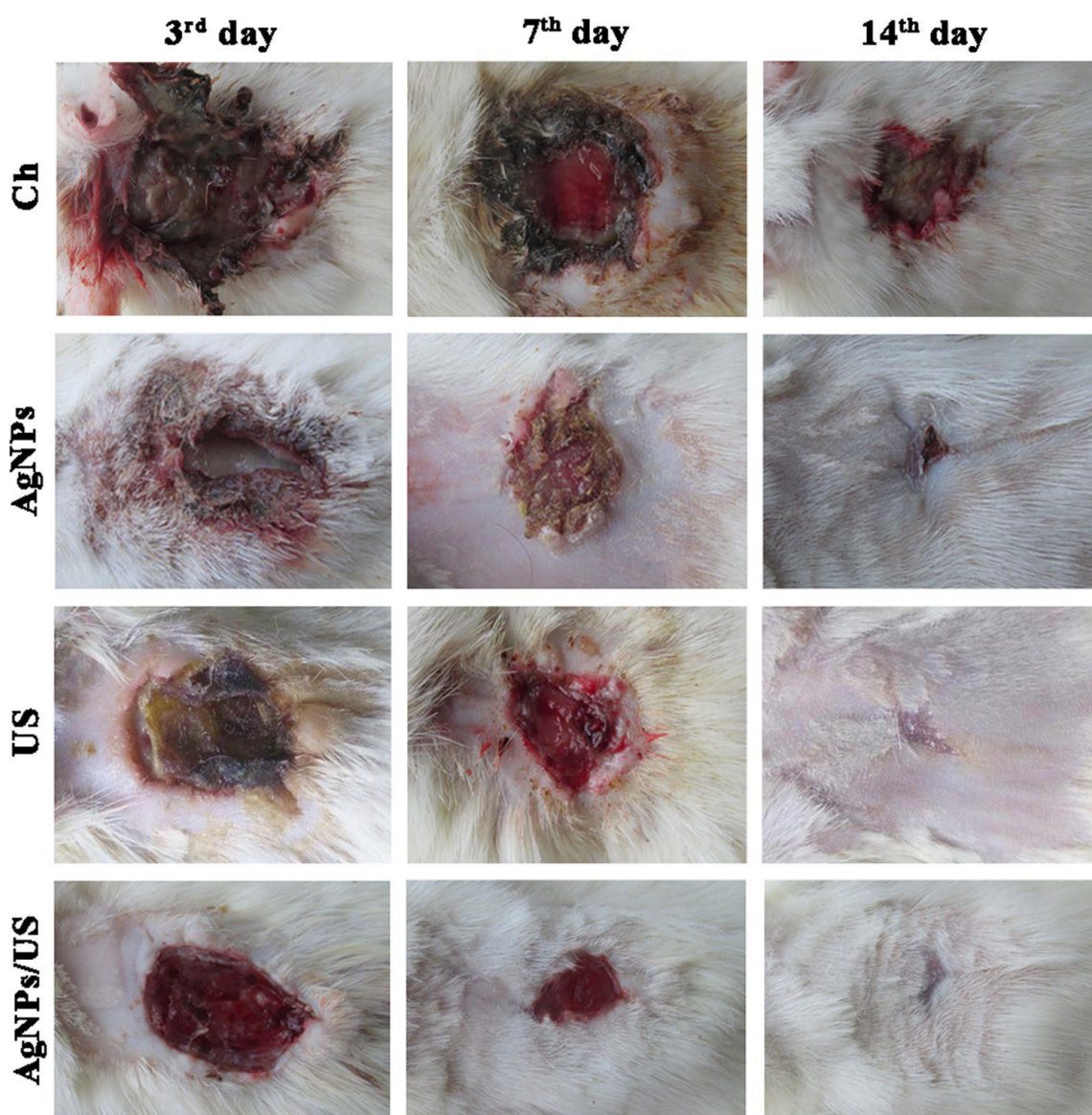


Рисунок 3.57 – Фото ран у тварин із різних експериментальних груп на 3, 7 та 14 день лікування

Регенерація ран розпочалася раніше ніж у контролі групи і характеризувалася швидким скороченням дистрофічно-некротичних змін та запальна реакція, кращі якісні та кількісні параметри в мікроциркуляції судини, розширення грануляційної тканини з більш значним інтенсивним дозріванням та більш раннім відновленням епітелію та повним закриттям раневого дефекту.

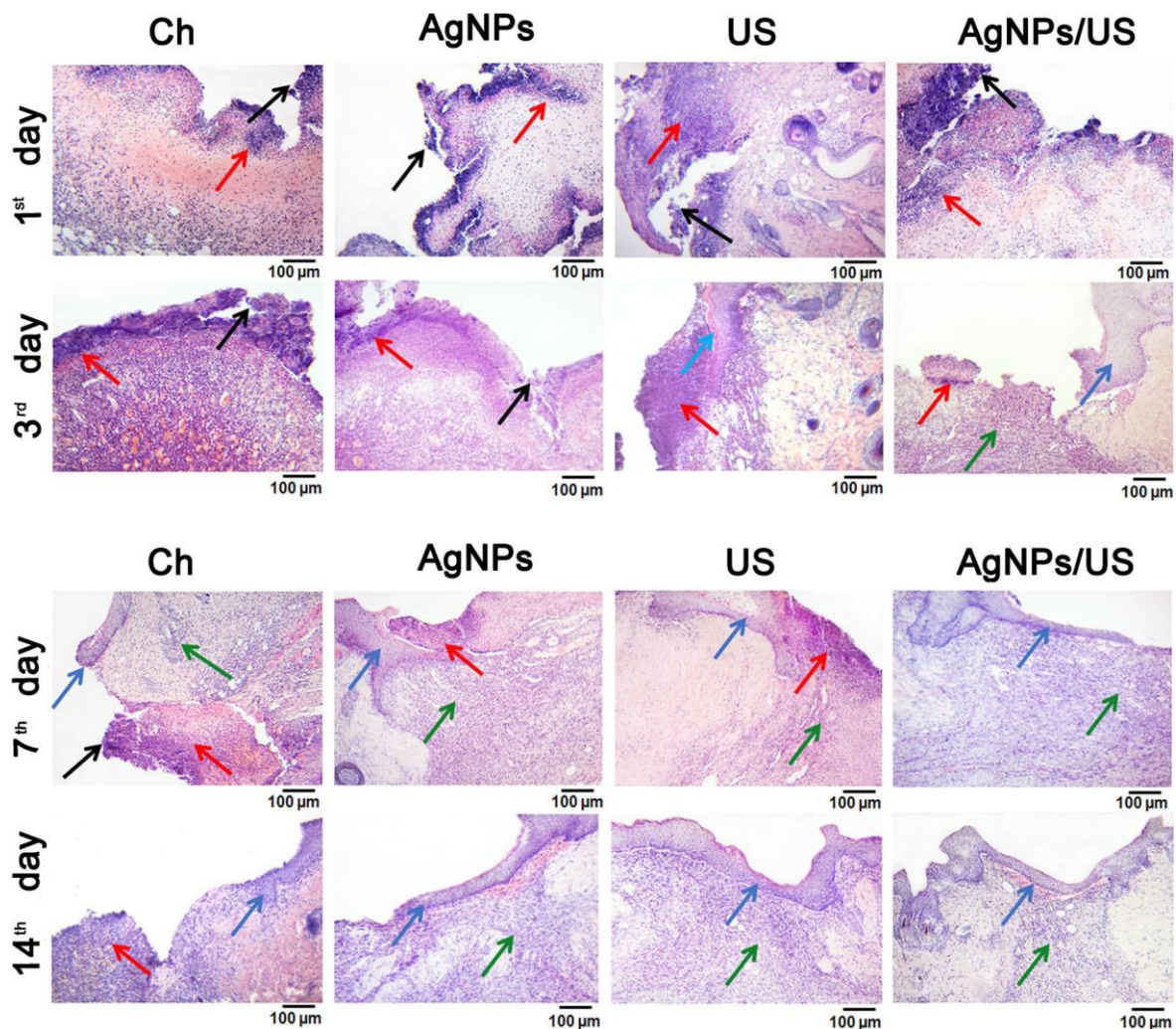


Рисунок 3.58 – Гістологічне дослідження ран у тварин на 1-у та 3-ю добу експерименту. Червоні стрілки – запалення, чорні стрілки – некротичні тканини, зелені стрілки —g грануляційна тканина, голубі стрілки — епітелій.

