Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби

УДК54.052: 615.281.9 На правах рукописи

САВДЕНБЕКОВА БАЛЖАН ЕСИМХАНКЫЗЫ

Физико-химические основы получения антибактериальных покрытий для имплантируемых изделий

6D060600 –Химия

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные руководители:
Доктор химических наук, профессор
Оспанова А.К., КазНУ им. аль-Фараби

Доктор химических наук, профессор Уваров Н.К., Новосибирский государственный технический университет, Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, Новосибирск, Россия

Республика Казахстан
Алматы, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ 4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ 5
ВВЕДЕНИЕ 6
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР 11
1.1 Полимеры, используемые при создании покрытий для имплантируемых средств 11
1.2 Различные методы и технологии мультислойной сборки 15
1.2.1 Метод погружения (dip coating) 18
1.2.2 Метод вращения (spin coating) 19
1.2.3 Метод распыления 20
1.2.4 Метод электромагнитной сборки 21
1.3 Предотвращение адгезии микроорганизмов 23
1.3.1 Ингибирование роста бактерий путем получения высокогидратированных пленок 24
1.3.2 Ингибирование роста бактерий путем использования пленок с определенной жесткостью 27
1.4 Контактные убивающие ПЭМС 28
1.4.1 Природные контактные убивающие поликатионные полимеры 28
1.4.2 Синтетические контактные убивающие поликатионные полимеры 30
1.4.3 Контактные убивающие НЧ активных металлов 31
1.4.4 Контактные убивающие ферменты 32
1.5 Высвобождаемые убивающие ПЭМС 33
1.5.1 Высвобождение ионов серебра 33
1.5.2 Вещества, генерирующие и высвобождающие активные формы кислорода (АФК) 35
1.5.3 Высвобождение антисептика 36
1.5.4 Высвобождение антибиотика 38
1.6 Самозащитные покрытия 43
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 46
2.1 Характеристика объектов исследования 46
2.2 Обработка поверхности твердых подложек 46
Обработка поверхностей стеклянных, кремниевых пластинок, а также титановых и стальных имплантатов 46
2.3 Получение антибактериальных полиэлектролитных мультислойных покрытий 47
2.3.1 Получение покрытий на основе поликатион/полианион 47
2.3.2 Внедрение антибактериального препарата в пленки 47
2.3.3 Определение содержания хлоргексидина в растворе 47
2.3.4 Получение ПЭМС на основе ХЗ/КМЦ содержащие НЧAg 48

2.3.5 Исследование высвобождения ионов серебра в физиологическом растворе 48
2.3.6 Определение антибактериальной активности 48
2.3.7 Определение степени деацетелирования хитозана методом потенциометрического титрования..... 49
2.4 Физико-химические методы исследования..... 50
2.4.1 Атомно-силовая микроскопия (АСМ)..... 50
2.4.2 Измерение толщины сухой пленки..... 50
2.4.3 Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)..... 51
2.4.4 Определение угла смачивания..... 51
2.4.5 Атомно-абсорбционная спектроскопия..... 51
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ 52
3.1 Квантово-химическое обоснование энергетических и структурных характеристик биоактивных полисахаридов и антибактериальных препаратов..... 52
3.1.1 Квантово-химическое исследование модельных фрагментов хитозана, карбоксиметилцеллюлозы и альгиновой кислоты 52
3.1.2 Квантово-химическое обоснование структурных и энергетических характеристик биоактивных реагентов..... 55
3.2 Установление условий получения активных поверхностей носителя для нанопокрытий 60
3.3 Установление условий получения нанопокрытий методом LbL..... 66
3.4 Исследование ПЭМС покрытий на основе ХЗ/ПАК и ХЗ/Na-КМЦ 75
3.5 Установление условий нанесения антибактериальных агентов на пленки..... 87
3.5.1 Включение ХГ в состав пленки во время сборки..... 90
3.5.2 Включение ХГ в готовую пленку..... 93
3.6 Установление условий получения антибактериальных покрытий с НЧAg 98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 108
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ..... 111

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 13867-68 Продукты химические. Обозначение чистоты.

ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные. Общие технические требования.

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 6.38-90 Унифицированные системы документации. Система организационно-распорядительной документации. Требования к оформлению документов.

ГОСТ 7.0.100-2018 Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.12-93 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила.

ГОСТ 7.9-95 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования.

ГОСТ 8.417-2002 Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы физических величин.

ГОСТ Р ИСО 5832-3-2014 Имплантаты для хирургии. Металлические материалы. Часть 3. Деформируемый сплав на основе титана, 6-алюминия и 4-ванадия (с Поправкой)

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

LbL	–	полислойная сборка (Layer-by-layer)
Na-КМЦ	–	карбоксиметилцеллюлоза натрия
pK_a	–	константа кислотности
QCM	–	кварцевый микробаланс
АМП	–	антимикробный пептид
АП	–	антибактериальный препарат
АСМ	–	атомно-силовой микроскоп
Геп	–	Гепарин
ГК	–	гиалуроновая кислота
ГМ	–	Гентамицин
ЗУ	–	зона угнетения
ИК	–	Инфракрасный
ЛП	–	лекарственный препарат
НЧ	–	Наночастицы
НЧAg	–	наночастицы серебра
ПАА	–	поли(акриламид)
ПАК	–	поли(акриловая кислота)
ПВП	–	поли(внилпирролидон)
ПЛЛ	–	поли(L-лизина)
ПСС	–	поли(стиролсульфонат)
ПУ	–	Полиуретан
ПЭИ	–	Полиэтиленимин
ПЭМС	–	полиэлектролитные мультислои
СЭМ	–	сканирующая электронная микроскопия
ТК	–	Триклозан
УФ	–	Ультрафиолет
ХЗ	–	Хитозан

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена установлению условий получения антибактериальных нанопленок на основе полиэлетролитов и биоактивных соединений для медико-биологических изделий. Обоснованы использование в качестве полимерных матриц для мультислоев хитозана, карбоксиметилцеллюлозы натрия, полиакриловой кислоты, а в качестве перспективных антисептиков – хлоргексидин, триклозан и наночастицы серебра (НЧAg). Разработаны методика получения пленок методом полислойной сборки (LbL) и способы внедрения антибактериальных агентов в полученные пленки, предложен механизм формирования мультслоев, изучено влияние физико-химических параметров на морфологию поверхности тонких пленок, показана возможность прикладного использования исследованных материалов в качестве антибактериальных покрытий для имплантируемых систем. Все исследования в рамках диссертационной работы проведены впервые, результаты оформлены в виде статей, в том числе в рецензируемом журнале, и тезисов докладов международных конференций, а также получено положительное решение о выдаче патента РК на полезную модель.

Актуальность темы исследования. В практической медицине важной проблемой на сегодняшний день являются инфекционные заболевания, связанные с последствиями имплантируемых в организме медико-биологических изделий. Фиксация бактерий и развитие биопленки на поверхности имплантирующих биомедицинских устройств очень часто приводят к инфекциям и воспалениям, к сожалению, даже к необходимости их удаления, что сопровождается моральными и материальными затратами, а иногда и гибелью пациента. В связи с этим остро стоит вопрос ингибирования роста биопленки вокруг имплантата. Удаление и уничтожение образовавшейся биопленки требует применения антибиотиков, а это в свою очередь может привести к долгосрочному, неэффективному лечению и проявлению резистентности. Решение данной проблемы облегчается разработкой многослойных покрытий, содержащих антибактериальные агенты, которые могут быть выращены на поверхности медико-биологических изделий. В отличие от монопокрытий, аналог, состоящий из нескольких слоев, эффективен с точки зрения пролонгированного действия и может служить в качестве системы для доставки и хранения антисептиков и других антибактериальных препаратов.

Одним из наиболее перспективных в научном и прикладном отношении разновидностей антибактериальных покрытий являются тонкие полимерные пленки, которые высвобождают биологические активные вещества и предотвращают инфекционные изменения рядом с имплантируемым изделием.

Таким образом, разработка условий получения полиэлектролитных мультислоев на основе биосовместимых, экологически безвредных и доступных полиэлектролитов с дальнейшим нанесением на их поверхность антибактериальных покрытий для медико-биологических изделий является актуальной проблемой современной практической медицины.

Степень разработанности темы. Научные исследования, выполненые в рамках диссертационной работы, позволили разработать условия получения полиэлектролитных мультислоев путем предварительного квантово-химического обоснования активных центров закрепления полимерных матриц в мультислоях и биоактивных соединений на поверхности нанопленок. На основании полученных данных была осуществлена мультислойная сборка полислоев путем формирования химических связей между функциональными группами полимеров в зависимости от pH среды и температуры. В качестве антибактериальных агентов будут использованы не антибиотики, как это практикуется в современных методах, а антисептики. Такой подход к получению полислоев с активной поверхностью сочетает в себе прогнозируемый теоретический путь реакции и его экспериментальное осуществление, что значительно облегчает выполнение поставленных в диссертационной работе задач.

За последние три года сотрудниками кафедры физической химии, катализа и нефтехимии КазНУ им. аль-Фараби, в том числе, диссертантом, под руководством д.х.н., профессора Оспановой А.К., в сотрудничестве с учеными лаборатории неравновесных твердофазных систем ИХТТМ СО РАН и НГТУ, под руководством д.х.н., профессора Уварова Н.Ф. проведены исследовательские работы и опубликованы научные статьи по теме настоящей диссертационной работы.

Целью диссертационной работы является разработка условий получения антибактериальных покрытий на основе биосовместимых, экологически безвредных полиэлектролитов для медико-биологических изделий.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1 Квантово-химическое обоснование энергетических и структурных характеристик биоактивных полисахаридов и антибактериальных препаратов;

2 Установление условий получения антибактериальных тонких пленок на поверхности медицинских имплантатов методом LbL;

3 Определение особенностей изменения морфологии и роста пленок в зависимости от pH системы и внедрения антибактериального агента в структуру пленок;

4 Определение антибактериальной активности полученных пленок;

5 Разработка рекомендации по получению антибактериальных тонких пленок на основе полиэлектролитов на поверхности медицинских имплантатов.

Объекты исследования: тонкие пленки на основе полиэлектролитов на поверхности различных подложек, обладающие антибактериальными свойствами.

Предмет научного исследования: нанесение пленок на поверхность различных подложек методом LbL; зависимость морфологии поверхности пленок от физико-химических параметров; антибактериальные свойства пленок на основе полиэлектролитов.

Методы исследования. При выполнении исследований в рамках диссертационной работы были применены следующие методы получения полиэлектролитных пленок и физико-химического исследования: метод LbL; эллипсометрия; атомно-силовая и сканирующая электронная микроскопия;

определение угла смачивания методом лежащей капли; определение антибактериальной активности методом диффузии в агар.

Теоретическая значимость исследования. Найденные экспериментальным путем условия получения тонких пленок на основе полиэлектролитов для покрытия поверхности имплантируемых систем, предложенный механизм формирования нанопленок в зависимости от pH среды и природы полимерных матриц, значения физико-химических параметров, влияющих на морфологию поверхности тонких пленок, а также условия внедрения и высвобождения антибактериального агента представляют значительный теоретический интерес.

Научная новизна. Впервые разработаны условия получения нанопленок на основе полисахаридов: хитозан-карбоксиметилцеллюлоза натрия, хитозан-полиакриловая кислота и исследованы физико-химические характеристики полученных мультислоев, установлены влияние природы полиэлектролитов и pH среды на механизм формирования нанопленок, обоснованы зависимость толщины пленок от количества бислоев и форм нахождения полиэлектролитов, разработаны два способа получения НЧAg и механизм их внедрения в мультислои, установлена антибактериальная активность полученных нанопленок на титановых и стальных имплантатах, которые оформлены как полезная модель.

Практическая ценность. Ценность результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы в области получения тонких пленок на основе полиэлектролитов, заключается в возможности их использования для покрытия имплантируемых систем для придания им антибактериальных свойств; кроме того, результаты изучения зависимости морфологии поверхности тонких пленок от физико-химических параметров найдут применение в будущем при получении тонких пленок. По результатам диссертационной работы будут выданы рекомендации по получению и нанесению тонких пленок на основе полиэлектролитов на различные подложки, в частности, на имплантируемые материалы, для придания им противомикробных свойств.

Личный вклад диссертанта. Автором диссертации проведен тщательный литературный обзор по теме диссертационной работы, освоены методики нанесения пленок на основе полиэлектролитов на поверхность различных подложек, в том числе имплантатов, для предотвращения накопления бактерий и придания им антибактериальных свойств. Также, прямой вклад диссертанта заключается в обработке и интерпретации полученных научных результатов, их апробации на международных конференциях и оформлении в виде научных трудов.

Связь с научно – исследовательскими работами и государственными программами. Исследования в рамках диссертационной работы выполнялись в рамках проекта ГФ на 2018-2020 годы «Физико-химические основы получения многофункциональных биомедицинских материалов (нанопленок) с антибактериальными и противовоспалительными свойствами», ИРН AP05131647, а также в рамках сотрудничества между КазНУ им. аль-Фараби, ИХТТМ СО РАН и Новосибирского государственного технического университета.

Основные положения, выносимые на защиту:

1 Результаты квантово-химического исследования структурных и энергетических характеристик хитозана, карбоксиметилцеллюлозы натрия, хлоргексидина и триклозана и обоснование потенциальных активных центров электростатического взаимодействия в полимерных матрицах и биоактивных реагентов позволяют обосновать использование вышеуказанных веществ в качестве полимерных матриц для получения биоактивных нанопленок с антибактериальными свойствами;

2 Использование полуавтоматического метода погружения «dip coating» позволяет получать монотонно растущую пленку на обе стороны твердой подложки. Начальная концентрация растворов полиэлектролитов и их pH влияют на толщину, шероховатость и морфологию пленок ХЗ/ПАК и ХЗ/КМЦ.

3 Пленки с ХГ показывают антибактериальную активность в отношении S.aureus, а также музейного штамма E.coli ATCC25922 и дикого штамма P.Aeruginosa. Зона угнетения пленок $(ХЗ/КМЦ)_{40}$ со встроенным ХГ составляет 19 мм и 7 мм, против E.coli ATCC25922 и P.Aeruginosa, соответственно, а пленки, содержащие в своем составе НЧAg, показали антибактериальную активность по отношению к музейным штаммам Staphylococcus aureus. Зона угнетения для образца ХЗ/КМЦ со встроенными НЧAg составляет 7,1 ± 0,03 мм.

Апробация работы. Результаты исследований в рамках диссертационной работы докладывались и обсуждались на отечественных и зарубежных международных научно-практических конференциях:

- V Научно-практическая конференция «Приоритеты фармации и стоматологии: от теории к практике», Алматы, Казахстан, 14 декабря 2016 г;
- III международная Российско-Казахстанская школа-конференция студентов и молодых ученых «Химические технологии функциональных материалов», Новосибирск, Россия, 27-29 апреля 2017 г.;
- 5 Международная конференция «Фундаментальные основы механохимических технологий» (FBMT 2018), Новосибирск, Россия, 25-28 июня 2018 г.;
- VII Бакеевская Всероссийская с международным участием конференция «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты», Москва, Россия, 07-12 октября 2018 г.;
- Международная конференция «International Conference on Materials Sciences and Nanomaterials» (ICMSN 2017), Барселона, Испания, 14-16 июля 2017 г.

Публикации. Результаты выполненных исследований отражены в 12 научных работах, в том числе:

- в одной статье, опубликованной в периодическом издании, индексируемой базой данных Scopus (с процентилем выше 25);
- в одной статье, опубликованной в материале международной научной конференций (Proceedings), индексируемой базой данных Scopus;
- в четырех статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки Министерства образования и науки Республики Казахстан;
- в пяти тезисах докладов на республиканских и зарубежных международных научно-практических конференциях и симпозиумах.

Кроме того, получено положительное решение о выдаче патента РК на полезную модель «Способ получения антибактериального покрытия на поверхности титановых и стальных имплантатов на основе хлоргексидина».

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, трех разделов, заключения, а также списка использованных источников из 180 наименований. Работа изложена на 124 страницах, содержит 52 рисунков и 14 таблиц.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Полимеры, используемые при создании покрытий для имплантируемых средств

По результатам исследований, проведенных центрами по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов FDA и Medtech Europe, в настоящее время на мировом рынке существуют более 500000 типов медицинских устройств [1]. Столь бурный прогресс в биомедицине во многом связан с расширением применения имплантируемых устройств. Например, ежегодно в мире выполняется около 10 миллионов процедур дентальной имплантации [2], а в США ежегодное количество операций по эндопротезированию коленного и тазобедренного суставов превысило 1 миллион [3]. Указанные выше биоматериалы являются потенциальными субстратами для адгезии бактерий, которая представляет собой первый этап инфицирования. После закрепления на субстрате патогены способствуют дальнейшей колонизации и образуют защитные биопленки, что позволяет им сохраняться в агрессивной среде организма хозяина. Процесс адгезии включает в себя сложные этапы, зависящие от типа микроорганизмов. Например, классическая модель формирования биопленки, применимая к бактериям S. aureus [4] и к грамотрицательным бактериям, таким как P. aeruginosa [5], включает несколько последовательных стадий: адгезия, образование микроколоний путем клеточной агрегации, образование макроколоний (представленных в виде башен), а также дальнейшее ремоделирование и созревание (рисунок 1.1).

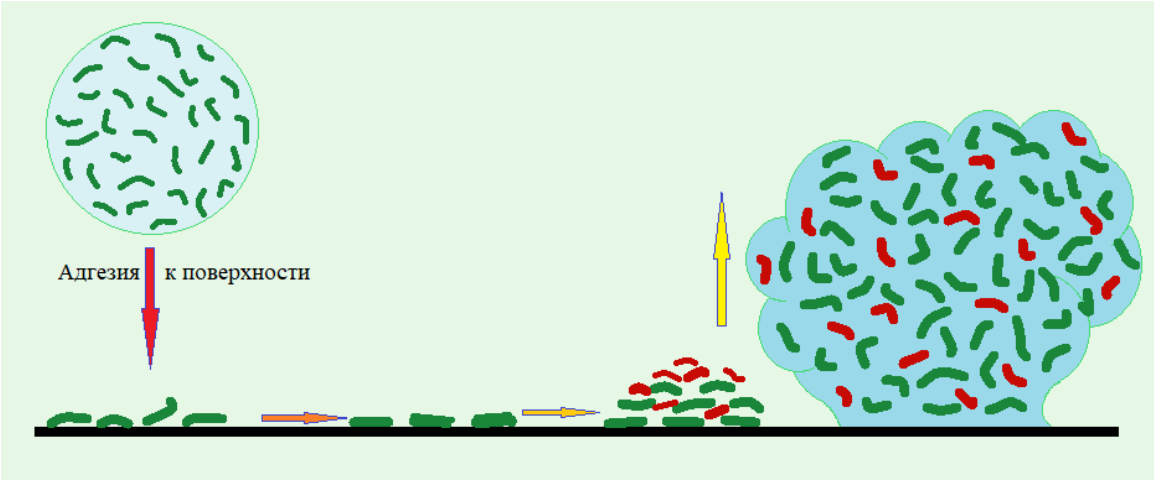


Рисунок 1.1 – Образование биопленки

Сформированные таким образом биопленки играют ключевую роль в патогенезе инфекций имплантатов. Инфекции, связанные с ортопедическими и зубными имплантатами, особенно опасны, поскольку они остаются в организме. При ортопедических протезных инфекциях наиболее часто выделяемыми микроорганизмами являются грамположительные кокки: S. aureus, коагулазонегативные стафилококки (КНС), энтерококки и в меньшей степени Escherichia coli, Proteus mirabilis и Pseudomonas aeruginosa [6]. При этом возникают проблемы с иммунной системой, которая реагирует на небольшие изменения в организме. В

отсутствие инородного тела осложнения, связанные с патогенами, обычно спонтанно предотвращаются иммунной защитой хозяина. Однако при имплантации биоматериал вызывает местную реакцию, которая приводит к иммунной депрессии, что приводит к микробной колонизации имплантата [7].

Как известно, одним из путей решения этой проблемы является переимплантация. Однако переимплантация - это, как правило, трудноуправляемый процесс из-за длительного периода антибактериальной терапии и повторных хирургических вмешательств [8], сопровождающийся возможными неблагоприятными последствиями, такими как психологические травмы, потеря трудоспособности и высокие финансовые затраты [9].

Поэтому, защита имплантатов от воздействия бактерий с целью продления срока службы, является чрезвычайно актуальной задачей современной медицины. Основными составляющими костной ткани являются коллагеновая органическая матрица и нанокристаллы гидроксиапатита неорганической природы, поэтому поверхность имплантатов можно защитить как органическими, так и неорганическими слоистыми композитными материалами.

Композиционные материалы могут включать множество компонентов различной природы с самыми разнообразными физико-химическими характеристиками, поэтому образованные ими гибридные структуры, в отличие от отдельных индивидуальных компонентов, имеют широкий спектр функциональных возможностей и характеристик. В последние годы достигнут значительный прогресс в области создания биокомпозитов, которые в настоящее время находят широкое применение при разработке новых биосовместимых материалов [10, 11]. Полимерные композитные материалы можно синтезировать на основе низко- и высокомолекулярных соединений. Низкомолекулярным антимикробным агентам характерен ряд недостатков: токсичность, кратковременная антимикробная активность, поэтому они редко применяются для стерилизации воды, в качестве лекарственных препаратов и т.д. [12]. Для решения указанных проблем в структуру молекулы полимера вводят антимикробные функциональные группы, способные убивать патогенные микроорганизмы на поверхности имплантатов. Прогресс в области синтеза и применения полимеров, достигнутый за последние десятилетия, объясняется следующими причинами:

– повышением эффективности и селективности существующих противомикробных агентов;

– увеличением срока действия низкомолекулярных антимикробных препаратов;

– минимизацией экологических проблем, связанных с препаратами, путем уменьшения остаточной токсичности агентов;

– переходом к нелетучим, химически стабильным полимерам, которые не проникают в кожу и, следовательно, могут снизить потери, связанные с испарением, фотолитическим разложением при хранении и транспортировке.

Очевидно, что не все полимеры проявляют антимикробное действие, и поэтому полимеры которые используются в биомедицине, должны отвечать следующим требованиям: (а) прекурсоры должны быть доступными, а методы

синтеза – простыми; (б) полимеры должны проявлять стабильность при длительном хранения и использовании при рабочей температуре; (в) они не должны растворяться в дезинфицирующем растворе; (г) полимеры не должны выделять токсичных продуктов; (д) они не должны быть токсичными; (е) при этом они должны обеспечивать биоцидность по отношению к широкому спектру патогенных микроорганизмов сразу после контакта [13].

