

УДК 616.8-085.011.4:661.12:547.458(047.31)

УКПП

№ держреєстрації 0120U101972

Інв. №

Міністерство освіти і науки України  
Сумський державний університет (СумДУ)  
40007, м. Суми, вул.Римського-Корсакова, 2 тел.  
(0542)33-53-39 факс (0542)33-40-58 e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи  
д-р фіз.-мат.наук, професор  
\_\_\_\_\_ А.М. Чорноус

ЗВІТ  
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

Функціональна та біологічна характеристика антимікробних нановолокнистих мембран хітозану виготовлених методом електропрядіння, функціоналізованими наночастинками срібла

**РОЗРОБКА ПЕРЕДУМОВ ГЕНЕРАЦІЇ УПОРЯДКОВАНИХ ТА  
РАНДОМНООРІЄНТОВАНИХ 2D-МАТРИЦЬ ІЗ  
ЕЛЕКТРОПРОВІДНОГО/ПРИРОДНОГО ПОЛІМЕРНОГО РОЗЧИНУ  
(ПОЛІПРОЛ, ПОЛІАНІЛІН/ХІТОЗАН, КОЛАГЕН) У КОМБІНАЦІЇ З  
ФІБРИНОВИМ БІОГЕЛЕМ  
(проміжний)**

Керівник НДР,  
канд. біол. наук

С.Д. Кириленко

2021

Рукопис закінчено 10 грудня 2021 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від 23 грудня 2021 р. № 7

**СПИСОК АВТОРІВ**

Керівник НДР, канд.біол.наук	(10.12.2020)	С.Д. Кириленко (реферат; вступ; висновки)
Відповідальний виконавець Старш. наук. співроб. канд.мед.наук	(10.12.2020)	В.В. Корнієнко (розділи 1, 2, 3)
Старш. наук. співроб. канд.хім.наук	(10.12.2020)	Г.О. Яновська (розділ 2, 3)
Мол. наук. співроб. канд.фіз-мат.наук	(10.12.2020)	Р.В. Вігер (розділ 2, 3)
Фахівець I категорії	(10.12.2020)	В.С. Казбан (розділ 1)
Студент	(10.12.2020)	А.А. Рощупкін (розділ 2, 3)
Лаборант	(10.12.2020)	Н.І. Безкоровайна (розділ 1)

## РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 38 с., 2 табл., 11 рис., 50 джерел

АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ, БІОПЛІВКА, БІОСУМІСНІСТЬ, ЕЛЕКТРОПРЯДІННЯ, НАНОВОЛОКНА, НАНОЧАСТИНКИ СРІБЛА, ХІТОЗАН

*Об'єкт дослідження* – особливості антибактеріального впливу мембран із природного полімеру хітозану (Ch), виготовлених методом електропрядіння (електроспінінгу), та їх біосумісності в залежності від кількості інкорпорованих наночастинок срібла (AgNPs).

*Предмет дослідження* – вивчення функціональних та біологічних характеристик антимікробних нановолокнистих мембран хітозану виготовлених методом електропрядіння та навантажених наночастинками срібла.

Для досягнення поставленої мети були визначені наступні завдання:

1. Вивчити фізико-хімічних та структурних характеристик матеріалів Ch-AgNPs, отриманих із використання різних співвідношень розчинників.
2. Вивчити вплив нейтралізації лужними розчинами на структуру та властивості хітозанових нановолокнистих мембран.
3. Дослідити динаміку деградації (біодеградації) хітозанових матеріалів залежно від системи розчинників та виду постпроцесингу.
4. Визначити ступінь адгезії, проліферації та метаболізму клітин при їх культивуванні на нановолоконах Ch-AgNPs мембран відповідно до концентрації інкорпорованих наночастинок.
5. Визначення антимікробної активності мембран Ch-AgNPs в залежності від концентрації інкорпорованих наночастинок.

*Методи дослідження:*

1. визначення пористості матеріалів та діаметра волон з використанням скануючої електронної мікроскопії;
2. дослідження деградації та біодеградації *in vitro*;
3. експеримент на культурах клітин;

#### 4. бактеріологічні дослідження.

Це дослідження було спрямовано на розробку нової мембрани Ch-AgNPs з використанням системи співрозчинників трифтороцтова кислота/дихлорметан (TFA/DCM) та оцінку антибактеріального потенціалу залежно від концентрації використаних AgNPs.

В результаті виконання роботи доведено, що отримані мембрани на основі Ch з AgNPs є перспективним матеріалом для тканинної інженерії з відповідною біосумісністю і високою антимікробною здатністю після нейтралізації лугом, мають відповідний режим деградації, а також можуть в подальшому бути використанні в біоінженерії та медицині.

## ЗМІСТ

с.

Перелік скорочень, умовних познач, одиниць і термінів .....	7
ВСТУП .....	8
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	9
2 АНТИМІКРОБНІ НАНОВОЛОКОННИСТІ МЕМБРАНИ ХІТОЗАНУ ВИГОТОВЛЕННІ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОПРЯДІННЯ, ФУНКЦІОНАЛІЗОВАНІ НАНОЧАСТИНКАМИ СРІБЛА	
2.1 Матеріали і методи .....	13
2.1.1 Виготовлення нановолокон Ch-AgNPs .....	13
2.1.2 Морфологія нановолокон .....	13
2.1.3 Антимікробна активність мембран Ch-AgNPs.....	14
2.1.4 Зображення біоплівки (SEM) .....	15
2.1.5 Статистичний аналіз .....	15
2.2 Результати.....	15
2.2.1 Морфологія нановолокон .....	15
2.2.2 Антимікробна активність.....	16
2.2.3 Зображення біоплівки (SEM) .....	18
2.3 Обговорення.....	19
3 ФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОВОЛОКНИСТИХ МЕМБРАН ВИГОТОВЛЕНИХ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОПРЯДІННЯ ІЗ ДОДАВАННЯМ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА .....	20
3.1 Матеріали та методи.....	20
3.1.1 Приготування розчинів хітозану, електропрядіння нановолокнистих мембран хітозану та їх нейтралізація лугом .....	20
3.1.2 Скануюча електронна мікроскопія (SEM) та енергодисперсійне рентгенівське випромінювання (EDX).....	21
3.1.3 Здатність до набухання (SD) і втрата ваги (WL).....	21
3.1.4 Дослідження клітинної культури in vitro.....	22
3.1.5 Бактеріологічний експеримент.....	23

3.1.6 Статистичний аналіз .....	23
3.2 Результати.....	23
3.2.1 SEM і EDX .....	23
3.2.2 Здатність до набухання (SD) і втрата ваги (WL).....	26
3.2.3 Дослідження клітинної культури <i>in vitro</i> .....	28
3.2.4 Антибактеріальна ефективність волокнистих мембран Ch-TFA/DCM з наночастицями срібла .....	29
ВИСНОВКИ.....	32
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ.....	33

**ПЕРЕІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ**

Ch - хітозан

TFA - трифтороцтова кислота

DMS - дихлорметан

AgNP - наночастинки срібла

МІС - мінімальна інгібуюча концентрація

NaOH - гідроксид натрію

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - карбонат натрію

Ag<sup>+</sup> - іони срібла

MW - молекулярна маса

DA - ступень ацетилювання

ECM - нативний позаклітинний матрикс

SEM - скануюча електронна мікроскопія

## ВСТУП

Застосування нанотехнологій у розробці біоматеріалів в даний час має потенційний інтерес для медичного застосування. Серед полімерів для цієї мети хітозан (Ch) є одним з найбільш перспективних через його біосумісність, біодеградацію та антибактеріальні властивості. Електропрядіння - це економічна та добре відтворювана процедура виготовлення полімерних нановолоконних мембран. Проте, електропрядіння хітозанових нановолокон має деякі проблеми для отримання однорідних волокон і запобігання їх пошкодження. Щоб подолати деякі з цих труднощів, поточні дослідження спрямовані на виготовлення нановолокнистої мембрани з хітозану методом електропрядіння та забезпечення нейтралізації матеріалу 1М гідроксидом натрію (NaOH), оцінку антибактеріальної активності та цитотоксичності оброблених нановолокон хітозану залежно від різної концентрації наночастинок срібла (AgNPs).



## 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Електропрядіння – це спосіб виготовлення нановолокон, який передбачає створення електрично зарядженого струменя з краплі розчину полімеру та збирання нановолокон на колекторі [1]. Виробництво нановолокнистих мембранів за допомогою електропрядіння може генерувати матеріали, надзвичайно аналогічні нативним тканинам і позаклітинному матриксу. Нині багато природних та синтетичних полімерів використовують для виробництва матеріалів для тканинної інженерії, загоєння ран, контролю гемостазу тощо [2]. Хітозан (Ch) є одним із найперспективніших біополімерів для розробки нанопористих біологічних замінників завдяки чудовому регенеративному потенціалу, антибактеріальним властивостям та здатності до контрольованої деградації [3]. Електропрядені нановолокна, виготовлені з Ch, мають велике медичне значення особливості застосування, такі як висока площа поверхні та пористість, біосумісність та антибактеріальні властивості [4].