Фарбування гематоксилін-еозину. Збільшення x 100.

Наш експеримент показав раннє очищення інфікованої рани від мікроорганізмів у групі тварин, яких лікували УЗ, що може полегшити розростання грануляційної тканини. Важливо зазначити, що знищення грампозитивних бактерій відбулося швидше ніж грамнегативний. Додавання

НЧ Ag викликало більш виражену антибактеріальну дію. На відміну від УЗ, НЧ Ag забезпечували тривалий ефект. У своєму дослідженні ми виявили, що застосування *in vitro* УЗ може зменшити МІК НЧ Ag більш ніж в 20 разів, що може запобігти токсичному ефекту срібла.

Окрім цього, нові НЧ Ag надають бактерицидний ефект у концентраціях, менших за токсичні. В групі з комбінованим застосуванням НЧ Ag та УЗ спостерігалось швидше видалення некротизованої тканини та дозрівання грануляційної тканини. В кінці процесу загоєння, УЗ та НЧ Ag можуть синергічно стимулювати формування сполучної тканини. Передбачуваний механізм взаємодії НЧ Ag та УЗ може бути у запобіганні агрегації НЧ Ag та збільшеному вивільненні іонів Ag та сприяння їх доставці в більш глибокі шари тканини.

Використання НЧ Ag та УЗ окремо для лікування гнійних ран призвело до швидшого очищення ран від мікроорганізмів та некротичного детриту в обох групах до 7 дня. Регенерація ран розпочалася раніше, ніж у контрольній групі і характеризувалася швидким зменшенням дистрофічно-некротичні зміни та запальної реакції, кращими якісними та кількісними параметрами мікроциркуляторного русла, розростанням грануляційної тканини з більш значним інтенсивним дозріванням та більш раннім відновленням епітелію з повним закриттям раневого дефекту.

Застосування НЧ Ag / УЗ призвело до найкращого очищення ран як від мікроорганізмів, так і від некротичних мас до 3 дня експерименту. Кращий стан рани, значне зниження запальної реакції в навколишніх тканинах, нормалізація кровообігу, зменшився набряку призвело до інтенсифікації росту грануляційної тканини (між днями 3 і 7) та формування посттравматичного рубця. Інтенсивна епідермізація, починаючи з 7-го дня, призвела до повного загоєння рани до 10-го дня.

Експериментальне лікування із застосуванням НЧ срібла синтезованих із використанням УФ реактора виявило, що закриття і відновлення ран

залежало від типу лікування. На 1-й день шкірні дефекти продемонстрували типові риси гнійної рани, перші ознаки очищення від патологічного детриту з'явилися з 5–6-го дня у групах тварин лікованих НЧ Ag та з 8-го дня у тварин контрольної групи, які отримували хлоргексидин. Швидкість закриття ран була вищою у групах НЧ Ag та хлоргексидину-НЧ Ag порівняно з лікуванням лише хлоргексидином. Примітно, що епітелізація була зареєстрована на 15-й день у щурів з пов'язками НЧ Ag-хлоргексидин та на 18-й день у групі, яка отримувала хлоргексидин.

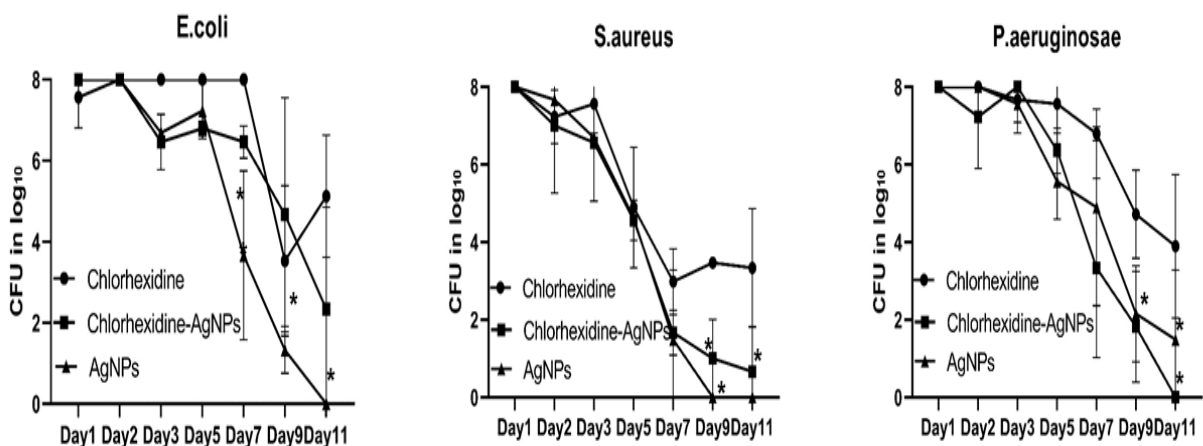


Рисунок 3.59 – Зміни площі рани у щурів при різному лікуванні. \* - суттєві відмінності між групами хлоргексидину та AgNP ( $p \leq 0,05$ )

Морфометричний аналіз загоєння ран показав, що гнійне запалення призвело до збільшення площі рани на 4 день від формування дефекту з наступним скороченням. Ми не виявили ніякої різниці в динаміці площі рани щодо варіантів лікування до 9-го дня. Однак з 10-го дня в групі

хлоргексидин-AgNPs було зареєстровано помітне прискорення закриття рани. Крім того, щури, оброблені Ch-AgNP, продемонстрували, що раніше епітелізація рани відбулася на 15 день, тоді як решта тварин продемонстрували повне закриття ран на 18 день.

Мікробіологічний профіль експериментальних гнійних ран вказував на те, що застосоване лікування призводило до елімінації бактерій з 4 по 6 день залежно від типу бактерій. НЧ Ag в монотерапії та в поєднанні з хлоргексидином, забезпечували більш ефективне очищення від бактерій - значні відмінності між групами були виявлені на 7-й день для кишкової палички та *S. aureus* та на 5-й день - для *P. aeruginosa*. Для всіх перевірених бактерій лікування НЧ Ag призвело до повного виведення бактерій до 11-го дня після початку антибактеріального лікування (рисунок 3.60).



**Рисунок 3.60 – Мікробіологічний склад рани в різні моменти часу обробки хлоргексидином, хлоргексидином-AgNP та розчинами AgNP.**