В общем, биоразлагаемые полимеры подразделяются на две большие группы: синтетические и природные [14]. Несомненным преимуществом природных полимеров является их метаболическая совместимость, нетоксичность и способность разлагаться ферментами. С другой стороны, низкая термостойкость и сложный, заметно изменяющийся от образца к образцу, химический состав природных полимеров порождает ряд проблем, которые можно решить, используя синтетические полимеры. Применение ряда синтетических полимеров связано с хорошо отработанной технологией их получения и чистотой, в результате чего не возникает иммунологических проблем по сравнению с природными белками [15].

Антимикробные полимеры в соответствии с механизмом действия классифицируются как пассивные и активные. Поверхность пассивных полимеров, как и у микробов, заряжена отрицательно, и по своей природе является гидрофобной. Поэтому, пассивные полимеры не убивают бактерий, а лишь отталкивают их от поверхности, которая имеет низкую поверхностную свободную энергию. Механизм действия активных полимеров объясняется наличием положительно заряженных функциональных групп в структуре полимеров [16].

Также предложена классификация полимеров по типу функциональных групп, определяющих их химические свойства, и согласно которой, полимеры подразделяются на катионные и анионные.

Наиболее интересными с точки зрения практической медицины являются поликатионы, которые в свою очередь подразделяются на синтетические и природные (рисунок 1.2) [17].

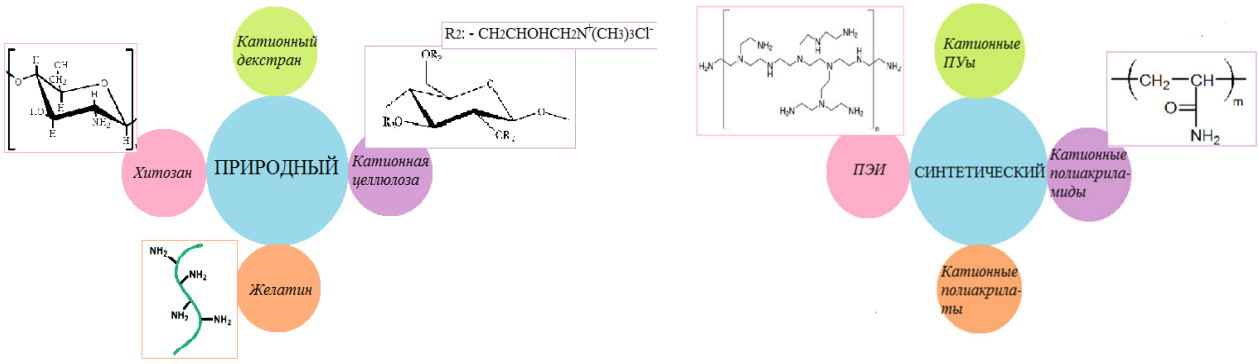


Рисунок 1.2 – Типы катионных полимеров

В целом, свойства поликатионов зависят от их молекулярной массы, степени диацетилирования и распределения ацетильных групп в основной цепи, и

они проявляют антибактериальную активность по отношению ко многим грамположительным и грамотрицательным бактериям благодаря наличию положительно заряженных аминных групп [18].

Одним из самых широко изученных природных катионных полимеров является хитозан, - линейный сополимер, получаемый из хитина и состоящий из фрагментов 2-амино-2-дезокси-D-глюкопиранозы и 2-ацетоамид-2-дезокси-D-гликопиранозы, связанных гликозидными связями (рисунок 1.3). В растворе поведение хитозана зависит от величины pH, особенно в рабочем интервале 2<pH<6,5. Также, очень важным параметром, при работе с хитозаном, является степень его деацетилирования, учитываемая при оценке параметров, влияющих на физико-химическое поведение хитозана в растворе, таких как плотность заряда, растворимость, а также адсорбция на заряженных поверхностях.

Кроме того, с помощью химического модифицирования реакционноспособных функциональных групп (аминогрупп в положении C2 каждого деацетилированного звена и гидроксильных групп в положениях C6 и C3) можно улучшить механические свойства и растворимость. В результате удается расширить области применения, в частности получать тонкие пленки, использовать полимеры в качестве перевязочных средств и каркасных материалов для тканевой инженерии [19].

Авторами в работах [20, 21] были предложены различные варианты модификации хитозана за счет включения четвертичных аммониевых групп, присоединения полимерных цепей или небольших молекул к основной цепи с целью повышения антимикробной эффективности. Такие изменения привели к увеличению растворимости и антибиопленочного действия.

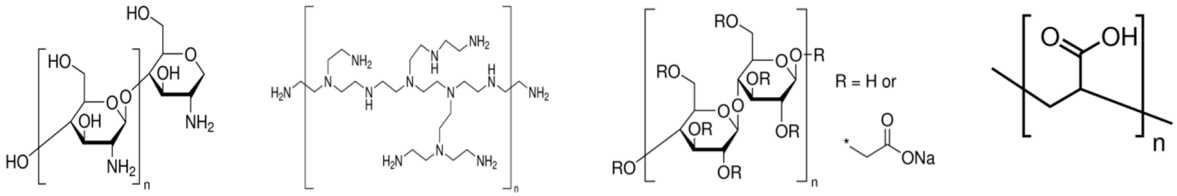
Уникальные химические свойства хитозана позволяют расширить область его применения. Одним из примеров является придание длительной антимикробной активности многослойным пленкам путем ассоцирования хитозана с анионными полисахаридами, такими как гепарин, гиалуроновая кислота [22], альгинат [23], пектин [24, 25], j-каррагинан и т.д.

Одно из применений хитозана было предложено отечественными исследователями. Так, учеными КазНУ им. аль-Фараби были разработаны полимерные пленки на основе хитозана и поли(2-этил-2-оксазолина). Оценка пленок в качестве систем для доставки лекарственных средств в организм показали, что пленки являются биосовместимыми и мукоадгезивными, а также могут обеспечить процесс замедленного высвобождения лекарственного препарата (ЛП) при местном применении на роговице [26].

Одним из наиболее широко распространенных синтетических катионных полимеров является поли(этиленимин) (ПЭИ). Как показано на рисунке 1.3 (б) ПЭИ имеет разветвленную структуру и в связи с высокой плотностью положительного заряда является эффективным противомикробным средством против ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий [27]. С другой стороны, плохая биосовместимость, низкая биоразлагаемость, сильная цитотоксичность и низкая гемосовместимость создают ограничения для применения ПЭИ в биомедицине [28]. Для решения этой проблемы было предложено использовать линейные и кватернизованные производные полиэтиленимина

[29]. Авторами также было проведено исследование по кватернизации низкомолекулярного ПЭИ различными алкильными и ароматическими группами с целью создания адгезивных покрытий на поверхности в комбинации с антибиотиками [30].

Аналогичное заметное улучшение активности в отношении S. Aureus и снижение цитоксичности ПЭИ было достигнуто за счет нуклеофильного связывания первичных аминных групп с альдегидными группами d-маннозы [31].



а) хитозан б) ПЭИ в) Na-КМЦ г) ПАК

Рисунок 1.3 – Химические структуры полимеров

Кроме поликатионных полимеров среди биополимеров существуют и полианионные полимеры, такие как поли(акриловая кислота) (ПАК) и карбоксиметилцеллюлоза натрия (Na-КМЦ), которые также представляют большой интерес при получении антиадгезионных покрытий. Карбоксильные группы, присутствующие в структурах этих полимеров, позволяют использовать эти полианионные соединения в качестве одного из составляющих мультислойных пленок, также дают возможность накопления в пленке ионов серебра с последующим восстановлением [32]. ПАК используется не только для связывания ионов активных металлов, но и для стабилизации НЧAg [33]. Кроме того, высокая гидрофильность КМЦ обеспечивает возможность его применения для получения пищевых пленок [34]. Например, ценным сегментом карбоксиметилцеллюлозы в пищевой промышленности является ее натриевая соль, так как она является нетоксичной, биоразлагаемой, биосовместимой и легко растворимой в воде, что характерно не для всех полимеров [35]. Использование гидрофильности полимеров для создания консервирующего эффекта при добавлении $CaCl_2$ обсуждается в работе [36].

Таким образом, информация об индивидуальных характеристиках полимеров дает возможность их применения в биомедицине в каждом конкретном случае.

1.2 Различные методы и технологии мультислойной сборки

На начальном этапе при создании наноструктурированных пленок доминировала методика Ленгмюра - Блоджетт (ЛБ). Этот метод дает возможность сформировать монослои на поверхности воды с последующим переносом на твердую подложку. Техника ЛБ требует специального оборудования, ограничивается размерами и формой подложки, что привело к падению интереса к дан-

ному методу [37]. В 60-70-х годах прошлого века В.Б. Алесковским и сотрудниками его школы был разработан метод «химической сборки» или молекулярного наслаивания, с помощью которого были получены пленки неорганических веществ, в основном оксидов. В начале 80-х годов прошлого века была разработана методика самосборки органических пленок, основанная главным образом на ковалентном или координационном связывании. К сожалению, методика ограничивалась определенными классами органических соединений, что ограничивало возможности ее дальнейшего широкого применения [38]. Кроме того, для биомедицинских применений создание антибактериальных покрытий с использованием мономолекулярного слоя, состоящего из нерастворимого органического материала, было всегда целесообразно. Другим недостатком метода являлось низкое качество пленок и ограничения для использования более широкого спектра веществ.

Интенсивные исследования в этом направлении привели к разработке новой технологии получения высококачественных пленок охватывающий весь спектр растворов как неорганических, так и органических полиэлектролитов, и даже было возможным использование коллоидных растворов. В 1991 г. Декер впервые предложил так называемый метод «layer by layer» (LbL) для функционализации поверхности твердых тел. [39]. Этот метод основан на последовательном нанесении различных молекулярных слоев на плоские твердые подложки с целью формирования полислоев. Это связано с тем, что пленки, образованные одним типом молекул, являются недостаточно стабильными при воздействии на них тепла, окислителей, электромагнитного излучения или химических факторов. Нанесенный на поверхность первого слоя второй слой из другого материала, хорошо связывается с первым слоем специфическими взаимодействиями с образованием более прочного двухслойного покрытия. В ходе сборки эта процедура повторяется циклически несколько раз, в зависимости от заданной толщины пленки. Несомненное преимущество метода заключаются в том, что: (а) пленки можно наносить практически на любой тип подложек, независимо от формы и состава; (б) могут варьироваться различные физико-химические и механические свойства покрытий; (с) в пленку могут быть обратимо внедрены активные соединения. Универсальность и простота метода дает возможность получить подложки, с активированной поверхностью и нужным типом поверхностного заряда, находящие применение в различных областях науки и техники, таких как оптика, катализ, средства доставки лекарственных препаратов в организме, изготовление биомедицинских материалов, пищевые системы хранения с использованием веществ, нанесение различных пленок (таблица 1.1).

В настоящее время методы LbL сборки были адаптированы для нанесения покрытий на пористые мембраны, частицы и биологические вещества, для этого были разработаны новые методики: методы погружения (dip coating), удаления влаги (liophylic drying), прокатки лент (roll-to-roll), центрифугирования (centrifugation), расчетное насыщение, иммобилизация, вращения (spin coating), распыление (spray coating), электроосаждение (electro-

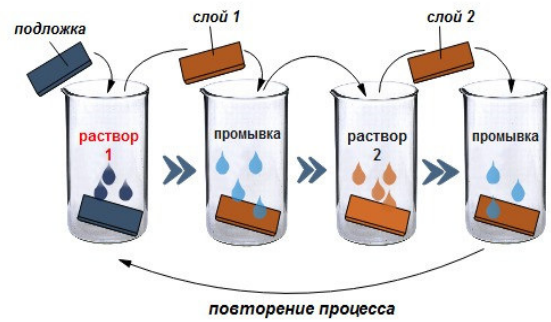
deposition), магнитная сборка (electromagnetic assembling), электросцепление и др. [40].

Таблица 1.1 – Примеры пленочных полимерных покрытий на различных материалах для конкретных применений

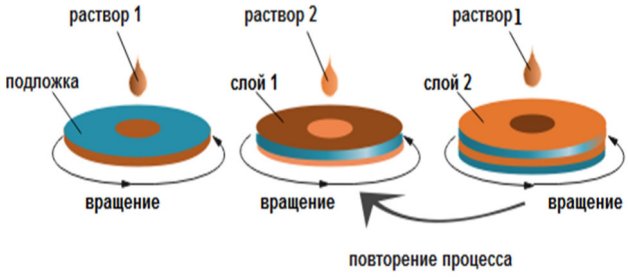
Покрываемая поверхность	Антимикробный агент	Применение
Полимеры		
поли (этилентерафталат)	метиленовый синий (антисептик)	текстиль
Полиуретан	поликатионный хитозан	катетеры
Металлы и сплавы		
Титан	НЧAg	зубные имплантаты
биомиметический имплантат	гентамицин (антибиотик)	ортопедические имплантаты
магниевые сплавные имплантаты	гентамицин	ортопедические имплантаты
нержавеющая сталь	ванкомоцин (антибиотик)	ортопедические имплантаты
Медицинские приспособления		
силиконовые катетеры	целлобиоздегидрогеназа (фермент)	введение жидкости или газа
полиэтиленовые катетерные трубки	антимикробные пептиды (β-пептиды)	введение жидкости или газа

Углубленные исследования в этой области позволили авторам систематизировать известные модификаций LbL сборки, и с учетом сходства некоторых методов, разделить различные модификаций метода полислойной сборки на четыре основные группы (рисунок 1.4).

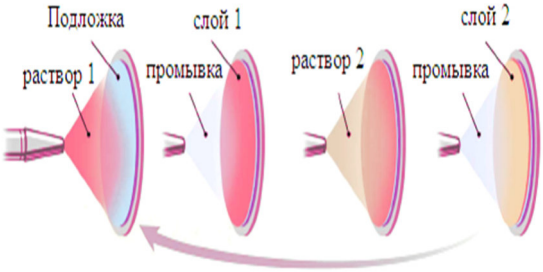
При получении пленок, в зависимости от заданной цели, выбирается наиболее подходящий метод. Далее, варьируя параметры процесса (время, масштабируемость и возможности оперативного управления), контролируются физико-химические свойства получаемых пленок (толщина, однородность и т.д.). Рассмотрим особенности основных методик.



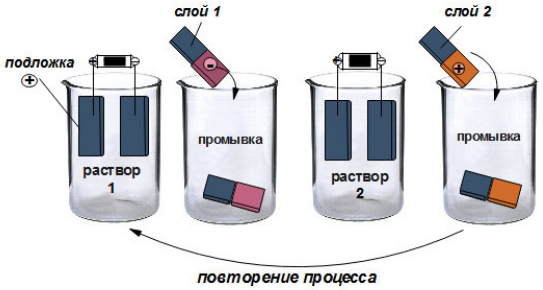
1) Погружение (immersive)



2) Вращение (spin)



3) Распыление (spray)



4) Электромагнитная сборка (electro-magnetic)

Рисунок 1.4 – Виды LbL сборки

1.2.1 Метод погружения (dip coating)

Самый распространенный вид самосборки, который используется в качестве стандарта для сравнения, является метод погружения. К данному методу LbL сборки относятся такие модификации, как удаление влаги, прокатка лент (roll to roll), центрифугирование, расчетная насыщенность и иммобилизация. Суть данного метода заключается в помещении подложки в раствор с дальнейшим промыванием для удаления частиц, не закрепившихся на подложке. Для осаждения веществ могут быть использованы подложки любого типа, (металл, неметалл, имплантируемые сплавные изделия, коллоидные частицы), как правило, имеющие поверхностный заряд [41].

Недостатком этого метода является медленный и неконтролируемый диффузионный поток раствора, омывающего подложку. Для исключения этого процесса и смещения кинетики в более быстрый режим авторами была использована методика осушения [42]. Данная методика основана на замене этапа промывки сушкой, что в свою очередь сокращает общее время процесса в 30 раз, при этом качество слоя зависит от природы органического растворителя и частоты испарения. Для ускорения процесса также были разработаны роботизированные системы, позволившие снизить скорость адсорбции каждого слоя [43]. Так как метод основан на простом погружении подложки, то оптимальное время осаждения составляет в среднем 10-15 мин в случае, если состав пленок состоит из полимеров, однако значение времени погружения может уменьшиться в среднем до 1 минуты, если покрытие образовано коллоидными частицами, являющиеся компонентами плоской сборки.

В модифицированном методе прокатки лент (roll-to-roll) покрытие в виде краски наносится на гибкие подложки. Процесс нанесения можно ускорить в 5-10 раз путем использования машины, которая способна нанести покрытия на большие поверхности. Например, время нанесения однослойного покрытия на ткань для придания ей огнестойкости составило лишь 78 с при скорости движения ленты через раствор 2 мм/с [44]. Такая модификации метода погружения используется при получении материалов противопожарного назначения и для медицинской одежды, используемой в лабораториях при работе с особо опасными видами бактерий. Несмотря на масштабируемость процесса данный способ нанесения покрытий не пригоден для твердых подложек. Тем не менее, благодаря простоте технологии, метод нашел широкое применение в различных направлениях для получения огнестойких покрытий, стекол с многослойными частицами, обладающих антиотражающими и противотуманными эффектами [45, 46]. Также, все разновидности данного метода являются легко масштабируемыми процессами.

1.2.2 Метод вращения (spin coating)

Один из видов LbL сборки, в ходе, которого растворы полиэлектролитов по каплям подаются на вращающуюся подложку, называют методом вращения (spin coating). С помощью данного метода можно получить пленки на подложках диаметром до 10 см, в зависимости от габаритов аппарата, и по сравнению с методом погружения, получить ровные слои, из-за равномерного вращения подложки с определенной скоростью. Однако, подход предназначен только для нанесения пленок на плоские поверхности, и не применим к реальным имплантатам и катетерам, имеющим нестандартные формы.

Сравнительный анализ автоматизированных методов погружения и вращения показал, что с помощью первого метода получают непрозрачные и неоднородные пленки вследствие наложения слоев друг на друга, в то время как второй метод дает возможность получить равномерно нанесенные прозрачные пленки. Также авторами предложены различные комбинации методов и оценены структура, состав, морфология и функциональные характеристики тонких пленок, получаемых методами вращения, в том числе при подаче распыленного раствора [47]. Было исследовано качество пленок в зависимости от таких параметров, как концентрация раствора (0,013 г/мл и 0,0065 г/мл) для обоих методов, скорости вращения (900-8000 rpm.), продолжительности вращения (20 и 60 с) и температура подложки (25 и 125 °С), на которую подается раствор. Увеличение концентрации раствора приводит к более быстрому осаждению для обоих методов, однако при низких концентрациях раствора было обнаружено наличие неоднородностей. Влияние концентрации сильно отражается на пленках, полученных с помощью распыления, в которых образуются большие дефекты в виде волнистых неровностей. Также было исследовано влияние цикличности процесса, при одинаковых условиях. Такие пленки, нанесенные с использованием распыления, имеют более шероховатую поверхность по сравнению с поверхностями, полученными стандартным методом вращения.

Одной из модификаций LbL сборки методом вращения является сборка в высоком гравитационном поле, основанная на том, что при вращении центробежная сила прижимает материал слоя непосредственно к подложке. [48]. Сочетания полимеров, показавшие экспоненциальный рост при сборке методом погружения, ведет себя иначе при использовании гравитационного метода, тем самым проявляя линейную зависимость, также наблюдалось отличительное изменение шероховатости (~ 2-10 раз меньше) [49].

Главное преимущество метода вращения заключается в сокращении времени затрачиваемого на сборку, так как один слой наносится приблизительно за 30 с, при этом образуются однородные прозрачные пленки. Но несмотря на это, недостатком данной методики является то, что требуется применение дорогостоящей аппаратуры и диаметр подложки не может превышать ~10 см [50].

1.2.3 Метод распыления

Сборка методом распыления основана на распылении раствора и дает возможность покрывать поверхность трехмерных образцов, например, пористых мембран, что невозможно осуществить с помощью метода вращения [51]. Среднее время распыления раствора одного полимера занимает всего лишь 6 с. Физико-химические свойства и качество пленок зависят от концентрации суспензии, скорости, от расстояния между подложкой и распылителем, а также пространственного расположения распылителя (вертикального или горизонтального) [52-54]. В ходе сборки после промывки, образуются толстые пленки, обусловленные перестановкой полимера, в то время как при других типах LbL сборки на этапе промывки удаляются незакрепленные частицы.

Для улучшения метода предложено комбинировать две разновидности метода LbL сборки: методы распыления и вращения. Процесс осуществляется распылением раствора на вращающуюся подложку [55]. Еще одна комбинация была предложена авторами, где тонкие пленки получены методом распыления с пиролизом: этим методом наносили покрытия с различным соотношением ZnO:Al на оптические стеклянные подложки. По этой методике вращается не сама подложка, а распылительная головка со скоростью 20 мм×с$^{-1}$ по направлению к плоскости X–Y, сканируя площадь поверхности размерами 200×200 мм [56]. Применение данного метода также описывается в работе [57], где на стеклянную подложку наносились покрытия из частиц TiO_2, объясняется роль нагрева подложек, что приводит к росту размера частиц. Использование такого подхода для полиэлектролитов не является желательным, так как растворы вместо закрепления на поверхности нагретой подложки будут улетучиваться, и не смогут функционализировать поверхность.

Для улучшения качества и контроля роста пленок был использован метод автоматизированного распыления на поверхность кварцевых микровесов. Масштабирование процесса осуществляли затем с использованием метода прокатки лент (roll to roll), позволяющему перейти к материалам промышленных подложек.

Для данной модификации LbL сборки характерны затруднения при распылении из растворов наночастиц (НЧ) из-за их малой массы и инерции. Эту проблему можно решить путем комбинации с методом погружение. С использованием данного подхода трехслойное покрытие состава NiCrAlY/нанопорошок диоксида циркония, стабилизированного иттрием (нано-YSZ)/поликапролактон было нанесено на имплантаты, изготовленные из сплава Mg-Ca [58].

Таким образом, анализируя вышесказанное, можно сделать вывод о том, что в случае, если подложка характеризуется низкой адгезией, то жидкий раствор, вместо удержания, будет стекать с поверхности, с последующим образованием размытых слоев. Также в большинстве случаев требуется использовать нагретые подложки (до 125 °C), так как вязкость капель раствора увеличивается при контакте с нагретой подложкой. Однако, при этом можно использовать растворы с концентрацией в 10-50 раз меньше по сравнению с методом погружения, что дает возможность создать супергидрофобные покрытия [59].

1.2.4 Метод электромагнитной сборки

Процесс электромагнитной LbL сборки осуществляется следующим образом: в раствор погружаются две подложки, используемые в качестве электродов, а затем через систему пропускается электрический ток. Заряженные частицы одного сорта закрепляются на поверхности электродов, и после промывки электродов система готова для дальнейшего осаждения второго противоположно заряженного слоя [60]. Комбинация данного подхода с электромагнитной иммобилизацией дает возможность нанести покрытия на твердую подложку, помещенную между электродами, в результате движения заряженных частиц в растворе [61-62]. Толщина покрытия зависит от значения напряжения тока и времени электроосаждения, например, в течение 1 секунды образуются слой толщиной 1,5 нм [63]. Однако увеличение напряжения, до 30 В приводит к увеличению времени сборки, для иммобилизованных частиц, до 15 минут на 1 слой, а также наблюдается отторжение последующего слоя и разрушение пленки. Было выяснено, что для получения толстых покрытий следует выбрать оптимальное напряжение и учитывать значение pH раствора, являющегося одним из ключевых факторов [64]. Например, при малом напряжении образование толстого слоя идет при значении pH ниже чем pK_a, в то время как при высоких напряжения, образование слоя идет при pH, близком или превышающем значения pKa. Из этого следует, что по сравнению с другими видами LbL сборки в данном случае стоит обратить внимание не только на напряжение, но и на конформацию самого полимера, зависящую от pH раствора. При формировании полимерных пленок показатель преломления не изменяется существенно, что свидетельствует о гомогенном характере осаждения; аналогичное поведение демонстрируют и пленки, состоящие из полимеров и коллоидных частиц [65].

Локальные эффекты на электродах, вызванные изменением pH раствора вблизи анода и катода, были использованы для электроосаждения таких полимеров как хитозан и альгинат. Толщина пленок невелика и достигает десятков

микрометров после нанесения нескольких бислоев, что ограничивает использование данного подхода [66]. Таким образом, данный тип модификации LbL сборки дает возможность сформировать пленки на поверхности с целью создания супергидрофобных, антикоррозионных [67] и даже антибактериальных покрытий с помощью одностадийного электроосаждения. При этом следует учесть, что не все твердые подложки стабильны и инертны в электролизере. Сравнительные характеристики методов LbL сборки приведены в таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Сравнительные характеристики различных методов LbL сборки слоев

Описание	Время формирования одного слоя	Толщина одного слоя (нм)	Параметры влияющие на качество пленок	Преимущества	Недостатки
1	2	3	4	5	6
Методы погружения					
простое погружение с осушкой прокатка лент (roll to roll)	10 с – 20 мин 30-60 с 2-5 мин	<1-15 1-2 1-15	Концентрация полимеров и pH раствора	Масштабность процесса, можно использовать подложки имеющие различные формы Не требует специальные оборудования	Образование неровных и рыхлых слоев
Методы вращения					
простой метод Вращение в гравитационном поле	10-60 с 20-5 мин	<1-2	Концентрация полимеров и коллоидных частиц, скорость вращения	Позволяет получить прозрачные тонкие и ровные слои	Предназначентолько для плоских поверхностей диаметром до 10 см

Продолжение таблицы 1.2

1	2	3	4	5	6
Методы распыления					
сборка с распыле-нием с иммобилиз ацией	<1-30 с 5-10 с	<1-5 2-4	Концентра-ция суспензий, скорость и расположени е распылителя: вертикальное или горизонтальн ое	Не требует много времени для сборки	Не применим для подложек, имеющих низкую адгезию, а также для распыления растворов, содержащих НЧ
Электромагнитные методы					
электрооса ждение с электро-иммобили зацией магнитные	1 с - 20 мин 15-20 мин 15-20 мин	2-20 2-3 1-2	Напряжение электрическо го тока, pH раствора, время элек-троосажде-ния	Может использоваться для формирования пленок LbL из матриалов, которые трудно наносить с использование м других технологий	Образуются толстые и плотные слои; требуется специально е оборудован ие

Анализ всех модификаций метода LbL позволяет сделать вывод о том, что именно метод погружения является одним из простых и наиболее недорогих для использования, особенно в научных исследованиях. Однако, это не исключает возможности широкого применения и не принижает значимости остальных видов модификаций, особенно для получения ровных тонких пленок с определенными свойствами.

1.3 Предотвращение адгезии микроорганизмов

За последнее десятилетие было сделано достаточно много исследований в области химии и биомедицины, направленных на снижение частоты инфицирования, связанных с имплантацией, которые влекут за собой сложные последствия. Как показывает статистика только в США [68] общая смертность от инфекций на имплантах составила уже более одного миллиона человек. Как уже было сказано выше, это в первую очередь связано с появлением биопленки, образуемой из многослойных микроколоний бактерий. Проблема в том, что бактерии в биопленке проявляют гораздо высокую устойчивость к

антибиотикам, чем в планктонном состоянии, уничтожить и удалить их с поверхности очень сложно [69], поэтому поверхность необходимо защищать антибактериальными покрытиями. Таким образом, разработка различных покрытий и пленок стала важной областью научных и технологических исследований. Для получения таких покрытий был предложен ряд стратегий представленных на рисунке 1.5.

Поскольку первым этапом бактериального инфицирования имплантатов является адгезия микроорганизмов на субстрате, то стоит вопрос о разработке субстратов и придание им антибактериальных свойств с помощью сборки ПЭМС. При создании антиадгезионных покрытий надо учитывать физические и химические характеристики поверхности, свойства бактериальных клеток и т.д.

Основная суть этого подхода заключается в появлении электростатического отталкивания между отрицательно заряженной поверхностью покрытия и клеточной стенкой бактерии. Устойчивые к адгезии ПЭМС могут быть получены двумя различными способами: путем ингибирования при близком контакте бактерий с гидрофильной поверхностью пленок [70] или путем использования пленок с определенной жесткостью, чтобы бактерий не прилипали при контакте [71].

1.3.1 Ингибирование роста бактерий путем получения высокогидратированных пленок

Суть данного метода заключается в том, что гидрофильные полимеры могут препятствовать близкому приближению бактерий к поверхности из-за сильного сродства полимеров к молекулам воды (рисунок 1.6 (а)).

Самым простым способом решения этой проблемы является использование полиэлектролитов, известных своей высокой гидрофильностью. Один из известных кандидатов – гепарин (Геп) является сильной поликислотой, значение pK_a которой коррелируется в интервале от 0,5 до 1,5, а также гиалуроновой кислотой (ГК), слабой поликислотой (pK_a=2,9). В работе [72] поверхность полиуретана (ПУ), часто используемого полимера при производстве медицинских изделий, была покрыта хитозаном (ХЗ) и иммобилизованным гепарином (Геп). Синтезированный ПУ не показал отрицательного влияния на пролиферацию клеток фибробластов L929, а его биосовместимость была доказана тестом на цитотоксичность. ПУ с привитым на поверхность хитозаном (ПУ-ХЗ) показал худшие антиадгезионные свойства по сравнению с гепарин-иммобилизованным ПУ (ПУ-ХЗ-Геп). Наблюдалась полная гибель штаммов Staphylococcus aureus (грамположительный) и Staphylococcus epidermidis (грамположительный). Однако тест на штаммы Pseudomonas aeruginosa (грамотрицательные) показал неполное удаление живой кишечной палочки после 24 ч инкубации.

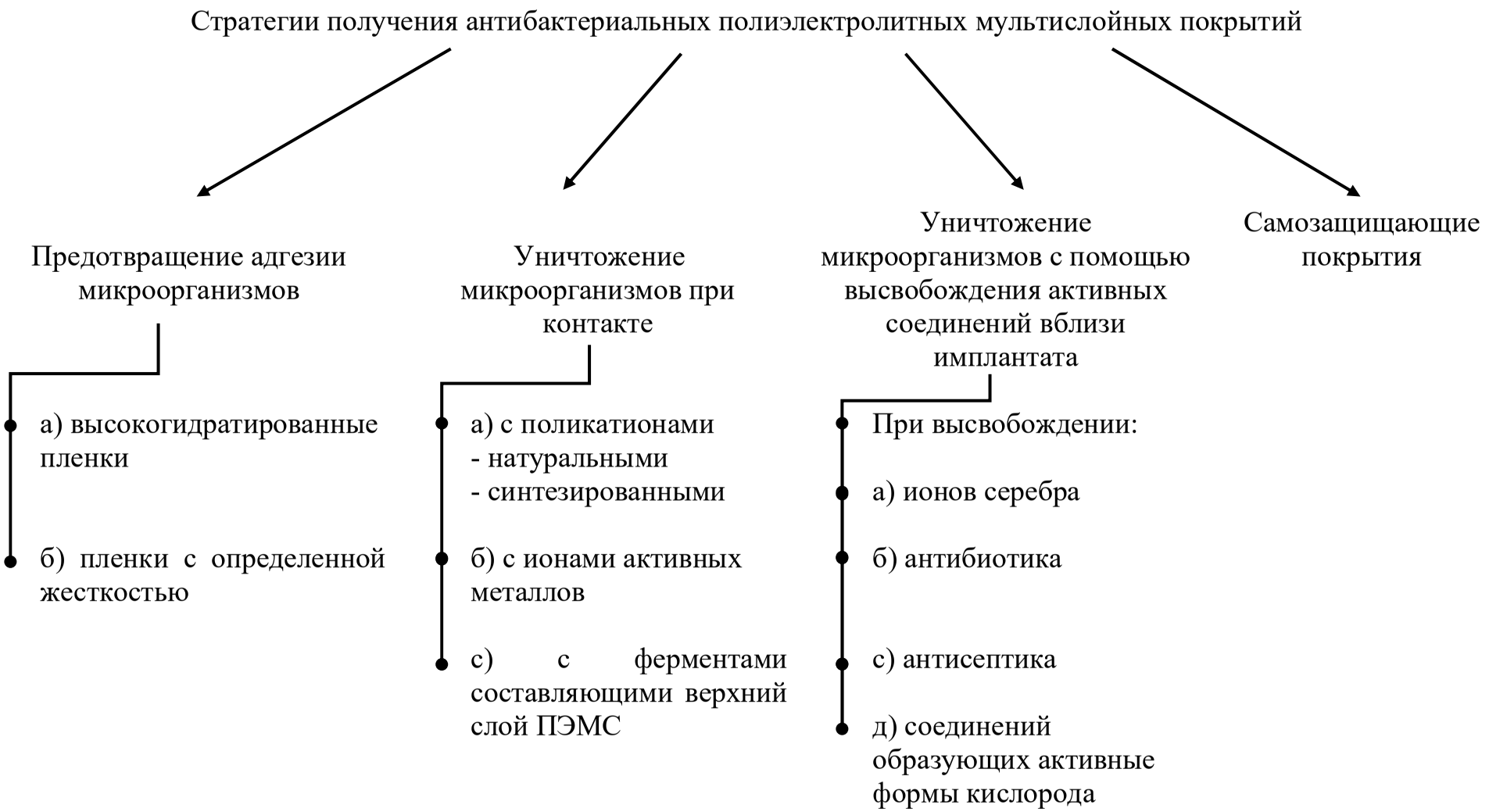
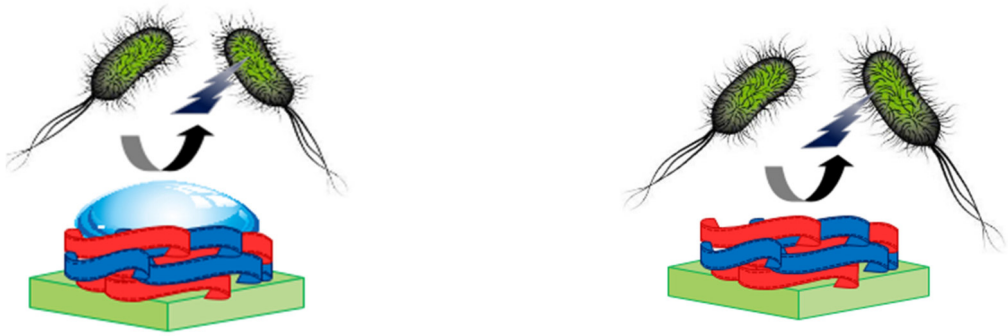


Рисунок 1.5 – Стратегии получения антибактериальных полиэлектролитных мультислойных покрытий



а) б)

а) высокогидратированные пленки; б) пленки с определенной жесткостью.

Рисунок 1.6 – Схема двух стратегий, использованных для создания ПЭМС, устойчивых к адгезии

Для придания антиадгезионных свойств титановым имплантатам их поверхность была модифицирована с помощью ульвы (морская зелёная водоросль семейства ульвовых). Чтобы выяснить влияние происхождения водорослей были выбраны два вида ульвы: один экстрагирован из *Ulva rotundata*, а другой - из *Ulva compressa*. Сначала поверхность титана была покрыта монослоем молекул амино-ундецилтриметоксисилана (АУТМС), которые был иммобилизован за счет ковалентного связывания карбоксильных групп ульвы и аминогруппами АУТМС. Анализ бактериальной адгезии показал, что иммобилизация ульвы снижает прилипание бактерий *Pseudomonas aeruginosa* на 90 %. С помощью метода АСМ было показано, что адгезионный слой ингибировал размножение бактерий на поверхности и эффективность защиты не уменьшалась в течение 24 ч [73]. Как известно, ульва – это сульфатированный полисахарид, состоящий из повторяющихся дисахаридных звеньев и содержащий глюкуроновую или идуроновую кислоты [74]. Авторами работы [75] была сделана попытка найти взаимосвязь между молекулярными параметрами ульвы и их антиадгезионными свойствами. Как и следовало ожидать, гидрофильность, шероховатость поверхности и отрицательный заряд не являются решающими параметрами, а ключевую роль играют молекулярная масса полисахарида и экспериментальные условия иммобилизации. Отличительная особенность заключается в том, что авторы использовали натуральный полисахарид, в то время когда в аналогичных работах были предприняты усилия по синтезу сильно гидрофильного и дорогостоящего полиэлектролита.

Чтобы удовлетворить спрос на создание покрытий, стойких к обрастанию бактериями и обладающих защитными свойствами, был синтезирован карбоксиметилхитозан (КМХЗ), который может легко связаться с декстраном (Декс). Посредством иминной связи был сконструирован ПЭМС. С увеличением количества собранных бислоев стойкость к обрастанию против бычьего сывороточного альбумина, адгезии бактерий (*S. aureus* и *E. coli*) и прикреплению водорослей (*Amphora coffeaeformis*) неуклонно улучшалось. Способность к противо-

обрастанию и противомикробной адгезии были обусловлены самошлифованием многослойных покрытий путем расщепления pH-чувствительной иминной связи в кислых средах. Таким образом, хитозан и декстран, являющиеся природными полимерами и входящие состав самополирующихся покрытий, представляют собой экологически безопасную и устойчивую альтернативу для борьбы с биологическим обрастанием в водной среде [76].

1.3.2 Ингибирование роста бактерий путем использования пленок с определенной жесткостью

Второй подход для создания покрытий, имеющих противоадгезионные свойства, является получение пленок с определенной жесткостью (риуснок 1.5 (б)). В этом направлении можно привести работы авторов [71, с. 1575], получивших фото-сшиваемые ПЭМС из поли(L-лизина) (ПЛЛ) и производного гиалуронана, модифицированного фотореактивными винилбензильными группами. Механические свойства варьировались с помощью настройки освещения ультрафиолетового (УФ) света. Для определения влияния жесткости пленки на предотвращение прилипания были протестированы две модельные бактерий: *Escherichia coli* и *Lactococcus lactis*. Результаты подтвердили более быстрое развитие колоний кишечной палочки в мягких областях, чем в твердой области. Как показали результаты АСМ, наблюдаются незначительные изменения значений среднеквадратичной шероховатости от 6,3 ± 1,3 нм до 4,7 ± 2,3 нм для несшитых и фотосшитых пленок, соответственно.

Известно, что получение ПЭМС является довольно длительным процессом. Для решения этой проблемы авторами [77] было предложено одноэтапное покрытие поверхности нержавеющей стали 316L (НС316L) методом электрического травления. Ингибирование бактериальной адгезии модифицированного НС316L объясняется образованием нанопор и нанопротрузий размером 20-25 нм, при этом сохраняется цитосовместимость с клетками млекопитающих in vitro. Также для улучшения коррозионной стойкости, поверхность была обогащена ионами Cr и Mo, которые тем самым создавали пассивную пленку. Ингибирование бактериальной адгезии без использования антибиотиков и масштабируемость делает этот метод привлекательным, однако для проведения процесса требуется электрическая система.

Ранее авторами также был использован вышеуказанный метод для модификации полидиметилсилоксана (ПДМС) с помощью электрохимического осаждения нанотрубчатого титана [78]. Результаты по определению угла смачивания и АСМ показали, что образование наноразмерной шероховатости и повышение гидрофильности могут способствовать увеличению адсорбции белка, которые могут влиять на клеточную и бактериальную активность. Антиадгезионные свойства объясняются тем, что присутствие определенного количества адсорбированного казеинового белка приводит к уменьшению взаимодействия на границе раздела бактерий с наношероховатой поверхностью. Значения среднеквадратичной шероховатости чистого и модифицированного ПДМС составляют 1,417 и 13,767, соответственно. Также наблюдается уменьшение значения угла смачивания от 99,2 °С до 66,6 °С, что свидетельствует о

превращении гидрофобной поверхности в гидрофильную в результате обработки ПДМС анодированным титаном.

Таким образом, основным преимуществом подхода, заключающегося в предотвращении адгезии биопленки, является то, что пленка не дает возможности размножения бактерий на раннем этапе, тем самым создавая благоприятные условия организму для адаптации инородного тела имплантата. Однако такие пленки обычно не живут долго и из-за нестабильности легко разрушаются и отделяются от подложки.

1.4 Контактные убивающие ПЭМС

Окруженные стенками, которые в основном состоят из кислых полисахаридов, большинство мембран бактериальных клеток заряжены отрицательно. Поэтому, большинство антимикробных пленок имеет избыток положительного заряда. Катионные полимеры на поверхности покрытий подавляют рост бактерий, разрушая их мембраны, что приводит к их смерти. Благодаря простоте данного подхода, рядом авторов было разработано множество пленок на основе полиэлектролитов с концевыми поликатионами [79-85]. Преимущество таких конструкций заключается в том, что они дают возможность контролировать поверхностный заряд, тем самым позволяя включить практически молекулы или частицы практически любого вида в многослойную структуру.

Самый простой способ создания мультислоев с положительно заряженной поверхностью – завершить сборку пленки поликатионным слоем. Различие таких покрытий от простых катионных заключается в том, что поверхность менее чувствительна к небольшим изменениям состава, и может иметь контролируемое количество зарядов. При контакте микроорганизмов с катионными полимерами происходят следующие последовательные процессы: а) адсорбция и проникновение агента в клеточную стенку; (б) реакции с клеточной мембраной (липидом или белком); (с) утечка внутриклеточного низкомолекулярного материала; (д) деградация белков и нуклеиновых кислот; (е) разрушение клеточной стенки [86]. Исходя из этого в последние годы был предложен ряд стратегий, где применяются как природные, так и синтезированные полимеры, имеющие в растворах большой положительный заряд [87].

1.4.1 Природные контактные убивающие поликатионные полимеры

Как известно, одним из самых распространенных природных поликатионных полисахаридов является хитозан. Хитозан в паре с другими природными полимерами, такими как каррагинан, гиалуроновая кислота [84, с. 3306] и альгинат натрия [80, с. 48], оказывает высокую антибактериальную активность, которая проявляется при ингибировании роста бактерий и грибков после достижения достаточного количества слоев. В частности, сообщалось, что ПЭМС, с последним слоем из ХЗ, обладает бактерицидной активностью, что объясняется большим количеством аминогрупп, доступных на поверхности, по сравнению с пленками, в которых последний слой является полианионным. Антибактериальная активность пленок на основе ХЗ/альгинат или ХЗ/пектин, нанесенных на нановолокнистые материалы, была улучшена во время сборки путем связыва-

ния слоистого силиката и органического ректорита с одним из полиэлектролитов. Органический ректорит, как и глина, несмотря на свою большой удельную поверхность, может иммобилизовать бактерии благодаря своим высокими поверхностной активности и адсорбционной емкости. Уникальные свойства нанокомпозита хитозана с ректоритом обусловлены синергетическим эффектом между адсорбцией и иммобилизацией бактерий на поверхности глины и более сильным взаимодействием между аминогруппами и бактериями из-за накопления хитозана на поверхности глины [85, с. 1883].

Как уже известно, хитозан является слабым полиэлектролитом, и поэтому pH раствора является важным критерием его поведения в растворе. В работе [88] авторами было показано влияние значения pH среды на физико-химические и антибактериальные свойства слоев ГК/ХЗ. Как и следовало ожидать, наилучший антибактериальный эффект проявляется при pH=3 из-за высокой концентрации свободных аммониевых групп NH_3^+. Так как, ионизация при pH=4,5 составляла около 100 % для обоих молекул, то значения шероховатости, толщины и угла смачивания заметно отличались от соответствующих значений для пленки собранной при pH=3. Авторы работы [89] исследовали влияние pH на морфологические изменения поверхности и рост пленок. Результаты, полученные с помощью метода кварцевого микробаланса (QCM), показали, что при всех значениях pH рост пленок являлся нелинейным. Также была изучена морфология пленок, собранных при pH=4, и показано, что первые девять бислоев имеют неоднородную структуру, состоящую из островков, которые сливаются при дальнейшем росте толщины пленки. Аналогичные исследования были проведены авторами [90] где было исследовано влияние изменения pH на характеристики биоматериала и на реакцию организма на инородное тело, так как это влияние обусловлено изменениями интерфейса с биологической средой.

Хитозан является природным полимером, для улучшения его свойств авторами работы [84, с. 3307] были синтезированы производные хитозана (Q-ХЗ). Эти полиэлектролиты использовались в качестве ПЭМС капсул. Было показано, что степень замещения Q-ХЗ является ключевым параметром в ингибировании роста бактерий. Более высокая степень замещения привела к самой низкой выживаемости бактерий *E.coli*. Капсулы с концевым полимером Q-ХЗ оказались более эффективными в уничтожении бактерий, чем капсулы, имеющие концевые группы гиалуроновой кислоты. Это объясняется тем, что бактерии, вероятно, застревали в микрокапсулах из-за электростатических взаимодействий между положительно заряженными капсулами и отрицательно заряженными бактериями. В пленки могут быть включены и другие полимерные четвертичные соли аммония [79, с. 2775; 91].

Возможности использования производных хитозана были продемонстрированы в работе [92], в которой представлены данные по нанесению на титановые сплавы пленок методом вакуумного плазменного напыления. Поочередное осаждение макромолекулы с электростатическим взаимодействием в течение 30 мин на один слой позволило получить многослойные модифицированные титановые покрытия состава коллаген I (Co

I)/ГК/ хлорид гидроксипропилтриметиламмония хитозана, ковалентно иммобилизированный под действием 1-этил-3,3-диметиламинопропилкарбодиимида/N-гидроксисукцинимида.

Несмотря на особенности подхода, решающего проблемы, вызванные бактериями без использования антибактериального препарата (АП), покрытия такого типа не могут существовать долго, поэтому для устранения этого пробела авторами было предложена сборка ПЭМС, включающая дополнительные стадии. Для дальнейшего улучшения свойств антибактериальных покрытий, в частности, в течение первого 24-часового периода, была разработана пленка состоящая из двух частей: первая - устойчивая к адгезии, термически сшитая пленка поли(винилпирролидон) (ПВП)/ПАК, вторая - контактно-убивающая пленка на основе ХЗ/Геп [93]. Непрерывное удаление верхней пленки ПВП/ПАК при pH = 7,4 и температуре 37 °C привело к ингибированию адгезии *S.Aureus*. После разрушения внешнего слоя оставшийся на поверхности следующий слой ХЗ/Геп подвергался воздействию внешней среды и проявлял контактно-убивающие свойства. Таким образом, различные исследования покрытий из хитозана дали возможность выявить ключевые моменты связанные с плохой растворимостью хитозана [94].

Несмотря на широкое использование природных полимеров, антибактериальная активность ряда синтетических поликатионов превосходит природные аналоги.

1.4.2 Синтетические контактные убивающие поликатионные полимеры

Среди синтетических полимеров широкое применение нашел полиакриламид (ПАА). В паре с другими полианионами существует почти точная компенсация между положительными и отрицательными зарядами полиэлектролитов и ионов, составляющих пленку. При использовании слабых полиэлектролитов соотношение положительного заряда к отрицательному в пленке можно контролировать изменением pH раствора. В соответствии с этим, при сборке и после сборки пленок ПЭМС, таких как ПАА/Полистиролсульфонат натрия (ПСС) и ПАА/ПАК, подбирались такие значения pH, чтобы поверхность обладала высоким катионным зарядом для обеспечения высокой антимикробной активности по отношению к S.*epidermidis* и *E.coli*. При высоких значениях pH, близких или превышающих значение pK_a, в пленках ПЭМС присутствуют цепи ПАА, содержащие большое количество незаряженных аминогрупп, которые не обладают контактными бактерицидными свойствами. При снижении pH незаряженные аминогруппы протонируются, создают достаточно высокий положительный заряд и вызывают гибель клеток [82, с. 7693]. Авторы указывают на важную роль значений pH в процессе сборки. Установлено, что бактерицидная активность пленок N, N-додецил-метил-поли(этиленимин)/ПАК по отношению к грамположительным, грамотрицательным бактериям, а также к вирусам гриппа A/WSN (H1N1) возрастает по мере снижения pH раствора ПАК. Изменяя длину алкильных цепей в структуре, поликатиону можно придать гидрофобные свойства, которые являются одной из основных причин разрушения бактериальной мембраны, при контакте с пленкой. Предложенный механизм действия

основан на прямом разрушении бактериальной мембраны гидрофобными поликатионными цепями при контакте с пленкой. [95].

Известно, что взаимодействие фенильного кольца с гидрофобными хвостами липидов за счет Ван-дер-Ваальсовых сил приводит к разрушению клеточной мембраны бактерии. В работе [83, с. 184] приведены данные о получении пленок на основе поли(4-винилфенола) (ПВФ), собранного с ПАА или хлоридом полидиаллилдиметиламмония (ПДДА) в диапазоне pH=10,5-12,5. Обе пленки позволили ингибировать рост штамма *S.Epidermidis* (на ≈60–70 % при pH=10,5), и в меньшей мере – рост штамма *E.Coli* (на ≈35 %). Эффект напрямую связано с протонированием фенольного фрагмента при pH=10,5.

Пленки, полученные на основе синтезированных полимеров, сочетают две характеристики, такие как противотуманные/противомикробные. Полупрозрачные полимерные сетки были изготовлены из полимеров частично четвертичного поли(2-(диметиламино)этилметакрилат-со-метилметакрилата и полимеризованным диметакрилатом этиленгликоля. Благодаря балансу гидрофильных и гидрофобных свойств частично четвертичного сополимера, пленка обладает устойчивостью к запотеванию, проявляя при контакте антимикробную активность: уничтожение как грамположительных бактерий *Staphylococcus epidermidis*, так и грамотрицательной кишечной палочки [96].

Для создания антимикробных покрытий необходимо учитывать не только природу последнего верхнего слоя, но и природу подложки. Авторами работы [97] показана важность природы подложки при нанесении на ее поверхность четвертичных поли(4-винилпиридина) и карбоксиметилцеллюлозы (Q-ПВП/КМЦ). В зависимости от вида подложки первый адсорбированный слой Q-ПВП имеет разные конформации. В случае гидрофильной поверхности (пластина Si/SiO_2) цепочки Q-ПВП являются более толстыми (более расширенными) из-за лучшей гидратации, в то время как для гидрофобной поверхности (полистирольные пленки) цепочки кажутся менее гидратированными и имеют тенденцию находиться в более компактной конформации. Биоцидная активность пленок ПЭМС с концевыми группами Q-ПВП, нанесенных на гидрофобные поверхности, слабее, чем наблюдаемая для пленок, нанесенных на гидрофильные подложки.

Несмотря на то, что синтезируемые полимеры сочетают в себе ряд полезных характеристик, процесс приготовления покрытий остается многоэтапным и довольно энергозатратным.

1.4.3 Контактные убивающие НЧ активных металлов

Не только полиэлектролиты, но и НЧ внедренные в ПЭМС во время процесса сборки, могут проявлять антибактериальную активность при прямом контакте. Например, в работе [98], были получены одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ), которые затем, используя различные амфифильные функционализированные фосфолипиды, диспергировали в водном растворе, и включали в пленки на основе поли-L-лизин/поли-L-глутаминовой кислоты (ПЛГК). По сравнению с чистыми пленками ПЛЛ/ПЛГК антибактериальная активность ПЭМС на основе ОУНТ усилилась в отношении *E.coli* и

S.epidermidis (до 90 % ингибирования) после 24 ч инкубации, вызывая серьезное повреждение бактериальной мембраны.

Отрицательно заряженные НЧ золота и положительно заряженный лизоцим попеременно наносили на отрицательно заряженные целлюлозные материалы, для получения лучшего антимикробного эффекта по отношению к *S. aureus*. Слабая антимикробная активность лизоцима в отношении *E.coli* (грамотрицательная бактерия) обусловлена защитой липополисахаридного слоя, окружающего мембрану бактерии [99].

1.4.4 Контактные убивающие ферменты

ПЭМС также обладают свойством, позволяющим загружать и иммобилизовать ферменты в их структуру. Авторами работы [100] была создана противоинфекционная поверхность путем включения диспергирующей биопленки фермента в структуру гидрогелей ПЭМС. Разрушающий биопленку, гликозидгидролазный дисперсин В, содержащийся в биопленочной матрице, был иммобилизован в пленки с поперечно-сшитой ПАА/поли(метакриловой кислотой) (ПМАК). ПЭМС содержащий дисперсин В показал ингибирование роста биопленки через 12 часов (98 %) и хорошую биосовместимость с остеобластами.

Для снижения риска заражения мочевыводящих путей катетер-ассоциированными инфекциями, авторами [101] была предложена новая стратегия создания пленок с использованием трех новых функциональных полимерных строительных блоков. Многослойная система была собрана с использованием синтетического поликатионных полимеров с цвиттерионными группами (до 50 %) и поли(стиролсульфоната). Такой полимер использовался для иммобилизации фермента целлобиоздегидрогеназы (ЦДГ). Используя синтетические полимеры и ферменты, авторами были разработаны три типа покрытий: а) первый тип основывается только на поли(стиролсульфонате) и поликатионе с цвиттерионными группами, и создает “неприлипающую поверхность” за счет поликатиона; б) пленка второго типа была собрана с помощью иммобилизации фермента. Благодаря отрицательному заряду, ЦДГ связывался в виде полианиона на разных этапах формирования слоя. Расположение и глубина нахождения фермента в слоях сильно влияет на активность. Использование ЦДГ основывалось на том, что он может продуцировать H_2O_2, который притягивает к себе много положительных протонов в присутствии полисахаридов; в) третий тип представляет собой смесь, которая комбинирует в себе и ЦДГ, и гидрофобный полимер с аминогруппами как верхний слой для создания покрытий.

Таким образом, из вышесказанного можно сделать вывод о том, что контактные убивающие ПЭМС имеют постоянную эффективность, при их сборке используются немедикаментозные вещества. К недостаткам этого метода можно отнести то, что при отсутствии на поверхности положительно заряженных групп ПЭМС неактивны по отношению к отрицательно заряженных бактерий и неэффективны при подавлении или уничтожении планктонных бактерий вокруг имплантатов, кроме того, их действие ограничено функционализацией поверхности.

1.5 Высвобождаемые убивающие ПЭМС

Высвобождаемые убивающие пленки, содержат антимикробные агенты, которые высвобождаются в физиологической среде. Существуют две основные методики, которые используются для разработки высвобождаемых убивающих пленок: 1) путем прямого диффузионного выхода антимикробных агентов из пленок; [102-107] 2) высвобождение антимикробных агентов путем разложения самого ПЭМС [108-114]. Важным параметром, который необходимо учитывать при разработке высвобождаемых убивающих ПЭМС является длительность действия антибактериального агента. Так как первые часы после имплантации являются решающими, то представляет интерес разработка кратковременных, противомикробных покрытий активностью от 6-12 часов до нескольких дней. Механизм действия антимикробных покрытий основывается на высвобождении различных активных препаратов, рассмотренных ниже.

1.5.1 Высвобождение ионов серебра

Достижения в области получения нанобиокомпозитов, когда одна из фаз композита имеет размер нанометрового диапазона, представляют особый интерес благодаря уникальным свойствам НЧ, придающих композитам исключительные химические, физические и биологические характеристики. В роли НЧ, входящих в состав различных биокомпозитных материалов, могут выступать НЧ серебра (НЧAg), являющиеся одними из самых эффективных антимикробных средств. Проявление активности серебра против бактериальных штаммов, являющиеся резистентными к антибиотикам, привели к расширению спектра его использования. Однако имеется ряд недостатков НЧAg, таких как нанотоксичность, сложности при синтезе и плохая коллоидная стабильность. Для понимания механизма действия серебра, сначала следует рассмотреть процессы, протекающие на клеточной стенке бактерий. В аэробных растворах металлическое серебро (Ag^0), на поверхности НЧAg, может окисляться до Ag_2O. Затем, метаболизм бактерий создает кислую среду для высвобождения ионов серебра, о чем свидетельствует ряд исследований. [115-117]. Пептидогликан является специфическим слоем бактериальной клеточной стенки, состоящий из сахаров и аминокислот. Рецепторы и ферменты, ответственные за клеточное дыхание, находятся в слое пептидогликана. Ионы серебра, связываясь с рецепторами и ферментами, путем присоединения к тиольной группе (SH^-), вызывают сворачивание белков, а также парализируют ферменты, метаболизирующие кислород, что в свою очередь приводит к гибели бактерий.

Возможно использование двух методов получения пленок, содержащих ионы Ag^+ или НЧAg: 1) введение катионов Ag^+ в предварительно собранные пленки; 2) введение серебра непосредственно в процессе сборки. В работе [103, с. 160] предварительно нанесенные на подложку пленки, содержащие свободные карбоновые кислоты или сульфонатные группы, погружали в раствор, содержащий ионы Ag^+. За счет ионного обмена с протонами ионы серебра входят в объем мультислоев. Количество захваченных катионов можно регулировать, варьируя концентрацию свободных карбоксильных групп в пленках ПЭМС изменением pH среды в процессе сборки. В дальнейшем ионы Ag^+ восстанавливались до НЧAg обработкой пленок раствором $NaBH_4$ или

облучением светом в УФ-диапазоне. После образования НЧAg данная процедура дает возможность регенерировать карбоксильные группы, что в дальнейшем позволяет ввести в пленку дополнительные ионы Ag^+. При нанесении покрытий на биологические ткани для восстановления ионов Ag^+ нельзя использовать нефизиологические растворы. Для устранения этого ограничения, авторами предложена сборка ПЭМС на эластомерных штампах, содержащих в своем объеме НЧAg, для дальнейшего механического переноса на поверхности биологических тканей и перевязочных материалов. Механический перенос на мягкие материалы значительно облегчается включением в ПЭМС полимерных микросфер диаметром от 1 до 2 мкм. Антибактериальная активность покрытий была протестирована, in vitro и in vivo, по отношению к S. *aureus*. Через 72 ч на ранах, обработанных перевязочным материалом с покрытием на основе НЧAg, наблюдалось значительно меньше ($P < 0{,}001$) колониеобразующих единиц, чем на ранах, обработанных немодифицированными перевязочными материалами (разница более 4 log 10).

Для того, чтобы не применять активных восстановительных агентов, авторы работы [102, с. 2818] использовали скрытую реакционную способность катехиновых функциональных групп. Поверхность титанового сплава, покрытую пленкой, состоящей из ХЗ/модифицированного альгинатом допамина, погружали в раствор $AgNO_3$ для получения и иммобилизации НЧAg на поверхности. Авторами показано, что процесс полимеризации дофаминовых групп одновременно приводит к восстановлению ионов благородного металла до НЧ без присутсвия дополнительных восстановительных агентов или поверхностно-активных веществ.

Ионы Ag^+ могут быть непосредственно введены в пленки путем попеременного осаждения комплексных ионов серебра в полиэлектролите и противоположно заряженных полиэлектролитов [118]. Как и в предыдущем случае, ионы Ag^+ внутри пленок затем восстанавливаются in situ до НЧAg с помощью химических восстановителей, нагревания или УФ-облучения. Преимущество этой методики заключается в более точном контроле количества ионов металлов, включенных в пленку, что, в свою очередь, позволяет контролировать размеры НЧ путем изменения концентрации ионов, присутствующих во время сборки. При использовании суспензии НЧ SiO_2 в растворах нитрата диаминсеребра(I) $[Ag(NH_3)_2]NO_3$ и полиаллиламингидрохлорида (ПААГ) синтез НЧAg осуществлялся in situ во время LbL сборки, при этом аминогруппы ПААГ действовали как восстановители. Пленки ПААГ/SiO_2 являются антибактериальными покрытиями, вероятно, вследствие сочетания их катионных свойств и нанотекстурированной шероховатой поверхности слоя [119].

При разработке разных пленок очень важным параметром является пролонгирование противовирусного действия. Для увеличения длительности антибактериальной активности, авторами проведены опыты по нанесению силанов на пленку (ПЭИ)-Ag^+/ПА, состоящую из полиэтиленимина с введенными в нее катионами серебра. При этом образовалась супергидрофобная поверхность, улучшилась стабильность покрытия, не наблюдалось адгезии бактерий и увеличилось время высвобождения серебра [106, с. 17022].

В вышеуказанных работах ионы серебра вводились в структуру пленок на первом этапе во время сборки, и только затем восстанавливались до НЧ. В работе [120] применен другой подход: в растворе хитозана были предварительно получены НЧAg добавлением аскорбиновой кислоты в качестве восстановителя, о чем свидетельствовало образование желтой суспензии. Полученные НЧAg совместно с гиалуроновой кислотой вводились в состав пленки. Наблюдалось полное уничтожение планктонных и прилипших бактерий в течение первых 4 дней и этот эффект сохранялся спустя 14 суток (до 65 % ингибирования).

Аналогичный подход предложен авторами в работе [121], в которой проводили биосинтез НЧAg обычными способами и методами «зеленой» химии с использованием хитозана, что позволили авторам разработать покрытия для зубных имплантатов. Полученные пленки обеспечивают непрерывное высвобождение ионов Ag^+ в течение 28 дней до полного заживления слизистой оболочки. Гепарин в паре с раствором хитозана, содержащим НЧAg, были использованы для сборки пленок на подложках подвергнутых термической и щелочной обработке. Использование хитозана в качестве стабилизатора и восстановителя исключает применение других восстановителей.

ПЭМС, содержащие ионы серебра, дают многообещающие результаты, однако при изготовлении пленок необходимо регулировать и знать допустимый предел концентрации серебра, иначе пленки проявляют цитотоксичность. Кроме того, следует отметить довольно затруднительный процесс получения НЧAg.

1.5.2 Вещества, генерирующие и высвобождающие активные формы кислорода (АФК)

Различные соединения, образующие активные формы кислорода, также вводились в структуру пленок. В частности, для изготовления полислоев использовались полиоксометаллаты (ПОМ), структуры Кеггина, и катионного хитозана. Уничтожение бактерий *E. coli* объясняется механизмом окисления их клеточной мембраны. Авторами в работе [122] продемонстрировано, что ХЗ используется в качестве пленкообразующего материала или среды для переноса функциональных веществ, таких как ПОМ и для разработки функциональных материалов.

Диоксид титана (TiO_2), синтезированный золь-гель методом, образует биоцидные радикалы при УФ-облучении. Авторы в работе [123] провели сборку серебросодержащих пленок ХЗ-TiO_2/Геп обладающих, как контактными активными свойствами, обусловленные титаном, так и активными свойствами, обусловленными за счет высвобождаемых ионов из НЧAg. Кратковременный антибактериальный анализ показал, что в темноте или при слабом УФ-излучении бактерицидное действие данных покрытий выражено сильнее, чем у пленки ХЗ-TiO_2/Геп погруженной в натрий-фосфатный буфер и содержащий серебро спустя 7 дней (по данным длительного антибактериального анализа).

Авторы работы [124] получили микрокапсулы, состоящие из чередующихся слоев противоположно заряженных конъюгированных полиэлектролитов поли(фениленэтиниленового) типа (CPE), путем послойного осаждения на частицы, матрицы $MnCO_3$, с дальнейшем растворением матрицы с использованием

раствора этилендиаминтетраацетата. Сильная антимикробная активность наблюдалась при смешивании полиэлектролитных капсул с бактериями *Cobetia marina* или *Pseudomonas aeruginosa*, которые сначала захватываются, а затем погибают под воздействием белого света. Материалы могут быть использованы в составе высокоэффективного микро активатора «Roach Motels», которое уничтожает более 95 % бактерий после воздействия белым светом в течение ~ 1 ч. Эффект объясняется тем, что при освещении капсул на границе раздела полимер/бактерия образуется синглетный кислород или другие активные промежуточные кислородсодержащие продукты.

Несмотря на уникальность вышеуказанных работ, недостатком этого подхода является то, что активные биоцидные материалы высвобождаются только при наличии освещения или излучения.

1.5.3 Высвобождение антисептика

Многослойная технология наряду с ионами металлов, активных по отношению к бактериям, позволяет также включать различные антимикробные органические молекулы, имеющие низкую молекулярную массу и способные в дальнейшем высвобождаться из пленки. К этой категории можно отнести антисептики и антибиотики. Различие между ними заключается в том, что антисептики ослабляют и замедляют рост микроорганизмов, а антибиотики используются для уничтожения бактерий путем подавления синтеза клеточной стенки нуклеиновых кислот и белков. В отличие от большинства антисептиков, бактерии могут стать резистентными по отношению к антибиотикам после длительного использования. В связи с этим, применение антибиотиков ограничено.

Для внедрения антисептиков и антибиотиков в пленки были разработаны и широко изучены различные технологии (методики). Первая – погружение предварительно собранных пленок в раствор антисептика или антибиотика [125]. Вторая – прямое осаждение молекул либо путем ассоциации с одним из полиэлектролитов, либо в качестве одного из компонентов многослойного покрытия [104, с. 188; 108, с. 6023]. При использовании антимикробных органических молекул в первую очередь необходимо обратить внимание на заряд (положительный или отрицательный), который, в дальнейшем, будет связываться с противоположно заряженными полиэлектролитами.

Было показано, что количество и процесс высвобождения антибиотиков зависят от различных факторов, таких как количество нанесенных слоев, pH сборки, время инкубации [126]. Для контролируемого высвобождения лекарственного средства применялись различные методы: диффузия через пленки [104, с. 190], гидролитическое разложение одного из полиэлектролитов [109, с. 2395; 110, с. 2510], изменение pH [111, с. e84360], воздействие электрического поля [112, с. 6420], лазерного излучения и ультразвука [113, с. 8870; 114, с. 209].

Самым распространенным антисептиком, используемым в клинической практике, является хлоргексидин, обладающий антимикробной активностью благодаря своему положительному заряду при физиологических значениях pH. Авторы работы [107, с. 6790] описали методику введения антисептика непо-

средственно во время сборки пленок. Для этого были изготовлены полиэлектролитные пленки, содержащие ПААГ, ПАК и хлоргексидин ацетат (ХГА) на эластомерных листах на основе поли(диметилсилоксана) (ПДМС). Положительно заряженный ХГА легко входил в состав пленок в паре с полианионом. Пленка состояла из двух частей: на поверхность материала сначала наносили так называемые «сэндвичи», состоящие из ПААГ/ПАК, а затем сборка продолжалась нанесением бислоев на основе ХГА/ПАК. Полученная пленка обеспечивала локальное нетоксичное высвобождение ХГА, приводящее к торможению колонизации штамма *S. aureus* и способствующее нормальному заживлению ран у мышей. Этот эффект объясняется дестабилизацией клеточной стенки бактерий и нарушением осмотического равновесия, что приводит к осаждению цитоплазматического содержимого и запускает гибель микробных клеток.

Помимо различных производных хлоргексидина, в качестве антисептика также нашел широкое применение метиленовый синий (МС), который является катионным красителем и может образовывать стабильные координационные соединения с некоторыми полимерами. Многослойные покрытия, основанные на ХЗ и циклодекстрине (ЦД), и активированные метиленовым синим, были собраны на подложке из полиэтилентерефталата (ПЭТ) [127]. Исследованы два различных вида хитозана: с низким молекулярным весом (ХЗ-Н) и со средним молекулярным весом (ХЗ-С), а также влияние молярного соотношения ЦД/МС на кинетику высвобождения МС в чистой воде и фосфатном буфере. Проведенные биологические и микробиологические тесты продемонстрировали устойчивую антибактериальную активность по отношению к *S. epidermidis* при контакте в течение 72 ч.

В потребительских товарах и здравоохранении при изготовлении различных хирургических моющих средств широко применяется антисептик триклозан (ТК), благодаря его превосходным антибактериальным свойствам. Так как ТК является гидрофобным, то для его внедрение в мультислои, авторами работы [128] разработаны ПЭМС, имеющие микропористую структуру, что облегчает диффузию и адсорбцию триклозана. Создание микропористой структуры осуществляется путем кислотной обработки с последующей лиофильной сушкой для удаления воды. Прямое введение гидрофобного препарата достигается однократным процессом за счет впитывания его раствора и последующего удаления растворителя. Таким образом, за счет высокой пористости пленки удалось достигнуть высокой концентрации ТК (≈303,5 мкг/см^2) в структуре 15-бислойной пленки.

При введении в структуру ПЭМС гидрофобных материалов одним из наилучших вариантов является их использование в виде мицелл, являющихся одним из компонентов сборки. Для этой цели авторами проведены исследования по инкапсулированию ТК в мицеллы бромида цетилтриметиламмония, которые, затем, диффузионным методом были введены в состав предварительно сформированной пленки ПЭИ/ПАК [129]. Пленки ПЭИ/ПАК с триклозаном могут ингибировать рост как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий в результате высвобождения молекул ТК в течение бо-

лее 20 дней. Данное покрытие обладает свойством заживления царапин и восстановления прозрачности в присутствии воды.

Также авторы в работе [130] использовали мицеллы как один из компонентов сборки. Мицеллы были получены посредством ковалентного связывания метоксиполиэтиленгликоля, поли-ε-капролактона и хитозана (МПЭГ-ПКЛ-ХЗ) и были способны удерживать в себе гидрофобный антисептик - ТК (~5 мас. %). Многослойная пленка состоит из катионных мицелл ТК/МПЭГ-ПКЛ-ХЗ и отрицательно заряженного ПАК. Авторы разработали пленку, которая имеет самозащитный характер, обусловленный высвобождением активного препарата только в кислых средах, вызванных адгезией бактерий.

Учитывая то, что сборка, идущая с использованием полиэлектролитов, делает поверхность гидрофильной и создает неблагоприятные условия для нанесения ТК, чаще вместо гидрофобных АП, используются гидрофильные.

1.5.4 Высвобождение антибиотика

В ряде случаев на раннем этапе инфицирования, покрытия, даже не содержащие антибактериальных препаратов (АП), могут быть активны и подавлять рост бактерий, которые еще не успели образовать стойкую биопленку. Однако, появление биопленки требует лечения с использованием антибиотиков. Как известно, большинство антибиотиков имеют небольшую молекулярную массу, не относятся к полимерам и являются незаряженными, поэтому напрямую ввести их в структуру многослойных тонких пленок затруднительно.

В работе [108, с. 6026] разработаны пленки на основе гидролитически разлагаемого поли(β-аминоэфира) и различных полианионных полисахаридов, которые эффективно высвобождают гентамицин (ГМ), противодействующий пролиферации *S. aureus* in vitro и in vivo. Пленки выделяли около 70 % активного вещества in vitro в течение первых трех дней, а затем продолжали высвобождать лекарственное средство в течение более четырех недель, достигая величины общего среднего высвобождения более 550 мг/см^2. Было доказано, что продукты распада ГМ не токсичны для мышиных преостеобластов MC3T3-E1.

Авторы [131] представили результаты контроля высвобождения антибиотика ГМ из пленок, полученных путем термического и химического связывания с использованием системы 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида/N-гидроксисульфосукцинимида (ЭДК/NГСС). Поскольку ГМ имеет низкую молекулярную массу (477 Da), то его сложно ввести непосредственно в структуру ПЭМС путем попеременного осаждения, однако он свободно диффундирует на поверхность и во внутрь пленки. Система для доставки лекарственного препарата ПАК/(ПВП/ХЗ) была синтезирована за счет электростатического взаимодействия между ХЗ и ПАК, а также водородных связей между ПАК и ПВП. Введение антибиотика в пленку осуществляли путем погружения пленки в раствор ГМ. При увеличении pH водородная связь между ПАК-ПВП разрушается, ПВП высвобождается, а на его место в пленку входит ГМ, который связывается с ПАК силами электростатического взаимодействия.

Комбинируя методы погружения и распыления, разработан композит декстрансульфата с альгинатом, который обеспечивает высвобождение, превышающее минимальную ингибирующую концентрацию антибиотика [109, с. 2401]. Для продления действия антибиотиков, введенных в ПЭМС методом гидролитического разложения, во время сборки в пленку можно ввести неорганические частицы, например, прослойки из сапонитовой глины, которые физически блокируют диффузию антибиотиков. Таким образом, можно с более точно контролировать свойства пленок.

Используя вышеприведенную стратегию, авторы продемонстрировали возможность разработки самосборного покрытия, включающего в себя ГМ на поверхности биомиметического имплантата двойного назначения, которое обеспечивает ступенчатое и/или замедленное высвобождение антибиотика. Данное многослойное покрытие состоит из двух частей: базовый остеоиндуктивный компонент, содержащий костный морфогенетический белок-2 (rhBMP-2) и антибактериальный компонент, содержащий гентамицин. Для контроля или настройки высвобождения препарата авторами предложена методика внедрения барьеров из лапонитовой глины, которые позволяют физически разделить два компонента, путем управления межслойной диффузией. Глиняные барьеры в однокомпонентной системе эффективно блокируют диффузионное высвобождение гентамицина, которое, в дальнейшем, приводит к 10-кратному увеличению времени высвобождения. Кроме того, в двойном композиционном покрытии верхний слой состоит из гентамицина, который служит эффективным физическим барьером для базового rhBMP-2. Такой подход дает возможность контролировать концентрацию препарата, который высвобождается при определенных условиях и снизить цитотоксичность антибиотика [132].

Благодаря своей антибактериальной активности, ГМ нашел широкое применение для покрытия поверхностей, отличающихся друг от друга по составу и свойству. Несмотря на широкое распространение в области ортопедии стальных и титановых имплантатов, они все чаще заменяются магниевыми сплавными имплантатами, характеризующимися [133] низкой плотностью и высокой удельной прочностью. [134]. По сравнению с инертными металлами сплавам магния характерна низкая коррозионная стойкость. Поэтому, авторами [135, 136] была предложена стратегия, решающая одновременно проблемы создания антикоррозионного и антибактериального покрытия с помощью композитного материала ПАК/ГМ. Скорость высвобождения ЛП зависит от двух факторов: (а) диффузии ГМ, вызванной градиентом концентрации между системой покрытия и средой; (б) деградацией покрытия, которая дает возможность растворению ГМ. В результате полное высвобождение (100 %) ГМ из системы $(ПАК/ГМ)_{20}$ достигается в течение 17 дней.

Для защиты магниевых сплавов, предложено использовать пленки состава ПСС/ГМ. Для уменьшения коррозии поверхность обрабатывают раствором NaOH. Побочный продукт коррозии OH^- стабилизирует продукт коррозии ($Mg(OH)_2$). Однако, до 40 % штаммов *S. Epidermidis* [137] и 32 % штаммов *S. Aureus*

[138], выделенных из ортопедических послеоперационных инфекций и связанных с имплантатами, были устойчивы к гентамицину.

Авторами работы [139] предложен удачный вариант использования антибиотика ванкомицина при создании пленок LbL сборкой с использованием трех растворов. Для защиты ортопедических имплантатов, сделанных из нержавеющей стали, были приготовлены прозрачные тонкие покрытия, состоящие из 40 трехслойных слоев. Первый раствор для погружения представлял собой ванкомицин (10,71 мг/мл), за которым следовало погружение в 4,5 % раствор поли(молочной кислоты) в дихлорметане (ДХМ), а затем - в раствор ниосома с ванкомицином.

Однако исследования, проведенные в Центре по контролю и профилактике заболеваний (США) [140] подтвердили, что ванкомицин является устойчивым к ортопедическим имплантат-ассоциированным инфекциям, включая *S aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Поскольку повреждения тканей, воспаления и инфекции обычно приводят к снижению внеклеточного pH, высвобождение антибиотиков на границе раздела имплантат-ткань, вызванное pH, крайне желательно. В зависимости от системы, увеличение или уменьшение pH вызывает диффузию антибиотиков за счет изменения проницаемости [141] или снижения сродства связывания [111, с. e84360].

Методом LbL сборки были сформированы полые капсулы, состоящие из двух слабых полиэлектролитов ПАА и ПМАК, которое способны поглощать ципрофлоксацин. Ципрофлоксацин входит в микрокапсулу при низких значениях pH, и выделяется из капсул при нейтральных значениях pH. Выделяющийся из микрокапсул антибиотик оказывает сильное антибактериальное действие на бактериальный патоген *E. coli* в течение 7 ч [141, с. 346].

В большинстве случаев полное высвобождение препарата требуется осуществить в течение 14 дней, так как такой отрезок времени является важным постоперационным периодом. Тем не менее, авторами работы [111, с. e84360] удалось продлить время высвобождения миноциклина, являющегося антибиотиком и противовоспалительным лекарственным средством, до 35 дней. Для этого миноциклин был связан с кальцием и введен в состав ПЭМС, состоящего из слоев декстран/желатин. При изменении pH среды уменьшалось сродство связывания, что приводило к высвобождению миноциклина при pH=6,0. Авторами было доказано, что биопленка, образующаяся из штамма *S. epidermidis*, обладала высокой устойчивостью к ципрофлоксацину.

В работе [142] изучено влияние pH на жесткость пленки и высвобождение антибиотика. Авторам удалось успешно ввести тобрамицин в состав пленок ХЗ/ПАК. При pH=7, т.е. вблизи к pH физиологической среды, образуются тонкие и жесткие пленки, образованные за счет сильного электростатического взаимодействия между ПАК и катионами тобрамицина. Это приводит к затруднению процесса высвобождения лекарственного препарата. Кроме того, при pH = 7 образуется жесткий наружный слой, связанный с нерастворимостью ХЗ (выше pH ~ 6,5). При снижении pH среды с 7,0 до 3,8 создаются благоприятные условия для диффузии тобрамицина. Этот факт объясняется тем, что при pH = 4

карбоксильные группы ПАК (pKa = 4,2) частично протонируются и связь между ПАК и тобрамицином ослабевает. Несмотря на это, остаточный поликатионный тобрамицин сохраняет сильные электростатические поперечные связи с анионными карбоксильными группами и, слой остается относительно тонким и жестким.

В различных исследованиях для высвобождения антибиотиков было использовано влияние внешнего импульсного воздействия. Как уже было сказано ранее, с помощью изменения pH раствора или используя специальные блокирующие реагенты, можно регулировать диффузионное высвобождение антибиотика или антисептика и контролировать пролонгирующее действие. Авторам работы [112, с. 6423] удалось разработать наноразмерные тонкие пленки, которые могут выделять точные количества низкомолекулярного лекарственного средства при приложении небольшого анодного электрического потенциала. Пленка $(ПС)/ХЗ)_5(ПС/ГМ)_n$ была получена на электроде из берлинской лазури (прусской сини, ПС) и состояла из пяти бислоев (ПС/ХЗ), на которые были нанесены слои $(ПС/ГЦ)_n$ с n = 25, 50 или 75. При окислении НЧ ПС изменяют заряд от отрицательного до нейтрального, вызывая растворение пленки. В зависимости от формы импульса электрического потенциала можно варьировать кинетические режимы высвобождения лекарственного средства: взрыв, включение/выключение или пульсирующие выбросы. Эффективность высвобожденного лекарственного средства in vitro была подтверждена в отношении бактерий *S.aureus*.

Авторами работ [113, с. 8868; 114, с. 210] были проведены исследования по совместному антимикробному эффекту антибиотиков и НЧAg, при этом высвобождение антимикробных агентов вследствие разрыва пленки ПЭМС инициировали воздействием лазерного облучения или ультразвука. Эффективность таких методов доказана на экспериментах, проведенных in vitro. Однако, использование внешних импульсов таких, как лазерное облучение и ультразвук, для высвобождения АП, не является желательным для ослабленного организма после имплантации.

В большинстве случаев полученные покрытия были протестированы по отношению к бактериям стафилококка (особенно *S. aureus* и *S. epidermidis*), так как именно они являются наиболее распространенными микроорганизмами, участвующими в инфицировании при ортопедических имплантациях. Ниже в таблице 1.3 указаны виды инфекции [143], микроорганизмы (штаммы), ответственные за инфекции, и антибиотики, проявляющие устойчивость и чувствительность по отношению к бактериям.

Исходя из данных таблицы 1.3, можно сделать вывод о том, что бактерии уже резистентны ко многим антибиотикам. Следовательно, необходимо либо применять большие и частые дозы лекарственных средств, либо разрабатывать более сильнодействующие антибиотики. Именно при ортопедической имплантации микроорганизмы более устойчивы к различным антибиотикам. Это связано с тем, что не все антибиотики проникают на всю глубину биопленки; некоторые клетки в биопленках медленно растут вследствие ограничения питательных веществ; ряд клеток в биопленках имеют

свойственные характеристики, связанные с образованием защищенного фенотипа.

Таблица 1.3 – Микроорганизмы (штаммы) проявляющие устойчивые и чуствительные свойства к антибиотикам

Инфекция	Микроорганизмы	Антибиотики
Стафилококковые штаммы, выделенные при инфицировании протезов	*S. aureus* и *S. epidermidis*. (*S. hominis, S. haemolyticus, S. capitis, S. warneri, и S. cohnii*)	■Устоичивый: пенициллин (51-66), ампициллин, клиндамицин, эритромицин, гентамицин, тобрамицин и ванкомицин.
Перипротезные инфекции суставов	*Escherichia coli (E.coli)*	■ципрофлоксацин ■чуствительный: гентамицин
	Klebsiella pneumoniae	■ ципрофлоксацин, гентамицин ■ котрикомоксазол

Таким образом, можно сказать, что не всегда использование покрытий, содержащих антибиотики, является эффективным. Несмотря на огромное количество работ, проведенных в мире за последнее десятилетие, ученым до сих пор не удалось ответить четко на вопрос, влияет ли устойчивость к антибиотикам на клинические исходы ортопедо-ассоциированных инфекций.

Возможно, эту проблему можно решить при использовании антимикробных пептидов (АМП) и возможности адресной доставки новых терапевтических средств, при этом, не позволяя развиться бактериальной устойчивости. В сравнении с рядом антибиотиков таких, как гентамицин, ванкомицин, миноциклин и т.д., АМП и полипептиды, секретируемые многочисленными живыми организмами против патогенов, отличаются низкой цитотоксичностью.

Были использованы различные стратегии включения АМП в пленки: электростатическая адсорбция, если АМП являются катионными, [144-146] либо путем прививки их к одному из полиэлектролитных компонентов [147, 148]. Дефенсин, - один из первых АМП, примененный в качестве компонента ПЭМС, имеет положительный заряд и состоит из 40 аминокислот. Биофункционализация поверхности была достигнута при завершении внешнего слоя пленки концевыми группами ПЛЛ. Вследствие сильного взаимодействия бактерий с положительно заряженными поверхностными группами пленок дефенсин деформирует структуру бактериальной мембраны, проявляя контактно-убивающие свойств. Другой положительно заряженный АМП, - понерицин G1, был успешно введен в гидролитически разлагаемый ПЭМС на основе поли(β-аминоэфира) с образованием высвобождаемого активного вещества, убивающего бактерий [145, с. 2351]. Разрушение пленки и, следовательно, профиль высвобождения зависели от самого полианиона.

Исследование свойств ПЛЛ привело к созданию пленок ПЛЛ/ПЛГК с включенными в них флуоресцентно-меченного противогрибкового β-пептида, который проявлял токсичность по отношению к *C.albicans*. Пептиды

высвобождались из пленки в течение 17 дней без ее физической эрозии [146, с. 2324]. Таким образом, используя фунгицидные или фунгистатические материалы, можно снизить или устранить инфекции, связанные с биопленкой.

Аналогичный опыт был поставлен авторами работы [149] для получения пленок, толщиной ~ 700 нм, которые были собраны для защиты полиэтиленовых катетерных трубок и проявляли противогрибковую активность. В данном случае β-пептиды высвобождались в течение ~ 4 месяцев при инкубации в физиологических средах.

Таким образом, используемый, так называемый метод заполнения - высвобождения (fill and clean) пленок дает возможность использовать очень большое количество различных антибактериальных препаратов, тем самым обеспечивая контроль количества высвобождающихся веществ. При удачном подборе полиэлектролитов и АП, можно совместить два метода защиты пленок: контактно-убивающий и высвобождаемо-убивающий. Но самый главный и важный аспект при использовании антибактериальных средств, - определение предельной концентрации препаратов, поскольку чрезмерное высвобождение антибиотиков может привести к образованию устойчивых бактерий. Кроме того, бактерицидная поверхность всегда загрязнена остатками мертвых бактерий, которые в дальнейшем могут вызывать иммунные реакций или воспаления.

1.6 Самозащитные покрытия

Самозащитные покрытия можно классифицировать как покрытия, которые становятся активными только в присутствии патогенных микроорганизмов. Результаты работ в этом направлении [150] указывают на то, что изменение pH вблизи покрытий и рост бактерий можно использовать в качестве импульса для внутреннего высвобождения антимикробного агента. Был разработан ультратонкий гидрогель, состоящий из ПМАК, способный внедрять в свою структуру и высвобождать поликатионные заряженные противомикробные агенты, антибиотики или АМП. После сборки пленки ПВП/ПМАК связанные водородными связями пленки ПМАК сшивали с использованием этилендиамина (ЭДА) или дигидразида адипиновой кислоты перед удалением ПВП. Сшивающий реагент увеличивал гидрофобность гидрогеля и увеличивал концентрацию активных центров, связывающихся водородными связями с антимикробными агентами. Полученный ультратонкий гидрогель ПМАК является резервуаром для катионных антимикробных препаратов, захваченных в порах с помощью электростатического механизма. Изменение pH, связанное с размножением *S.epidermidis*, использовалось в качестве внутреннего импульса для высвобождения антибиотика, гентамицина, и пептида L5. При изменении pH гидрогель, сшитый с помощью ЭДА, набухает, одновременно освобождая захваченные вещества. Антибактериальная активность относительно грамположительных бактерий *S.Epidermidis*, полученная в основном на поверхности гидрогеля, наблюдалась через 4 ч инкубации

Авторами в работе [151] предложен ряд концепций самозащитных покрытий, работающих за счет подкисления окружающей среды патогенными

бактериями. Разработаны покрытия, полученные путем прямой сборки дубильной кислоты (ДК) с одним катионных антибиотиков (тобромицином, гентамицином или полимиксином В). Методами эллипсометрии, УФ- и масс-спектрометрии подтверждено, что все покрытия не выделяют антибиотиков в физиологическом растворе с фосфатным буфером при pH= 7,4 в течение одного месяца в отсутствие бактерий и, следовательно, не способствуют развитию резистентности к антибиотикам. Однако, при снижении pH эти пленки выделяют антибиотики. Также в этом направлении можно выделить работу PhD докторанткой Ментбаевой А. проведенную под руководством профессора КазНУ им. Аль Фараби Оспановой А.К., в которой многослойный нанокомпозит, состоящий из ПАК/ НЧ монтмориллонита, был пропитан антибиотиком гентамицином, для дальнейшего контролируемого высвобождения антибиотика [152]. Высвобождение гентамицина идет благодаря подкислению окружающей среды, тогда как гентамицин, адсорбированный на монтмориллоните, остается в пленке. Сочетая в себе два способа уничтожения бактерий таких, как высвобождаемо-убивающие и контактно-убивающие свойства, это покрытие также подвергается набуханию, препятствующему бактериальной адгезии.

Авторами работы [153] был разработан гидрогель поли(2-алкилакриловой кислоты), который становится гидрофобным и бактерицидным в ответ на вызванное бактериями подкисление среды. Если pH среды не изменяется, то покрытия остаются в состоянии готовности. Однокомпонентные гидрогелевые тонкие пленки, состоят из химически сшитых поли(2-алкилакриловых кислот) (ПАК) различной гидрофобности. Гидрофобные пленки при pH= 7,4 были более устойчивы к колонизации Staphylococcus epidermidis, но как только среда становится более кислой из-за бактериальной пролиферации, гидрогели обезвоживаются и начинают убивать бактерий на контакте с поверхностью. Этот метод отличается от остальных тем, что само покрытие имеет бактериально-чувствительные свойства без участия каких-либо токсичных катионных полимеров или выделения антимикробных агентов.

Дальнейшее развитие концепция зашиты за счет самого ПЭМС получила в работе [154], согласно которой высвобождение антимикробного пептида запускается ферментативным расщеплением пленки, катализируемым патогенами. Для этого антибактериальный и противогрибковый пептид катезлитин, был привит к гиалуронувой кислоте, которая затем была использована для сборки ПЭМС с хитозаном. Оказалось, что после 24 ч инкубации пленки ГК-катезлитин/ХЗ полностью ингибируют развитие S.aureus и C.albicans. Учитывая то, что покрытия предотвращают адгезию фибробластов, не вызывая цитотоксичности, эту методику можно применить для создания покрытий на катетерах или трубках трахеи, где нежелательна инкапсуляция фиброзной ткани.

Также следует отметить огромный вклад, внесенный в эту область науки, сделанный командой под руководством профессора Оспановой А.К. (КазНУ им. аль-Фараби) в сотрудничестве с профессором Сухишвили С. (Техасский Университете A&M). В рамках данного сотрудничества были разработаны многофункциональные полимерные композиций на основе ПЭИ/ПАК, ПЭИ/ПСС,

QПВП/ПАК и QПВП/ПСС, методом LbL, иммобилизированных в структуру Co^{2+} и Cu^{2+} с каталитическими свойствами проявляющие многократную активность [155].

Также был проведен ряд экспериментов по получению pH-чувствительного антибактериального композита на основе глина/ПАК, проявляющий двойной механизм ингибирования роста бактерий: высвобождая биологическое активное вещество – гентамицин; уничтожение бактерий при контакте с ними, за счет наличия в их структуре слабой поликислоты ПАК [152, с. e121]. Проведенный эксперимент создал основу для дальнейших исследований по созданию антибактериальных покрытий методом LbL.

Несмотря на перспективность данного подхода, в этом направлении пока сделано лишь несколько работ, для дальнейшего развития метода требуется проведение дополнительных исследований.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Характеристика объектов исследования

Объектами исследования в работе были следующие вещества: поли(этиленимин) линейный (ПЭИ, M_W=10kDa), поли(акриловая кислота) (ПАК, M_W=1,8 kDa), Na-карбоксиметилцеллюлоза (Na-КМЦ, M_W=700 kDa), низкомолекулярный хитозан (M_W=50-190kDa, степень деацетилирования (СД) 75-85%) и высокомолекулярный хитозан, $AgNO_3$ (99,8 – 100,5 %), которые были приобретены в Sigma Aldrich. Также в исследованиях были применены: ледяная уксусная кислота, ацетон, этиловый спирт (96 %), соляная (37 %) и серная кислоты (98 %), гидроксид натрия, пероксид водорода (37 %), натрий лаурил сульфат ($C_{12}H_{25}SO_4Na$), бромфениловый синий, аскорбиновая кислота.

В качестве антимикробных агентов были использованы хлоргексидина биглюконат ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_6H_{12}O_7$, M_W = 897,8 Da) и триклозан ($C_{12}H_7Cl_3O_2$, M_W =289,54 Da).

В качестве подложек были использованы: кремниевые пластинки фирмы Sigma Aldrich, полированные с одной стороны (<100>) N-типа с оксидным слоем ~2 нм, медицинские ортопедические имплантаты, и стеклянные пластины размером 8 см × 3 см и толщиной 1 мм (Swiss Glass).

2.2 Обработка поверхности твердых подложек

Обработка поверхностей стеклянных, кремниевых пластинок, а также титановых и стальных имплантатов

Природа выбранных носителей отличается друг от друга, поэтому для каждого типа подложек были использованы различные методы химической обработки.

Процесс химической обработки стекла состояла из двух этапов: обработка ацетоном с дальнейшим травлением «хромовой смесью». После каждого этапа стеклянные пластинки промывались большим количеством дистиллированной воды.

Кремниевые пластины были разрезаны с помощью (SY J-150 Low speed diamond saw, MTI corporation) для получения подложек размером 1 см× 1см. Так как для улучшения трения во время резки используется смазывающее масло, первый этап чистки включает в себя удаление масла этиловым спиртом. В дальнейшем была проведена обработка концентрированной серной кислотой ($H_2SO_{4конц}$), с последующей промывкой дистиллированной водой. Для нейтрализации остатков кислоты подложки погружаются в 0,1 М раствор NaOH на 10 мин, и затем снова промываются и сушатся в потоке азота. Часть кремниевых пластин также были обработаны раствором «пиранья» (смесь серной кислоты и перекиси водорода) в течение 1 часа. Процесс завершают промывкой большим количеством дистиллированной воды.

Медицинские ортопедические титановые и стальные имплантаты также были обработаны двумя методами: механическая чистка с последующей активацией раствором «пиранья» в течение 15 минут.

Некоторые имплантаты были обработаны следующим образом: механическая чистка с последующей выдержкой в ультразвуковой ванне в течение 1 ч, и дальнейшей последовательной обработкой растворами ацетона (1 ч) и этилового спирта (1 ч). Процесс заканчивался выдержкой в ультразвуковой ванне (15 мин) для удаления остаточных примесей органических растворителей.

2.3 Получение антибактериальных полиэлектролитных мультислойных покрытий

2.3.1 Получение покрытий на основе поликатион/полианион

Получение мультислоев на поверхности подложек проводили с помощью полуавтоматического метода погружения. Метод погружения осован на поочередном погружении подложек в растворы полиэлектролитов и широко используется для получения тонких слоев.

В работе использовали растворы полиэлектролитов с концентрацией 0,01 М; скорость погрузки и вынимания составила 0,001 м/с. Получение тонких пленок начинали с погружения подложек в раствор хитозана, с последующей сушкой для закрепления адсорбированных частиц полимера, и промывания буферным раствором, имеющий такое же значение pH, для удаления неадсорбированных частиц.

Адсорбирование полианиона на поверхности подложек проводили в аналогичной последовательности. Таким путем получали нужное количество бислоев.

Исследования проводились при значениях pH= 2-7. Время одного цикла составило, в среднем, 5 мин, что является самым эффективным временем осаждения. Завершением процесса является проведение термической обработки (150° С) в муфельной печи в течение 2 ч, так как термообработанные сшитые пленки проявляют повышенную стойкость при погружении в относительно агрессивный раствор и не наблюдается расслоения пленок.

2.3.2 Внедрение антибактериального препарата в пленки

В работе использовали гидрофобный и гидрофильный антибактериальные агенты, отличающиеся друг от друга зарядами. Включение антисептика низкомолекулярного соединения – хлоргексидина проводили двумя путями: 1) во время сборки ПЭМС, принимая ХГ как один из компонентов пленки; 2) после получения пленки, с помощью выдерживания в растворе хлоргексидина в течение 48 ч.

Внедрение гидрофобного триклозана в мультислои проводили следующим образом: подложка с покрытием, в которой последний слои заканчивается КМЦ, сначала подвергали кислотной обработке в течение 2 часов, с последующей промывкой дистиллированной водой, и затем отстаивали в растворе триклозана в течение 2 суток.

2.3.3 Определение содержания хлоргексидина в растворе

К 50 мл раствора хлоргексидина добавляли 30 % раствор уксусной кислоты. В качестве индикатора использовали 0,1 % раствор бромфинилового синего, растворенного в 95 % этиловом спирте. Титрование проводили с 0,005

моль/л лаурил сульфатом натрия. Переход цвета от зеленого к светло зеленому свидетельствовало об окончании титрования.

2.3.4 Получение ПЭМС на основе ХЗ/КМЦ содержащие НЧAg

Синтез и включение НЧAg в тонкие пленки осуществлялось с использованием двух альтернативных подходов 1) внедрение НЧ во время сборки и 2) после сборки.

Первый способ основан на постепенном включении НЧAg от внутренней к внешней поверхности пленки. Процесс включает в себя следующие этапы: а) получение НЧAg в растворе хитозана, полученный раствор был обозначен как НЧAg-ХЗ для дальнейшего использования; б) сборка ПЭМС на основе НЧAg-ХЗ/КМЦ. Как уже говорилось для получения НЧAg, распределенных в ХЗ, сначала был приготовлен 0,01 М раствор хитозана в 1 % уксусной кислоте, с последующей обработкой в ультразвуковой ванне в течение 1 ч. Так как при образовании НЧAg может наблюдаться агрегация частиц, то раствор хитозана оставляли на ночь до полного растворения. Далее, раствор НЧAg-ХЗ был приготовлен при соотношении хитозана к нитрату серебра как 10:4, с последующим перемешиванием раствора при скорости 140 rpm и нагреванием до 40 °С в течение 30 минут. Образование желтого раствора свидетельствовало о наличии НЧAg. Далее комплекс НЧAg-ХЗ, который имеет положительный заряд, адсорбировали на КМЦ с образованием одного бислоя при pH = 4,0.

Второй подход основан на внедрении ионов серебра в мультислои после сборки, с последующим восстановлением «in situ». Этот процесс включает в себя следующие шаги: изготовление многослойного покрытия, термическая обработка, погружение твердой подложки, с покрытием, в раствор $AgNO_3$ (0,01-0,001 М) на 12 часов (раствор выдерживали в холодном месте во избежание окисления серебра), с последующим восстановлением («in situ») ионов серебра (Ag^+) до НЧAg (Ag°) с использованием 0,01 М раствора аскорбиновой кислоты. Процесс включения катионов металла и восстановления повторяли несколько раз.

2.3.5 Исследование высвобождения ионов серебра в физиологическом растворе

Модифицированные титановые имплантаты погружали в свежеприготовленный раствор фосфатного буфера в физиологическом растворе на 24 часа и хранили в темном месте. После этого имплантаты заново погружали в свежий раствор. Каждые 24 часа отбирались пробы. Количество ионов серебра, перешедшее в раствор, определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

2.3.6 Определение антибактериальной активности

Определение проводили методом диффузии в агар-агар на плотной питательной среде, путем сравнения размеров зон угнетения роста тест-микробов, образующихся при испытании растворов определенных концентраций. Staphylococcus aureus (S.aureus, ATCC 25923), Escherichia coli *(*E.coli) и P.Aeruginosa использовался в качестве эталонного штамма для тестирования антибактериальной активности.

В стерильные чашки Петри наливали по 20 мл питательного агара. Толщина агарового слоя влияет на результаты определения, поэтому строго соблюда-

ли указанное количество питательной среды. В качестве питательной среды применяли среду Мюллера-Хинтона и Сабуро агар.

Для получения газонов приготовили гомогенную суспензию бактериальных клеток в физиологическом растворе, соответствующий стандарту 0,5 ЕД мутности по МакФарланду бактериальную взвесь нанесли стерильным тампоном на поверхность агара в трех различных направлениях. Через 5–10 минут после инкубирования, на подсохшую поверхность агара нанесли титановый имплантат с антимикробными свойствами.

Чашки в течение 30 минут оставили при комнатной температуре, а затем, не переворачивая, инкубировали в термостате при температуре 28-37 °С в течение 24 часов. Образование прозрачной зоны вокруг образца является показателем антибактериальной активности для полученных материалов. Зоны угнетения микробного роста измеряли миллиметровой линейкой

2.3.7 Определение степени деацетелирования хитозана методом потенциометрического титрования

Как уже известно, хитозан является продуктом деацетилирования хитина. Для потенциального использования данного полиэлектролита в биомедицине необходимо учитывать не только его молекулярную массу, но и СД для оценки его растворимости в водно-кислых средах, способности к биодеградации, биосовместимости и др. С целью определения СД, точную массу хитозана сушили при 100 °С до постоянной массы для избавления от адсорбированной воды, затем растворяли в 0,1М водном растворе соляной кислоты. Полученный раствор титровали 0,1 М раствором NaOH. СД рассчитывали с использованием следующей формулы (1.1-1.2):

$$NH_2(\%) = \frac{(C_1V_1 - C_2V_2)\cdot M}{m} \times 100\ \% \quad (1.1)$$

$$\text{СД}\% = NH_2\%/9{,}94\% \times 100 \quad (1.2)$$

где, C_1 – концентрация соляной кислоты, моль/л; V_1 – объем соляной кислоты, мл; C_2 – концентрация гидроксида натрия, моль/л; V_2 – объем гидроксида натрия, затраченного на титрование (значение находят из графика зависимости $pH = f(V_{NaOH})$), мл; М-мольная масса NH_2, г/моль; m – масса сухого хитозана, г; 9,94 – теоретическая эквивалентная масса аминогрупп, выраженная в процентах.

Для расчета СД хитозана методом титрования был построен график зависимости pH от V_{NaOH} (рисунок 2.1).

На рисунке 2.1 первый максимум на кривой титрования (красная линия) соответствует объему щелочи, который был затрачен на нейтрализацию HCl в растворе, а второй максимум соответствует количеству гидроксида натрия необходимого для взаимодействия с H^+ связанных с аминогруппами в составе хитозана.

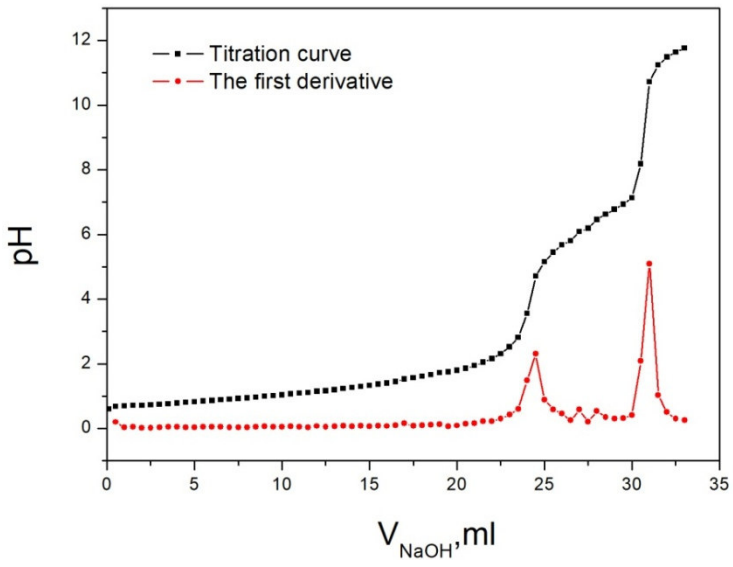


Рисунок 2.1 – Кривые потенциометрического титрования хитозана раствором NaOH

Рассчитанное значение СД хитозана составило 78,5%, что дает оценку о биосовместимости образца и теоретически можно сделать предположение о растворимости в кислом водном растворе

2.4 Физико-химические методы исследования

2.4.1 Атомно-силовая микроскопия (АСМ)

Шероховатость была исследована с помощью атомно-силовой микроскопии («НТ-МДТ»). Сканирование осуществляли в полуконтактном и контактном режимах на воздухе и при комнатной температуре. Сканирование было проведено с частотой 0,8–1,01 Гц, с разрешением 156 × 156 и 256 × 256 точек. Обработку изображений и статистическую обработку результатов осуществляли с использованием Microsoft Excel и Origin. Использовали кремниевые кантилеверы Golden NSG01. Резонансная частота кантилевера составила 87-230 кГц, радиус закругления зонда 10 нм, жесткость 5,1 Н/м. Стандартный размер и толщина консольного чипа - 1,6 × 3,4 × 0,3 мм.

2.4.2 Измерение толщины сухой пленки

Для эллипсометрического анализа системы использовали данные, полученные с помощью спектрального эллипсометра «ЭЛЛИПС-1891-САГ» (ИФП СО РАН). Измерения спектральных зависимостей эллипсометрических углов Ψ и Δ проводили в диапазоне длин волн 250-1100 нм. Спектральное разрешение прибора составляет 2 нм, время записи одного спектра не превышало 20 сек., угол падения луча света на образец составило 70 °С. Использовалась четырехзонная методика измерений, с последующим усреднением по всем четырем зонам.

Записанные спектры $\Psi\ (\lambda)_{exp.}$ и $\Delta\ (\lambda)_{exp.}$ использовались далее для решения обратной задачи эллипсометрии (ОЗЭ) и подгонки расчетных спектральных за-

висимостей эллипсометрических углов $\Psi\ (\lambda)_{calc.}$ и $\Delta\ (\lambda)_{calc.}$ к экспериментальным, в соответствии с основным уравнением эллипсометрии (1.3).

$$\mathrm{tg}\,\Psi \cdot e^{i\Delta} = \frac{R_p}{R_s}, \qquad (1.3)$$

где, R_p, R_s - комплексные коэффициенты отражения света для волн, поляризованных в плоскости падения и перпендикулярно к ней, зависят от оптических постоянных и толщин слоев.

Для эллипсометрических расчетов в работе использовалась оптическая модель однослойной отражающей системы: прозрачная изотропная пленка на поглощающей подложке. Подгонка спектральных зависимостей поляризационных углов во всем спектральном диапазоне для m точек спектра осуществлялась при помощи минимизации функции ошибки (1.4):

$$\sigma^2 = \frac{1}{m} \cdot \sum_{i=1}^{m} \left[\left(\Delta_{\text{exp.}} - \Delta_{calc.} \right)^2 + \left(\Psi_{\text{exp.}} - \Psi_{calc.} \right)^2 \right], \qquad (1.4)$$

где, $\Psi\ (\lambda)_{exp.}$, $\Delta\ (\lambda)_{exp..}$ и $\Psi\ (\lambda)_{calc.}$ и $\Delta\ (\lambda)_{calc.}$ – экспериментальные и расчетные значения эллипсометрических углов Ψ и Δ соответственно, m – число точек спектра.

2.4.3 Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Изображения СЭМ были получены с помощью двух сканирующих электронных микроскопов (Quanta 3D 200i (FEI company) и Hitachi S-3400N (USA)). До исследования образцы были покрыты Au в течение 10 секунд (так как покрытие на основе Au генерирует частицы, размер которых зависит от времени нанесения покрытий), для получения наилучших изображений и избегания зарядки образцов. Высокое напряжение (15-30 kV) было выбрано для лучшего разрешения, низкое напряжение (3-5 kV) позволило более детализировать поверхность и снизить поверхностные заряды.

Рисунки были сняты с различными разрешениями увеличения: 250, 500, 1000, 2 000, 5 000 и 30 000.

2.4.4 Определение угла смачивания

Для определения угла смачивания был использован метод лежащей капли. Измерения проводили на аппарате “DSA100-KRUSS GmbH”, при комнатной температуре и нормальном давлении. Средний диаметр капли составлял в среднем 2-5 мм. Угол смачивания был определен после 30 секунд, 1 и 2 минуты. Снимок поверхности титановых имплантатов был сделан минимум в трех областях из-за неровностей.

2.4.5 Атомно-абсорбционная спектроскопия

Содержание ионов серебра определяли с помощью двухлучевого атомно-абсорбционного спектрофотометра AA-6200 (Shimadzu) при спектральном диапазоне, соответствующие ионам металла.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Квантово-химическое обоснование энергетических и структурных характеристик биоактивных полисахаридов и антибактериальных препаратов

3.1.1 Квантово-химическое исследование модельных фрагментов хитозана, карбоксиметилцеллюлозы и альгиновой кислоты

Для проведения квантово-химических расчетов было созданы 3 модели молекулярных структур: хитозан, карбоксиметилцеллюлоза и альгиновая кислота с содержанием числа элементарных звеньев, равного трем, для них были рассчитаны геометрические, энергетические и зарядовые характеристики на основании программы HyperChem (версия 8.0.8). Для расчетов был использован полуэмпирический метод PM3.

Метод PM3 является модифицированным методом AM1, отличаясь только величинами параметров. Параметры для метода PM3 были получены сравнением большого числа и вида экспериментов с результатами расчетов. Не ковалентные взаимодействия в методе PM3 имеют меньший расталкивающий эффект, чем в методе AM1, так как PM3 первоначально разрабатывался для расчета органических молекул. Данный метод дает достаточно точные значения длин связей C=O, C–C и C=C.

Результаты расчетов представлены в таблицах 3.1-3.4.

В таблице 3.1 представлены результаты расчетов межатомных расстояний (длин связей) в исследованных молекулярных моделях.

Таблица 3.1– Межатомные расстояния в исследованных фрагментах молекул, Å

Связь	Хитозан	КМЦ	Альгиновая кислота
C_{17}-C_{16}	1,5348	C_{16}-C_{17} 1,5553	C_{24}-C_{25} 1,5568
C_{17}-O_{18}	1,5390	C_{17}-O_{18} 1,4250	C_{25}-O_{26} 1,5553
O_{18}-C_{23}	1,4134	C_{16}-O_{15} 1,4310	O_{26}-C_{27} 1,5579
C_{18}-C_{19}	1,5343	C_{18}-C_{19} 1,4110	C_{27}-C_{28} 1,5572
C_{19}-C_{20}	1,5323	C_{19}-C_{20} 1,5620	C_{28}-O_{23} 1,4238
C_{20}-C_{21}	1,5312	C_{20}-C_{21} 1,5528	O_{23}-C_{24} 1,4099
C_{19}-O_3	1,4051	C_{21}-C_{16} 1,5595	C_{24}-O_{13} 1,4058
C_{20}-N_{32}	1,4426	C_{21}-O_6 1,4059	C_{25}-O_{22} 1,4072
C_{21}-O_{15}	1,4086	C_{30}-O_{20} 1,3987	C_{26}-O_{10} 1,4060
		C_{19}-O_{22} 1,4080	C_{27}-O_{21} 1,4273
		C_{17}-C_{36} 1,5418	C_{28}-C_{37} 1,5397
		C_{36}-O_{37} 1,4189	C_{37}-O_3 1,2124
		O_{37}-C_{38} 1,4169	C_{37}-O_4 1,3472
		C_{38}-C_{39} 1,5191	
		C_{39}-O_3 1,2145	
		C_{39}-O_{46} 1,3551	

Сравнение значений длин связей С-С позволяет отметить, что в концевых фрагментах исследованных молекулярных моделей они близки по величине к значениям, представленных в литературных данных [156]. Во внутренних фрагментах всех полимерных моделей длины связей С-С несколько выше по сравнению с литературными данными.

Анализ длин связей С-О показывает, что во внутренних фрагментах всех исследованных моделей эти связи соответствуют по значениям известным литературным данным [157], а по мере приближения этих связей к концевым фрагментам молекулярных моделей они становятся более короткими.

Значения основных валентных углов, представленные в таблице 3.2, указывают на трехмерное (неплоскостное) расположение исследованных молекулярных моделей: концевые звенья полимеров расположены под углами 100-112 градусов по отношению к внутреннему звену полимера.

Таблица 3.2 – Валентные углы в исследованных фрагментах молекул, град

Валентный угол	Хитозан	КМЦ	Альгиновая кислота
1	2	3	4
$C_{18}C_{17}C_{22}$	137,52	$C_{19}C_{20}C_{21}$ 106,63	$C_{24}C_{25}C_{26}$ 108,77
$C_{17}C_{18}C_{19}$	149,08	$C_{20}C_{19}O_{18}$ 112.54	$C_{25}C_{26}C_{27}$ 110,76
$C_{19}C_{20}C_{21}$	112,11	$C_{19}O_{18}C_{17}$ 113,65	$C_{26}C_{27}C_{28}$ 112,41
$C_{20}C_{21}O_{22}$	111,54	$C_{17}C_{18}C_{21}$ 110,31	$C_{27}C_{28}O_{23}$ 112,49
1	2	3	4
$C_{21}C_{20}N_{32}$	110,06	$C_{17}C_{18}O_{15}$ 105, 59	$C_{24}C_{28}C_{37}$ 112,75
		$O_{18}C_{17}C_{36}$ 106,12	$C_{25}C_{24}O_{13}$ 112,24

В таблице 3.3 представлены результаты расчетов энергетических характеристик: общих энергий ($E_{общ}$); энергий связывания ($E_{свз}$), стандартной энтальпии образования ΔH_f, энергий верхней занятой ($E_{ВЗМО}$) и нижней свободной молекулярных орбиталей ($E_{НСМО}$).

Таблица 3.3 – Энергетические характеристики в исследованных фрагментах молекул

Параметр	Хитозан	КМЦ	Альгиновая кислота
$E_{общ}$, ккал/моль	-160923,11	-228123,05	-187147,32
$E_{свз}$, ккал/моль	-6553,17	-8309,79	-6359,77
ΔH_f, ккал/моль	-540,31	-918,26	-797,48
$E_{ВЗМО}$, эВ	-9,60	-10,59	-10,75
$E_{НСМО}$, эВ	1,81	0,19	0,31

Анализ результатов, представленных в таблице 3.3, показывает, что все исследованные модели имеют отрицательные по знаку значения общих энергий ($E_{общ}$) и энергий связывания ($E_{свз}$).

Энтальпия образования, отражающая изменение энергии при образовании сложного вещества из простых веществ [157] и обеспечивающая устойчивость молекулы как структуры, для всех моделей имеет отрицательное значение, что свидетельствует об их достаточно высокой термодинамической устойчивости.

Для всех исследованных моделей характерны отрицательные по знаку значения энергии верхних занятых молекулярных орбиталей (ВЗМО) и положительные по знаку значения энергий нижних свободных молекулярных орбиталей (НСМО). Значительная разница между энергиями этих орбиталей (отрицательная по знаку) свидетельствует о достаточно высокой реакционной способности исследованных объектов.

В таблице 3.4 представлены результаты расчетов величин эффективных зарядов на атомах в исследованных моделях, представляющих собой разность между числом электронов, принадлежащих данному атому в химическом соединении, и числом электронов свободного атома. Данная характеристика позволяет определить реакционные центры в исследованных молекулах.

Таблица 3.4 - Зарядовые характеристики в исследованных фрагментах молекул, ед. зар.

Параметр	Хитозан	КМЦ	Альгиновая кислота
O_1	-0,3264	-0,3105	-0,2807
O_2	-0,3121	-0,3766	-0,4061
O_3	-0,2885	-0,3692	-0,3530
O_4	-0,3050	-0,3292	-0,2577
O_5	-0,3035	-0,3051	-0,2617
O_6	-0,3066	-0,3198	-0,3377
O_7	-0,3399	-0,3254	C_7 +0,3955
C_8	+0,0720	O_8 -0,2940	+0,3247
C_9	+0,0309	O_9 -0,2638	O_9 -0,2831
C_{10}	+0,0052	+0,0339	O_{10} -0,2911
N_{31}	-0,0211		
N_{32}	-0,0007		
N_{33}	-0,0359		
μ, D	2,32	4,18	8,19

Из таблицы видно, что потенциальным центром для атаки электрофильными агентами в исследованных моделях являются атомы кислорода, а потенциальными центрами для атаки нуклеофильными агентами являются атомы углерода. Эти данные однозначно указывают на потенциальную возможность их участия в образовании водородных и электростатических связях при формировании нанопленок с образованием мультислоев и адсорбции на поверхности твердых носителей.

Все исследованные модели имеют значения дипольных моментов, свидетельствующие о существенной асимметричности зарядового поля, что также

указывает на возможность электростатических взаимодействий со многими химическими соединениями.

Таким образом, квантово-химические исследования позволили обосновать использование вышеуказанных веществ в качестве полимерных матриц для получения биоактивных нанопленок с антибактериальными свойствами.

3.1.2 Квантово-химическое обоснование структурных и энергетических характеристик биоактивных реагентов

Совокупность экспериментальных данных в сочетании с литературными данными позволили нам выбрать перспективным антибактериальным агентом триклозан. Для установления активных центров молекулы триклозана в реакциях взаимодействия с полиэлектролитами были проведены квантово-химические расчеты энергетических характеристик триклозана. Предварительная оптимизация геометрии была проведена методом молекулярной механики ММ+. Для более корректной оптимизации геометрии и изучения реакционной способности, основных физических свойств был выбран метод РМ3, входящий в комплекс расчетных квантово-химических программ HyperChem версии 7. использовалось приближение Флэтчера-Ривса. В качестве дескрипторов реакционной способности исследованных молекул были взяты следующие электронные характеристики: общая энергия молекулярной системы ($E_{общ}$), стандартные энтальпии образования ($\Delta_f H^o$), энергии верхней занятой ($E_{ВЗМО}$) и нижней свободной ($E_{НСМО}$) молекулярных орбиталей, зарядовые характеристики (q) на гетероатомах и дипольные моменты (μ) молекул в целом. Значения указанных параметров представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Дескриптор реакционной способности молекулы триклозана

Дескриптор	$E_{общ}$, ккал/моль	$\Delta_f H^o$, ккал/моль	$E_{ВЗМО}$ эВ	$E_{НСМО}$ эВ	q,ед.заряда	μ, D
Триклозан	70690,53	-26,65	-8,665	-0,431	O_7-0,10 O_{14} -0,21 Cl_{15}0,07 Cl_{16}0,12 Cl_{17}0,08	0,508

Анализ значений дескрипторов, представленных в таблице 3.5, показывает, что исследованная молекулярная системы триклозана характеризуется значительным по абсолютной величине отрицательным значением общей энергией, что обусловлено значительным количеством электронов у таких атомов, входящих в состав этой молекулы, как хлор и кислород. Наблюдается значительные зарядовые характеристики на атомах хлора и кислорода, при этом атомы кислорода являются наиболее вероятными центрами электрофильной атаки.

Анализ энергий граничных орбиталей $E_{ВЗМО}$ и $E_{НСМО}$ ($E_{ВЗМО}$-$E_{НСМО}$) показывает для триклозана – 8,234 эВ. Это свидетельствует о том, что для исследованной молекулы характерны орбитально-контролируемые процессы. Отрицательный знак энергии НСМО для молекулы триклозана, несмотря на то, что существуют нуклеофильные (электронодонорные) центры–атомы кислорода, в

целом позволяет охарактеризовать его как электрофильного реагента, поэтому для него наиболее характерны процессы принятия «чужих» электронов на наинизшие вакантные (свободные) орбитали.

Особое значение приобретает в фармакологии выяснение потенциальных возможностей регулирования эффектов лекарства с использованием свойства многих фармакологических веществ вызывать те или иные изменения в организме. В связи с этим, с помощью программы Molinspiration были рассчитаны некоторые биологически активные свойства триклозана: липофильность, ингибиторная способность в отношении протеазы, киназы и энзимов. Эти свойства имеют особое значение при прогнозировании фармакологической активности новых антибактериальных свойств. Показатель липофильности (в нашем случае: miLogP), рассчитанный по программе Molinspiration, для триклозана (5,133). Это свидетельствует о его значительном сродстве к жирам и его биосовместимости к живому организму.

Не менее важным свойством химического соединения, как потенциального лекарственного вещества, является его ингибирующая способность по отношению к действию различных ферментов и белковых соединений. В частности, если соединение выступает в качестве ингибитора протеазы, то для него характерно проникновение в инфицированные вирусом клетки, блокирование активности вирусного фермента протеазы, препятствие распаду длинных цепей протеинов и энзимов на короткие звенья, используемые различными инфекциями, в том числе и вирусами ВИЧ для образования новых копий. Без них вирус дефектен и не может инфицировать клетку. Ингибиторы протеазы сильнее тормозят репликацию вируса, чем ингибиторы обратной транскриптазы. Расчет указанного выше показателя для триклозана составляет – 0,43 который однозначно указывает на способность молекул триклозана выступать в качестве ингибиторов протеазы.

Таким образом, проведенные расчеты для молекулы триклозана предполагают хорошую биосовместимость с организмом и способность этого соединения выступать в качестве ингибиторов энзимов и, следовательно, возможность его применение как потенциального и перспективного антибактериального агента в мультислоях.

Следующим перспективным антисептиком, характеристики которого были рассчитаны квантовохимическими методами, был хлоргексидин. В химическом отношении хлоргексидин является дихлорсодержащим производным бигуанида. По структуре весьма близок к бигумалю. Механизм действия хлоргексидина заключается во взаимодействии с фосфатными группами на поверхности клетки, вследствие чего возникает смещение осмотического равновесия, нарушение целостности и гибель клеток бактерий. С целью выявления особенностей геометрического и электронного строения хлоргексидина были рассчитаны его основные дескрипторы реакционной способности, а также соответствующие дескрипторы двух его бромзамещенных производных. Некоторые из межатомных расстояний в модельных молекулах (те, на которых в наибольшей степени сказалось замещение атома хлора, на атомы брома) представлены в таблице 3.6 Точность расчетов межатомных расстояний составляет 0,02 Å.

Таблица 3.6 – Межатомные расстояния в исследованных модельных молекулах

Межатомное расстояние, Å	Хлоргексидин	Монобромзамещенное соединение	Дибромзамещенное соединение
r (C-Cl_1)*)	1,68	1,76	-
r (C-Cl_2)	1,69	-	-
r (C-Br_1)	-	1,91	1,87
r (C-Br_1)	-	-	1,87
r (C_{ap}-N_1)	1,45	1,40	1,45
r (C-N_2)	1,29	1,52	1,29
r (C-N_3)	1,45	1,40	1,46
r (C_{ap}-N_4)	1,45	1,40	1.45
r (C-N_5)	1,46	1,40	1,45
r (C-N_6)	1,29	1,52	1,29

Из таблицы видно, что расстояния между ароматическими атомами углерода и связанными с ними атомами хлора в молекуле хлорбензидина практически одинаковы (1,68 и 1,69 Å, соответственно), что свидетельствует об одинаковой прочности данных связей. При замене одного из атомов хлора на атом брома связь между ароматическим атомом углерода с оставшимся атомом хлора слабеет, что приводит к увеличению соответствующего межатомного расстояния, а это позволяет предположить о возможности увеличения химической активности этого атома хлора. Расстояние между ароматическим атомом второго бензольного кольца и атомом брома, замещающим атом хлора, имеет значение 1,91 Å, что указывает на более слабую связанность с бензольным кольцом атома брома по сравнению с атомом хлора. Так как бром также является биоактивным компонентом, то можно предположить, что это соединение будет проявлять более сильные антибактериальные свойства. Замена двух атомов хлора на атомы брома приводит к стабилизации прочности связей атомов брома с разными бензольными кольцами, так как наблюдающиеся между этими атомами и атомами углерода бензольных колец межатомные расстояния становятся одинаковыми и равными 1,87 Å.

В молекулах, содержащих по два атома хлора или брома, наблюдается полное совпадение расстояний между атомами углерода и связанными с ними атомами азота. В модельной молекуле, в которой с разными бензольными кольцами связаны либо атом хлора, либо атом брома, рассматриваемые расстояния отличаются от аналогичных в молекулах с одинаковыми атомами галогенов: одни из них становятся короче, другие – длиннее. Последние производные хлоргексидина, вероятно, будут обладать более сильными антибактериальными свойствами.

Характеристики внутренней части исследованных молекул не зависят от замещения атомов хлора на атомы брома из-за их удаленности от места замены. Таким образом, анализ межатомных расстояний показывает, что введение в молекулу хлоргексидина одного или двух атомов брома приводит к ослаблению связи последних с бензольными кольцами в исследованных молекулах, что со-

ответствует уменьшению ковалентности и увеличению ионности связи между ароматическим углеродом и атомами брома. Это должно способствовать увеличению растворимости бромзамещенных молекул в воде по сравнению с хлоргексидином, что может оказать положительное влияние на их фармакологические свойства.

В качестве дескрипторов реакционной способности исследованных молекул были взяты следующие электронные характеристики: общая энергия молекулярной системы ($E_{общ}$), стандартные энтальпии образования ($\Delta_f H^o$), энергии верхней занятой ($E_{ВЗМО}$) и нижней свободной ($E_{НСМО}$) молекулярных орбиталей, зарядовые характеристики (q) на гетероатомах и дипольные моменты (μ) молекул в целом. Значения указанных параметров представлены в таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Дескрипторы реакционной способности молекул хлоргексидина и его бромзамещенных

Дескриптор	Хлоргексидин	Монобромзамещенное соединение	Дибромзамещенное соединение
E_{tot}, ккал/моль	-122772,51	-123617,73	-124462,45
$\Delta_f H^o$,ккал/моль	98,84	112,59	126,82
$E_{ВЗМО}$, эВ	-9,24	-8,99	-9,18
$E_{НСМО}$, эВ	-0,51	-0,39	-0,38
q (C_6)	-0,100	-0,087	-0,122
q (Cl_7)	0,079	0,069	q (Br_7) 0,002
q (C_3)	-0,095	-0,081	-0,073
q (N_{10})	-0,207	-0,139	-0,140
q (N_{11})	0,049	0,010	0,010
q (C_{25})	-0,090	-0,074	-0,073
q (N_{26})	-0,175	-0,165	-0,171
q (N_{27})	0,086	0,083	0,083
q (C_{33})	-0,081	-0,126	0,112
q (Cl_{34})	0,079	q (Br_{34})0,008	q (Br_{34}) 0,008
μ, D	1,153	2,133	2,411

Анализ значений дескрипторов, представленных в таблице, показывает, что исследованные молекулярные системы характеризуются значительными по абсолютной величине отрицательными значениями общих энергий ($E_{общ}$), что обусловлено значительным количеством электронов у таких атомов, входящих в состав молекул, как хлор и бром. При сравнении данных характеристик наблюдается следующая закономерность: по мере замещения атомов хлора на атомы брома значение рассматриваемого параметра по абсолютной величине возрастает. Для исследованных модельных молекул характерна положительная по знаку энтальпия образования ($\Delta_f H^o$), которая дает вполне корректную информацию о термодинамической стабильности. Как показывает анализ значений данной характеристики, термодинамическая устойчивость данных систем уменьшается при переходе от незамещенного хлоргексидина к его бромсодер-

жащим производным по мере увеличения числа атомов брома, замещающих атомы хлора. Об этом свидетельствует возрастающие по абсолютной величине значения стандартной энтальпии образования исследованных моделей.

Замещение атомов хлора на атомы брома в молекуле хлоргексидина приводит также к заметному изменению зарядовых характеристик. Так, замена одного из атомов хлора на атом брома приводит к следующей зарядовой картине: отрицательный заряд на ароматическом атоме углерода, с которым связан оставшийся атом хлора, понижается по абсолютной величине. При замене этого атома хлора на атом брома рассматриваемый ароматический атом углерода, наоборот, становится более электроотрицательным, и потому может быть активным центром электростатического взаимодействия с полимерными матрицами в мультислоях.

Заряды на атомах азота, связанных непосредственно с бензольными кольцами и присутствующими в них в качестве заместителей атомами галогенов, имеют отрицательное по величине значение. Причем по абсолютной величине, значения этих зарядов достаточно значительны и расположены в интервале от $|0{,}1395|$ до $|0{,}2066|$ ед. заряда. Эти результаты однозначно указывают, что атомы азота могут быть потенциальными центрами электростатического взаимодействия в полислоях или участвовать в образовании водородных связей с полиэлектролитами в бислоях полученных пленок.

Для исследованных молекулярных систем рассчитаны дипольные моменты, которые имеют следующие значения в D: 1,153 (хлоргексидин); 2,133 (его монобромзамещенное) и 2,411 (дибромзамещенное соединение). Сравнивая эти значения с дипольными моментами известных растворителей, например: μ (H_2O) = 1,83 D, μ (CH_3OH) = 1,69 D, которые относятся к полярным растворителям, можно отметить, что все исследованные системы имеют полярную природу и будут растворимы в полярных растворителях, в частности в воде. Данный факт, вытекающий из сравнительного анализа величин дипольного момента, является очень важным показателем для оценки фармакологической активности хлоргексидина и его бромзамещенных, так как позволяет прогнозировать их взаимодействия в биосистемах.

Важную роль в определении реакционной способности играют такие дескрипторы, как энергии граничных молекулярных орбиталей – высшей занятой и нижней свободной ($E_{ВЗМО}$ и $E_{НСМО}$), поэтому для исследованных моделей были рассчитаны эти характеристики. Из рассмотрения данных характеристик следует, что отрицательный знак энергии НСМО во всех исследованных системах, несмотря на то, что в них существуют нуклеофильные (электронодонорные) центры – атомы азота, в целом позволяет охарактеризовать эти системы как электрофильные реагенты, поэтому для них наиболее характерны процессы принятия «чужих» электронов на наинизшие вакантные (свободные) орбитали.

Исходя из разницы в энергиях ВЗМО и НСМО ($E_{ВЗМО}$ - $E_{НСМО}$), так называемой «энергетической щели», которая составляет в эВ: для хлоргексидина - 8,73; для монобромзамещенной формы - 8,60; для дибромзамещенной формы - 8,80; можно сделать вывод о том, что для исследованных систем характерны орбитально-контролируемые процессы, т.е. те процессы, которые лимитируют-

ся особенностями электронного строения. Это подтверждает вывод, сделанный выше из анализа энергии НСМО.

Кроме того, знание значений энергий ВЗМО и НСМО позволяет определить «жесткость» или «мягкость» ($\eta = (E_{ВЗМО} - E_{НСМО})/2$) исследованных молекул. Как показывает расчет показатель η для всех исследованных молекул по величине более 1 эВ, что позволяет сделать вывод о том, что все изученные молекулярные системы являются «жесткими» реагентами и могут быть использованы для получения перспективных модифицированных препаратов для фармтехнологии.

3.2 Установление условий получения активных поверхностей носителя для нанопокрытий

Используемые в медицине имплантаты, при контакте с кислородом, естественным образом покрываются оксидным слоем, толщиной 3-10 нм, характеризующиеся низкой химической активностью а также влияющим на биосовместимость и шероховатость [158]. Однако, как было сказано выше, не все имплантаты могут противостоять жестким условиям организма, и следовательно, в скором времени выходят из строя. Кроме того, причиной отторжения имплантатов может стать недостаточная интеграция с костной тканью или инфекции. Таким образом, для продления срока действия имплантатов в организме следует покрывать их антибактериальными и противовоспалительными средствами, предварительно активировав поверхность. Так как поверхностный химический состав имплантатов играет большую роль для предотвращения адгезий, существуют различные физические и химические методы активации.

Физические методы модификации поверхности включают механическое осаждение из газовой фазы, облучение ионными пучками, методы литографии и плазменной обработки. Химические методы считаются наиболее известными и эффективными способами модифицирования поверхностей имплантатов. К таким методам относятся кислотное травление, перекисное окисление, щелочную обработку, анодное окисление, включение функциональных молекул посредством ковалентной сшивки, химическое осаждение из газовой фазы и гидротермальная обработка [159]. Однако, эти способы неудобны для практического применения из-за сложности процедур, применения вредных химических веществ или крупномасштабного производственного оборудования. Кроме того, одним из распространенных методов подготовки является плазменная активация, которая требует для получения активной поверхности использования очень чистых газов (99,99 %), таких как кислород и аргон, что не всегда осуществимо в обычных условиях [160]. Цель всех методов в целом заключается в увеличении гидрофильности, так как при взаимодействии с биологическими жидкостями, клетками и тканями организма гидрофильные поверхности являются более активными, чем гидрофобные [161-163]. Авторами в работе [164] показано, что гидрофильная поверхность, подвергнутая пескоструйной обработке и кислотному травлению, дает более высокий контакт кости к имплантату, чем обычная стандартная поверхность. В работе для этой цели

проведено травление титановых имплантатов с использованием 25 % раствора HF, с последующей пассировкой 25 % раствором HNO_3.

Некоторыми исследователями, для прогрессирования клеточной адгезии, использованы одноэтапные процедуры, такие как плазменное напыление, кислотное травление или плазменное электролитическое окисление [165, 166], позволяющие изменить шероховатость поверхности и образовывать оксидную пленку.

Так как целью научных исследований является установление условий получения эффективных антибактериальных покрытий для медико-биологических изделий, важным этапом работы является подготовка активной поверхности как модельных, так и используемых материалов имплантируемых изделий.

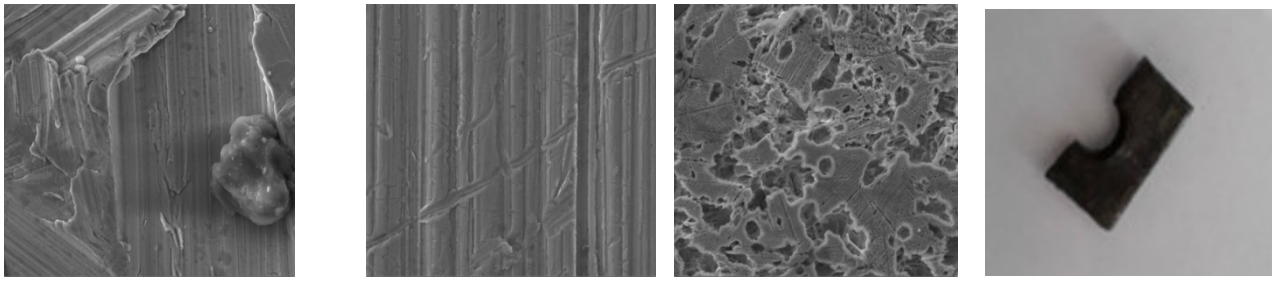
В современной медицине используются имплантаты из различных материалов, отличающиеся друг от друга химической природой, физическими характеристиками, и поэтому для них применяются различные методы активации. Для получения антибактериальных покрытий для конкретного медицинского изделия, важным требованием является получения развитой поверхности, которая бы обеспечивала хорошую «сцепляемость» химических реагентов с основой материала. С этой целью надо добиться изменения морфологии и угла смачивания поверхности до и после активации. Кроме того, как уже известно, поверхность любой подложки достаточно не развита, и поэтому адсорбция полиэлектролитов приводит к образованию дефектов за счет физической адсорбции.

В результате анализа различных методов травления поверхностей титановых и стальных имплантатов были выбраны растворители на основе неорганических (раствор «пиранья») и органических веществ. Обработка органическими растворителями включает в себя полировку наждачной бумагой с дальнейшей промывкой последовательно ацетоном и этиловым спиртом.

На рисунке 3.1 показаны особенности поверхностной морфологии подложек на снимках СЭМ.

Как видно из рисунка 3.1 (а, б) после механической обработки и травления органическими растворителями на поверхности стальных подложек не наблюдается отличительных изменении, а в случае травления раствором «пиранья» (рисунок 3.1 (в)) отчетливо видны образованные микротрещины, что создает благоприятные условия для адсорбции гидрофильных полимеров на поверхности подложки. Такие изменения связаны с тем, что серная кислота, которая входит состав раствора «пиранья», растворяет оксидную пленку и тем самым исключает процесс полировки поверхности. Пероксид водорода, является «поставщиком» атомарного кислорода, который окисляет органические и неорганические примеси, находящиеся на поверхности образцов. Из этого следует, что такая одноэтапная активация дает возможность изменить топографические характеристики поверхности, тем самым перекрывая все недостатки обработкой органическими растворителями, которая состоит из нескольких последовательных этапов. Однако, это не исключает потенциальное использование метода активации с органическими растворителями, так как этот

подход может быть полезным при адсорбции и иммобилизации гидрофобных веществ, а также когда не требуется полного удаления оксидной пленки.



а) б) в) д)

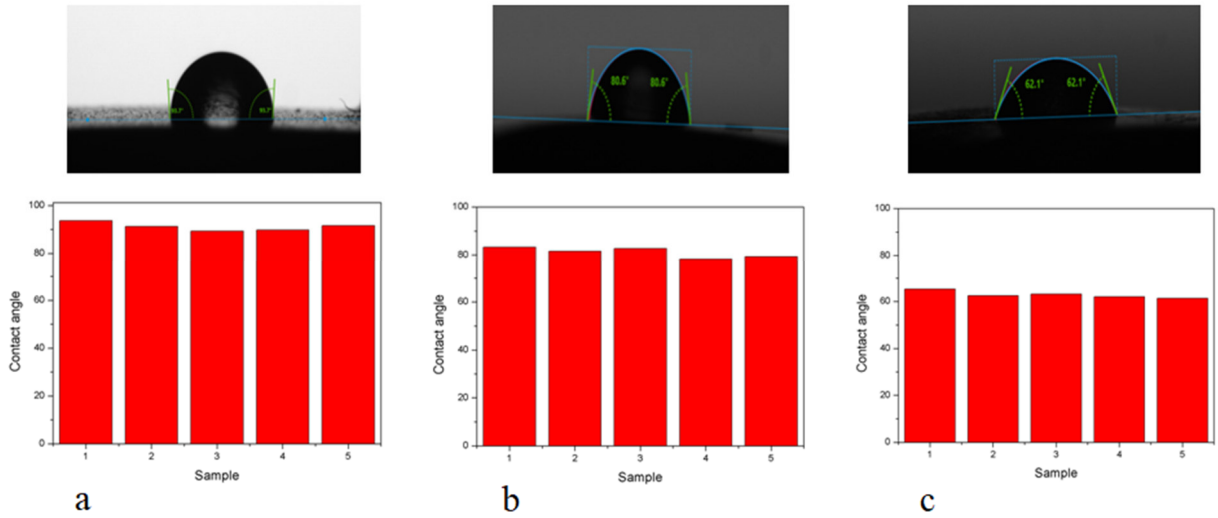
а) после полировки наждачной бумагой; б) после травления органическими растворителями с последующей обработкой в ультразвуковой ванне; в, д) после травления раствором «пиранья».

Рисунок 3.1 – Топографические изображения СЭМ поверхностей стальных подложек

Изменение физико-химических характеристик поверхности отслеживали измерением угла смачивания поверхности, после каждой обработки растворами, методом лежащей капли (рисунок 3.2). Из-за неоднородности поверхности реальных стальных имплантатов определение угла смачивания проводили на 5 точках.

Как показано на рисунке 3.2 (а) до травления угол смачивания стальных имплантатов находился в интервале 89-93,7°. Активация поверхности привела к обеспечению более высокой гидрофильности в двух тестируемых различных методов обработки. Травление поверхности имплантатов органическими растворителями, с последующей обработкой в ультразвуковой ванне, (рисунок 3.2 (б)) и раствором «пиранья» уменьшило значение угла смачивания до 70-80,6° и ~62° (рисунок 3.2 (с)), соответственно.

В качестве модельных образцов для получения нанопокрытий были применены кремниевые пластины. Так как по химической природе кремний отличается от материала имплантатов. Главная цель очистки поверхности является удаление естественной пленки SiO_2 и избавление от поверхностных водородных связей. Как известно, поверхность монокристаллических кремниевых пластин, за счет долгого хранения на открытом воздухе, покрывается слоем естественного окисла, толщина которого может увеличится до ~ 15 нм, в зависимости от условия хранения [167]. Также могут существовать силанольные группы с водородными связями. Эти же группы являются активными центрами адсорбции механических примесей, органических веществ. Если полностью не удалить продукты адсорбции, то это в дальнейшем приведет к отслаиванию пленок, что может сильно повлиять на механическую прочность и адгезию.

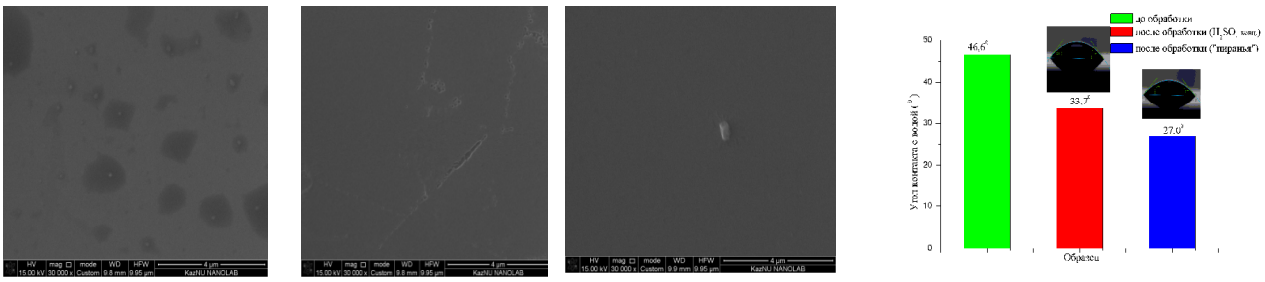


a) поверхность стальных имплантатов до обработки; b) поверхность после травления органическими растворителями с последующей обработкой в ультразвуковой ванне; c) поверхность после травления раствором «пиранья».

Рисунок 3.2 –Угол смачивания поверхности

В настоящее время существуют различные методы очистки поверхности кремниевых пластин, отличающиеся по агрегатному состоянию, такие как «сухой» и «жидкий» [168]. Например, одним из самых распространенных путей решения проблемы является использование раствора «КАРО», который представляет собой смесь NH_4OH и H_2O_2. Однако, недостаток использования «КАРО» заключается в уменьшении концентрации аммиака в ходе применения, из-за его летучести. Поэтому в работе для очистки были использованы растворы пиранья и H_2SO_4 (конц.), который имеет большой «редокс»-потенциал. Результаты по влиянию очистки на топографию показаны на рисунке 3.3.

Из рисунка 3.3 (а) можно наблюдать образование неровной оксидной пленки и наличие неких адсорбированных частиц на поверхности кремниевых пластин, которые могут затруднять адсорбцию водорастворимых полимеров за счет низкой энергии связывания. Рисунок 3.3 (б, в) показывает снимки поверхности после обработки H_2SO_4 (конц.) и раствором «пиранья», соответственно. Как и следовало, ожидать, раствор «пиранья» дает возможность полностью удалить загрязнители. В случае очистки концентрированной серной кислотой на поверхности можно наблюдать участки с дефектами. Однако, это не исключает потенциальной возможности применения данной кислоты. Также был определен угол смачивания всех образцов для апробации проведенного эксперимента. Как и следовало ожидать, после очистки раствором «пиранья» значение угла смачивания водой составит 27,0°. Для образцов, очистка которых была проведена с использованием серной кислоты, данное значение составило 33,7°, что может быть результатом неполного удаления органических жиров.



а) б) в) г)

а) до очистки; б) после обработки концентрированной серной кислотой; в) после обработки раствором «пиранья»; г) изменение гидрофильности.

Рисунок 3.3 – Топографические изображения СЭМ поверхностей кремниевых пластинок

Таким образом, нельзя исключать недостаток использования раствора «пиранья» и H_2SO_4 (конц.), заключающийся в том, что атомарный кислород и вода могут образовать оксидную пленку, если не использовать HF, а в свою очередь серная кислота не полностью удаляет органические жиры. Также, следует обратить внимание на то, что при работе с раствором «пиранья» требуется особое обращение при приготовлении (необходимо строго соблюдать соотношение) и применении, хотя эта смесь значительно уменьшает время обработки и не требует нейтрализующего агента.

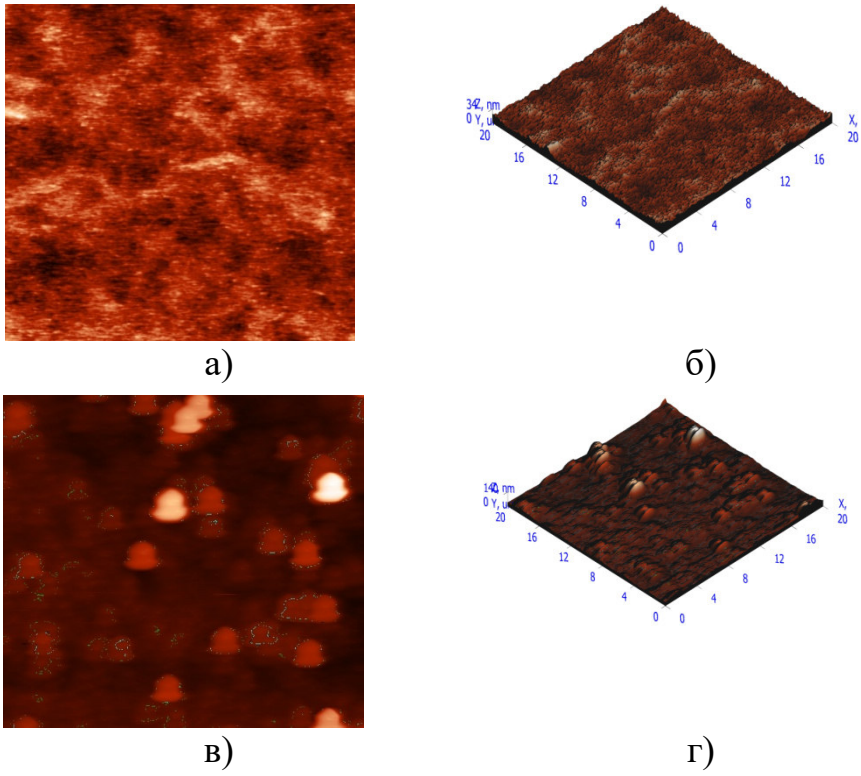
Таким образом, из вышеизложенного ясно, что подготовка поверхности является одним из ответственных и главных этапов получения равномерных нанопокрытий в виде мультислоев. Для титановых, стальных и кремниевых образцов наиболее приемлемы обработка раствором серной кислоты с добавлением перекиси водорода. Полученные в результате обработки многочисленные микротрещины являются активными центрами и согласно теории Тейлора, способствуют хорошей и равномерной адсорбции функциональных групп полиэлектролитов.

Поскольку в исследованиях также были использованы стеклянные подложки, было интересным оценить адгезию подложек из стекла и кремния. Однако, данная характеристика не была определена для реальных медицинских имплантатов, применяемых для проведения эксперимента, так как их количество было ограничено.

На основании техники погружения были получены покрытия толщиной 5 бислоев на основе ХЗ/КМЦ и проведена оценка адгезии разных подложек из стекла и кремниевых пластинок. С использованием АСМ анализа проведено сканирование морфологии поверхности подложек с слоями, а также определены значения средней квадратической шероховатости.

На рисунке 3.4 показана эволюция рельефа поверхности пленок, собранных на стекле (рисунок 3.4(а, б)) и кремниевых пластинках (рисунок 3.4 (в, г)) при pH=4. Сравнивая трехмерные изображения АСМ (рисунок 3.4 (б, г)), можно заметить, что в обоих случаях на поверхности присутствуют неровности в

виде пиков, причем поверхности отличаются как по высоте пиков, так и по формам и природе распределения пиков. Это связано с индивидуальными характеристиками поверхностей, что и приводит к образованию неоднородных слоев, и развитию морфологии в виде островков, случайно сформированных при росте первых бислоев. На стеклянных пластинках образуются монослои из отдельных глобулярных частиц, на кремниевых пластинах видны островки отличающиеся по высоте и распределению. Значения среднеквадратичной шероховатости пленок на стекле и кремниевых пластинках составили 3,5 и 15,0 нм, соответственно. Это доказывает то, что кремниевые подложки имеют лучшую адгезию по сравнению со стеклом.



а) б)

в) г)

а, б) собранных на стекле; в, г) собранных на кремниевых пластинках.

Рисунок 3.4 – 2D и 3D АСМ изображения поверхностей ПЭМС покрытий $(ХЗ/КМЦ)_5$, собранных при pH=4

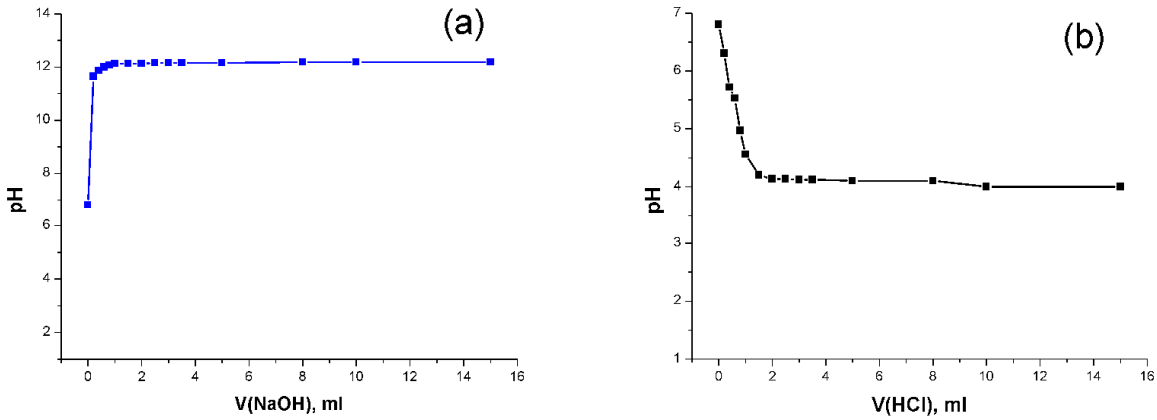
Из этого следует сделать вывод о том, что поверхность стекла менее подвержена адгезии по сравнению с кремниевой пластинкой. Так как кремниевые пластины возможно имеют большее количество активных центров для адсорбции, то при получении первого монослоя поверхность притягивает больше заряженных групп, тем самым предоставляя активные центры для следующего слоя и создавая один толстый бислой. Однако, нужно иметь в виду, что адсорбция полиэлектролитов на поверхности кремниевых пластинок не идет равномерно, но несмотря на это, для различных целей можно использовать эти подложки, которые могут отличаться друг от друга различной адгезионной способностью. Например, авторами в работе [97] показана важность природы подложки при нанесении на ее поверхность квартернизированный поли (4-

винилпиридин) и карбоксиметилцеллюлозу (Q-ПВП/КМЦ). При этом, в зависимости от вида подложки, первый адсорбированный слой имеет разные конформации.

3.3 Установление условий получения нанопокрытий методом LbL

Из данных литературного обзора ясно, что на основе полиэлектролитов можно получать качественные функциональные покрытия. В данной работе из полиэлектролитов нами были выбраны хитозан, натрий карбоксиметилцеллюлоза и полиакриловая кислота как наиболее биосовместимые полисахариды, которые обладают кислотно-основными свойствами и могут потенциально быть использованы для получения мультислоев с нужными химико-биологическими характеристиками.

На начальном этапе цель наших исследований заключалась в научно-обоснованном выборе подходящих полиэлектролитов путем изучения влияния pH на их водные растворы. Для исследования рабочей области полиэлектролитов было проведено потенциометрическое титрование водных растворов выбранных полиэлектролитов (с концентрацией $C=1\cdot10^{-2}$ моль/л) гидроксидом натрия и соляной кислотой (C = 1 н) при комнатной температуре и температуре человеческого тела. Результаты потенциометрического титрования раствора КМЦ при комнатной температуре показаны на рисунке 3.5. Аналогичные результаты получены и при температуре человеческого тела (36-37 °C).

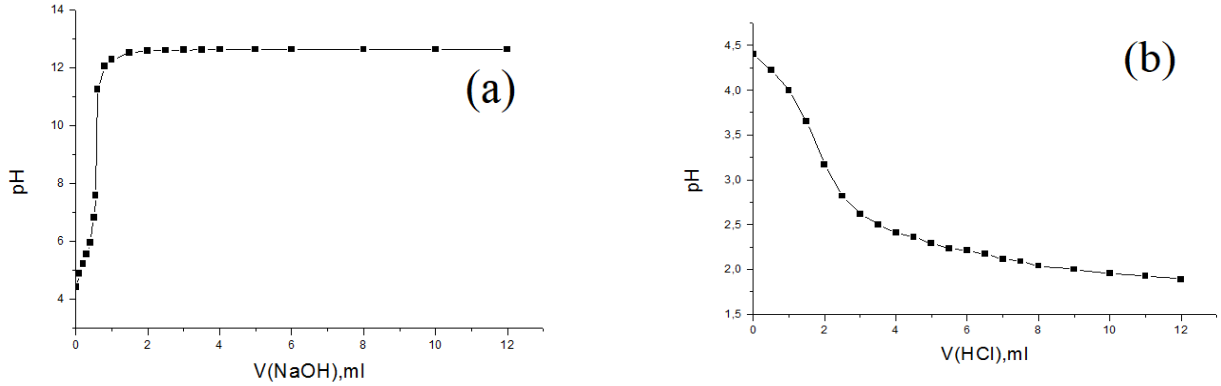


a) NaOH; b) HCl.

Рисунок 3.5 – Потенциометрическое титрование КМЦ

В ходе титрования раствором NaOH после добавления 0,2 мл щелочи в раствор КМЦ происходит резкий скачок pH до 11,65. Дальнейшее титрование приводит к незначительному изменению pH, однако это не указывает на сокращение рабочей области полианиона, так как кривые титрования полиэлектролитов отличаются от низкомолекулярных соединений. Также следует отметить, что практически во всей области pH не наблюдается образование какого-либо осадка, при этом КМЦ находился в растворимой форме. Это позволяет проводить научные исследования практически во всем интервале pH.

Аналогичные исследования проведенные с использованием хитозана (рисунок 3.6) показали, что при pH≥7 образуется муть, что связано, вероятно, с выпадением в осадок самого хитозана. Тем не менее, при титровании раствором соляной кислоты не наблюдалось никаких внешних изменении цвета раствора, и выраженного скачка титрования, что дает возможность работать с хитозаном в кислой среде.



a) NaOH; b) HCl.

Рисунок 3.6 – Потенциометрическое титрование хитозана

Таким образом, кривые титрования, полученные при двух температурах, указывают на то, что форма нахождения молекул КМЦ практически не изменяется, рабочая область, пригодная для получения мультислоев, включает весь исследованный интервал pH, влияние температуры несущественно; рабочая же область для хитозана находится в интервале pH=2-7.

Продолжением дальнейших исследований было изучение возможности взаимодействия хитозана и КМЦ. С этой целью было исследовано влияние pH и ионной силы раствора на свойства двойную систему хитозан (ХЗ)-карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), состояние двойной системы контролировали с помощью измерения оптической плотности раствора; полученные результаты приведены в таблице 3.8.

Результаты опытов показали, что выпадения осадка в двойной системе не наблюдалось, т.е. между реагентами происходит взаимодействие с образованием растворимого комплекса, состав которого не зависит от ионной силы раствора. Зависимость оптической плотности от pH представлена на рисунке 3.7.

Таблица 3.8 – Влияние pH и ионной силы раствора на двойную систему ХЗ - КМЦ при температуре 25 °С

ХЗ, 0,01М	КМЦ, 0,01М	HCl, 0,1М (мл)	NaOH, 0,25М	pH	A
1	2	3	4	5	6
5	5	-	-	4,20	0,625
5	5	-	2,00	5,50	0,435
5	5	0,50	-	4,10	0,535

Продолжение таблицы 3.8

1	2	3	4	5	6
5	5	1,00	-	3,90	0,520
5	5	2,50	-	2,80	0,311
5	5	3,50	-	2,50	0,135
5	5	4,50	-	2,00	0,058
5	5	5,50	-	1,75	0,011

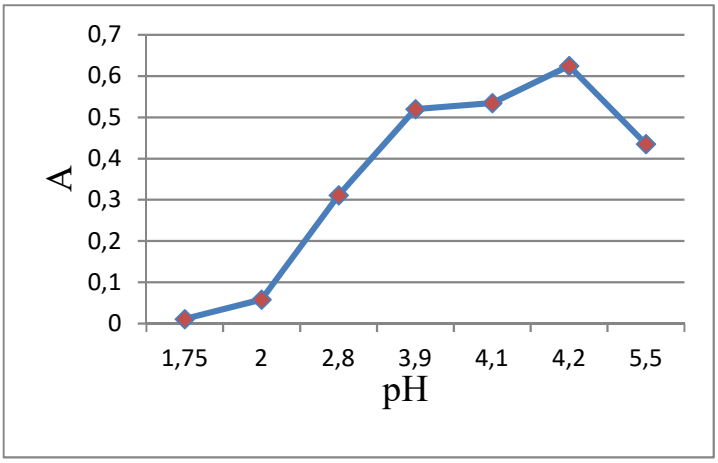


Рисунок 3.7 – Зависимость оптической плотности от pH

На основании экспериментальных данных можно утверждать, что между полиэлектролитами имеется кислотно-основное взаимодействие и в области pH=4-4,2 образуется комплекс между хитозаном и карбоксиметилцеллюлозой. Химизм формирования двойного комплекса носит, вероятно, чисто электростатический характер, что очень важно для установления условий получения нанопленок на их основе.

Таким образом проведенные физико-химические исследования позволили нам на основании выбранных полиэлектролитов разработать условия получения мультислоев на поверхности твердых подложек.

Метод LbL, разработанный Декером и его колегами [39], привлекает большое внимание, так как с помощью простого в лабораторном отношении метода, можно получить тонкие, но прочные пленки с перестраиваемой архитектурой (составом пленки и микроструктурой). Кроме того, пленки, методика получения которых в значительной степени не зависит от природы и размера подложки, нашли широкое применение при разработке антибактериальных покрытий для медицинских имплантатов. Для этой цели использование, именно, полиэлектролитов выгодно с точки зрения хорошей адгезии слоя с нижележащей поверхностью подложки или пленки за счет наличия определенного количества ионных или водородных связей функциональных групп полимерных матриц и нанесенных антибактериальных агентов.

Общая методология получения нанопленок методом мультислойной сборки можно представить в виде следующей схемы, рисунок 3.8.

Как уже упоминалось ранее в разделе 3.2, поверхности подложек недостаточно активны для нанесения покрытий, поэтому, сначала ее необходимо активировать одним из предложенных выше методов. Далее, поверхность покрывается слоем линейного полиэтиленимина (ПЭИ) для придания поверхности заряда, так как данный полимер широко используется в качестве «мостикового» агента. В результате нанесения ПЭИ на вновь образованной поверхности возникают положительно заряженные потенциальные центры. Далее образование следующего слоя в водных растворах, содержащих полианионы (КМЦ или ПАК), показано на рисунке 3.9. За счет карбоксильных групп, которые приобретают отрицательный заряд, полианион притягивается к поверхности ПЭИ и тем самым создает один монослой.

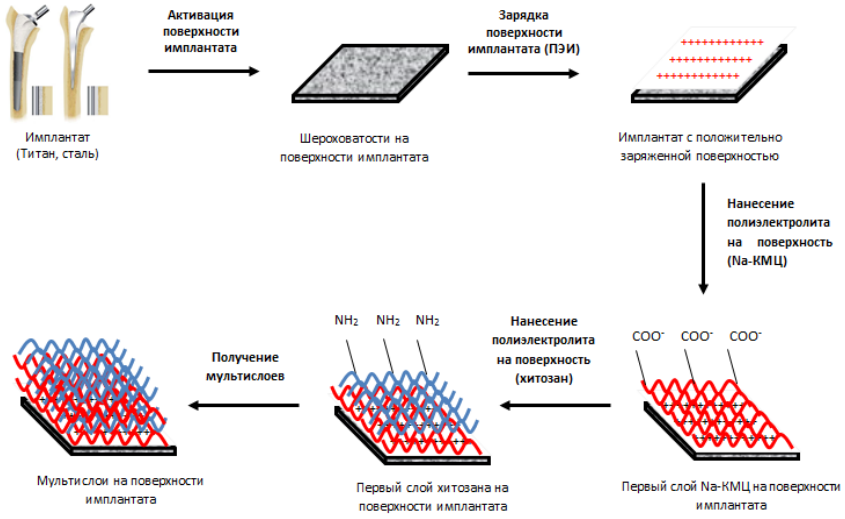


Рисунок 3.8 – Схема получения полиэлектролитных мультислойных покрытий на поверхности твердых подложек

На следующем этапе на поверхность, порытую полианионами наносятся поликатионы из хитозана. Как известно, свободные аминогруппы -NH_2 поликатиона в водном растворе протонированы за счет связывания с H^+ и тем самым приобретают положительный заряд -NH_3^+ (рисунок 3.9). В результате электростатического связывания поликатионов с поверхностными полианионами образуется один бислой. