

*На правах рукописи*



Бурмистров Дмитрий Евгеньевич

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ МЕТАЛЛОВ,  
ЗАКЛЮЧЕННЫХ В ПОЛИМЕРЫ, НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ  
ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК**

1.5.2. — биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва — 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре Институте общей физики им. А. М. Прохорова Российской академии наук (ИОФ РАН).

**Научный руководитель:** **Гудков Сергей Владимирович**, доктор биологических наук, профессор РАН, профессор, руководитель Центра биофотоники ИОФ РАН

**Официальные оппоненты:** **Хлебцов Борис Николаевич**, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук” (ИБФРМ РАН)

**Чернов Александр Сергеевич**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории инструментов для диагностики и терапии инфекционных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет»

Защита диссертации состоится 16 ноября 2023 года в 15 ч 00 мин на заседании диссертационного совета 24.2.340.06 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д 23, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2023/1380/diss-Burmistrov-1380.pdf>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Черкасова Елена Игоревна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Благодаря своим уникальным свойствам, обусловленным большой удельной площадью поверхности за счёт малого размера (<100 нм) и, как следствие, высокой реакционной способностью, неорганические наноматериалы находят всё больше применений в различных областях жизни современного человека [Gudkov et al., 2020; Khlebtsov et al., 2022; Kolahalam et al., 2019; Pleskova et al., 2016]. Из результатов многочисленных исследований, накопленных к настоящему времени, известно, что наночастицы (НЧ) многих оксидов металлов (ZnO, TiO<sub>2</sub>, CuO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Ag<sub>2</sub>O, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MgO, и др.) проявляют бактериостатический и бактерицидный эффекты в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных видов бактерий [Gudkov et al., 2021; Hajipour et al., 2012; Nastulyavichus et al., 2022; Omelyanchik et al., 2020; Stanić & Tanasković, 2020], а в некоторых случаях могут проявляют активность в отношении грибковых патогенов [Sun et al., 2018]. Одним из главных преимуществ использования НЧ металлов и оксидов металлов по сравнению с антибиотиками является низкая вероятность развития резистентности к наноматериалам за счет одновременного воздействия на бактериальную клетку несколькими повреждающими факторами (механическое повреждение, образование свободных катионов металлов и продукция АФК) [Wang et al., 2017]. Следовательно, данные наноматериалы могут быть весьма перспективными как для биомедицины, так и для пищевой промышленности. Поскольку известно, что одним из главных источников бактериальной контаминации являются поверхности, на которых возможна адгезия и колонизация бактериальных клеток [Dogan, 2008], появляется необходимость в новых материалах и покрытиях на их основе, обладающих пролонгированным антибактериальным эффектом [Yang et al., 2022]. Применение наночастиц в чистом виде часто бывает затруднительным, зачастую не способно обеспечить продолжительный антибактериальный эффект и не всегда безопасно для организма человека и животных. Как следствие, возникает необходимость поиска путей применения наночастиц оксидов металлов в качестве функциональной добавки в материалах для антибактериальных покрытий. Для достижения стабильности наночастиц, снижения их токсического воздействия на клетки и ткани, а также обеспечения продолжительного антимикробного эффекта предлагается использовать НЧ металлов и их оксидов в составе композитных материалов на основе полимерных матриц [Anwar et al., 2022; Arzhakova et al., 2021; Zezin et al., 2022; Гарасько и др., 2009; Чуловская и др., 2013].

Композитные материалы на основе полимеров с добавлением микроразмерных частиц используются человеком с начала 20 века: частицы углерода и металлов добавлялись в бакелит [Baekeland, 1909] и вулканизированный каучук [Goodyear, 1956] для придания механической прочности данным полимерам. Значительно позднее, в середине 80-х, начале 90-х годов, создаются первые нанокомпозитные материалы [Bourgeat-Lami et al., 1996; Helbert et al., 1996; Reynaud et al., 1999; Okada et al., 1988]. Начинают активно исследоваться биологические свойствам композитных наноматериалов на основе полимеров с добавлением НЧ металлов и оксидов металлов, исследуется антибактериальная активность [Weickmann et al., 2005; Pradhan et al., 2003], а также биосовместимость данных материалов на клеточном и тканевом уровнях [Gerhardt et al., 2007]. Тем не менее, несмотря на значительное число современных работ, демонстрирующих получение композитных материалов на основе полимеров с

добавлением НЧ металлов и оксидов металлов, проявляющих антибактериальные свойства, часто в процессе синтеза и при получении покрытий на основе синтезируемых композитных материалов возникают поверхностные дефекты и структурные повреждения [Ranjbar et al., 2019; Hosseini et al., 2016]; в ряде случаев получаемые материалы токсичны для клеток животных и человека [Nirmala et al., 2012; Lee et al., 2014; Ramezani et al., 2014]. Нужно отметить, что цитотоксичность антибактериальных композитных материалов в некоторых работах вовсе не рассматривалась [Ciofi et al., 2005; Dimitrakellis et al., 2021; Preethi et al., 2020].

В качестве полимерных матриц для конструирования композитных материалов были использованы 3 вида полимеров, принадлежащих к различным классам химических соединений, имеющие характерные физико-химические свойства и представляющие интерес с точки зрения конструирования композитных материалов на их основе: поли(лактид-ко-гликоlid) (ПЛГА), боросилоксан (БС) и политетрафторэтилен (ПТФЭ). ПЛГА — сополимер молочной и гликолевой кислот. Особенностью данного полимера является регулируемая биоразлагаемость, достигаемая за счет изменения соотношения остатков молочной и гликолевой кислот в полимерной цепи [Haider et al., 2015; Makadia & Siegel, 2011]. БС — полимер класса кремнийорганических соединений, представляющий собой неньютоновский материал. Данный полимер обладает уникальной способностью к самовосстановлению, которую также называют «самозалечиванием» боросилоксана. Благодаря данным свойствам боросилоксан широко используется в противоударной экипировке и броне, а также может применяться в качестве сухого «обеззараживающего средства» для рук. ПТФЭ — полимер класса фторопластов; обладает превосходными гидрофобными, антифрикционными, термостабильными свойствами благодаря химической связи углерод-фтор [Dhanumalayan & Joshi, 2018]. Еще одной важной особенностью фторполимеров является их биоинертность и превосходная биосовместимость [Demling et al., 2010].

Таким образом, для получения бездефектных образцов композитных материалов на основе рассматриваемых полимерных матриц, появляется необходимость в разработке и оптимизации метода синтеза [Hiremath et al., 2021; Fu et al., 2019; Xu et al., 2008]. Для дальнейшего практического применения важно также охарактеризовать физическо-химические свойства синтезированных материалов, а для биомедицинского применения композитных материалов, на основе неньютоновского материала (боросилоксан), необходимо оценивать механические (вязкоупругие) свойства при функционализации наночастицами. Также немаловажной характеристикой новосинтезированных композитных материалов является оценка способности образовывать биологически активные соединения — активные формы кислорода; а также степени их воздействия на клеточные биополимеры — нуклеиновые кислоты и белковые молекулы. Безусловно важна оценка способности синтезированных композитных материалов ингибировать рост бактериальных клеток. Отдельный интерес представляет исследование возможности полученных материалов и покрытий на их основе предотвращать рост бактериальных биопленок, образованных видами бактерий, имеющими эпидемиологическое значение. Как известно, антибактериальные агенты, используемые в медицине, пищевой промышленности, и других сферах, не могут использоваться при наличии явного токсического воздействия на клетки. Как следствие, крайне актуальным является проведение оценки влияния полученных композитных материалов на жизнеспособность клеточных культур *in vitro*.

**Целью** настоящей работы являлась исследование влияния наночастиц оксидов железа, цинка и алюминия, импегрированных в полимерные матрицы боросилоксана (БС), поли(лактид-ко-гликолида) (ПЛГА) и политетрафторэтилена (ПТФЭ), на жизнеспособность прокариотических и эукариотических клеток.

#### **Задачи:**

1. Разработать метод получения композитных полимерных пленок с поверхностями, не имеющими существенных дефектов, на основе поли(лактид-ко-гликолида), боросилоксана, политетрафторэтилена и наночастиц оксидов железа, цинка и алюминия;
2. Оценить способность полученных композитных полимерных материалов к генерации в водных растворах активных форм кислорода, а также окислительному повреждению ДНК и белков *in vitro*;
3. Исследовать бактериостатические и бактерицидные свойства полученных композитных полимерных материалов в условиях культивирования клеток в жидких средах и на твердых поверхностях;
4. Изучить влияние полученных композитных полимерных материалов на параметры, характеризующие жизнеспособность эукариотических клеток в культурах.

#### **Новизна научной работы**

Ранее нашим коллективом была разработана модификация метода лазерной абляции в жидкостях, позволяющего получать НЧ с заданными физико-химическими характеристиками. На основе литературных данных и серии предварительных экспериментов в ходе выполнения настоящей работы среди нескольких десятков типов синтезированных наночастиц были отобраны наиболее эффективные препараты НЧ оксидов металлов с необходимыми физико-химическими свойствами.

Была разработана низкотемпературная технология изготовления композитных материалов на основе полимеров, содержащих полученные НЧ в различных концентрациях (0,001–0,1 %), а также установлен регламент получения образцов пленок на их основе [Симакин и др., 2022]. Полученные покрытия, содержащие в составе НЧ оксида железа, способствовали генерации активных форм кислорода (гидроксильных радикалов и перекиси водорода). При контакте с данными покрытиями наблюдалось окислительное повреждение молекул ДНК и белков, что подтверждалось повышением содержания 8-оксогуанина в ДНК *in vitro*, — ключевого биомаркера окислительного стресса, а также увеличением концентрации долгоживущих активных форм белков. Полученные композитные материалы обладали бактериостатическими свойствами; композитные материалы, функционализированные НЧ оксида цинка, обладали ярко выраженными антибактериальными свойствами и способностью разрушать бактериальные биопленки. При этом все синтезированные композитные материалы не влияли на рост и развитие культур эукариотических клеток линии SH-SY5Y и первичных культур легочных фибробластов мыши.

#### **Научно-практическая ценность**

Как было показано в многочисленных экспериментальных исследованиях, проведенных за последние десятилетия, НЧ многих металлов и оксидов металлов, а также системы на их основе, в том числе, композитные материалы, показывают многообещающие результаты в качестве агентов для борьбы с бактериальными возбудителями инфекций, включая антибиотикорезистентные штаммы. Как известно, широкое применение наноматериалов в качестве антибактериальных агентов возможно только при отсутствии токсического воздействия на клеточном уровне. Результаты,

полученные в ходе исследований воздействия изготовленных композитных материалов на живые системы *in vitro* (исследование антибактериальной активности и влияние на жизнеспособность культур животных клеток) носят преимущественно прикладной характер, поскольку рассматривают возможность использования таких материалов в качестве покрытий, препятствующих росту и развитию бактериальных клеток на поверхностях, подверженных бактериальной контаминации. Использование таких покрытий может являться перспективным подходом для предотвращения контаминации и порчи продуктов в пищевой промышленности, а также в качестве материалов, применяемых в биомедицинской отрасли. В настоящее время покрытия на основе политетрафторэтилена, функционализированного наночастицами оксида цинка проходят апробацию в качестве материала для восстановления досок для разделки туш.

#### **Положения, выносимые на защиту**

Синтезированные низкотемпературным методом композитные материалы на основе ПЛГА, боросилоксана и политетрафторэтилена с наночастицами оксидов цинка, железа и алюминия обладают бактериостатическими свойствами. Композитные материалы на основе ПЛГА, боросилоксана и политетрафторэтилена с наночастицами оксидов железа увеличивают интенсивность генерации активных форм кислорода в водных растворах, способствуют окислительному повреждению ДНК и белков *in vitro*.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и обусловлена широкой апробацией и надёжностью использования экспериментальных методов исследования, а также качественной и количественной согласованностью с результатами других независимых исследований. Материалы и результаты исследований в диссертации были представлены на российских конференциях, в том числе, с международным участием: Международная конференция «Volga Neuroscience Meeting» (Нижний Новгород, 2021); школа-конференция «Прохоровские чтения-2021» (Москва, 2021); международная конференция «Food quality and food safety» (Москва, 2021); 75-ая всероссийская с международным участием школа-конференция «Биосистемы: организация, поведение, управление 2022» (Нижний Новгород, 2022); 20 международная конференция по лазерной оптике «ICLO-2022» (Санкт-Петербург, 2022); школа-конференция «Самоорганизация в «мягких» средах: достижения и современное состояние 2022» (Москва, 2022); школа-конференция «Физика водных растворов-2022» (Москва, 2022); 76-ая всероссийская с международным участием школа-конференция «Биосистемы: организация, поведение, управление 2023» (Нижний Новгород, 2023); VII Съезд биофизиков России (Краснодар, 2023).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 11 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в систему индексирования Web of Science.

**Личный вклад автора.** Автор лично принимал участие в проведении экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также совместно с соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследования на научных конференциях и симпозиумах.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 173 страницах, содержит 4 таблицы, 74 рисунка. Библиографический указатель содержит 427 источников литературы.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Объекты и методы исследования

**Генерация наночастиц.** НЧ оксидов металлов были синтезированы методом лазерной абляции в деионизированной воде [Dolgaev et al., 2002]. В качестве мишени использовались образцы металлов (железа, цинка и алюминия) высокой чистоты ( $\geq 99,99\%$ ) в виде пластины, погруженной в рабочую жидкость ( $V=10$  мл). Был использован импульсный иттербиевый волоконный лазер со следующими параметрами излучения: длина волны 1064 нм; длительность импульса 4–200 нс; частота следования импульсов — 10–20 кГц; средняя мощность — до 20 Вт; энергия импульса — 0,7–2 мДж. Слой жидкости над мишенью составлял около 1000–1500 мкм. Время облучения варьировалось в пределах от 5 до 20 мин.

**Получение композитных материалов.** Для получения композитных материалов на основе боросилоксана использовали полидиметилсилоксан с концевыми гидроксильными группами (ПДМС) (молекулярная масса 20000 г/моль) (Sigma-Aldrich, США) и измельченную борную кислоту (БК) (Sigma-Aldrich, США) (содержание основного вещества 99,9 %, массовая доля борного ангидрида 57,1 %, средний размер частиц БК 0,075 мкм) в качестве прекурсоров. Массовое соотношение ПДМС и БК составляло 10:1. Боросилоксан разбавляли этанолом и смешивали с НЧ до конечных концентраций 0,001; 0,01; 0,1 % массы. Далее этанол упаривали в вакууме. Боросилоксан без НЧ также разбавляли этанолом и сушили. Образцы композитов и боросилоксан, не содержащий НЧ, раскатывали при помощи валиков для формирования образцов в виде пленок.

Для получения композитного материала на основе ПЛГА применялась низкотемпературная технология. Вкратце, композитный материал готовился путем предварительного приготовления 3 % раствора коммерческого ПЛГА (Creative Biolabs, США) в хлороформе с перемешиванием до гомогенного состояния в течение 1 часа при температуре раствора 57 °С. Далее к растворенному ПЛГА добавлялся коллоидный раствор НЧ необходимой концентрации. Материал нагревали до 40 °С, а затем прокатывали через валки.

Для синтеза композитных материалов на основе матрицы ПТФЭ, в коллоидных растворах НЧ воду заменяли ацетоном при помощи центрифугирования. Коллоидный раствор наночастиц центрифугировали на с помощью центрифуги Sigma 3-16KL (Sigma, Германия) в течение 40 мин при 7000 g; надосадочную жидкость заменяли на ацетон (не менее трех раз). Полученный коллоидный раствор смешивали с фторопластовым лаком (Пласт Полимер-Пром, Россия) до конечной концентрации наночастиц 0,1; 0,01 и 0,001 %. Данный лак представляет собой политетрафторэтилен, растворенный в смеси ацетона, бутилацетата, циклогексанона и толуола в соотношении 25:40:10:25 массовых частей. Для получения образцов покрытий капли раствора наночастиц в лаке объемом 500 мкл наносили на круглые обезжиренные стекла диаметром 25 мм. Перед началом экспериментов покрытия сушили в течение 48 ч в вытяжном шкафу. Перед проведением микробиологических исследований образцы фторопласта (4×4×6 мм) с нанесенным композитным покрытием предварительно дезинфицировали путем замачивания в 70 % этиловом спирте на 2–3 ч.

**Исследование микрорельефа** поверхности образцов пленок композитных материалов осуществлялось при помощи атомно-силового микроскопа NPX200 (Seiko Instruments, Япония). Измерения проводились в контактном режиме.

**Распределение наночастиц в образцах** композитных материалов определялось с помощью модуляционно-интерференционного микроскопа МИМ-321 (Amphora Labs, Россия).

**Реологические характеристики** боросилоксана и композитов на его основе измеряли модульным высокоточным реометром MCR 302e (Anton Paar, Австрия). Измерения проводились в осцилляторном режиме с использованием шпинделя с плоской поверхностью PP25 (Anton Paar, Австрия).

**Концентрацию образовавшейся  $H_2O_2$**  оценивали с помощью хемилюминесцентного метода с использованием системы люминол–пара-йодфенол–пероксидаза хрена. Хемилюминесценцию регистрировали с помощью высокочувствительного хемилюминометра Биотокс-7А-УЗИ (АНО "Инженерный центр - Экология", Россия). Образцы композитных материалов, содержащие различные концентрации НЧ в составе (0,001–0,1 %), в виде пленок размером 10×10 мм и толщиной 700–900 мкм помещали в полипропиленовые флаконы (Beckman, США) при 40 °С на 2 часа. После инкубации в 20 мл воды к пробе добавляли 1 мл заранее приготовленного «счетного раствора». Данный раствор содержит 1 мМ Трис-НСl буфера, рН 8,5, 50 мкл пара-йодфенола, 50 мкл люминола, 10 нМ пероксидазы хрена. В группе «контроль» эксперимент проводился без образца. Чувствительность метода позволяла определять  $H_2O_2$  при концентрациях <1 нМ.

**Концентрацию гидроксильных радикалов**, образующихся в водных растворах, определяли по реакции с кумарин-3-карбоновой кислотой (ККК), продуктом которой является гидроксикумарин-3-карбоновая кислота (7-ОН-ККК). Инкубация проводилась при 80 °С в течение 2 часов. 7-ОН-ККК — флуоресцентный зонд, обеспечивающий количественное определение ОН-радикалов. Флуоресценцию 7-ОН-ККК регистрировали на спектрофлуориметре JASCO 8300 (JASCO, Япония) при  $\lambda_{ex} = 400$  нм (длина волны возбуждения),  $\lambda_{em} = 450$  нм (длина волны излучения). Коммерческая 7-ОН-ККК (Sigma -Aldrich, США) использовалась для калибровки.

**Оценка изменения концентрации долгоживущих активных форм белков** осуществлялась при помощи хемилюминесцентного метода. Данный метод эффективен и чувствителен для определения свободнорадикальных реакций. Хемилюминометр Биотокс-7А (АНО "Инженерный центр - Экология", Россия) использовали для изучения долгоживущих реакционноспособных форм белков путем измерения хемилюминесценции белковых растворов бычьего сывороточного альбумина при повышении температуры. Измерения хемилюминесценции проводили в темноте при комнатной температуре в пластиковых полипропиленовых флаконах объемом 20 мл (Beckman, США). Образцы предварительно нагревали на водяной бане до 45 °С в течение 2 часов. Все образцы хранились в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин после экспозиции. В качестве контроля использовали ненагретые белковые растворы.

**ИФА.** Для количественного определения 8-оксогуанина (8-ОГ) в ДНК применялся неконкурентный твердофазный ИФА с использованием моноклональных антител, специфичных к 8-ОГ. Формирование комплекса антиген-антитело с антителами против 8-ОГ (в разведении 1:2000) проводили в блокирующем растворе (100 мкл/лунку) путем инкубации в течение 3 часов при 37 °С. Оптическую плотность образцов измеряли на планшетном фотометре (Titertek Multiscan, Финляндия) при  $\lambda = 405$  нм.

**Статистический анализ** данных проводили с помощью пакетов программного обеспечения SigmaPlot 12 и GraphPad Prism 8. Данные на графиках представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего. Для усреднения использовали данные

не менее трех независимых экспериментов ( $n \geq 3$ ). Для проверки нормальности распределения выборки применялся критерий Шапиро-Уилка. Для сравнения 2-х независимых выборок, подчиняющихся нормальному закону распределения, применялся  $t$ -критерий Стьюдента. Для сравнения с контрольной группой в экспериментах с большим количеством независимых экспериментальных групп ( $>3$ ) применялся дисперсионный анализ Уэлча (ANOVA Уэлча), являющийся альтернативой однофакторному дисперсионному анализу, при котором нарушается допущение о равных дисперсиях. В качестве апостериорного критерия для множественных сравнительных тестов использовался критерий Даннета. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Исследования с культурами эукариотических клеток.** В качестве биологических объектов исследования были использованы клеточные культуры: постоянная клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™), а также первичные культуры фибробластов легких мыши. Клеточная линия SH-SY5Y является удобной моделью для изучения развития и дифференцировки клеток *in vitro*. Все манипуляции с тканями и клетками животных проводили в чистых помещениях с использованием бокса биологической безопасности II класса «Ламинар-С» («Lamsystems», Россия). Первичные культуры клеток изолированных фибробластов легких мыши получали по стандартному протоколу с небольшими изменениями; легочную ткань получали из мышц линии BALB/c. В качестве питательной среды для культивирования клеточных культур использовали среду ДМЕМ («Биолот», Россия), содержащую 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США), L-глутамин («ПанЭко», Россия), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). Культивирование проводили в инкубаторе S-Bt Smart Biotherm CO<sub>2</sub> (Biosan, Латвия) при температуре 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub>.

**Микробиологические исследования.** Для исследований бактериостатических свойств композитных материалов использовались суспензионные культуры лабораторного штамма *Escherichia coli*. Для культивирования бактериальных клеток *E. coli* применялся бульон Лурия-Бертани (Росмедбио, Россия). Оценка бактериостатического эффекта осуществлялась при помощи регистрации оптической плотности суспензии бактериальных клеток *E. coli* в среде при 600 нм (OD<sub>600</sub>) через 24 часа после культивирования в непрерывном контакте с поверхностями образцов композитных материалов.

Для оценки антибактериальных свойств композитных материалов на основе ПТФЭ также применялись бактериальные изоляты, полученные с поверхностей пищевых производств: грамположительные *L. monocytogenes* (резистентные к азитромицину, эритромицину и сульфаметоксазолу), *S. aureus* и грамотрицательные *P. aeruginosa*, *S. enterica* серотип *Typhimurium* (резистентные к азитромицину). Экспериментальная часть микробиологических исследований с использованием изолятов, выделенных на пищевых предприятиях, проводилась на базе Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской Академии Наук. На тестируемые поверхности (образцы фторопласта) наносились композитные материалы на основе ПТФЭ, содержащие различные концентрации НЧ. Оценку антибактериальной активности проводили при помощи метода микробиологических смывов с последующими посевами на плотную питательную среду. Бактериальные клетки культивировали на поверхностях композитных покрытий в течение 8 и 16 часов. В качестве культуральных сред использовали среду Лурия-Бертани (BD Difco, США) и

триптон-соевый бульон (Panreac AppliChem, Испания). Для оценки антибиопленочной активности композитных покрытий на основе политетрафторэтилена, на поверхность тефлоновых кубиков наносили бульонную культуру бактериальных клеток ( $V=30$  мкл) и оставляли высыхать при комнатной температуре на 30 мин. Для визуализации живых и мертвых клеток бактериальных биопленок производили окрашивание с помощью набора флуоресцентных красителей Filmtracer Live/Dead Biofilm Viability Kit (Invitrogen, США) и анализировали под микроскопом Eclipse Ni (Nikon, Япония) с соответствующими фильтрами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Синтез и характеристика НЧ оксидов металлов*

При помощи метода лазерной абляции в деионизированной воде были синтезированы коллоидные растворы наночастиц оксидов железа, цинка и алюминия разных размеров. В ходе предварительных испытаний было выяснено, что наиболее подходящими для поставленных задач являются НЧ размером 40–60 нм. Налажено потоковое получение наночастиц с средним гидродинамическим диаметром порядка 50 нм (Рис. 1 А–В). Стабильность — важная характеристика коллоидных систем; частицы, имеющие показатель  $\zeta$ -потенциала более 20 мВ по модулю, как правило, считаются стабильными. В связи с этим оценивался профиль  $\zeta$ -потенциала полученных наночастиц; максимумы распределений составили +20, +20 и +50 мВ для НЧ оксидов железа, цинка и алюминия соответственно (Рис. 1 Г–Е). Нужно отметить, что НЧ оксида алюминия обладали высокой стабильностью и не образовывали агрегатов в течение нескольких месяцев. Полученные спектры поглощения коллоидных растворов НЧ соответствовали оксидам железа, цинка, алюминия и в дальнейшем использовались для экспресс-определения концентрации наночастиц (Рис. 1 Ж–И).

С помощью просвечивающей электронной микроскопии была определена морфология полученных наночастиц: НЧ оксида цинка имели стержневидную морфологию, в то время как НЧ оксидов железа цинка сферическую морфологию (Рис. 1 К–М). При помощи энергодисперсионной спектроскопии был определен элементный состав синтезированных НЧ. Установлено, что полученные НЧ не имели в своем составе примесей и обладали высокой химической чистотой (Рис. 2).

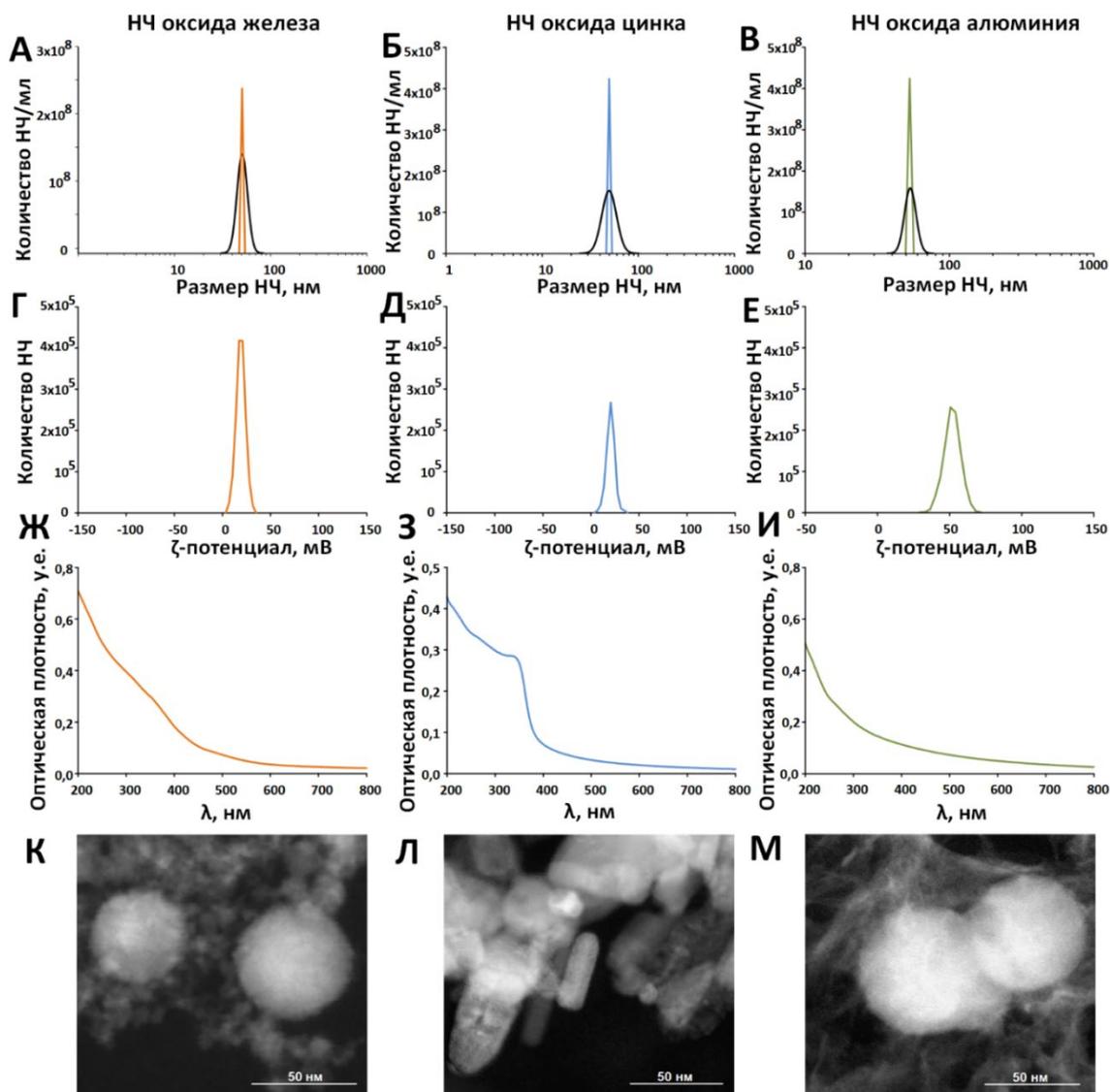


Рисунок 1. Характеристики синтезированных НЧ оксидов металлов. А, Б, В — концентрация и распределение гидродинамических диаметров НЧ; Г, Д, Е — профили дзета-потенциалов НЧ; Ж, З, И — спектры оптического поглощения коллоидных растворов НЧ; К, Л, М — микрофотографии одиночных НЧ, полученные при помощи ПЭМ. Оранжевый цвет — характеристики НЧ оксида железа, синий цвет — характеристики НЧ оксида цинка, зеленый цвет — характеристики НЧ оксида алюминия

### *Синтез и характеристика композитных материалов*

С помощью разработанной низкотемпературной технологии были синтезированы композитные материалы на основе поли(лактид-ко-гликолида), боросилоксана и политетрафторэтилена, содержащие НЧ оксидов металлов и были получены образцы пленок на их основе. При помощи атомно-силовой микроскопии (АСМ) был исследован микрорельеф поверхностей полученных пленок композитных материалов на основе ПЛГА (Рис. 3 А–Г) и ПТФЭ (Рис. 3 Д–З).

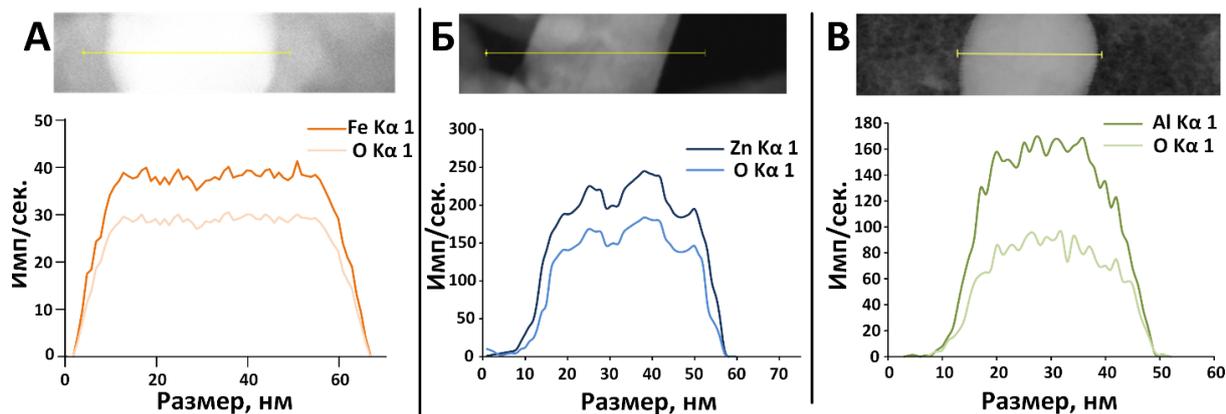


Рисунок 2. Результаты энергодисперсионной спектроскопии синтезированных НЧ. А – состав НЧ оксида железа, Б – состав НЧ оксида цинка, В – состав НЧ оксида алюминия.

Верхний ряд — анализируемая область НЧ (ROI), нижний ряд – профиль распределения химических элементов

Исследование микрорельефа поверхностей образцов композитных материалов на основе боросилоксана с помощью АСМ было затруднено, так как кантилевер срезал часть поверхности и застревал. Установлено, что поверхности образцов композитных материалов на основе ПЛГА и ПТФЭ являются бездефектными и не имеют выраженных повреждений, каверн, изломов и трещин. На анализируемых участках неоднородность поверхности не превышала нескольких десятков нанометров.

Известно, что метод атомно-силовой микроскопии является классическим подходом для выявления дефектов на поверхности материалов, однако не позволяет определить и визуально оценить распределение добавок в многокомпонентных системах. Для исследования пространственного распределения наночастиц в полимерах был использован метод модуляционно-интерференционной микроскопии (МИМ). МИМ фактически измеряет «набег фаз», что дает возможность различать в полимере объекты, имеющие различный показатель преломления. МИМ обладает высокой разрешающей способностью (разрешение по поверхности – до 50 нм, разрешение по вертикали – 0,1 нм), а также возможностью регистрировать разность фаз до 200 нм.

Показатели преломления рассматриваемых НЧ оксидов металлов при 405 нм (рабочая длина волны МИМ) значительно отличались от показателей преломления полимеров, используемых в качестве матриц для композитных материала (2.50 для НЧ оксида железа, 2.02 для НЧ оксида цинка, 1.99 для НЧ оксида алюминия, 1.57 для боросилоксана, 1.47 для ПЛГА, 1.77 для ПТФЭ). На Рисунке 4 представлены 3D-реконструкции распределения НЧ в образцах композитных материалов на основе политетрафторэтилена, полученные при помощи МИМ, а также плоскостные изображения. Установлено, что распределение НЧ в полимерных матрицах является неоднородным; НЧ в полимерах формируют локальные области с повышенной концентрацией, размер которых увеличивался пропорционально росту концентрации НЧ в полимерных матрицах. Такие структуры достигают размеров в несколько микрометров в образцах композитных материалов, содержащих 0,1 % НЧ (Рис. 4).

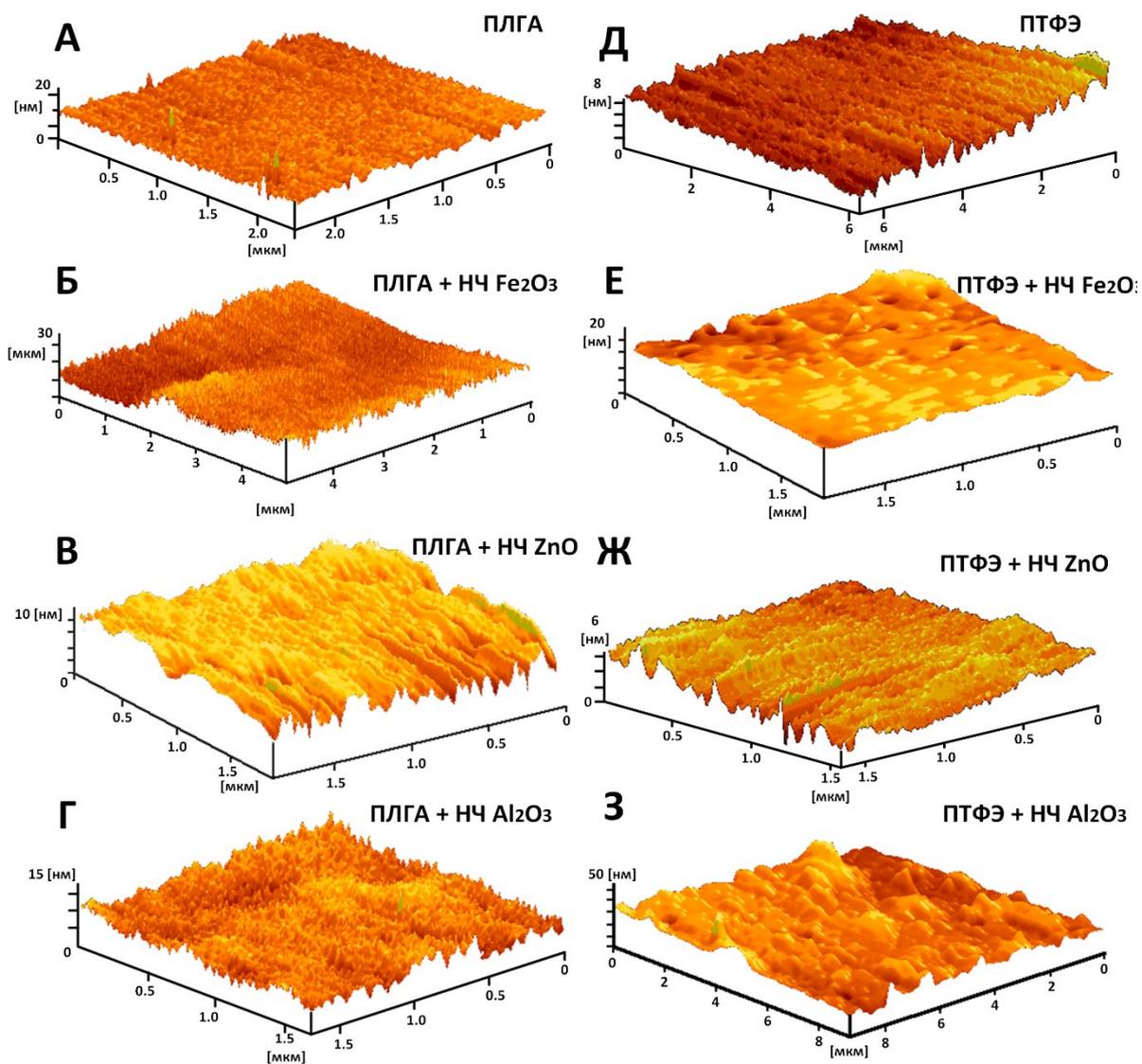


Рисунок 3. Реконструкция поверхностей композитных материалов на основе ПЛГА и ПТФЭ, полученная при помощи атомно-силовой микроскопии. А, Б, В, Г — поверхности композитных материалов на основе ПЛГА; Д, Е, Ж, З — поверхности композитных материалов на основе ПТФЭ; ПТФЭ — политетрафторэтилен, ПЛГА — поли(лактид-ко-гликолид)

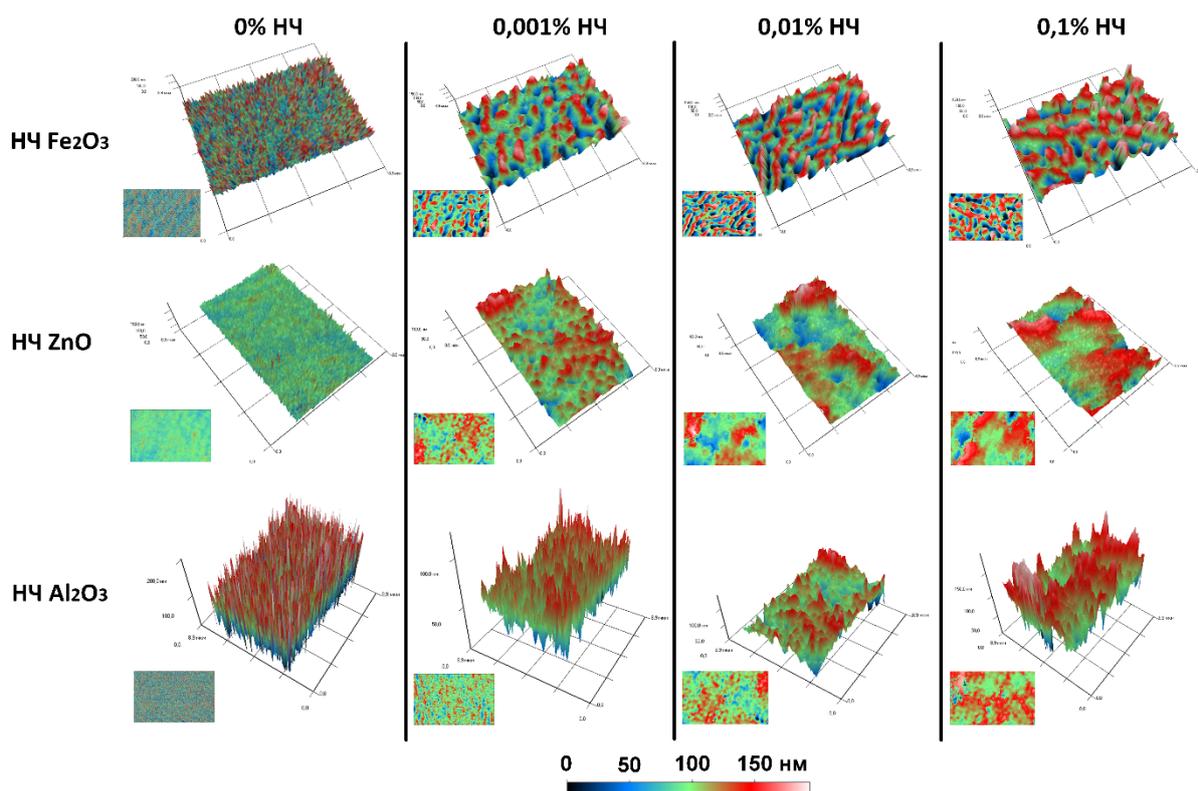


Рисунок 4. 3D-реконструкции композитных материалов на примере композитных материалов на основе политетрафторэтилена, содержащего различные виды НЧ оксидов металлов в диапазоне концентраций 0–0,1 %, полученные при помощи модуляционно-интерференционной микроскопии. В нижнем левом углу каждого изображения представлен вид реконструкции «сверху». Размер ячейки сетки —  $2,45 \times 2,45$  мкм

#### *Исследование механических свойств композитных материалов на основе боросилоксана*

Боросилоксан является полимером с изменяемыми вязкоупругими свойствами в зависимости от градиента скорости приложения внешнего воздействия и ведет себя как неньютоновская жидкость. В связи с этим, оценивалось влияние добавления наночастиц оксидов металлов на механические свойства композитов на основе данного полимера. Проведенные реологические исследования полученных композитных материалов на основе боросилоксана, функционализированные НЧ  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , НЧ  $\text{ZnO}$  и НЧ  $\text{Al}_2\text{O}_3$  показали, что при низких частотах сдвига наблюдается преобладание вязких свойств материалов над упругими, при этом с увеличением скорости сдвига вклад вязких свойств снижается. Из полученных реологических спектров, представленных на Рис. 5 (А, В, Д) следует, что добавление НЧ в используемых концентрациях не приводило к значительному изменению вязкоупругих свойств боросилоксана. Также установлено, что снижение вязкости при увеличении температуры в рассматриваемом диапазоне (295–335 К) являлось близким к линейному. Важно отметить, что в диапазоне температуры с 294 до 310 К, что соответствует температурному диапазону порядка 21–37 °С, вязкость композитных материалов на основе боросилоксана снижалась не значительно независимо от концентрации вносимых НЧ оксидов металлов (Рис. 5 Б, Г, Е).

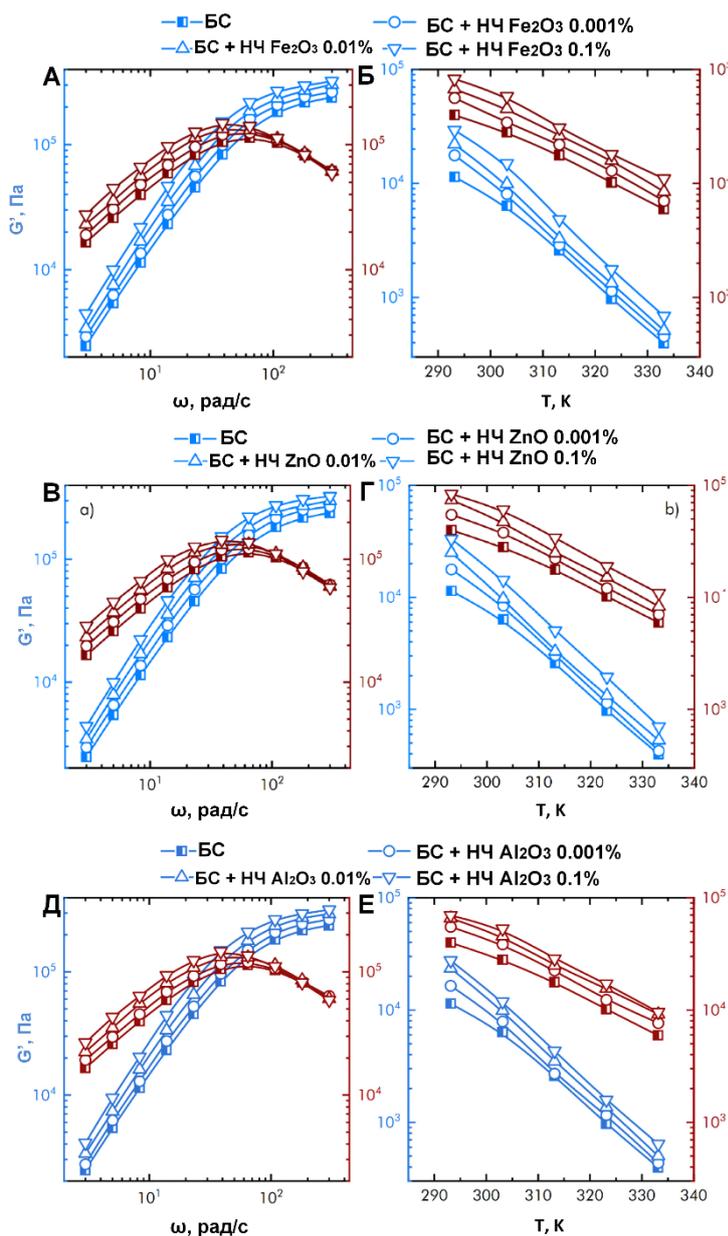


Рисунок 5. Влияние добавления НЧ оксидов металлов различной концентрации (0,001–0,1 %) в матрицу боросилоксана на механические спектры композитных материалов. Модуль накопления — синий цвет, модуль потерь — красный цвет. А, В, Д — зависимость изменения механических спектров композитов от круговой частоты вращения; Б, Г, Е — температурная зависимость изменения механических спектров композитных материалов

инкубируемых с материалами, содержащими 0,1 % данных НЧ, составляла менее 50 нМ. Аналогично результатам оценки концентрации образующихся гидроксильных радикалов, композитные материалы, содержащие в составе НЧ  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , способствовали образованию перекиси водорода; наиболее выраженный эффект также наблюдался для образцов материалов, содержащих 0,1 % НЧ  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , концентрация перекиси водорода в водных растворах, инкубируемых с данными образцами достигала 15–20 нМ (Рис. 6 Б).

### Оценка влияния композитных материалов на генерацию АФК в водных растворах

Исследовано влияние синтезированных композитных материалов на генерацию биологически активных молекул — АФК: перекиси водорода и гидроксильных радикалов (рис. 6). Установлено, что все полученные композитные материалы, содержащие НЧ  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , способствовали увеличению интенсивности генерации АФК в водных растворах. При этом, изменений концентрации рассматриваемых АФК в водных растворах с образцами полимеров, не содержащих НЧ в составе не наблюдалось. Тип используемой полимерной матрицы (ПЛГА, боросилоксан или ПТФЭ) также не влиял на изменение концентрации рассматриваемых АФК. Наиболее выраженное повышение концентрации ОН-радикалов наблюдалось при использовании композитов, функционализированных 0,1 % НЧ  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Концентрация ОН-радикалов достигала порядка 150 нМ при концентрации НЧ  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (Рис. 6 А). Для композитных материалов, функционализированных НЧ  $\text{Al}_2\text{O}_3$  и НЧ  $\text{ZnO}$ , эффект был выражен незначительно, концентрация гидроксильных радикалов в водных растворах,

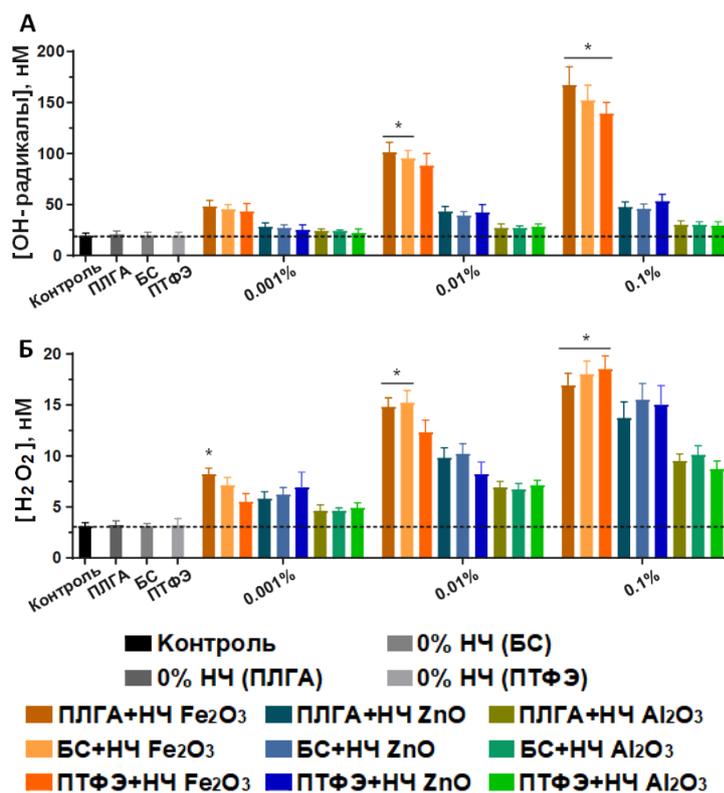


Рисунок 6. Влияние синтезированных композитных материалов на образование АФК: А — гидроксильных радикалов, Б — перекиси водорода; \* — статистически значимая разница, по сравнению с контролем;  $p < 0,05$ , ANOVA

присутствии полученных полимерных композитных материалов (Рис. 7). Наиболее интенсивное окислительное повреждение белков наблюдалось при использовании композитных материалов, содержащих НЧ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (в 3 раза интенсивнее, чем в контроле при концентрации 0,1 %). Степень интенсивности образования ДАФБ увеличивалась с увеличением концентрации наночастиц оксидов металлов. В то же время вид и концентрация НЧ оксидов металлов, вносимых в полимерные матрицы, практически не влияли на средний период полураспада ДАФБ белков, который составлял около 4–5 часов во всех экспериментальных группах.

### Оценка влияния композитных материалов на окислительное повреждение белков и ДНК

Известно, что АФК — это высоко реакционноспособные соединения, проявляющие биологическую активность, повреждающие биологические макромолекулы (мембранные липиды, белки и нуклеиновые кислоты). В присутствии АФК в среде, наблюдается окислительное повреждение молекул белков, что приводит к генерации долгоживущих активных форм белков (ДАФБ), к которым относятся долгоживущие белковые радикалы и белковые гидропероксиды. Сами ДАФБ могут являться источником вторичных свободных радикалов, вызывающих повреждение других биомолекул. В связи с этим, оценивалась интенсивность образования ДАФБ в водных белковых растворах в

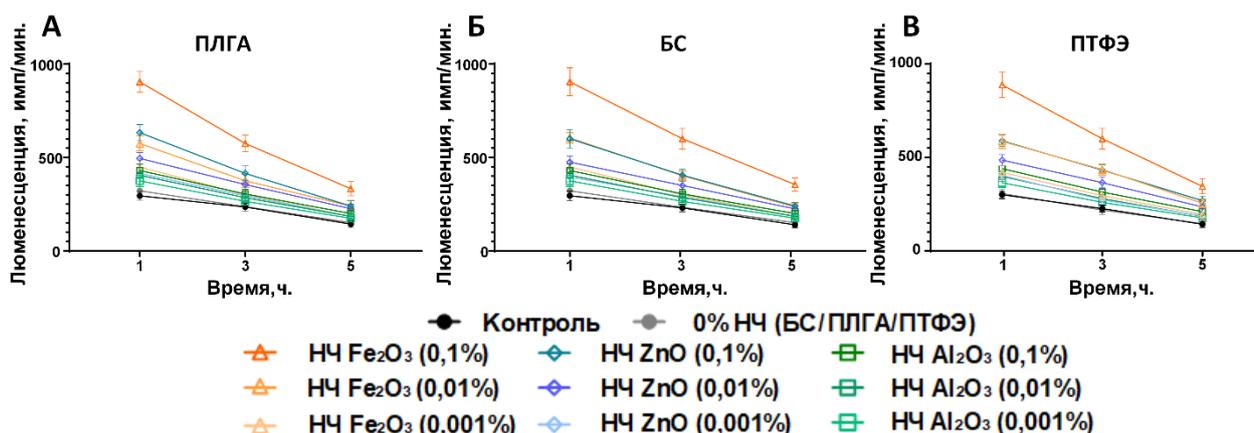


Рисунок 7. Влияние композитных материалов на образование долгоживущих активных форм белков. А — композитные материалы на основе полилактид-ко-гликолида (ПЛГА); Б — композитные материалы на основе полилактид-ко-гликолида (БС); В — композитные материалы на основе политетрафторэтилена (ПТФЭ); инкубация с образцами композитных материалов в течение 2 ч при 45 °С

Ключевым биомаркером окислительного повреждения ДНК является 8-оксогуанин (8-ОГ). Данный продукт окисления гуанина может приводить к ошибочному кодированию, поскольку 8-ОГ комплементарен как цитозину, так и аденину. Вследствие таких ошибочных взаимодействий в ходе последующих актов репликации в ДНК происходит замена пары Г-Ц на А-Т — процесс, также известный как трансверсия. С помощью метода твердофазного ИФА оценивалось количество образующихся 8-ОГ в водных растворах молекул ДНК, инкубируемых с образцами композитных материалов (Рис. 8).

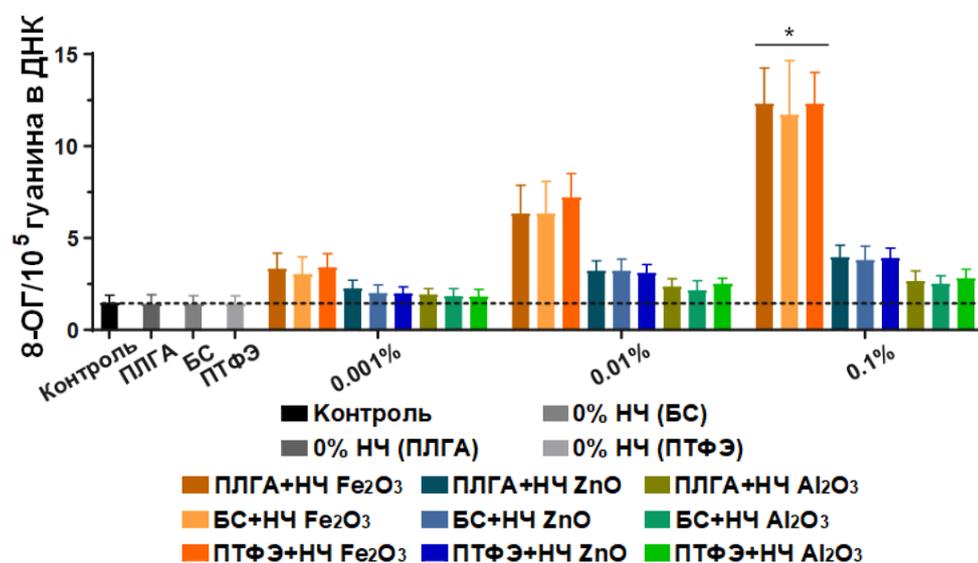


Рисунок 8. Влияние композитных материалов на образование 8-оксогуанинов в ДНК *in vitro*; \* — статистически значимая разница, по сравнению с контролем;  $p < 0,05$ , ANOVA

Полимерные матрицы, не содержащие НЧ оксидов металлов, не зависимо от состава полимера (боросилоксан, ПЛГА или ПТФЭ), не влияли на образование 8-ОГ в ДНК. Добавление к раствору ДНК композитных материалов содержащих НЧ  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  концентрацией 0,1 % приводило к увеличению содержания 8-ОГ в ДНК, в то время как добавление НЧ  $\text{ZnO}$  и НЧ  $\text{Al}_2\text{O}_3$  в аналогичных концентрациях не приводило к

статистически значимым изменениям. Таким образом, окислительное повреждение ДНК было выявлено при использовании композитных материалов, содержащих НЧ оксида железа в концентрации 0,1 %, в этом случае содержание 8-ОГ в ДНК увеличивалось почти в 6 раз относительно контрольных уровней. Композитные материалы, функционализированные НЧ ZnO и НЧ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> не приводили к развитию окислительных повреждений ДНК, концентрация 8-ОГ в группах с содержанием данных НЧ в полимерных матрицах 0,1 % составляла менее 5 молекул на 10<sup>5</sup> гуанинов в ДНК.

### **Оценка влияния полимерных композитных материалов на рост суспензионных культур клеток *E. coli***

Было исследовано влияние синтезированных композитных материалов на рост и развитие культур бактерий *E. coli* в жидкой среде (Рис. 9). Установлено, что концентрация бактериальных клеток *E. coli* в объеме среды, контактирующей с поверхностями образцов полимерных матриц, не содержащих НЧ, не отличалась от контрольного значения и через 24 часа составляла  $2,3 \times 10^5$ – $2,6 \times 10^5$  кл./мм<sup>3</sup>. Добавление НЧ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и НЧ ZnO в полимерные матрицы в концентрации 0,01% привело к ингибированию роста бактериальных клеток на ~80 и 90%, соответственно. Концентрация клеток, контактирующих с поверхностями образцов композитных материалов с 0,1 % НЧ ZnO, НЧ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и НЧ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> уменьшалась до  $\sim 1 \times 10^4$  кл./мм<sup>3</sup>,  $\sim 3 \times 10^4$  кл./мм<sup>3</sup> и  $\sim 6 \times 10^4$  кл./мм<sup>3</sup> соответственно. Таким образом, композитные материалы, функционализированные НЧ ZnO обладали наиболее выраженными бактериостатическими свойствами в отношении *E. coli*; наблюдалось максимальное ингибирование роста бактериальных клеток в 25 раз. Функционализация полимерных матриц НЧ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> приводила к значительному бактериостатическому эффекту только при использовании данных НЧ в концентрации 0,1 %.

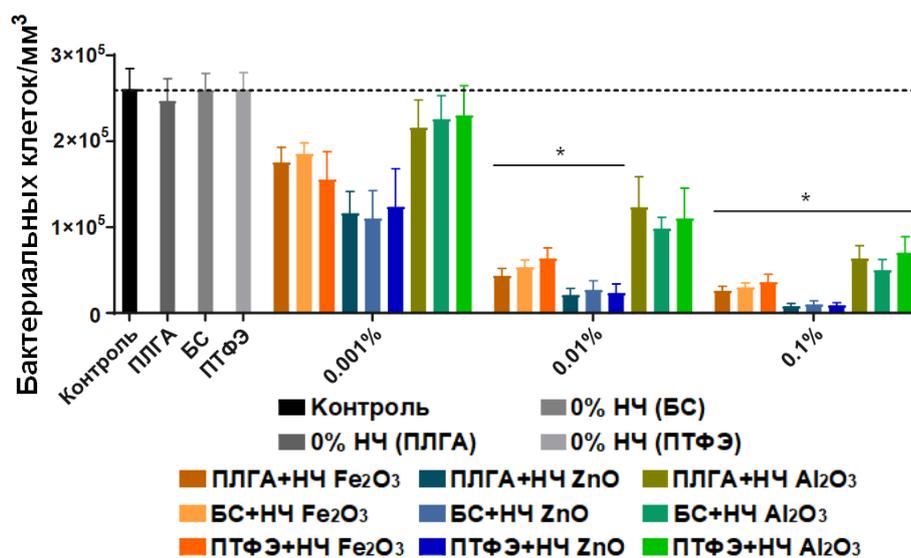


Рисунок 9. Влияние полимерных композитных материалов на рост суспензионных культур *E. coli*; \* — статистически значимая разница, по сравнению с контролем;  $p < 0,05$ , ANOVA

**Оценка антибактериальной активности композитных материалов на основе ПТФЭ в отношении резистентных бактериальных клеток, формирующих биопленки**

С помощью метода микробиологических смывов с последующими посевами на плотную питательную среду была исследована антибактериальная эффективность композитных покрытий на основе ПТФЭ, содержащих рассматриваемые НЧ оксидов металлов (0,1 %) в отношении бактериальных изолятов с пищевых производств: грамположительных *L. monocytogenes* (резистентные к азитромицину, эритромицину и сульфаметоксазолу), *S. aureus* (Рис. 10 А, Б) и грамотрицательных *P. aeruginosa*, *S. enterica* серотип *Typhimurium* (резистентные к азитромицину) (Рис.10 В, Г) видов бактерий. Все рассматриваемые композитные материалы обладали антибактериальным эффектом в отношении рассматриваемых видов бактерий. Композитный материал на основе ПТФЭ, функционализированный НЧ ZnO, обладал выраженными бактерицидными свойствами как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Количество КОЕ, идентифицированных в течение 6 и 18 часов культивирования на поверхности данного композитного материала снижалось на несколько порядков, по сравнению с контрольными значениями. Стоит отметить, что композитные материалы на основе политетрафторэтилена, содержащие НЧ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> также обладали антибактериальными свойствами в отношении рассматриваемых бактерий, однако эффект был выражен слабее.

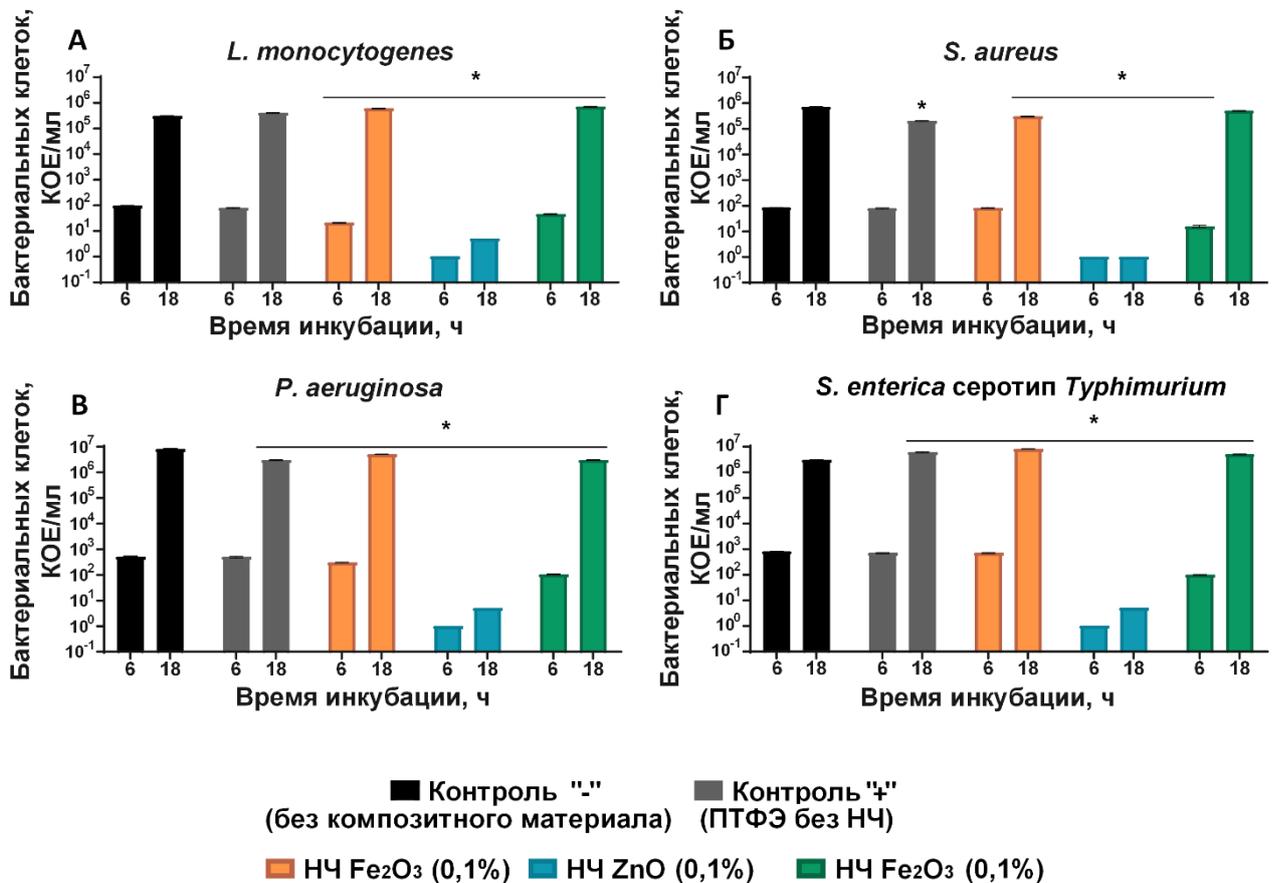


Рисунок 10. Концентрации бактериальных клеток (КОЕ) в смывах с поверхностей композитных материалов на основе политетрафторэтилена, содержащих 0,1 % НЧ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, НЧ ZnO и НЧ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> после инкубации в течение 6 и 18 часов; \* — статистически значимая разница, по сравнению с контролем;  $p < 0,05$ , ANOVA

Проведенные исследования антибиопленочной активности композитных материалов при помощи окрашивания флуоресцентными красителями SYTO-9 и пропидий-йодид показали, что на поверхности композитного материала, содержащего 0,1 % НЧ ZnO жизнеспособные бактериальные клетки практически не визуализируются и у большинства мертвых бактериальных клеток нарушена морфология (Рис. 11). Таким образом, было определено, что композитный материал на основе ПТФЭ, функционализированный НЧ ZnO, обладал значительным антибиопленочным эффектом.

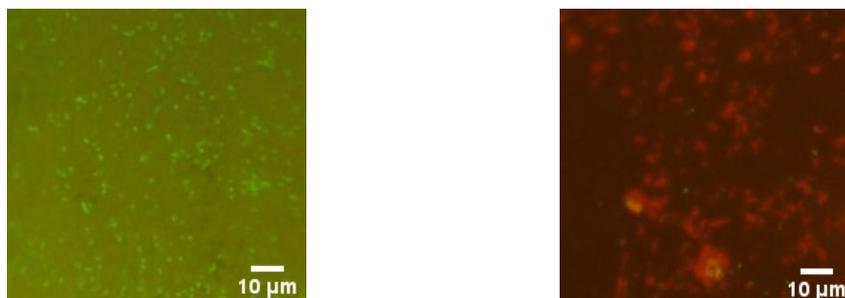


Рисунок 11. Репрезентативные микрофотографии бактериальных биопленок, окрашенных live-dead kit: слева — поверхность ПТФЭ без НЧ; справа — поверхность ПТФЭ, функционализированного 0,1 % НЧ ZnO. Зеленый цвет — жизнеспособные клетки, красный цвет — мертвые клетки). ПТФЭ — политетрафторэтилен.  $\mu\text{m}$  — мкм

#### ***Влияние композитных материалов на основе БС, ПЛГА и ПТФЭ на жизнеспособность клеточных культур *in vitro****

Влияние полученных композитных материалов на основе БС и ПЛГА на рост и развитие клеток в культурах было исследовано в отношении клеточной линии SH-SY5Y; оценка влияния на жизнеспособность клеточных культур образцов композитных покрытий на основе ПТФЭ проводилась в отношении первичных клеточных культур фибробластов мыши. Оценку жизнеспособности клеточных культур, адгезированных на поверхностях образцов композитных материалов проводили на 4 сутки культивирования *in vitro* (через 72 часа).

Показатель доли нежизнеспособных клеток в культурах, растущих на поверхностях композитных материалов на основе БС и ПЛГА статистически значимо увеличивался при концентрации НЧ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> и НЧ ZnO 0,1 %, однако не превышал 10 % (Рис. 12 А). Значения показателя плотности клеточных культур значительно не изменялись. Для образцов материалов, содержащих НЧ ZnO отмечалась тенденция к снижению плотности клеточных культур (Рис. 12 Б). Показатель митотического индекса, являющегося индикатором пролиферационной активности клеток, во всех рассматриваемых группах статистически не изменялся и сохранялся в диапазоне от 1,2 до 1,7 %. Тенденция к снижению количества митотических событий наблюдалась только в клеточных культурах, растущих на поверхностях композитных материалов, функционализированных НЧ ZnO (Рис. 12 В). В то же время стоит отметить, что клетки на поверхностях всех рассматриваемых композитных материалов локализовались преимущественно в виде агрегатов, либо диффузно, без образования единого монослоя (Рис. 12 Г).

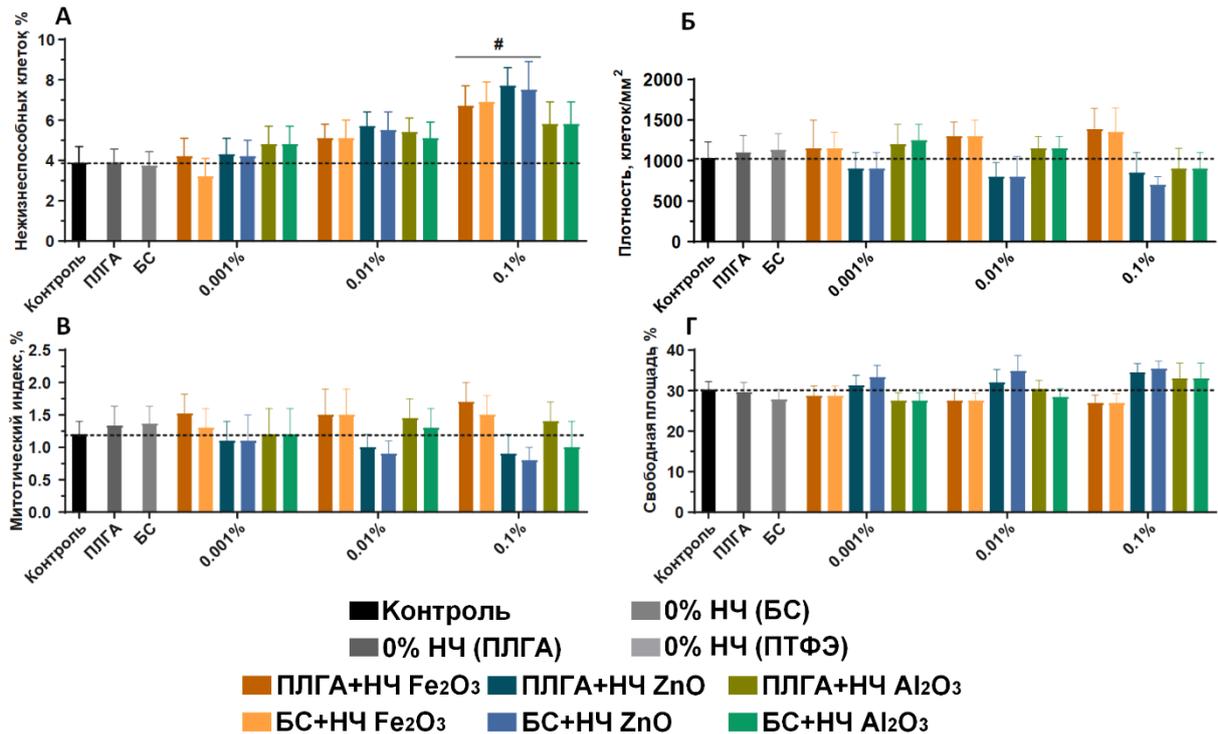


Рисунок 12. Результаты оценки жизнеспособности культур клеток линии SH-SY5Y, культивируемых в течение 72 часов на поверхностях композитных материалов на основе боросилоксана, поли(лактид-ко-гликолида) и политетрафторэтилена, функционализированных НЧ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. А — доля (%) нежизнеспособных клеток в культуре; Б — плотность клеточных культур; В — митотический индекс; Г — доля (%) площади поверхности образца композитного материала, свободная от клеток, # — статистически значимая разница, по сравнению с контролем.  $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента; \* — статистически значимая разница, по сравнению с контролем.  $p < 0,05$ , ANOVA

Покрытия культуральных стекол композитными полимерными материалами на основе политетрафторэтилена, функционализированного НЧ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, НЧ ZnO и НЧ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в концентрации 0,1% были протестированы в отношении первичных клеточных культур фибробластов легких мыши.

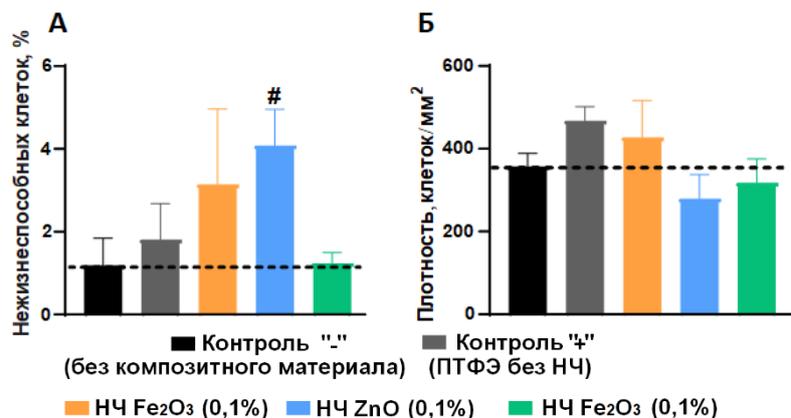


Рисунок 13. Результаты оценки жизнеспособности культур клеток фибробластов мыши, культивируемых на поверхностях композитных материалов на основе политетрафторэтилена с добавлением 0,1% НЧ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, НЧ ZnO и НЧ Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. А — доля (%) нежизнеспособных клеток в культуре, Б — плотность клеточных культур; # — статистически значимая разница, по сравнению с контролем.  $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента; \* — статистически значимая разница, по сравнению с контролем;  $p < 0,05$ , ANOVA

Аналогично полимерым матрицам ПЛГА и боросилоксана, поверхность политетрафторэтилена, не содержащего НЧ, не оказывала влияния на изменение доли нежизнеспособных клеток в культурах. Процент нежизнеспособных клеток в данной группе не превышал 3 %. Статистически значимое изменение доли нежизнеспособных клеток выявлено только в культурах, локализованных на поверхностях полимерных композитных материалов, содержащих 0,1% НЧ ZnO ( $4,08 \pm 0,87$  %) (Рис. 13 А). Значения параметра плотности клеточных культур, локализованных на исследуемых поверхностях, статистически значимо не отличались от контрольных показателей (Рис. 13 Б). При помощи флуоресцентной микроскопии и микроскопии в проходящем свете на поверхностях композитных материалов на основе политетрафторэтилена, содержащих НЧ оксидов металлов, визуализировались отдельные клетки, а также локально расположенные скопления жизнеспособных клеток (Рис. 14).

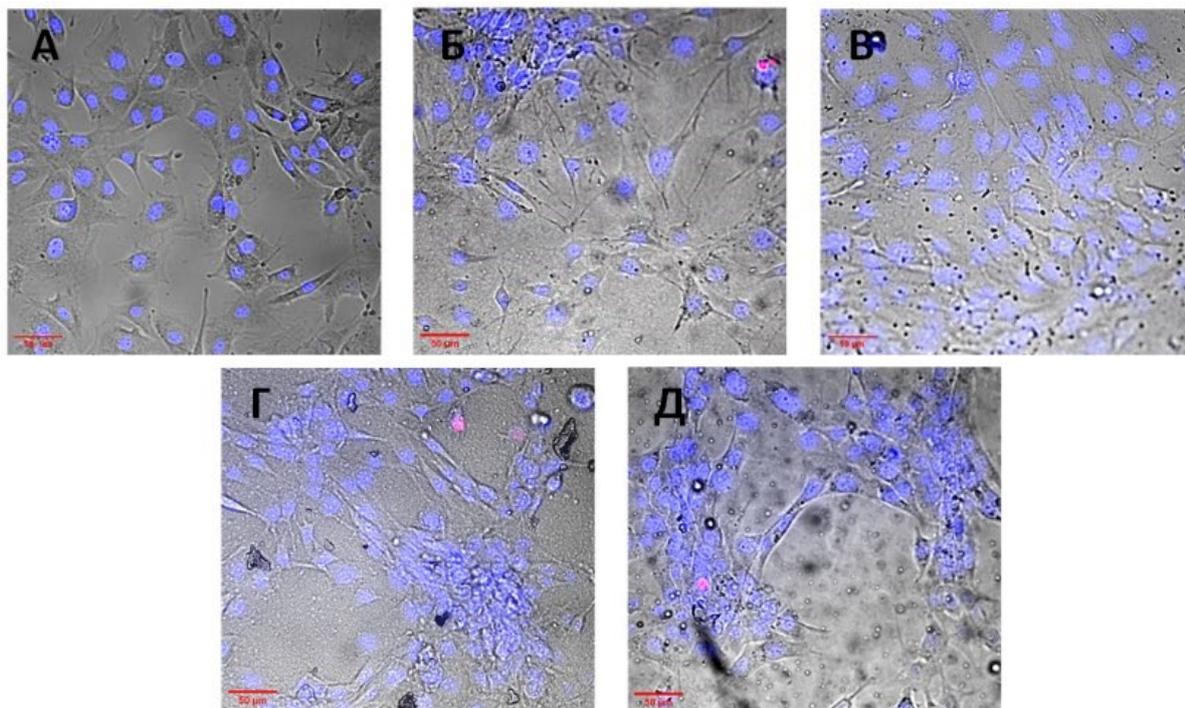


Рисунок 14. Репрезентативные микрофотографии клеточных культур легочных фибробластов мыши, культивируемых на различных поверхностях. Снимки представлены в виде наложения 3-х каналов: проходящего света (черно-белый), окрашивание Hoechst (синий цвет) и пропидий-йодидом (красный цвет). А — поверхность культурального стекла, Б — покрытие политетрафторэтиленом (ПТФЭ), не содержащим НЧ, В — поверхность композитного материала на основе ПТФЭ, содержащего 0,1 % НЧ оксида железа; Г — поверхность композитного материала на основе ПТФЭ, содержащего 0,1 % НЧ оксида цинка; Д — поверхность композитного материала на основе ПТФЭ, содержащего 0,1 % НЧ оксида алюминия. Шкала в нижнем левом углу изображений соответствует 50 мкм

Таким образом, определено, что все синтезированные композитные материалы оказывали слабое влияние на рост и развитие культур животных клеток *in vitro*; поверхности композитных материалов не препятствовали пролиферации клеток, что подтверждалось отсутствием значимых изменений параметра митотического индекса и плотности клеточных культур. Наиболее выраженная тенденция к влиянию на жизнеспособность клеточных культур была характерна для композитных материалов, содержащих НЧ ZnO.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе реализации настоящей работы методом лазерной абляции в деионизированной воде были синтезированы и далее отобраны, согласно литературным данными и серии предварительных экспериментов, образцы НЧ оксидов металлов ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) с необходимыми характеристиками. При помощи разработанной низкотемпературной технологии получены композитные материалы на основе полимеров (ПЛГА, боросилоксана и политетрафторэтилена) с добавлением синтезированных НЧ оксидов металлов в концентрации 0,001–0,1 %. Изготовлены образцы пленок на их основе. Поверхности полученных пленок не имели значительных дефектов. НЧ в объеме полимерных матриц были распределены неравномерно, образуя области с повышенной концентрацией. Физические свойства полимерных матриц слабо изменялись при функционализации наночастицами в рассматриваемом диапазоне концентраций (0,001–0,1 %).

При помощи высокочувствительных методов установлено, что полученные композитные материалы, содержащие НЧ  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , способны увеличивать интенсивность образования в водных растворах гидроксильных радикалов и перекиси водорода. В присутствии композитных материалов с НЧ  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  наблюдалось повреждение молекул белков и ДНК. Полученные результаты свидетельствуют о высокой окислительной способности композитных полимерных материалов, содержащих НЧ  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .

В ходе проведенных микробиологических исследований установлено, что полимерные композитные материалы, содержащие 0,001 % НЧ оксидов металлов не обладали бактериостатическими свойствами в отношении планктонных клеток *E. coli*. Композитные материалы, функционализированные 0,01 % и 0,1% НЧ  $\text{ZnO}$  и  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  значительно ингибировали рост бактериальных клеток в среде. При этом наиболее явный ингибирующий эффект в отношении планктонных клеток *E. coli* был выявлен для образцов материалов, содержащих 0,1 % НЧ  $\text{ZnO}$ . Важно отметить, что композитные материалы на основе политетрафторэтилена, функционализированные рассматриваемыми наночастицами оксидов металлов, обладали антибактериальными свойствами в отношении резистентных бактерий-изолятов, выделенных на пищевых производствах. При этом полимерные материалы, функционализированные НЧ  $\text{ZnO}$  проявляли значительные бактерицидные свойства в отношении резистентных микроорганизмов (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* серотип *Typhimurium*), предотвращая образования биопленок на поверхности.

Скорость роста клеток, плотность, а также митотическая активность клеточных культур клеток линии SH-SY5Y и легочных фибробластов мыши, культивируемых на полученных композитных материалах и контрольных поверхностях существенно не отличались. Значительные изменения по сравнению с контрольными показателями наблюдались только для параметра доли нежизнеспособных клеток в культурах, локализованных на поверхностях полимерных композитных материалов, содержащих НЧ оксида цинка и железа.

Таким образом, полученные полимерные композитные материалы могут являться перспективной основой для изготовления антибактериальных покрытий для оборудования пищевой промышленности, биомедицинской техники и аппаратов автономного использования.

## ВЫВОДЫ

На основании проведенной диссертационной работы можно сформулировать следующие выводы:

1. Благодаря разработанному низкотемпературному методу, получены образцы композитных материалов на основе полимеров ПЛГА, боросилоксана и политетрафторэтилена, содержащие наночастицы оксидов железа, цинка и алюминия. Образцы пленок, изготовленные из полученных материалов, не обладали значительными дефектами поверхностей;

2. Показано, что композитные материалы на основе ПЛГА, боросилоксана и политетрафторэтилена с добавлением наночастиц оксидов цинка и алюминия существенно не влияют на интенсивность генерации активных форм кислорода в водных растворах, не способствуют окислительному повреждению ДНК и белков *in vitro*. Все композитные материалы, содержащие 0,1 % наночастиц оксида железа, увеличивали генерацию АФК и поврежденность биополимеров. По сравнению с контролем, повышенная генерация АФК также наблюдалась при меньших концентрациях наночастиц оксида железа в полимере, вплоть до 0,001 % для материала на основе ПЛГА;

3. Установлено, что полученные композитные материалы проявляют выраженные бактериостатические свойства по отношению к суспензионным культурам клеток *E. coli*, при этом наиболее выраженную бактериостатическую активность проявляют материалы, содержащие НЧ оксида цинка. Материалы на основе НЧ оксида цинка обладали ярко выраженными бактерицидными свойствами относительно резистентных патогенных микроорганизмов *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* серотип *Typhimurium*, предотвращая образования биопленок на поверхности;

4. Показано, что негативное влияние полученных композитных материалов менее выражено в отношении культур эукариотических клеток, по сравнению с прокариотическими клетками.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

## Статьи в журналах:

1. **Burmistrov D.E.**, Simakin A.V., Smirnova V.V., Uvarov O.V., Ivashkin P.I., Kuchеров R.N., Ivanov V.E., Bruskov V.I., Sevostyanov M.A., Baikin A.S., Kozlov V.A., Rebezov M.B., Semenova A.A., Lisitsyn A.B., Vedunova M.V., Gudkov S.V. Bacteriostatic and Cytotoxic Properties of Composite Material Based on ZnO Nanoparticles in PLGA Obtained by Low Temperature Method // *Polymers*. – 2021. – V. 14. – №. 1. – P. 49. [doi: 10.3390/polym14010049].
2. **Burmistrov D.E.**, Yanykin D.V., Pashkin M.O., Nagaev E.V., Efimov A.D., Kaziev A.V., Ageychenkov D. G., Gudkov S.V. Additive Production of a Material Based on an Acrylic Polymer with a Nanoscale Layer of ZnO Nanorods Deposited Using a Direct Current Magnetron Discharge: Morphology, Photoconversion Properties, and Biosafety // *Materials*. – 2021. – V. 14. – №. 21. – P. 6586. [doi: 10.3390/ma14216586].
3. **Burmistrov D.E.**, Serov D.A., Simakin A.V., Baimler I.V., Uvarov O.V., Gudkov S.V. A Polytetrafluoroethylene (PTFE) and Nano-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Based Composite Coating with a Bacteriostatic Effect against *E. coli* and Low Cytotoxicity // *Polymers*. – 2022. – V. 14. – №. 21. – P. 4764. [doi: 10.3390/polym14214764].
4. Gudkov S.V., **Burmistrov D.E.**, Serov D.A., Rebezov M.B., Semenova A.A., Lisitsyn A.B. A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO Nanoparticles // *Frontiers in Physics*. – 2021. – V. 9. – P. 641481. [doi: 10.3389/fphy.2021.641481].
5. Gudkov S.V., **Burmistrov D.E.**, Serov D.A., Rebezov M.B., Semenova A.A., Lisitsyn A.B. Do iron oxide nanoparticles have significant antibacterial properties? // *Antibiotics*. – 2021. – V. 10. – №. 7. – P. 884. [doi: 10.3390/antibiotics10070884].
6. Gudkov S.V., **Burmistrov D.E.**, Smirnova V.V., Semenova A.A., Lisitsyn A.B. A Mini Review of Antibacterial Properties of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles // *Nanomaterials*. – 2022. – V. 12. – №. 15. – P. 2635. [doi: 10.3390/nano12152635].
7. Serov D.A., **Burmistrov D.E.**, Simakin A.V., Astashev M.E., Uvarov O.V., Tolordava E.R., Semenova A.A., Lisitsyn A.B., Gudkov S.V. Composite Coating for the Food Industry Based on Fluoroplast and ZnO-NPs: Physical and Chemical Properties, Antibacterial and Antibiofilm Activity, Cytotoxicity // *Nanomaterials*. – 2022. – V. 12. – №. 23. – P. 4158. [doi: 10.3390/nano12234158].
8. Chausov D.N., **Burmistrov D.E.**, Kurilov A.D., Bunkin N.F., Astashev M.E., Simakin A.V., Vedunova M.V., Gudkov S.V. New Organosilicon Composite Based on Borosiloxane and Zinc Oxide Nanoparticles Inhibits Bacterial Growth, but Does Not Have a Toxic Effect on

- the Development of Animal Eukaryotic Cells // Materials. – 2021. – V. 14. – №. 21. – P. 6281. [doi: 10.3390/ma14216281].
9. Gudkov S.V., **Burmistrov D.E.**, Lednev V.N., Simakin A.V., Uvarov O.V., Kucherov R.N., Ivashkin P.I., Dorokhov A.S., Izmailov A.Yu. Biosafety Construction Composite Based on Iron Oxide Nanoparticles and PLGA // Inventions. – 2022. – V. 7. – №. 3. – P. 61. [doi: 10.3390/inventions7030061].
  10. Serov D.A., Baimler I.V., **Burmistrov D.E.**, Baryshev A.S., Yanykin D.V., Astashev M.E., Simakin A.V., Sergey V Gudkov. The Development of New Nanocomposite Polytetrafluoroethylene/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs to Prevent Bacterial Contamination in Meat Industry // Polymers. – 2022. – V. 14. – №. 22. – P. 4880. [doi: 10.3390/polym14224880].
  11. Astashev M.E., Sarimov R.M., Serov D.A., Matveeva T.A., Simakin A.V., Ignatenko D.N., **Burmistrov D.E.**, Smirnova V.V., Kurilov A.D., Mashchenko V.I., Ivashkin P.I., Uvarov O.V., Voronov V.V., Shkirin A.V., Nagaev E.V., Efimov A.D., Ivanov V.E., Bruskov V.I., Dubinin M.V., Sharapov M.G., Kozlov V.A., Bunkin N.F., Volkov M.Yu., Vedunova M.V., Rebezov M.B., Semenova A.A., Lisitsyn A.B., Glinushkin A.P., Chausov D.N., Gudkov S.V. Antibacterial behavior of organosilicon composite with nano aluminum oxide without influencing animal cells // Reactive and Functional Polymers. – 2022. – V. 170. – P. 105143. [doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105143].

**Ноу-хау:**

Симакин А.В., **Бурмистров Д.Е.**, Гудков С.В. Секрет производства (ноу-хау): «Способ получения полимерных композитных материалов с антибактериальными свойствами». Приказ №313 от 31.10.2022 г. Правообладатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный научный центр Пищевые системы Российской академии наук.