Завдяки біосумісності та антибактеріальним властивостям матеріали на основі хітозану використовуються в місцях інфекції для захисту тканин від вторинного бактеріального забруднення. Антибактеріальну ефективність хітозану можна пояснити кількома запропонованими механізмами залежно від його молекулярної маси (MW) та ступеня ацетилювання (DA) [5]. Таким чином, низькомолекулярний хітозан, проникаючи крізь клітинну стінку, пригнічує синтез мРНК і білка [6]. Антимікробні властивості олігомерів хітозану посилюються за рахунок позитивних зарядів полімерного ланцюга та вільних аміногруп. Отже, збільшення кількості аміногруп призводить до поліпшення антимікробної активності за рахунок зміни проникності клітинної стінки бактерій. Протоновані амінні групи хітозану зв'язують негативно заряджені бактерії, порушуючи їхнє розмноження [7]. Таким чином, низькомолекулярний Ch проникає через клітинну стінку, пригнічує синтез мРНК і білка [8]. Крім того, Ch може зв'язуватися з негативно зарядженою бактеріальною клітинною стінкою, руйнуючи клітину, таким чином змінюючи проникність мембрани, з

подальшим приєднанням до ДНК, викликаючи пригнічення реплікації ДНК і згодом загибель клітини [9].

Утворення бактеріальної біоплівки є складною проблемою в медицині через колонізацію медичних імплантатів у тканинах людини та хронічні інфекції [10, 11]. Більше того, біоплівки є одним із факторів, що забезпечують мікробну толерантність і стійкість до антибіотиків. З іншого боку, токсичні та побічні ефекти антибіотиків обмежують їх мінімальну концентрацію *in vivo* [12].

Тим не менш, хоча наночастинки срібла (AgNPs) є одними з найпривабливіших протимікробних сполук, застосування срібловмісних наноматеріалів для мікробної інактивації вимагає ефективних стратегій застосування, щоб уникнути їх потенційної токсичності.

Протимікробна дія хітозанових мембран з електропрядінням очевидна, особливо в поєднанні з AgNP. Цей аспект передбачає вивчення антибактеріальних властивостей матеріалів залежно від концентрації використовуваного срібла.

Електропрядіння хітозанових нановолокон викликає деякі проблеми через складність вибору відповідних розчинників і стійкість залежно від властивостей волокна, параметрів обробки та концентрації розчину для отримання однорідних волокон і запобігання їх пошкодженню. На діаметр волокон і ширину їх розподілу впливають різноманітні параметри розчину та обробки, включаючи співвідношення розчинників, внутрішній діаметр голки, прикладену напругу та відстань наконечник-колектор [13]. Для подолання деяких з цих труднощів в якості розчинників використовували трифторуксусну кислоту (TFA) та дихлорметан (DMC) [14]. Однак залишкові розчинники в електропрядних мембранах впливають на біологічні властивості хітозанових нановолокон, пошкоджують волокнисту структуру нановолокон і роблять їх розчинними в нейтральних або слабких основних водних розчинах в результаті високої розчинності в цих водних середовищах  $-NH_3^+$   $CF_3COO^-$  залишки солі, які утворюються при розчиненні хітозану в TFA. Подальшу обробку в абсолютному етанолі, суміші етанол-вода, придатну для підтримки волокнистої структури та

отримання стабільних хітозанових мембран, проводили з використанням гідроксиду натрію (NaOH) та карбонату натрію (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) [15][16].

Подальша обробка хітозанових каркасів лугом впливає на ступінь їх набухання та механічні властивості [17]. Порівняльні дослідження показали різну протимікробну активність хітозанових нановолокон і хітозану в розчиненому стані та запропонували комбінувати хітозан з іншими антимікробними засобами для отримання синергетичного ефекту [18]. Агенти срібла, такі як наночастинки Ag (AgNP), можуть бути включені в нановолокна хітозану, забезпечуючи стійке вивільнення іонів срібла (Ag<sup>+</sup>), які є антибактеріальними агентами з антибактеріальними властивостями широкого спектру дії та покращують антибактеріальні властивості хітозану [19][20]. Виявлено, що електропрядні нановолокна з нанокристалічними частинками гідроксиапатиту, що містять іони срібла (Ag<sup>+</sup>), демонструють антибактеріальну ефективність проти кишкової палички [21]. AgNP можуть зв'язуватися з клітинною стінкою бактерій і викликати пошкодження мембрани, витік клітинного вмісту та загибель бактерій [22] [23]. Крім того, антибактеріальний ефект AgNP на грамнегативні бактерії є більш потужним, ніж на грампозитивні бактерії, через різницю в товщині клітинної стінки між грампозитивними бактеріями (30 нм) і грамнегативними бактеріями (3–4 нм) [24]. Крім того, позитивний заряд забезпечує електростатичну взаємодію між AgNPs та негативно зарядженою клітинною мембраною мікроорганізмів [25]. Крім прямого контакту з мікроорганізмами, антибактеріальні механізми AgNP можуть сприяти вивільненню іонів срібла, які можуть викликати дезактивацію білка клітинної мембрани. Антибактеріальний ефект AgNP можна пояснити виробництвом високих рівнів активних форм кисню (АФК) і видів вільних радикалів, які призводять до апоптозоподібної реакції, перекисного окислення ліпідів і пошкодження ДНК [26][27].

Деякі автори також стверджували про потенційну токсичність AgNP і дійшли висновку, що AgNPs викликають цитотоксичність у різних клітинних лініях залежно від дози, але вони не запропонували, як зменшити ефект

токсичності [28][29]. Біосумісність є життєво важливою вимогою для застосування в медицині, яку можна вирішити шляхом зміни морфології та характеристик поверхні AgNPs та модифікації поверхні за допомогою біомолекул, полімерів або іонів металів [30][31].

Антимікробна дія хітозанових мембран з електропрядінням не визначена, зокрема поєднання Ch з AgNP. Цей аспект вимагає вивчення цитотоксичності та варіацій морфології залежно від співрозчинників та обробки лугом. Метою дослідження було оцінити структуру, біодеградацію, антибактеріальну поведінку та цитосумісність нових електропрядних нановолокон AgNPs-Ch.

## **2 АНТИМІКРОБНІ НАНОВОЛОКОННИСТІ МЕМБРАНИ ХІТОЗАНУ ВИГОТОВЛЕННІ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОПРЯДІННЯ, ФУНКЦІОНАЛІЗОВАНІ НАНОЧАСТИНКАМИ СРІБЛА**

### **2.1 Матеріали і методи**

#### **2.1.1 Виготовлення нановолокон Ch-AgNPs**

Ch (MW 50-190 кДа, DD 75-85%, Glentham Life Sciences, Corsham, UK) розчиняли і змішували в TFA/DCM (Honeywell Fluka, Loughborough, Wiltshire, UK) у об'ємному співвідношенні 7:3. Кінцева концентрація розчину Ch становила 3,5%, мас/об.

Потім до розчину Ch додавали AgNPs (NanoWave, Гданськ, Польща) у концентрації, що розглядається відповідно до мінімальної інгібуючої концентрації (MIC) НЧ, виміряної для *S. aureus* та *E. coli* (2,5 та 1,25 мкг/мл відповідно) [32,33]. Зразки, розроблені для цього дослідження, були наступними: Ch без Ag, Ch-Ag 0,625 мкг/мл, Ch-Ag 1,25 мкг/мл і Ch-Ag 2,5 мкг/мл, що відповідало від ½ до 1 MIC AgNPS.

Застосовано джерело живлення постійного струму високої напруги (Linari Engineering s.r.l., Італія) на 21 кВ. Відстань між голкою і колектором 15 см. Електропрядіння проводили зі швидкістю подачі 1,0 мл/год. Зразки з електропрядіння нановолокна сушили у вакуумній печі при 30 °C протягом 24 год для видалення залишків розчинника. Усі мембрани нейтралізували розчином луку (70% розчин етанолу) – 1M NaOH (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, США) протягом 24 год, промивали дистильованою водою та сушили протягом 24 год при кімнатній температурі[34]

#### **2.1.2 Морфологія нановолокон**

Морфологію характеристик нановолоконних зразків (вимірювання середнього діаметра нановолокна та розподілу діаметра нановолокна за мікрофотографіями SEM шляхом 50 вимірювань випадкових волокон) та

колонізацію бактерій на електропрядних мембранах спостерігали за допомогою скануючої електронної мікроскопії (FEI Inspect S50B SEM). , Брно, Чехія) після покриття зразків нановолокна вуглецем за допомогою вакуумної установки ВУП-5М (SELMІ, Суми, Україна).

### 2.1.3 Антимікробна активність мембран Ch-AgNPs

Для оцінки антибактеріальної дії мембран Ch-AgNPs були відібрані *E. coli* та *S. aureus*. Нічну культуру розбавляли до концентрації  $5 \log_{10}$  колонієутворюючих одиниць/мл (КУО/мл).

Бактеріостатичний вплив оцінювали диско-дифузійним методом Кірбі-Бауера. Спочатку на чашки з агаром Мюллера-Хінтона додавали кількість 100 мкл бактеріальної суспензії ( $10^5$  КУО·мл<sup>-1</sup>) і постійно струшували. Потім зразки додавали в чашки з агаром і культивували при 37 °С протягом 24 годин. Нарешті, були перевірені зони пригнічення росту.

Тести на антибактеріальну активність проводили методом бактеріальної суспензії. Спочатку мембрани розрізали на прямокутники 0,5 см<sup>2</sup> і стерилізували в ультрафіолетовій лампі протягом 24 год. Потім зразки поміщали в бактеріальну суспензію та інкубували протягом 2, 4, 6 та 8 год у стерильному 24-лунковому пластиковому планшеті. Необроблені бактерії, суспендовані в живильному бульйоні в концентрації  $10^5$  КУО/мл, використовували як контроль. Наприкінці кожного періоду 10 мкл бактеріальної суспензії переносили з кожної лунки та висівали на агарові чашки методом по Голду.