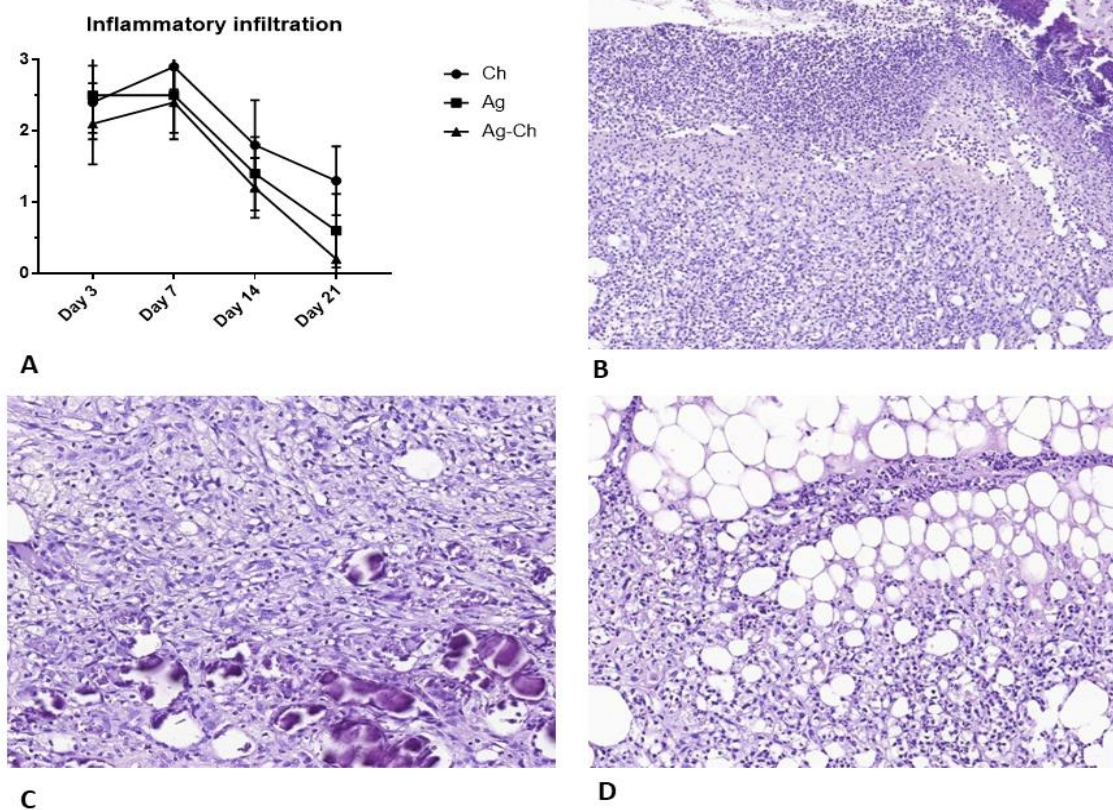
Гістологічна оцінка біоптатів з ран (рис 3.61) виявила, що інтенсивність запальної інфільтрації на 3-й день не відрзнялася між ранами, обробленими різними антимікробними засобами, глибина та периферичне поширення запалення були менш



помітними у тварин, яких лікували НЧ Ag та хлоргекседин-НЧ Ag.

Це призвело до обмеженого пошкодження тканин у глибині ран. На 7-й день відмічалось значне прискорення очищення рани від залишків у тварин лікованих комбінацією хлоргексидин-НЧ Ag.

На 14-й день інтенсивність інфільтрації ПМН грануляційної тканини в ранах, оброблених хлоргексидином- НЧ Ag, була значно нижчою порівняно з групою хлоргексидину. Зниження запальної інфільтрації на 14-й день у групах тварин лікованих НЧ Ag та хлоргексидином- НЧ Ag, було пов'язано з активним формуванням



грануляційної тканини та прискореною епітелізацією рани.

.

Рисунок 3.61 – Запалення та вторинна зміна тканин у гнійних інфікованих ранах

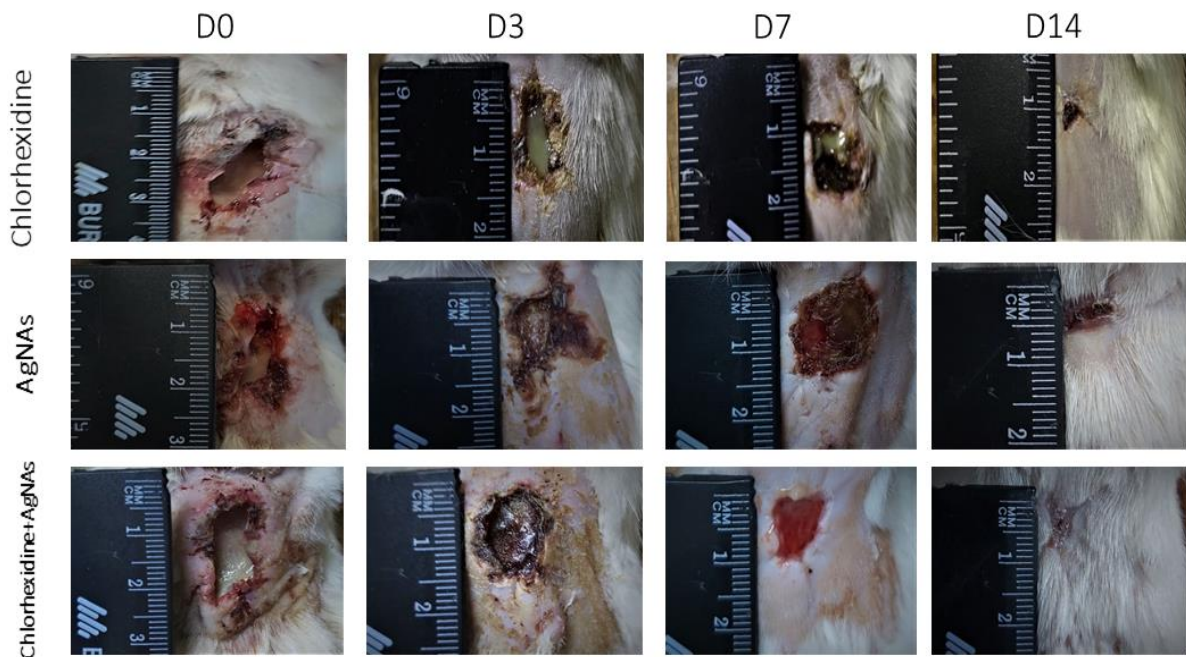
А - демонструє динаміку запальної інфільтрації тканин у рановому руслі (за оцінкою);

Б - гнійний запальний інфільтрат дна рани, забрудненого численними мікробними колоніями на 3 день; Фарбування Н&Е, x 50;

С - залишки некротичних тканин (м'язових волокон) у межах грануляційної тканини на краях рани на 7 день; Фарбування Н&Е, x 200;

Д - паннікуліт, що вражає жирову тканину внизу та периферичні краї рани; Фарбування Н&Е; × 200.

На 21 день поверхня ран була покрита епідермісом, вистілавшим конусоподібну ділянку ремоделювання, заповнену грануляційною тканиною. Однак ширина ділянки реконструкції варіювалась залежно від типу лікування. У випадку інфікованої рани, обробленої хлоргексидином, запальна фаза була продовжена, що визначало затримку подальших фаз загоєння ран. Застосування препарату, що містить НЧ Ag, у поєднанні з хлоргексидином асоціювалося з прискоренням загоєння ран



**Рисунок 3.62 Фотографії рани в різні моменти часу після застосування процедур (хлоргексидин, AgNA та комбіновані AgNAs-хлоргексидин). На 21 день усі експериментальні групи пережили повну епітелізацію рани.**

Експериментальне лікування із застосуванням наноархітектур срібла дозволило встановити, що ефективність використання AgNA для лікування інфікованих ран в монотерапії та в поєднанні з хлоргексидином призвело до значного зниження гнійного процесу з 3-го дня порівняно з контрольною групою (9-й день). Ознаки очищення від патологічного детриту в групах AgNA та хлоргексидин-AgNA з'явилися з 5-6-го дня, тоді як у тварин, які отримували хлоргексидин, з 9-го дня. Процес закриття рани у хлоргексидин-AgNA групі відбувся на 14 день, тоді як групи тварин лікованих AgNA та хлоргексидин рани були закриті на 16 та 18 день відповідно. Слід зазначити, що розмір рани суттєво відрізнявся в контрольній групі та групах лікованих AgNA у всі проміжки часу до 16-го дня, тоді як хлоргексидин-AgNA демонструють значну різницю з чистими AgNA на 8 та 9 день (рис. 3.62).

**Бактеріологічне дослідження вмісту рани виявило, що звичайне лікування хлоргексидином призводить до зменшення кількості кишкової палички та *P. aeruginosa* відповідно з 9 та 6 дня (рис. 3.63). AgNA окремо та у поєднанні з хлоргексидином забезпечують сильний антибактеріальний ефект, що призводить до зменшення бактерій гнійних ран з 5 дня для *P. aeruginosa* і з 6 дня для кишкової палички.**

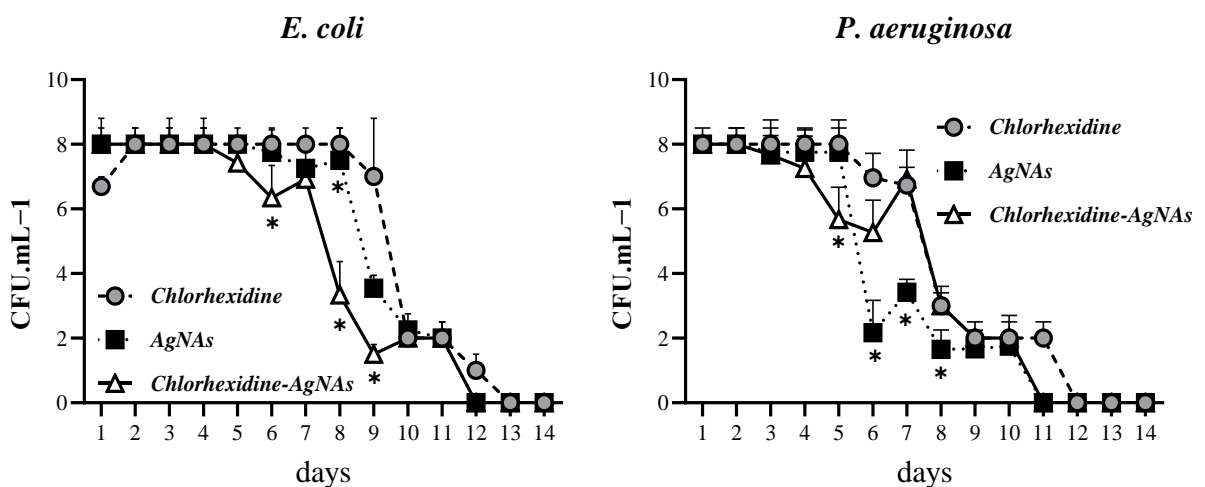


Рисунок 3.63 – Мікробіологічний профіль ран на різних термінах після обробки хлоргексидином, хлоргексидином-AgNAs та розчинами AgNAs. \* - суттєва різниця з контрольними (хлоргексидиновими) групами ( $p \leq 0,05$ ).

Гістологічна оцінка загоєння ран встановила, що використання AgNA прискорює очищення рани та скорочує запальну фазу ранового процесу. Гістологічно застосування AgNA асоціювалося зі зменшенням вторинного пошкодження тканин та запалення на ранніх стадіях лікування. На 3 день рани були вкриті гнійним детритом. Численні поліморфно-ядерні лейкоцити (ПМН) інфільтрували м'які тканини (жир і м'язи) внизу рани та по краях. Хоча на 3 день запальна реакція суттєво не відрізнялася між групами, на 7 день щільність інфільтрації ПМН була значно нижчою у ранах, оброблених AgNA ( $p = 0,017$ ), порівняно з контрольною групою. В цей термін рани тварин контрольної групи продемонстрували підвищений показник запалення через прогресивне пошкодження тканин. У щурів, які отримували лікування AgNA, відмічалась менші інфільтрація ПМН, набряки та був найнижчий показник запалення ( $p = 0,022$ ). У цій групі також продемонстровано значно вищий рівень утворення грануляційної тканини. Найбільш суттєві відмінності в темпі відновлення між групами були виявлені на 7 день ( $P < 0,001$ ).

Щоб з'ясувати можливі механізми впливу AgNA на заживлення ран, ми оцінили макрофаги, як ключові клітини, що регулюють запалення та відновлення тканин. Проаналізовано розподіл та кількість M1- (CD68 +) та M2-макрофагів (CD163). Цікаво, що з 3-го дня після обробки кількість клітин CD68 + була вищою у щурів, оброблених хлоргексидином ( $p < 0,001$ ), порівняно з іншими групами. На відміну від цього, застосування AgNA асоціювалось із більшим числом клітин CD163 + ( $p = 0,003$ ) протягом усього періоду дослідження (рис. 3.65). Варто зазначити, що застосування AgNA окремо або в комбінації з хлоргексидином призвело до збільшення співвідношення CD163 / CD68, що відображає зміщення макрофагів у бік

M2-фенотипу, тобто прискорене формування грануляційної тканини та зменшення запалення.

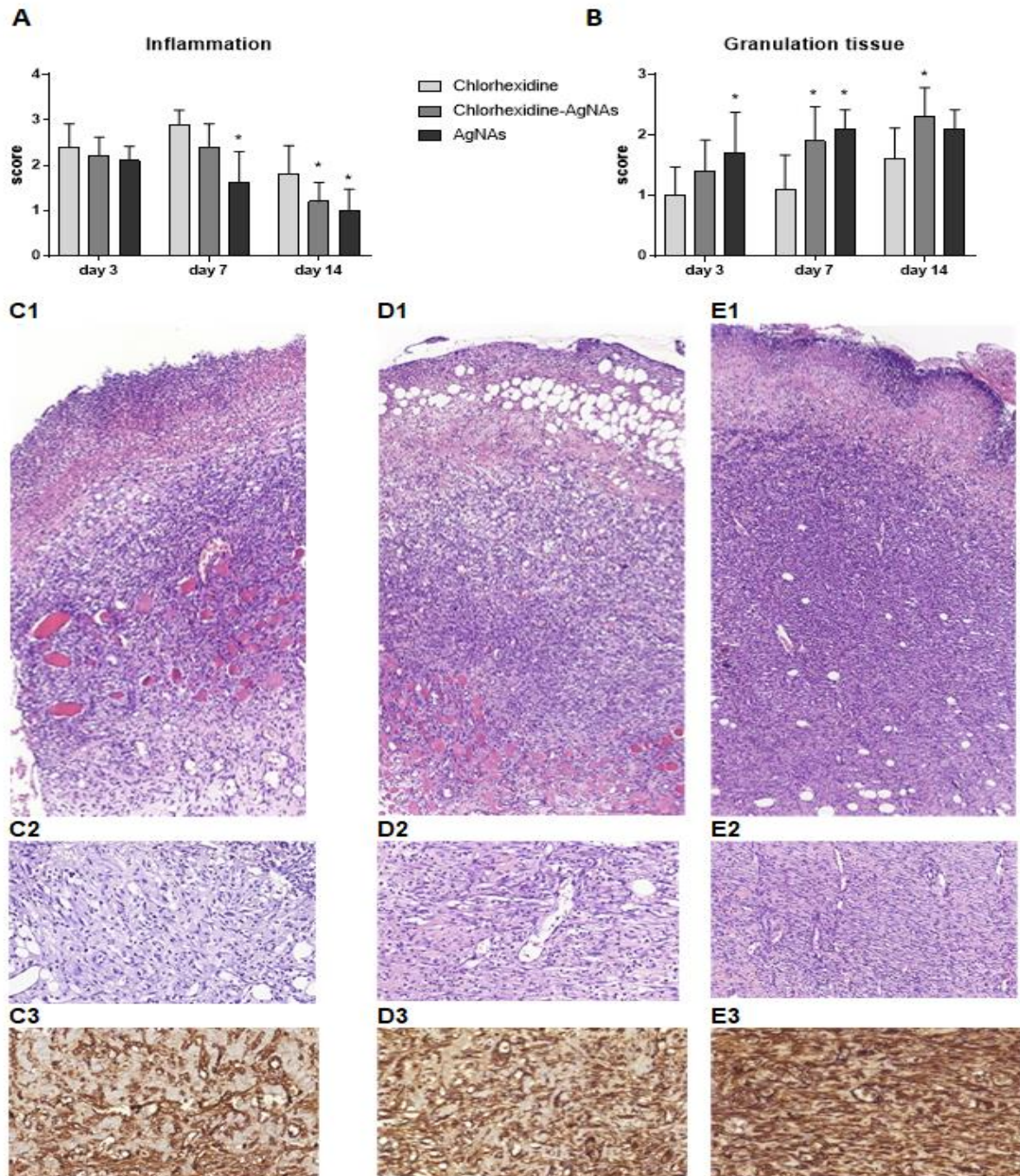


Рисунок 3.64 – Гістологічне дослідження біоптатів з ран у різні терміни лікування. Запалення (А), грануляційна тканина (В) в групах лікованих: хлоргекседином (С), хлоргекседин + AgNAs (D) та AgNAs (E). С-Е1-2: Фарбування гематоксилін-еозин С3-Е3: Імуногістохімія aSMA.

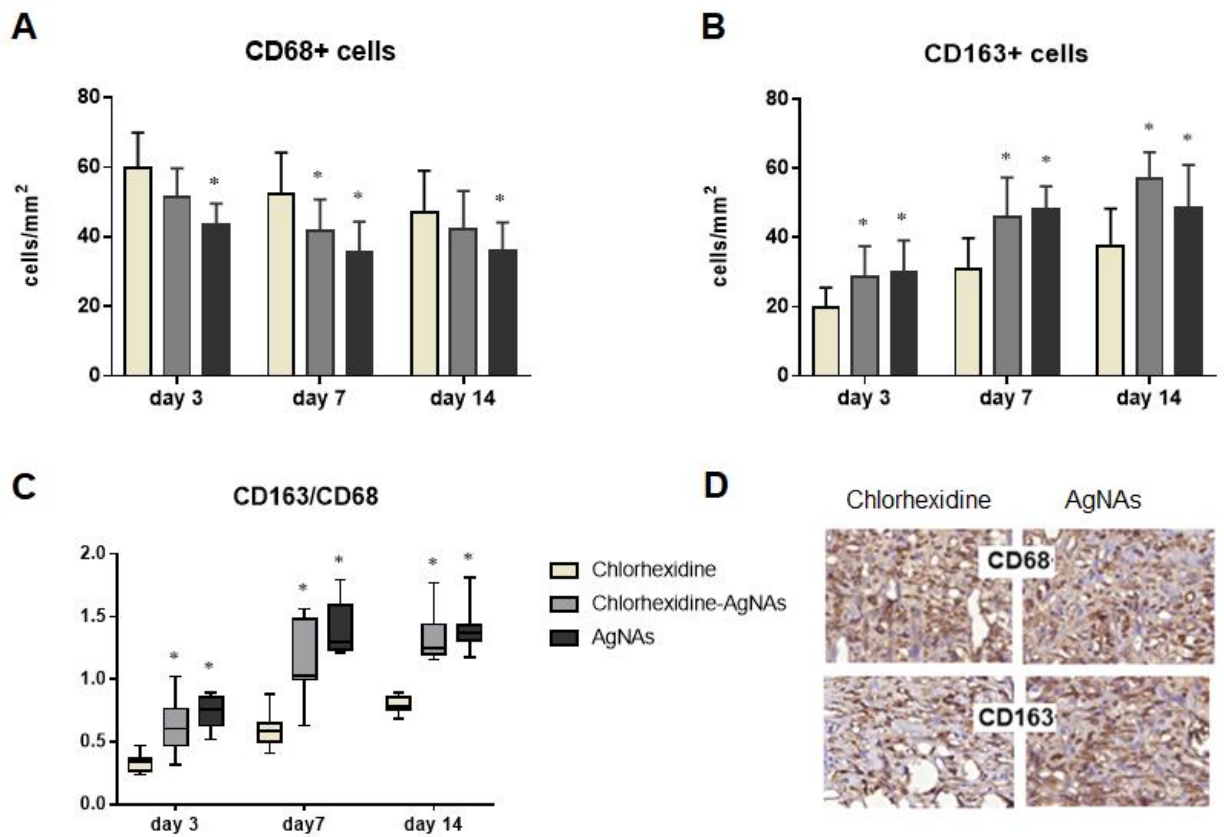


Рисунок 3.65 – Кількість макрофагів M1 та M2 під час загоєння ран у щурів з різною обробкою ран. А і В - демонструють зміни кількості клітин CD68 + і CD163 +, відповідно, С - вказує на порівняння співвідношення CD163 / CD68, що відображає поляризацію M2-макрофагів. D - ілюструє відмінності у кількості різних макрофагів у групі, яка отримувала хлоргексидин, порівняно із застосуванням AgNAs.

Ця знахідка представляє особливий інтерес, оскільки перехід від M1 до M2 є важливим для усунення запалення та для ефективного відновлення [121]. У патологічних умовах активація M2-макрофагів індукується грибами, паразитами, імунними комплексами, компонентами, апоптотичними клітинами, колонієстимулюючим фактором макрофагів (M-CSF), інтерлейкіну-4 (IL-4), IL-13, IL-10 та різні інші сигнали [122]. Недавні дослідження показали, що застосування Ag вмісних наноматеріалів може модулювати поляризацію макрофагів *in vitro* та *in vivo*, сприяючи переходу

M2-фенотипу. Цей ефект був зумовлений сигнальними ефектами клітин шляхом регулювання транспорту глюкози через GLUT1 та механізмів аутофагії [123]. Подібним чином, AgNA сприяють M2-макрофагам під час гнійного загоєння ран. Однак, щоб тонко пролити світло на молекулярні механізми імуномодуючих ефектів AgNA, потрібні подальші дослідження.

## ВИСНОВКИ

1. У роботі досліджено склад мікробіоти верхнього респіраторного тракту у пацієнтів із гострими запальними процесами носоглотки та вивчено профілі антибіотикорезистентності у виділених мікроорганізмів. Мікрофлора була представлена переважно моноізолятами стафілококів та стрептококів. Чутливість виділених мікроорганізмів до антибіотиків варіювала між різними видами мікроорганізмів, грамнегативні мікроорганізми, зокрема *K.pneumoniae*, були переважно полірезистентними.
2. Проведено синтез наночастинок срібла, міді та оксиду цинку із використанням різних підходів та вивчено їх фізико-хімічні характеристики, стабільність отриманих сполук, антимікробну активність щодо полірезистентних клінічних ізолятів. Встановлено, що наночастинок срібла, синтезовані з використанням УФ-реактора, та срібні наноархітектури є найбільш перспективними наночастинками металів із антимікробною активністю. Виявлено, що наночастинок срібла та міді спричиняють зміни в структурі бактерій, які пов'язані з порушенням цілісності клітинної стінки та механізму поділу клітин.
3. Виконано синтез композитних матеріалів на основі хітозану з використанням різних розчинників, НЧ срібла, міді, оксиду цинку та інших компонентів, що поліпшували біологічні властивості отриманих субстанцій. Встановлено синергічне підсилення антибактеріальної активності компонентів, із суттєвим зниженням їх активних концентрацій, у випадку отримання хітозанових гелів, аерогелів, губок, мембран.
4. Оцінка безпечності отриманих сполук для соматичних клітин встановила, що наночастинок срібла, синтезовані з використанням УФ-реактора, та срібні наноархітектури у концентраціях еквівалентних мінімальним інгібуючим, були не токсичними.
5. Поєднане застосування наночастинок срібла з ультразвуком та хлоргексидином прискорює загоєння інфікованих ран за рахунок більш



швидкої деконтамінації від бактерій та поляризації M2-макрофагів, та може розглядатись, як новий перспективний варіант оптимізації лікування інфікованих ран.

## ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Деркач С.А. Мікробіологічні аспекти лікування гнійно-запальних захворювань. *Інфекційні хвороби*. 2015. № 4 (82). С. 5-15.
2. Van Boeckel et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis*. 2014. № 14 (8). P. 742-750.
3. Luria Leslie Founou., Raspail Carrel Founou., Sabiha Yusuf Essack. Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology*. 2016. Vol. 7. P. 1-19.
4. Clarence S. Yah., Geoffrey S. Simate Yah., Simate Daru. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015.
5. P.G. Luo., F. J. Stutzenberger. Nanotechnology in the detection and control of microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol*. 2008. Vol. 63. P. 145-181.
6. 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). doi: 10.1371/journal.pone.0102108.
7. D. Cassano., A. K. Mapanao., M. Summa., Y. Vlamidis., G. Giannone., M. Santi., E. Guzzolino., L. Pitto., L. Polisenò., R. Bertorelli and V. Voliani. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2019, 2, 4464–4470.
8. Wang X., Wang Z., Zhang J., Qi H, Chen J., Xu M. Cytotoxicity of AgNPs/CS composite films: Ag NPs immobilized in chitosan matrix contributes a higher inhibition rate to cell proliferation. *Bioengineered*. 2016. № 7 (5). P. 283–290.
9. Luis Martines., Fernando Baquero. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter Space. *Jose Upsala Journal of Medical Sciences*. 2014. № 119. P. 68–77.

10. J. O'Neill. Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final report and Recommendations. *The review on Antimicrobial Resistance*. 2016. URL: [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final paper\\_with cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final paper_with cover.pdf)
11. Інфекційна захворюваність населення України. URL: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/inshi-infekciyni-zakhvoryuvannya/monitoring-i-ocinka/infekciyna-zakhvoryuvanist-naselennya-ukraini>.
12. 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, 2016. 172 с.
13. Yohann Lacotte1., Christine Årdal., Marie-Cécile Ploy1 and on behalf of the European Union Joint Action on Antimicrobial Resistance and Healthcare-Associated Infections (EU-JAMRAI). Infection prevention and control research priorities: what do we need to combat healthcare-associated infections and antimicrobial resistance? Results of a narrative literature review and survey analysis.
14. Maria Vitale., Paola Galluzzo., Patrizia Giuseppina Buffa., Eleonora Carlino., Orazio Spezia., Rosa Alduina. Comparison of Antibiotic Resistance Profile and Biofilm Production of *Staphylococcus aureus* Isolates Derived from Human Specimens and Animal-Derived Samples.
15. Johnson AP. Surveillance of antibiotic resistance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015. № 370 (1670). doi: 10.1098/rstb.2014.0080.
16. GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis*. 2018. № 18 (11). P. 1191-1210. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30310-4.

17. Forum of International Respiratory Societies. The Global Impact of Respiratory Disease – Second Edition. Sheffield, European Respiratory Society, 2017.
18. Torumkuney D., Pertseva T., Bratus E. et al. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2014-16 in Ukraine and the Slovak Republic. *J Antimicrob Chemother.* 2018. Vol. 73. Iss. 5. P. 28-35.
19. Chairedby J. O'Neill. Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final report and Recommendations. *The review on Antimicrobial Resistance.* 2016.
20. Jie Li, Junwei Wang., Yi Yang, Peishan Cai., Jingchao Cao., Xuefeng Cai and Y. Etiology and antimicrobial resistance of secondary bacterial infections in patients hospitalized with COVID-19 in Wuhan, China.
21. Mulani Mansura S., Kamble Ekta E., Kumkar Shital N., Tawre Madhumita S., Pardesi Karishma R. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology.* 2019. Vol. 10. P. 539.
22. Qiao Lin., Berthony Deslouches., Ronald C. Montelaro., Y. Peter Di. Prevention of ESKAPE pathogen biofilm formation by antimicrobial peptides WLBU2 and LL37. *Int J Antimicrob Agents.* 2018. № 52 (5). P. 667–672.
23. Asadpour L. Antimicrobial resistance, biofilm-forming ability and virulence potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in northern Iran. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018. № 13. P. 214-220.
24. Hadadi-Fishani M., Khaledi A., Fatemi-Nasab ZS. Correlation between biofilm formation and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a meta-analysis. *Infez Med.* 2020. № 28 (1). P. 47-54.
25. Qi Lin et al. The Prevalence, Antibiotic Resistance and Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* in Bulk Ready-To-Eat Foods. *Biomolecules.* 2019. № 9 (10). P. 524.
26. Levy S.B., Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine Supplement.* 2004. № 10 (12). P.123 – 129.

27. Syafiqah Saidin., Mohamad Amin Jumat., Nur Ain Atiqah Mohd Amin., Abdullah Sharaf Saleh Al-Hammadi. Organic and inorganic antibacterial approaches in combating bacterial infection for biomedical application. *Materials Science and Engineering*. 2021. Vol. 118. doi.org/10.1016/j.msec.2020.111382.
28. Florence Croisier., Christine Jérôme. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European polymer journal*. 2013. № 49. P. 780-792.
29. Z. Shariatnia. Pharmaceutical applications of chitosan. *Colloid Interface Sci*. 2019. Vol. 263. P. 131–194. doi: 10.1016/j.cis.2018.11.008.
30. Esam A. Elhefian., Mohamed Mahmoud Nasef., Abdul Hamid Yahaya. Chitosan Physical Forms: A Short Review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2011. № 5 (5). P. 670-677.
31. V. Sencadas et al. Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology. *Carbohydr. Polym*. 2012. Vol. 87. P. 1295–1301. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.09.017.
32. P. Sangsanoh., P. Supaphol. Stability improvement of electrospun chitosan nanofibrous membranes in neutral or weak basic aqueous solutions. *Biomacromolecules*. 2006. Vol. 7. № 10. P. 2710–2714.
33. V. Sencadas et al. Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology. *Carbohydr. Polym*. 2012. Vol. 87. № 2. P. 1295–1301. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.09.017.
34. H. Homayoni., S. A. H. Ravandi., M. Valizadeh. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydr. Polym*. 2009. Vol. 77. № 3. P. 656–661. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.02.008.
35. H. Celebi., M. Gurbuz., S. Koparal., A. Dogan. Development of antibacterial electrospun chitosan/polyvinylalcohol nanofibers containing silver ion-incorporated HAP nanoparticles. *Compos. Interfaces*. 2013. Vol. 20. № 9. P. 799–812. doi: 10.1080/15685543.2013.819700.
36. Mansab Ali Saleemi., Navindra Kumari Palanisamy., Eng Hwa Wong. Alternative Approaches to Combat Medicinally Important Biofilm-Forming Pathogens. 2018. doi: 10.5772/intechopen.80341.

37. Okamoto Y., Kawakami K., Miyatake K., Morimoto M., Shigemasa Y., Minami S. Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydr. Polym.* 2002. Vol. 49. P. 249–252.
38. Okamoto Y., Yano R., Miyatake K., Tomohiro I., Shigemasa Y., Minami S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr. Polym.* 2003. Vol. 53. P. 337–342.
39. 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. Vol. 144.
40. Allan C. R., Hadwiger L. A. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology.* 1979. Vol. 3. P. 285-287.
41. Raffaella Campana., Luca Casettari., Eleonora Ciandrini., Lisbeth Illum., Wally Baffone. Chitosans inhibit the growth and the adhesion of *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* clinical isolates on urinary catheters. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2017. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.031
42. Rejane C. Goy., Sinara T.B. Morais., Odilio B.G. Assis. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Rev. bras. farmacogn.* 2016. Vol. 26. №1. P. 122-127.
43. Zeinab Abedian., Niloofar Jenabian., Ali Akbar Moghadamnia., Ebrahim Zabihi., Hamed Tashakorian., Mahdi Rajabnia., Farahnaz Sadighian., Ali Bijani. Antibacterial activity of high molecular weight and low molecular weight chitosan upon oral pathogen. *J Conserv Dent.* 2019. Vol. 22. Issue 2. P. 169-174. doi: 10.4103/JCD.JCD\_300\_18.
44. L. F. Gómez Chabala., C. E. Echeverri Cuartas., M. E. Londoño López. Release Behavior and Antibacterial Activity of Chitosan/Alginate Blends with Aloe vera and Silver Nanoparticles. *Mar Drugs.* 2017. Vol. 15 (10). P. 328. doi: 10.3390/md15100328.
45. Yang Tang., Linlin Xie., Mingze Sai., Ningning Xu., Derun Ding. Preparation and antibacterial activity of quaternized chitosan with iodine. *Materials Science and Engineering.* 2015. Vol. 48. P. 1-4.

46. Esam A. El-hefian., Mohamed Mahmoud Nasef., Abdul Hamid Yahaya. Chitosan Physical Forms: A Short Review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2011. Vol. 5 (5). P. 670-677.
47. Lambertus A.M. van den Broek., Carmen G. Boeriu. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *John Wiley & Sons Ltd*. 2020.
48. Linlin Wang., Chen Hu., Longquan Shao. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine*. 2017. Vol. 12. P. 1227–1249.
49. Anu Mary Ealias., Saravanakumar M P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*. 2017. Vol. 263. doi:10.1088/1757-899X/263/3/032019.
50. Saba Hasan. A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. *Res. J. Recent. Sci*. 2015. Vol. 4. P. 1-3.
51. Lucia Salvioni et al. Negatively charged silver nanoparticles with potent antibacterial activity and reduced toxicity for pharmaceutical preparations *International Journal of Nanomedicine* 2017;12 2517–2530
52. Krutagn Patel., Bhavesh Bharatiya., Tulsi Mukherjee., Tejal Soni., Atindra Shukla. Role of stabilizing agents in the formation of stable silver nanoparticles in aqueous solution: Characterization and stability study. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2017. Vol. 38. Issue 5. P. 626-631.
53. Slavin, Y.N., Asnis, J., Häfeli, U.O. et al. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnol*. 2017. Vol. 15. № 65. doi: 10.1186/s12951-017-0308-z.
54. Gudepalya Renukaiah Rudramurthy., Mallappa Kumara Swamy. Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: an update *JBIC. Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2018. Vol. 23. Issue 8. P. 1185–1204.
55. Yun'an Qing., Lin Cheng., Ruiyan Li., Guancong Liu., Yanbo Zhang., Xiongfeng Tang., Jincheng Wang., He Liu., Yanguo Qin. Potential antibacterial

mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int J Nanomedicine*. 2018. Vol. 13. P. 3311–3327.

56. 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. Vol. 374. P. 1–8.

57. Guerrini L., Alvarez-Puebla RA., Pazos-Perez N. Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids. *Materials (Basel)*. 2018. Vol. 6. 11(7). P. 1154. doi: 10.3390/ma11071154.

58. Bélteky P., Rónavári A., Igaz N., Szerencsés B., Tóth IY., Pfeiffer I., Kiricsi M., Kónya Z. Silver nanoparticles: aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity. *International Journal of Nanomedicine*. 2019. Vol. 14. P. 667—687. doi:10.2147/IJN.S185965.

59. Nelson Durán., Priscyla D. Marcato., Roseli De Conti., Oswaldo L. Alves., Fabio T. M. Costa., Marcelo Brocchi. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *J. Braz. Chem. Soc*. 2010. Vol. 21. No.6. doi: 10.1590/S0103-50532010000600002.

60. Tejamaya M., Römer I., Merrifield RC., Lead JR. Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environ Sci Technol*. 2012. Vol. 46(13)7011-7. doi: 10.1021/es2038596.

61. Xi-Feng Zhang., Zhi-Guo Liu., Wei Shen., Sangiliyandi Gurunathan. Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016. Vol. 17(9). P. 1534. doi: 10.3390/ijms17091534.

62. Afshin Mohammadi Bardbori., Mitra Korani., Elham Ghazizadeh., Zahra Hami. Effects of silver nanoparticles on human health. *European Journal of Nanomedicine*. 2015. Vol. 7(1). P. 51-62.

63. Shabir Ahmad., Sidra Munir., Nadia Zeb., Asad Ullah., Behramand Khan., Javed Ali., Muhammad Bilal., Muhammad Omer., Muhammad Alamzeb., Syed Muhammad Salman., Saqib Ali. Green nanotechnology: a review on green



- synthesis of silver nanoparticles — an ecofriendly approach. *Int J Nanomedicine*. 2019. Vol. 14. P. 5087–5107.
64. 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 Nanoparticle Res*. 2013. Vol.15. P. 1595.
65. Yin IX., Zhang J., Zhao IS., Mei ML., Li Q., Chu CH. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine*. 2020. Vol. 15. P. 2555-2562. doi:10.2147/IJN.S246764.
66. Iris Xiaoxue Yin, Jing Zhang, Irene Shuping Zhao, May Lei Mei, Quanli Li, and Chun Hung Chu2PMCID: PMC7174845 PMID: 32368040 The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry
67. Alexandra-Cristina Burdusel., Oana Gherasim., Alexandru Mihai Grumezescu., Laurențiu Mogoantă., Anton Ficai., Ecaterina Andronescu. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials (Basel)*. 2018. Vol. 8(9). P. 681.
68. Yaohua Dong., Hongling Zhu., Yuanyuan Shen., Wenting Zhang., Li Zhang. Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against *Vibrio Natriegens*. *PLoS One*. 2019. Vol. 14(9). doi :10.1371.
69. Hemeg HA. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *Int J Nanomedicine*. 2017. Vol. 12. P. 8211-8225. doi: 10.2147/IJN.S132163.
70. M.H. El-Rafie., A.A. Mohamed., Th.I. Shaheen., A. Hebeish. Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers*. 2010. Vol. 80 (3). P. 779-782. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.12.028.
71. Wolfram J., Zhu M., Yang Y., Shen J., Gentile E., Paolino D., Fresta M., Nie G., Chen C., Shen H., Ferrari M., Zhao Y. Safety of Nanoparticles in Medicine. *Curr Drug Targets*. 2015. Vol. 16(14). P. 1671-81. doi: 10.2174/1389450115666140804124808.

72. Nelson Durán I,\*; Priscyla D. Marcato I; Roseli De Conti I; Oswaldo L. Alves I; Fabio T. M. Costa II; Marcelo Broc Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action
73. Bélteky P., Rónavári A., Igaz N., Szerencsés B., Tóth IY., Pfeiffer I., Kiricsi M., Kónya Z. Silver nanoparticles: aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity. *International Journal of Nanomedicine*. 2019. Vol. 14. P. 667—687 .
74. Loo YY., Rukayadi Y., Nor-Khaizura MA., Kuan CH., Chieng BW., Nishibuchi M., Radu S. In Vitro Antimicrobial Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles Against Selected Gram-negative Foodborne Pathogens. *Front Microbiol*. 2018. Vol. 9.P. 1555. doi: 10.3389/fmicb.2018.01555.
75. Sukumaran Prabhu, S., Poulouse, E.K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett*. 2012. Vol. 2, 32. doi.org/10.1186/2228-5326-2-32
76. D. Cassano., A.K. Mapanao., M. Summa., Y. Vlamidis., G. Giannone., M. Santi., E. Guzzolino., L. Pitto., L. Polisenò., R. Bertorelli., V. Voliani. Biokinetics and clearance of inhaled gold ultrasmall-in-nano architectures. *ACS Appl. Bio Mater*. 2019. Vol. 2. P. 4464–4470.
77. S. Pocoví-Martínez., D. Cassano., V. Voliani. Naked Nanoparticles in Silica Nanocapsules: A Versatile Family of Nanorattle Catalysts. *ACS Appl. Nano Mater*. 2018. Vol. 1. P. 1836–1840. doi :10.1021/acsanm.8b00247.
78. Srinivas A., Kaman L., Raj P., Gautam V., Dahiya D., Singh G., Singh R., Medhi B. Comparison of the efficacy of chlorhexidine gluconate versus povidone iodine as preoperative skin preparation for the prevention of surgical site infections in clean-contaminated upper abdominal surgeries. *Surg Today*. 2015. Vol. 45(11). P. 1378–84.
79. Holubnycha V., Myronov P., Bugaiov V., Opanasyuk A., Dobrozhan O., Yanovska A., Pogorielov M., Kalinkevich O. Effect of ultrasound treatment on chitosan-silver nanoparticles antimicrobial activity. *Conf Proc IEEE 8th International Conference on Nanomaterials: Applications and Properties*. 2018.

80. 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. Vol. 136. P. 750–7.
81. Sibhghatulla Shaikh., Nazia Nazam., Syed Mohd Danish Rizvi., Khurshid Ahmad., Mohammad Hassan Baig., Eun Ju Lee., Inho Choi. Mechanistic Insights into the Antimicrobial Actions of Metallic Nanoparticles and Their Implications for Multidrug Resistance. *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20(10). P. 2468.
82. Muhammad Sani Usman., Mohamed Ezzat El Zowalaty., Kamyar Shameli., Norhazlin Zainuddin., Mohamed Salama., Nor Azowa Ibrahi. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2013. Vol. 8. P. 4467–4479.
83. Lesley L. Duffy., Megan J. Osmond-McLeod., Jonathan Judy., Thea King. Investigation into the antibacterial activity of silver, zinc oxide and copper oxide nanoparticles against poultry-relevant isolates of Salmonella and Campylobacter. *Food Control.* 2018. Vol. 92. P. 293-300. doi :10.1016/j.foodcont.2018.05.008.
84. Sanchez-Sanhueza Gabriela., Fuentes-Rodriguez Daniela., Bello-Toledo Helia. Copper Nanoparticles as Potential Antimicrobial Agent in Disinfecting Root Canals. A Systematic Review. *Int. J. Odontostomat.* 2016. Vol.10. No 3. P. 547-554. doi :10.4067/S0718-381X2016000300024.
85. Yasaman Sadat Nabipour., Arman Rostamzad. 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).* 2015. Vol. 36. No. 3.
86. Minqi Wang., Tingting Tang. Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning. *J Orthop Translat.* 2019. Vol.17. P. 42–54. doi: 10.1016/j.jot.2018.09.001.
87. Arijit Kumar Chatterjee., Ruchira Chakraborty., Tarakdas Basu. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology.* 2014. Vol. 25. P. 12.

88. 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.* 2007. Vol. 9(3). P. 479–489. doi: 10.1007/s11051-006-9150-1.
89. Sirelkhatim A. et al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett.* 2015. Vol. 7(3). P. 219–242.
90. Zhang Y et al. Nano Ag/ZnO-Incorporated Hydroxyapatite Composite Coatings: Highly Effective Infection Prevention and Excellent Osteointegration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018. Vol. 10(1). P. 1266-1277. doi: 10.1021/acsami.7b17351
91. Yogendra K. M., Rainer A. ZnO tetrapod materials for functional applications. *Materials Today.* 2018. Vol. 21. Issue 6. P. 631-651.
92. Zhang Y et al. Nano Ag/ZnO-Incorporated Hydroxyapatite Composite Coatings: Highly Effective Infection Prevention and Excellent Osteointegration. *ACS Appl Mater Interfaces.* (2018)
93. Luting Y., Ashraf U., Haiwei W. ZnO Tetrapods: Synthesis and Applications in Solar Cells. *Nanomaterials and Nanotechnology.* 2015. doi :10.5772/60939.
94. 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. P. 1–8.
95. X. Peng., S. Palma., N.S. Fisher., S.S. Wong. Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. *Aquat. Toxicol.* 2011. Vol. 102(3). P. 186–196.
96. 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. Vol. 11. P. 54–71.
97. Karunakaran C., Gomathisankar P., Manikandan G. Preparation and characterization of antimicrobial Ce-doped ZnO nanoparticles for photocatalytic detoxification of cyanide. *Mater Chem Phys.* 2010. Vol. 123. P. 585–94.

98. C. Ashajyothi<sup>1</sup>., K. Handral Harish., Nileshkumar Dubey., R. Kelmani Chandrakanth. Antibiofilm activity of biogenic copper and zinc oxidenanoparticles-antimicrobials collegiate against multiple drugresistant bacteria: a nanoscale approach. *J Nanostruct Chem.* 2016. Vol. 6. P. 329–341.
99. Feng X., Feng L., Jin M., Zhai J., Jiang L., et al. Reversible super-hydrophobicity to super-hydrpphilicity transictionof aligned ZnO nanorod films. *J.Am.Chem.* 2004. Soc.126. P. 62-63.
100. Jafari A et al. Bactericidal impact of Ag, ZnO and mixed AgZnO colloidal nanoparticles on H<sub>37</sub>Rv Mycobacterium tuberculosis phagocytized by THP-1 cell lines. *Microb Pathog.* 2017.
101. Sirelkhatim A. et al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett.* 2015. Vol. 7(3). P. 219–242.
102. K.R. Raghupathi., R.T. Koodali., A.C. Manna. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir.* 2011. Vol. 27 (7). P. 4020–4028. doi: 10.1371/journal.pone.0085981.
103. 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. Vol. 27 (2). P. 210-2.
104. Karpuraranjith M et al. Chitosan/zinc oxide-polyvinylpyrrolidone (CS/ZnO-PVP) nanocomposite for better thermal and antibacterial activity. *Int J Biol Macromol.* 2017.
105. Zhang Y et al. Nano Ag/ZnO-Incorporated Hydroxyapatite Composite Coatings: Highly Effective Infection Prevention and Excellent Osteointegration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018.
106. Mahboubeh Mirhosseini. Synergistic Antibacterial Effect of Metal Oxid Nanoparticles and Ultrasound Stimulation *J. Biol. Today's World.* 2015. Vol. 4 (6). P. 138-144.

107. C. Bankier., R. K. Matharu., Y. K. Cheong., G.G., Ren E. Synergistic Antibacterial Effects of Metallic Nanoparticle Combinations. *Cloutman-Green & L. Ciric Scientific Reports*. 2019. Vol. 9. No. 16074.
108. Hajer Rokbani., France Daigle., Abdellah Ajjil. Combined Effect of Ultrasound Stimulations and Autoclaving on the Enhancement of Antibacterial Activity of ZnO and SiO<sub>2</sub>/ZnO Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)*. 2018. Vol. 8 (3). P. 129.
109. Karpuraranjith M et al. Chitosan/zinc oxide-polyvinylpyrrolidone (CS/ZnO-PVP) nanocomposite for better thermal and antibacterial activity. *Int J Biol Macromol*. 2017.
110. Nasajpour A. et al. Nanostructured Fibrous Membranes with Rose Spike-Like Architecture. *Nano Lett*. 2017. Vol. 17 (10). P. 6235–6240. doi:10.1021/acs.nanolett.7b02929.
111. Chang YR., Perry J., Cross K. Low-Frequency Ultrasound Debridement in Chronic Wound Healing: A Systematic Review of Current Evidence. *Plast Surg (Oakv)*. 2017. Vol. 25 (1). P. 21-26. doi: 10.1177/2292550317693813.
112. 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.
113. M. Hosseinejad., S. M. Jafari. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol*. 2016. Vol. 85. P. 467–475. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022.
114. J. Champer., J. Patel., N. Fernando., E. Salehi., V. Wong., J. Kim. Chitosan against cutaneous pathogens. *AMB Express*. 2013. Vol. 3. P. 1–8. doi: 10.1186/2191-0855-3-37.
115. Po-hui Chen et al. Improvement in the properties of chitosan membranes using natural organic acid solution as solvent for chitosan dissolution. *Journal of medical and biological engineering*. 2017. Vol. 27 (1). P. 23-28.
116. V. Sencadas., D.M. Correia., C. Ribeiro., S. Moreira., G. Botelho., J.L. Gómez Ribelles., S. Lanceros-Mendez. Physical-chemical properties of cross-

- linked chitosan electrospun fiber mats. *Polymer Testing*. 2012. Vol. 31. Issue 8. P. 1062-1069. doi :10.1016/j.polymertesting.2012.07.010.
117. G. Zheng., X. Liu., X. Wang., L. Chen., H. Xie., F. Wang et al. Improving stability and biocompatibility of alginate/chitosan microcapsule by fabricating Bi-functional membrane. *Journal of Macromolecular Bioscience*. 2014. Vol. 14 (5). P. 655–666.
118. H. Amir Afshar., A. Ghaee. Preparation of aminated chitosan/alginate scaffold containing halloysite nanotubes with improved cell attachment. *Carbohydrate Polymers*. 2016. Vol. 151. P. 1120–1131.
119. A.M. Banoi., T. Yasin., M.A. Ghauri., M. Younus. Chitosan: a potential biopolymer for wound management. *Int.J.Biol. Macromol*. 2017. Vol. 102. P. 380–383.
120. S. Nokhasteh., A. M. Molavi., M. Khorsand-Ghayeni., A. Sadeghi-Avalshahr. Preparation of PVA/Chitosan samples by electrospinning and film casting methods and evaluating the effect of surface morphology on their antibacterial behavior. *Mater.Res.Express* . 2020. Vol. 7. No. 015401.
121. D. M. Mosser and J. P. Edwards. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol*. 2008. Vol. 8. P. 968-969.
122. Röszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*. 2015. Vol. 2015. No. 816460. doi: 10.1155/2015/816460.
123. Chen Y., Guan M., Ren R., Gao C., Cheng H., Li Y., Gao B., Wei Y., Fu J., Sun J., Xiong W. Improved Immunoregulation of Ultra-Low-Dose Silver Nanoparticle-Loaded TiO<sub>2</sub> Nanotubes via M2 Macrophage Polarization by Regulating GLUT1 and Autophagy. *International Journal of Nanomedicine*. 2020. Vol.15. P. 2011-2026.