Антибактеріальну ефективність оцінювали шляхом розрахунку швидкості відновлення (R) загальної кількості бактерій за таким рівнянням (1) [35]:

$$R = (C-T) / C \times 100 \quad (1)$$

де C (КУО/мл) і T (КУО/мл) – кількість бактерій, що вижили, у контрольних і досліджуваних зразках після певного часу контакту відповідно.

### **2.1.4 Зображення біоплівки SEM**

Для цього експерименту зразки інкубували протягом 24 год при 37 °C у бактеріальній суспензії. Після інкубації зразки біоплівки фіксували 2,5% глутаровим альдегідом 2 рази по 30 хв, зневоднювали в серії водних розчинів етанолу та сушили на повітрі при кімнатній температурі [36].

### **2.1.5 Статистичний аналіз**

Усі експерименти повторювали три або більше разів із потрібною кількістю зразків. Достовірні відмінності між групами оцінювали за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA).

## **2.2 Результати**

### **2.2.1 Морфологія нановолокон**

Середній діаметр функціоналізованих волокон AgNPs 2,5 мкг/мл становить  $318,5 \pm 84,9$  нм, що подібне до нативної хітози п волокон ( $p > 0,05$ ) (рисунок 2.1.). Концентрація полімеру, система розчинників, в'язкість розчину впливають на формування нановолокон та їх діаметр [37]. Додавання наночастинок срібла до розчину може впливати на провідність, що призводить до зменшення діаметра нановолокна [38]. Характеризуючи структурні властивості, немає доказів будь-яких відмінностей між порівнюваними зразками, незважаючи на додавання наночастинок срібла. Зображення SEM зразків з AgNP підтвердили, що наночастинок послідовно розподіляються на нановолокнах Ch.

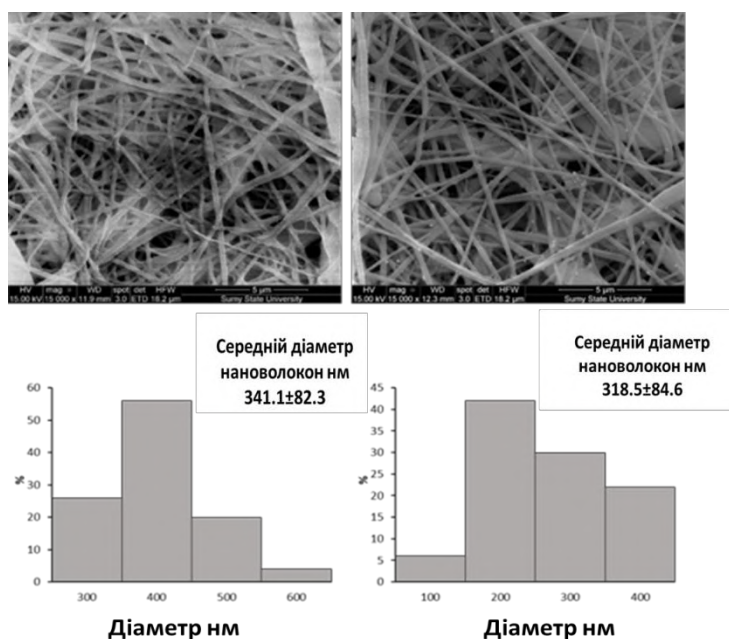


Рисунок 2.1 – Морфологія нановолокна хітозану (лівий ряд) і нановолокнистої мембрани після додавання 2,5 мкг/мл AgNP (правий ряд) і розподіл їх діаметрів, n=50

### 2.2.2 Антимікробна активність

На Рис. 2.2 показана зона інгібування росту, отримана після інкубації різних типів мембран. Особливість антибактеріальної здатності мембран проти обох бактерій схожа. Діаметр зони інгібування росту навколо мембран збільшується зі збільшенням вмісту наночастинок срібла.

Проте інгібуючий потенціал зразків Ch-AgNPs щодо *E. coli* був вищим, ніж у *S. aureus*, як свідчить зона вищого інгібування (9 мм проти 7 мм відповідно) (Таблиця 2.1).

Таблиця 2.2 демонструє, що через 2 год зростання *S. aureus* зменшувався зі збільшенням навантаження AgNPs у зразках, тоді як для *E. coli* він був майже на тому ж рівні.



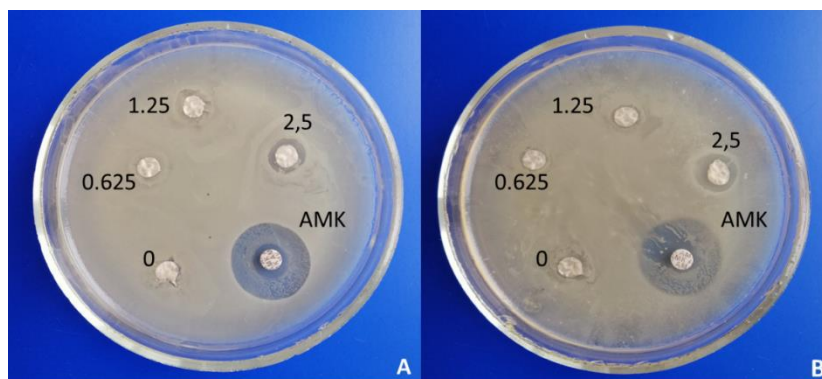


Рисунок 2.2 – Антибактеріальна активність електроспінінгових мембран, оцінена методом дискової дифузії Кірбі Бауера, порівняно з амікацином (АМК). Цифри вказують на вміст AgNPs в Ch мембранах. А – *S. aureus*, В – *E. coli*

Таблиця 2.1 – Діаметр зони інгібування росту, мм проти *S. aureus* та *E. coli*

Зразки	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
	Діаметр зони гальмування росту, мм	
Ch без Ag	6	6
Ch-Ag 0,625 мг/мл	6	7
Ch-Ag 1,25 мг/мл	8	7
Ch-Ag 2,5 мг/мл	7	9
АМК	15	15

Результати продемонстрували, що до 4 год популяції *S. aureus* поступово збільшувалися, і зразок Ch-Ag 0,625 мкг/мл не міг забезпечити зниження росту. Мембрани з більшою кількістю AgNP показали максимальне зниження росту обох бактеріальних штамів завдяки здатності наночастинок срібла порушувати цитоплазматичну мембрану бактерій і вивільняти внутрішньоклітинні білки [39]. В іншому випадку *E. coli* була більш чутливою до впливу зразка, оскільки позитивно заряджена вільна аміногрупа Ch може взаємодіяти з протилежною бактеріальною клітинною стінкою, що призводить до розриву мембрани [5].

Таблиця 2.2 – Швидкість зменшення (R) загальної кількості *S. aureus* та *E. coli* залежно від часу інкубації з мембранами Ch-TFA/DCM, кількісно оцінена методом КУО, %. Не було визначено різниці після 6 год та 8 год впливу порівняно з позитивним контролем для обох бактеріальних штамів (R=0)

Зразки	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Час інкубації, год			
	2 год	4 год	2 год	4 год
Ch безAg	25.0±6.25	12.5±6.25	25±6.25	0
Ch-Ag 0.625 мг/мл	25.0±6.25	16.3±3.75	28.8±3.75	0
Ch-Ag 1.25 мг/мл	28.8±3.75	25±3.75	37.5±6.25	12.5±6.25
Ch-Ag 2.5 мг/мл	28.8±3.75	28.8±3.75	41.3±3.75	16.3±3.75

### 2.2.3 Зображення біоплівки SEM

Продукцію біоплівки досліджуваних штамів бактерій (рис. 2.3.) оцінювали після 24-годинного спільного культивування. Обидва штами мали меншу кількість біоплівкової маси на зразках, інкорпорованих AgNP, ніж на ненавантажених мембранах [40, 41]. Крім того, наночастинки срібла, що входять до складу нановолокна хітозану, забезпечуючи стабільне вивільнення іонів срібла (Ag<sup>+</sup>), посилюють антибактеріальні властивості електропрядених матеріалів [6, 42]. AgNP можуть зв'язуватися з клітинною стінкою бактерій і викликати пошкодження мембрани, витікання клітин і загибель бактерій [43].

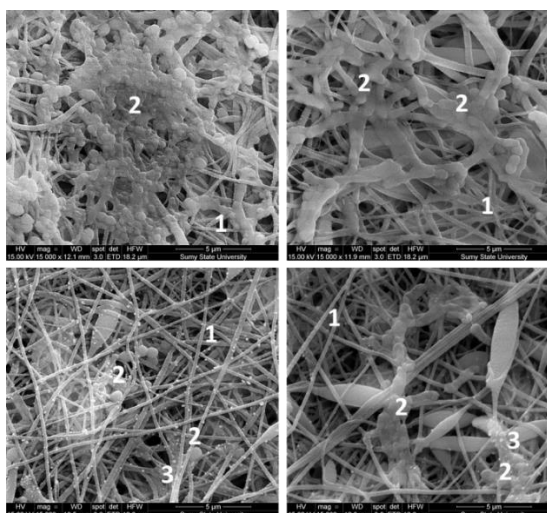


Рисунок 2.3 – SEM-зображення мембран після 24-годинної інкубації в бактеріальних суспензіях (верхній ряд – чиста Ch мембрана, нижній ряд – мембрана Ch-Ag 2,5 мкг/мл): 1 – волокна, 2 – бактеріальні клітини, 3 – AgNPs

### 2.3 Обговорення

Мембрани Ch, інкорпоровані AgNP, продемонстрували вищу антибактеріальну активність, ніж ненавантажені зразки. Кількість включених наночастинок срібла, необхідна для запобігання прикріпленню та колонізації бактерій, не перевищувала  $\frac{1}{2}$  -1 MIC. Додавання наночастинок срібла зменшувало утворення біоплівки як *S. aureus*, так і *E. coli*.

#### Розділ 2 висвітлений у наступних роботах:

1. Korniienko, V. et al. Antimicrobial electrospun chitosan nanofibrous membranes functionalized with silver nanoparticles. Proceedings of the 2021 IEEE 7th International Conference on Nanomaterials: Applications and Properties, NAP 2021 (article in press).
2. Матеріали розділу були частково використані при підготовці студентської наукової роботи студентки 6 курсу Навчально-наукового медичного інституту СумДУ Варави Ю. В. на Всеукраїнський конкурс студентських наукових робіт з галузей знань і спеціальностей (науковий керівник - відповідальний виконавець науково-дослідної роботи, с.н.с. ЦККНО ННМІ Корнієнко В.В.).

### **3 ФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОВОЛОКНИСТИХ МЕМБРАН ВИГОТОВЛЕНИХ МЕТОДОМ ЕЛЕКТРОПРЯДІННЯ ІЗ ДОДАВАННЯМ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА**

#### **3.1 Матеріали і методи**

##### **3.1.1 Приготування розчинів хітозану, електропрядіння нановолокнистих мембран хітозану та їх нейтралізація лугом**

Розчин хітозану (3,5%, вага/об'єм) готували шляхом розчинення порошку хітозану (Ch) (MW 50-190 кДа, DD 75-85%, в'язкість 20-300 сП Glenham Life Sciences, Corsham, UK) у співвідношенні суміші TFA/DCM (розчин Honeywell Fluka (Loughborough, Wiltshire, UK) рівний 9:1. AgNPs (NanoWave, Гданськ, Польща) готували за допомогою методу мокрого синтезу, описаного раніше [44]. Потім AgNPs додавали до Ch-TFA/ розчин DCM та перемішували на магнітній мішалці протягом ночі при кімнатній температурі. Концентрацію AgNPs розглядали відповідно до мінімальної інгібуючої концентрації (MIC) NPs, виміряної для *S. aureus* та *E.coli* (2,5 та 1,25 мкг/мл відповідно) [45,34]. Розчини Ch-TFA/DCM, розроблені для цього дослідження, містили таку кількість наночастинок: (a) 0,625 мкг/мл, (b) 1,25 мкг/мл, (c) 2,5 мкг/мл і (d) 5 мкг /мл, що відповідало від ½ до 2 MIC AgNPS.

Хітозанові нановолокнисті мембрани були виготовлені на колекторі електропрядіння, покритому алюмінієвою фольгою (Linari Engineering s.r.l., Італія). Металеву голку шприца об'ємом 10 мл (внутрішній діаметр 0,69 мм) заповнювали розчином. Відстань голка-колектор 15 см, швидкість подачі 1,0 мл/год, прикладена напруга 21 кВ. Умови електропрядіння були такими: вологість менше 35% і температура 21–24 °С. Хітозанові нановолокнисті мембрани сушили у вакуумній печі при 30 °С протягом 24 год для видалення залишків розчинників. [46].

Мембрани Ch-TFA/DCM нейтралізували в розчині луку (70% етанол/30% розчин води) – 1M NaOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США) протягом 24

годин, після чого багаторазово промивали дистильованою водою та висушували. протягом доби при кімнатній температурі.

### **3.1.2 Скануюча електронна мікроскопія (SEM) та енергодисперсійне рентгенівське випромінювання (EDX)**

За допомогою FEI Inspect S50B SEM (FEI, Брно, Чеська Республіка) спостерігали структуру волокна, прикріплення клітин та колонізацію бактеріями. Зразки напилювали під вакуумом карбоном на вакуумній установці ВУП-5М (СЕЛМІ, Суми, Україна). Діаметр волокна та пористість вимірювали за допомогою програмного забезпечення Image J. Частотні гістограми розподілу діаметра волокна були побудовані за допомогою програмного забезпечення Excel.

### **3.1.3 Здатність до набухання (SD) і втрата ваги (WL)**

Мембрани розрізали на розміри 1,5 см × 1,5 см, а потім замочували у фосфатно-сольовому буферному розчині (PBS) при нейтральному рН на 20 і 60 хв. Потім зразки видаляли пінцетом, надлишок води видаляли фільтрувальним папером і сушили при кімнатній температурі протягом 24 годин. Ступінь набухання (SD) розраховували за таким рівнянням (1) [47]:

$$SC (\%) = (W_d - W_s) / W_s \times 100 \quad (1)$$

де  $W_s$  (г) – вага набряклого нановолокнистого килимка,

$W_d$  (г) – маса зразків після сушіння при кімнатній температурі.

Втрату маси (WL) зразків (1,5 x 1,5 см) визначали до і після занурення в PBS. Мембрани хітозану замочували в PBS (рН 7,4) на 1, 3, 7 і 28 днів. Потім зразки промивали водою Milli-Q і сушили протягом ночі при кімнатній

температурі, щоб видалити поглинуту воду. Для розрахунку відсотка втрати ваги (WL) (2) було використано наступне рівняння [48]:

$$WL (\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (2)$$

де  $W_s$  (г) – вага набряклого нановолокнистого килимка,  
 $W_d$  (г) – маса зразків після сушіння при кімнатній температурі.

### 3.1.4 Дослідження клітинної культури *in vitro*

Клітини (тип клітин U2OS) вирощували в модифікованому Dulbecco середовищі Eagle/живильної суміші F-12 (DMEM/F-12) з L-глутаміном, доповненим 100 од. мл-1 пеніциліну, 100 мкг, мл-1 стрептоміцину, 2,5 мкг. мл-1 амфотерицину В і 10% фетальної бичачої сироватки. Клітини культивували в пластикових культуральних колбах об'ємом 75 см<sup>2</sup> та інкубували в інкубаторі за стандартних умов культивування (37°C і 5% CO<sub>2</sub>). Клітини промивали фосфатним буферним розчином (PBS; рН = 7,4), після чого проводили інкубацію в трипсині/ЕДТА (0,25% трипсину, 1 мМ EDTA; Sigma), а потім повторно суспендували в середовищі. Зразки стерилізували контактом із 70% розчином етанолу протягом однієї години, потім тричі промивали стерильним PBS. Після цього клітини висівали на зразки при щільності висіву клітин 1×10<sup>4</sup> клітин/лунку, і до кожної лунки додавали 2 мл середовища. Поживне середовище змінювали кожні 2 дні. Життєздатність клітин оцінювали на 1, 3 і 7 день. В якості негативного контролю використовували лунки, які містили тільки клітини без зразків. Таким же чином інкубували зразки без клітин. У призначений час до кожної лунки додавали Alamar blue (Invitrogen, США) у кількості, що дорівнює 10% об'єму середовища, та інкубували протягом 8 год при 37 °C у темряві. Оптичну густину (OD) кожного зразка вимірювали при 570 і 595 нм за допомогою планшетного зчитувача (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Через 3 дні зразки збирали та фіксували 2,5% глутарового

альдегіду (0,1 М PBS) протягом 40 хв, двічі. Потім фіксовані клітини зневоднювали шляхом занурення в зростаючу концентрацію етанолу у воді (50–96%) на 30 хв при кожній концентрації. SEM використовували для визначення морфології клітин на поверхні зразків.

### **3.1.5 Бактеріологічний експеримент**

Для оцінки антибактеріальної активності Ch-TFA/DCM мембран було відібрано *E. coli* та *S. aureus*, отримані з Національної колекції мікроорганізмів (Інститут мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного, Україна). Штами культивували в бульйоні при 37°C протягом 24 год. Зразки площею 0,5 см<sup>2</sup> готували в асептичних умовах і поміщали в стерильний 24-лунковий пластиковий планшет з 2 мл попередньо приготовленої бактеріальної суспензії (10<sup>5</sup> КУО/мл). Бактерії, суспендовані в живильному бульйоні, використовували як контроль. Після інкубації протягом 2, 4, 6 і 8 годин поживний агар інокулювали аліквотами по 10 мкл з кожної лунки, а потім інкубували при 37 °C протягом 12 годин для подальшого підрахунку колоній.

### **3.1.6 Статистичний аналіз**

Односторонній дисперсійний аналіз (ANOVA) проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica® v.8. Результати були виражені як середнє ± стандартне відхилення. Значення *p* менше 0,05 вважалося значущим. Всі досліди проводилися в трьох повторах.

## **3.2 Результати**

### **3.2.1 SEM і EDX**

Системи співрозчинників TFA та DCM 9:1 використовували для приготування мембрани методом електропрядіння. TFA утворює солі з

аміногрупами хітозану, які руйнують молекули взаємодію мономерами хітозану, роблячи їх придатними до електроспінінгу [49]. Сканувальна електронна мікроскопія демонструє утворення високопористої мембрани з випадково орієнтованими волокнами діаметром  $200 \pm 10$  нм. Структурних дефектів і склеювання волокон не було (рис. 3.1.). Нановолокниста мембрана з хітозану має високу швидкість деградації та потребує нейтралізації. Через 24 години після обробки в розчині лугу (70% етанолу/30% розчину води) діаметр волокна збільшується до  $300 \pm 10$  нм і зменшується пористість з 7,9% до 4,5%. Набухання і склеювання волокна є основною причиною структурних змін.

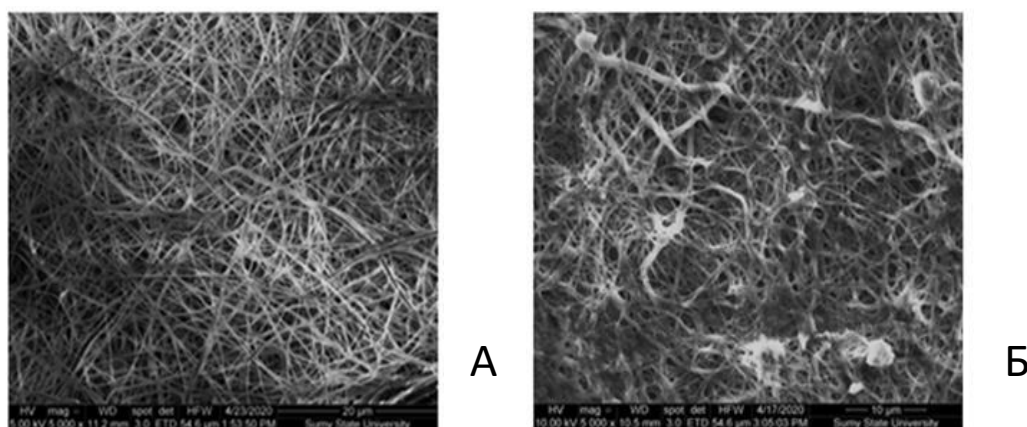


Рисунок 3.1 – Мембрани Ch-TFA/DCM до (А) і після обробки 1М NaOH 70% етанол/30% водним розчином (Б)

Додавання AgNPs до розчину не вплинуло на кінцеву морфологію електропрядених мембран (рис. 3.2, верхній ряд), які демонструють випадкову архітектуру. Ag AgNPs істотно впливають на діаметр волокон і пористість, які зменшуються до  $160 \pm 1,3$  нм і 2,41%. Хан та ін. показали, що введення срібла в розчин електропрядіння підвищує його провідність і зменшує діаметр волокна після процесу прядіння [50].



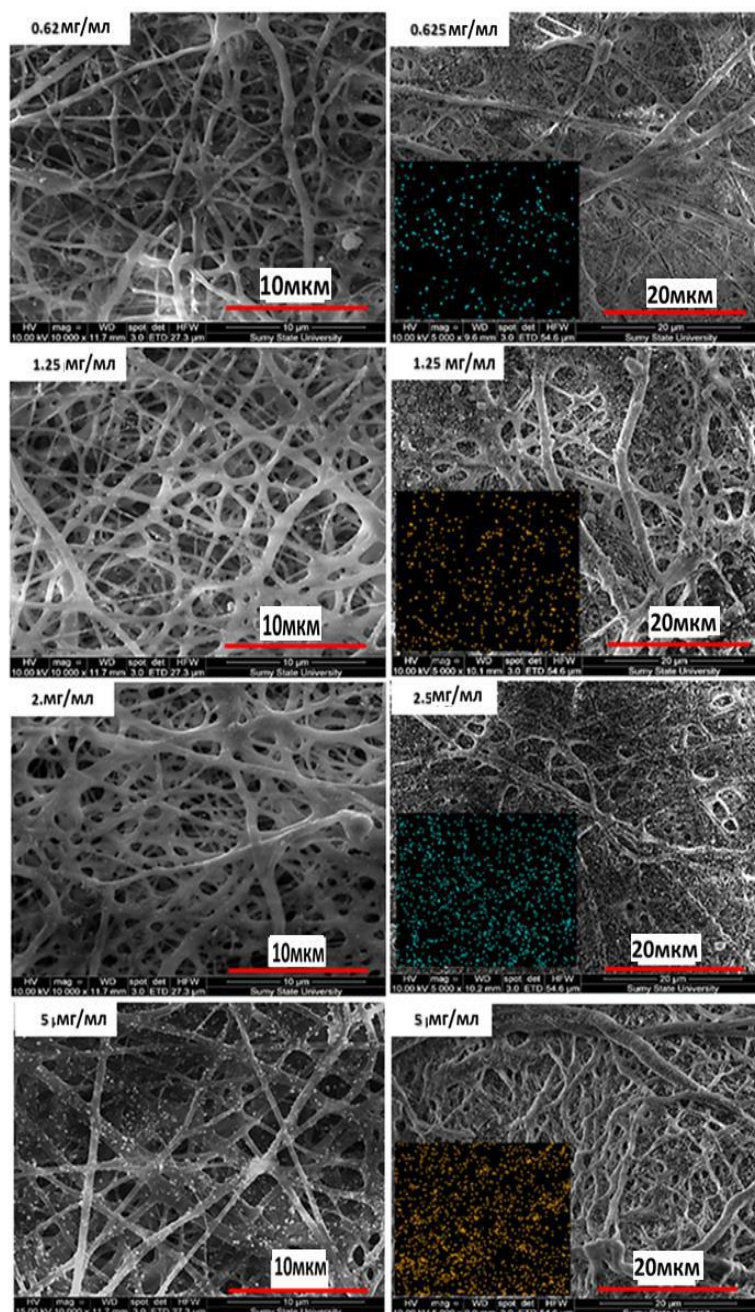


Рисунок 3.2 – Мембрани Ch-TFA/DCM з AgNP в різних концентраціях до (лівий ряд) і після обробки в 70% розчині етанолу / 30% водному розчині (правий ряд) з EDX розподілом AgNP (вставка)

Протягом ночі обробка 70% етанол/30% водним розчином призводить до збільшення діаметра волокна та зменшення пористості так само, як у мембранах без AgNPs (рис. 5). EDX демонструє рівномірний розподіл AgNPs всередині мембран (рис. 3.2., нижній ряд, вставка). Концентрація AgNPs не вплинула на структуру мембрани (як до, так і після обробки).

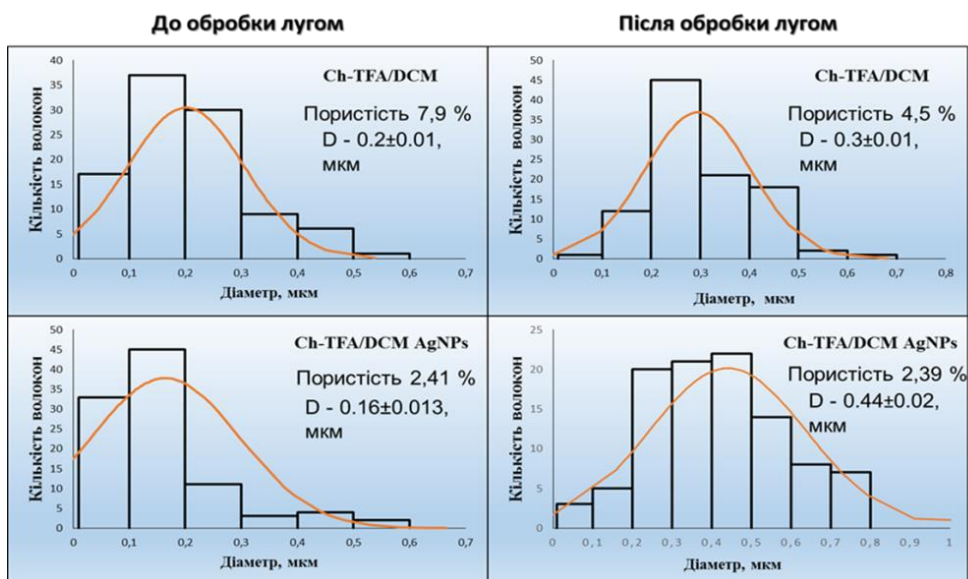


Рисунок 3.3 – Розподіл діаметру волокон та пористості хітозанових мембран до та після обробки лугом

### 3.2.2 Здатність до набухання (SD) і втрата ваги (WL)

Кінетика деградації волокнистих мембран після нейтралізації в суміші етанол-вода та після видалення надлишку розчинної солі TFA/DCM показала, що нейтралізація лугом 1M NaOH є доцільною для збереження структури нановолокна (рис.3.4.). Здебільшого отримані нановолокна зберігали морфологію після багаторазового занурення в PBS. Здатність набухання фіброзних мембран була майже на однаковому рівні через 20 хв і 60 хв занурення. Втрата ваги нановолокнистих зразків під час занурення в PBS постійно збільшувалася протягом перших трьох днів і помітно збільшувалася після 1-го тижня. Суттєва різниця у втраті ваги спостерігалася лише між 3-м і 28-м днем аналізу ( $p \leq 0,01$ ). Відсутність деградації хітозанових волокон після тижня аналізу може бути пояснена відсутністю ацетильних груп [51]. Розбіжностей у точках деградації серед зразків з різним вмістом AgNPs не було.

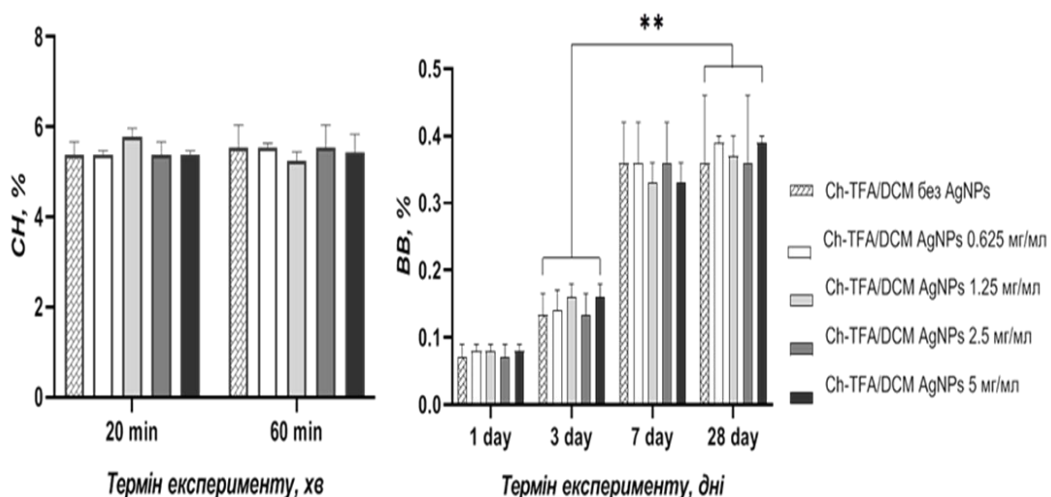


Рисунок 3.4 – Кінетика деградації (SD та WL) волокнистих мембран Ch-TFA/DCM, з наночастинками срібла. Зірочки вказують на статистично значущі відмінності між двома групами

Нановолокнисті мембрани зберегли структуру хітозанового нановолокна через після одностороннього занурення в PBS. Після трьох днів занурення в PBS спостерігалося зменшення загальної пористості мембрани. Слід зазначити, що більшість волокон зберегли свою структуру. На цьому дібу спостерігалися численні набряклі нановолокна зі збільшенням кількості острівців зрощених волокнистих пучків [52]. Крім того, в структурі зразків з'явилося стоншення волокон і тріщини (рис. 3.5.). Кількість розривів і витончення волокон збільшилася до 28 доби експерименту. Вага змінилася в результаті розчинення волокон. Наприкінці дослідження незначну зміну ваги можна пояснити відкладенням фосфату, видимим на поверхні після 28 днів занурення.

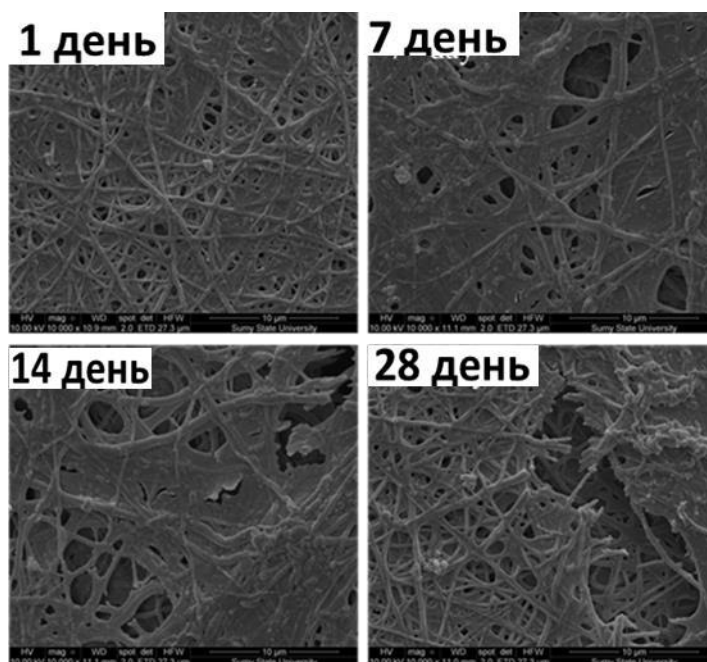


Рисунок 3.5 – SEM Ch-TFA/DCM мембран, завантажених наночастицями срібла, під час 4-тижневого занурення в PBS

### 3.2.3 Дослідження клітинної культури *in vitro*

Значення оптичної щільності (OD), що представляють кількість клітин, присутніх на мембранах, підтверджують подібний ріст клітин у кожній точці часу культивування (рис. 3.6.), незважаючи на кількість срібла. Проте через 3 та 7 днів значення OD для зразків без срібла було вищим, ніж для зразків із сріблом. Клітини, культивовані на ненавантажених AgNPs хітозанових мембранах на 7 день, продемонстрували приблизно в 2 рази вищу життєздатність, ніж на 1 день. Проте життєздатність клітин на срібловмісних зразках була вищою в динаміці культивування. Ці дані свідчать про те, що проліферація клітин після приєднання клітин відбувалася під впливом AgNP, але застосовувані концентрації срібла не пригнічували проліферативну активність остеобластів.

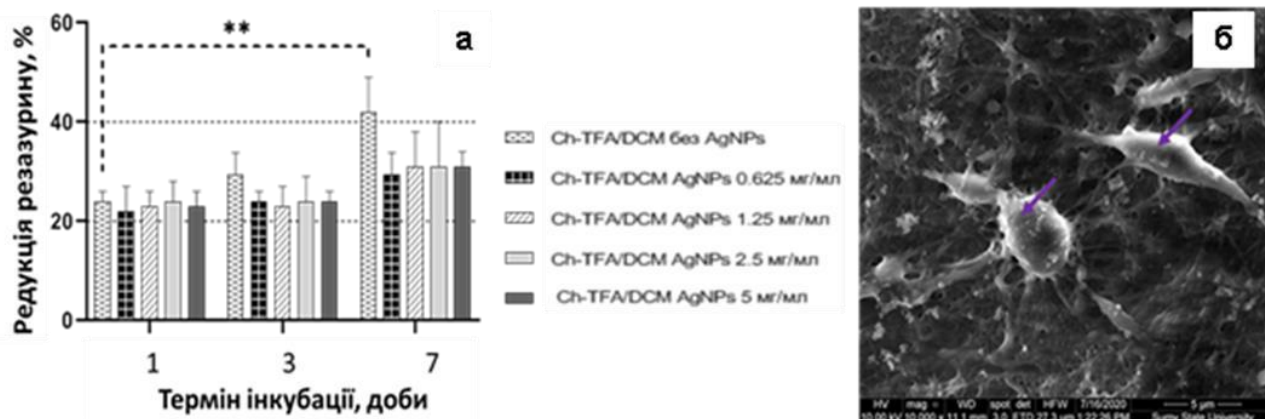


Рисунок 3.6 – Дослідження відновлення резаурину з клітинами U2OS, засіяними на хітозанові мембрани з різною кількістю AgNPs (а),  $**p < 0,01$ ; SEM клітин U2OS на поверхні хітозанової мембрани містила максимальну кількість AgNPs через 7 днів після посіву клітин (б), фіолетовими стрілками вказано клітини

### 3.2.4 Антибактеріальна ефективність волокнистих мембран Ch-TFA/DCM з наночастинками срібла

На Рис. 3.7. показана антибактеріальна активність мембран проти досліджуваних бактерій *in vitro*, кількісно оцінена методом КУО.

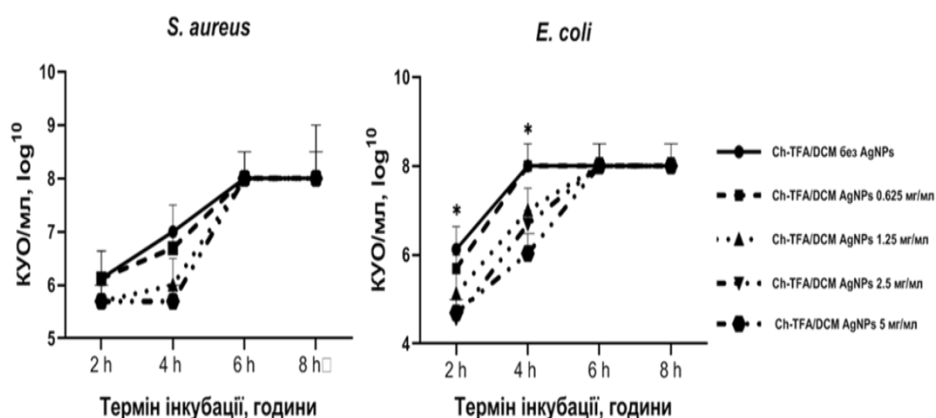
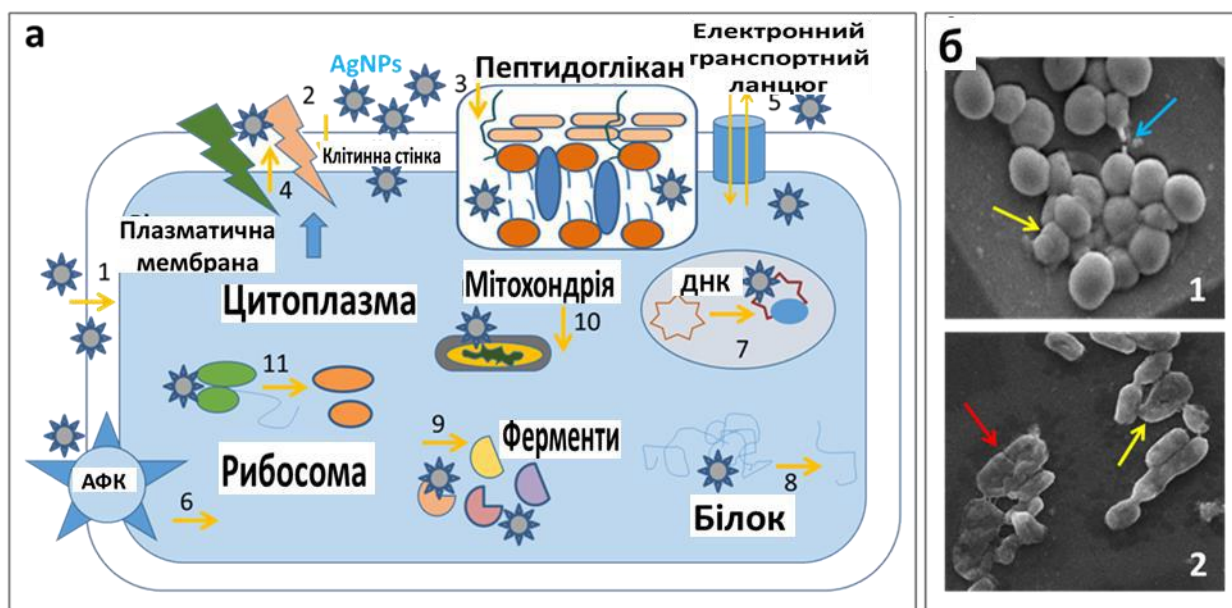


Рисунок 3.7 – Антибактеріальна ефективність мембран Ch-TFA/DCM з різною кількістю AgNP, проти *S. aureus* і *E. coli*, КУО/мл

Значне залежне від дози AgNPs зменшення популяції бактерій *S. aureus* та *E. coli* (5,5 log та 6 log відповідно) спостерігалось на 4-добі експерименту. Крім того, була помітна залежна від часу динаміка швидкості зменшення загальної кількості обох штамів бактерій, інкубованих з мембранами Ch-TFA/DCM. В іншому випадку всі типи мембран мали більш високу антимікробну активність щодо грамнегативних бактерій, ніж до грампозитивних після 2 год експерименту. Доведено, що хітозан має більш значний вплив на грамнегативні бактерії завдяки їх вищій гідрофільності, ніж у грампозитивних бактерій [5]. В даний час хітозан, як агент, що впливає на зовнішню мембрану, володіє скоріше бактеріостатичними властивостями, ніж бактерицидними. Однак для підвищення антимікробного потенціалу біофункціональних матеріалів хітозан можна комбінувати з іншими антимікробними агентами [51]. Таким чином, через 4 години спільного культивування з мембранами, які містили AgNP, швидкість редукції *S. aureus* була порівняно вищою, ніж *E. coli*. Це підтверджує результати інших дослідників про те, що навантаження сріблом мембран надавало їм посилюючий антибактеріальний ефект на грампозитивні та грамнегативні бактерії [52].

Загальний механізм антибактеріальної дії хітозану та наночастинок срібла був посилений можливими механізмами AgNPs [53], представленими на малюнку 3.8.(а). В результаті впливу мембран Ch, завантажених AgNPs, на SEM було виявлено порушення цілісності бактеріальної мембрани, що призводить до витоку внутрішньоклітинних сполук (рис. 3.8 (б)).



Рисуно 3.8 – Загальні механізми антибактеріальної дії AgNPs (а):

1) змінюють проникність мембрани – пошкодження та лізис мембрани; 2) порушення клітинної стінки - перфорація - утворення пор; 3) руйнування пептидоглікану; 4) цитоплазматичний витік; 5) обрив ланцюга транспорту електронів; 6) окислювальний стрес - зниження утворення АТФ; 7) деградація ДНК - перешкода реплікації; 8) денатурація білка; 9) інактивація ферментів; 10) дисфункція мітохондрій; 11) руйнування рибосом - пригнічення синтезу білка; і SEM зображення (б) ураження бактеріальної мембрани (1 - *S. aureus* і 2 - *E. coli*) після 8 годин спільного культивування з мембранами Ch-TFA/DCM, навантаженими AgNPs: стрілки вказують на руйнування бактеріальних клітин (жовті – ушкодження мембрани шляхом перфорації, сині – витікання цитозолу, червоні – лізис клітин).

### Розділ 3 висвітлений у наступних роботах:

1. V. Korniienko et al. Functional and biological characterization of chitosan electrospun nanofibrous membrane nucleated with silver nanoparticles. *Appl. Nanosci.*, 2021.

2. Матеріали розділу були частково використані при підготовці студентської наукової роботи студентки 6 курсу Навчально-наукового медичного інституту СумДУ Варави Ю. В. на Всеукраїнський конкурс студентських наукових робіт з галузей знань і спеціальностей (науковий керівник - відповідальний виконавець науково-дослідної роботи, с.н.с. ЦККНО ННМІ Корнієнко В.В.).

## ВИСНОВКИ

Мембрани Ch, навантажені з AgNP, продемонстрували вищу антибактеріальну активність (швидкість зниження КУО), ніж незавантажені зразки. Потрібно зазначити, що кількість наночастинок срібла, необхідна для запобігання прикріпленню та колонізації бактерій, не перевищувала  $\frac{1}{2}$  -1 МІС. Крім того, було помічено, що застосування наночастинок срібла пригнічувало утворення біоплівки як *S. aureus*, так і *E. coli*. Таким чином, стратегія покращення антимікробних властивостей Ch мембран з використанням інших антибактеріальних агентів може бути реалізована шляхом включення наночастинок срібла.

Нейтралізація хітозанових нановолокнистих мембран TFA/DCM в 1M розчині NaOH зберігала пористу структуру та забезпечувала їх нерозчинність у нейтральних або основних водних середовищах. Постнейтралізовані хітозанові нановолокнисті мембрани демонструють високу біосумісність і забезпечують відповідне середовище для проліферації клітин. Наночастинки срібла не впливають на біосумісність, але забезпечують значний антибактеріальний ефект проти грамнегативних і грампозитивних бактерій. Мембрани хітозан-TFA/DCM, інкорпоровані наночастками срібла, можуть бути перспективним матеріалом для тканинної інженерії з відповідним рівнем біосумісності і високою антимікробною здатністю після нейтралізації лугом.



## ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. R. P. Gonçalves, W. H. Ferreira, R. F. Gouvêa, and C. T. Andrade, “Effect of chitosan on the properties of electrospun fibers from mixed poly(Vinyl Alcohol)/Chitosan solutions,” *Mater. Res.*, vol. 20, no. 4, pp. 984–993, 2017, doi: 10.1590/1980-5373-MR-2016-0618.
2. V. Deineka et al., “Hemostatic and Tissue Regeneration Performance of Novel Electrospun Chitosan-Based Materials,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 6, p. 588, 2021, doi: 10.3390/biomedicines9060588.
3. M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D. A. Saldaña-Koppel, and L. F. Quiñones-Olvera, “Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/821279.
4. A. F. De Faria, F. Perreault, E. Shaulsky, L. H. Arias Chavez, and M. Elimelech, “Antimicrobial Electrospun Biopolymer Nanofiber Mats Functionalized with Graphene Oxide-Silver Nanocomposites,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 23, pp. 12751–12759, 2015, doi: 10.1021/acsami.5b01639.
5. R. C. Goy, D. De Britto, and O. B. G. Assis, “A review of the antimicrobial activity of chitosan,” *Polimeros*, vol. 19, no. 3, pp. 241–247, 2009, doi: 10.1590/S0104-14282009000300013.
6. M. Hosseinnejad and S. M. Jafari, “Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 85, pp. 467–475, 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022.
7. J. Champer, J. Patel, N. Fernando, E. Salehi, V. Wong, and J. Kim, “Chitosan against cutaneous pathogens,” *AMB Express*, vol. 3, pp. 1–8, 2013, doi: 10.1186/2191-0855-3-37.
8. V. Sencadas et al., “Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 87, no. 2, pp. 1295–1301, 2012, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.09.017. [9] R. Roy, M. Tiwari, G. Donelli, and V. Tiwari, “Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-

biofilm agents and their mechanisms of action,” *Virulence*, vol. 9, no. 1, pp. 522–554, 2018, doi: 10.1080/21505594.2017.1313372.

9. H. Homayoni, S. A. H. Ravandi, and M. Valizadeh, “Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 77, no. 3, pp. 656–661, 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.02.008.

10. Y. Huang, S. Onyeri, M. Siewe, A. Moshfeghian, and S. V. Madihally, “In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 36, pp. 7616–7627, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.036.

11. S. Jin et al., “Electrospun silver ion-loaded calcium phosphate/ chitosan antibacterial composite fibrous membranes for guided bone regeneration,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 4591–4605, 2018, doi: 10.2147/IJN.S167793.

12. Abebe, G. M. (2020). The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1705814>

15. P. Sangsanoh and P. Supaphol, “Stability improvement of electrospun chitosan nanofibrous membranes in neutral or weak basic aqueous solutions,” *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 10, pp. 2710–2714, 2006, doi: 10.1021/bm060286l.

16. J. M. Frick, A. Ambrosi, L. D. Pollo, and I. C. Tessaro, “Influence of Glutaraldehyde Crosslinking and Alkaline Post-treatment on the Properties of Chitosan-Based Films,” *J. Polym. Environ.*, vol. 26, no. 7, pp. 2748–2757, 2018, doi: 10.1007/s10924-017-1166-3.

17. M. Arkoun, F. Daigle, M. C. Heuzey, and A. Aji, “Antibacterial electrospun chitosan-based nanofibers: A bacterial membrane perforator,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 5, no. 4, pp. 865–874, 2017, doi: 10.1002/fsn3.468.

18. S. Jin et al., “Electrospun silver ion-loaded calcium phosphate/ chitosan antibacterial composite fibrous membranes for guided bone regeneration,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 4591–4605, 2018, doi: 10.2147/IJN.S167793.

19. J. Lopez-Esparza, L. Francisco Espinosa-Cristobal, A. Donohue-Cornejo, and S. Y. Reyes-Lopez, “Antimicrobial activity of silver nanoparticles in polycaprolactone

nanofibers against gram-positive and gram-negative bacteria,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 55, no. 49, pp. 12532–12538, 2016, doi: 10.1021/acs.iecr.6b02300.

20. H. Celebi, M. Gurbuz, S. Koparal, and A. Dogan, “Development of antibacterial electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver ion-incorporated HAP nanoparticles,” *Compos. Interfaces*, vol. 20, no. 9, pp. 799–812, 2013, doi: 10.1080/15685543.2013.819700.

21. Y. Husak et al., “Morphological changes in gram-negative microorganisms treated with silver and copper nanoparticles,” *Springer Proc. Phys.*, vol. 244, pp. 51–57, 2020, doi: 10.1007/978-981-15-3996-1\_5.

22. B. Khalandi et al., “A Review on Potential Role of Silver Nanoparticles and Possible Mechanisms of their Actions on Bacteria,” *Drug Res. (Stuttg.)*, vol. 67, no. 2, pp. 70–76, 2017, doi: 10.1055/s-0042-113383.

23. T. Chatterjee, B. K. Chatterjee, D. Majumdar, and P. Chakrabarti, “Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1850, no. 2, pp. 299–306, 2015, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.10.022.

24. A. Abbaszadegan et al., “The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: A preliminary study,” *J. Nanomater.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/720654.

25. E. Z. Gomaa, “Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: A case study on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as models for gram-positive and gram-negative bacteria,” *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol. 63, no. 1, pp. 36–43, 2017, doi: 10.2323/jgam.2016.07.004.

26. W. Lee, K. J. Kim, and D. G. Lee, “A novel mechanism for the antibacterial effect of silver nanoparticles on *Escherichia coli*,” *BioMetals*, vol. 27, no. 6, pp. 1191–1201, 2014, doi: 10.1007/s10534-014-9782-z.

27. S. Prabhu and E. K. Poulouse, “Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects,” *Int. Nano Lett.*, vol. 2, no. 1, 2012, doi: 10.1186/2228-5326-2-32.

28. S. Castiglioni, A. Cazzaniga, L. Locatelli, and J. A. M. Maier, “Silver nanoparticles in orthopedic applications: New insights on their effects on osteogenic cells,” *Nanomaterials*, vol. 7, no. 6, 2017, doi: 10.3390/nano7060124.
29. O. Oleshko et al., “Ag nanoparticle-decorated oxide coatings formed via plasma electrolytic oxidation on ZrNb alloy,” *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 22, 2019, doi: 10.3390/ma12223742.
30. N. Xu et al., “Silver-loaded nanotubular structures enhanced bactericidal efficiency of antibiotics with synergistic effect in vitro and in vivo,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 731–743, 2017, doi: 10.2147/IJN.S123648.
31. N. Kumar et al., “Biocompatible agarose-chitosan coated silver nanoparticle composite for soft tissue engineering applications,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 46, no. 3, pp. 637–649, 2018, doi: 10.1080/21691401.2017.1337021.
32. O. Oleshko et al., “In vitro biological characterization of silver-doped anodic oxide coating on titanium,” *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 19, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3390/ma13194359.
33. Y. Varava, Y. Samokhin, A. Savchenko, K. Diedkova, S. Kyrylenko and V. Korniienko, “Antimicrobial Electrospun Chitosan Nanofibrous Membranes Functionalized with Silver Nanoparticles,” 2021 IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP), 2021, pp. 1-4, doi: 10.1109/NAP51885.2021.9568584.
34. Варавя Ю. В. “Функціональні властивості нановолокнистих мембран на основі хітозану, виготовлених методом електропрядіння та модифікованих наночастками срібла,” Всеукраїнський конкурс студентських наукових робіт з галузей знань і спеціальностей у 2020/2021 навчальному році у галузі “Теоретична медицина”. – Одеса, 2021.
35. Y. Qing et al., “Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 3311–3327, 2018, doi: 10.2147/IJN.S165125

36. M. Arkoun, F. Daigle, M. C. Heuzey, and A. Ajji, “Antibacterial electrospun chitosan-based nanofibers: A bacterial membrane perforator,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 5, no. 4, pp. 865–874, 2017, doi: 10.1002/fsn3.468.
37. D. A. Pompa-Monroy et al., “Bacterial biofilm formation using pcl/curcumin electrospun fibers and its potential use for biotechnological applications,” *Materials (Basel)*., vol. 13, no. 23, pp. 1–22, 2020, doi: 10.3390/ma13235556.
38. V. Pillay et al., “A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications,” *J. Nanomater.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/789289.
39. M. Zienkiewicz-Strzałka, A. Deryło-Marczewska, Y. A. Skorik, V. A. Petrova, A. Choma, and I. Komaniecka, “Silver nanoparticles on chitosan/silica nanofibers: Characterization and antibacterial activity,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 1, 2020, doi: 10.3390/ijms21010166.
40. S. Shinde, L. H. Lee, and T. Chu, “Inhibition of biofilm formation by the synergistic action of EGCG-S and antibiotics,” *Antibiotics*, vol. 10, no. 2, pp. 1–21, 2021, doi: 10.3390/antibiotics10020102.
41. M. Arkoun, F. Daigle, M. C. Heuzey, and A. Ajji, “Mechanism of action of electrospun chitosan-based nanofibers against meat spoilage and pathogenic bacteria,” *Molecules*, vol. 22, no. 4, 2017, doi: 10.3390/molecules22040585.
42. D. A. Pompa-Monroy et al., “Bacterial biofilm formation using pcl/curcumin electrospun fibers and its potential use for biotechnological applications,” *Materials (Basel)*., vol. 13, no. 23, pp. 1–22, 2020, doi: 10.3390/ma13235556.
43. B. Khalandi et al., “A Review on Potential Role of Silver Nanoparticles and Possible Mechanisms of their Actions on Bacteria,” *Drug Res. (Stuttg)*., vol. 67, no. 2, pp. 70–76, 2017, doi: 10.1055/s-0042-113383.[1] M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D. A. Saldaña-Koppel, and L. F. Quiñones-Olvera, “Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/821279.

44. O. Oleshko et al., “In vitro biological characterization of silver-doped anodic oxide coating on titanium,” *Materials (Basel)*, vol. 13, no. 19, pp. 1–12, 2020, doi: 10.3390/ma13194359.
45. P. Nitti et al., “Influence of nanofiber orientation on morphological and mechanical properties of electrospun chitosan mats,” *J. Healthc. Eng.*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/3651480.
46. V. Korniienko, Ye. Husak, A. Yanovska, R. Banasiuk, A. Yusupova, A. Savchenko, V. Holubnycha & M. Pogorielov, “Functional and biological characterization of chitosan electrospun nanofibrous membrane nucleated with silver nanoparticles,” *Applied Nanoscience*, 2021, <https://doi.org/10.1007/s13204-021-01808-5>
47. I. Laidmäe, K. Ērglis, A. Cēbers, P. A. Janmey, and R. Uiibo, “Salmon fibrinogen and chitosan scaffold for tissue engineering: in vitro and in vivo evaluation,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 29, no. 12, 2018, doi: 10.1007/s10856-018-6192-8.
48. Y. Liu, Y. Liu, N. Liao, F. Cui, M. Park, and H. Y. Kim, “Fabrication and durable antibacterial properties of electrospun chitosan nanofibers with silver nanoparticles,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 79, pp. 638–643, 2015, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.058.
49. S. J. Lee et al., “Electrospun chitosan nanofibers with controlled levels of silver nanoparticles. Preparation, characterization and antibacterial activity,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 111, pp. 530–537, 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.04.026.
50. A. T. Hang, B. Tae, and J. S. Park, “Non-woven mats of poly(vinyl alcohol)/chitosan blends containing silver nanoparticles: Fabrication and characterization,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 82, no. 2, pp. 472–479, 2010, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.05.016.
51. R. Ramalingam et al., “Poly- $\epsilon$ -caprolactone/gelatin hybrid electrospun composite nanofibrous mats containing ultrasound assisted herbal extract: Antimicrobial and cell proliferation study,” *Nanomaterials*, vol. 9, no. 3, 2019, doi: 10.3390/nano9030462.

52. J. An, H. Zhang, J. Zhang, Y. Zhao, and X. Yuan, "Preparation and antibacterial activity of electrospun chitosan/ poly(ethylene oxide) membranes containing silver nanoparticles," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 287, no. 12, pp. 1425–1434, 2009, doi: 10.1007/s00396-009-2108-y.
53. Y. Qing et al., "Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 3311–3327, 2018, doi: 10.2147/IJN.S165125.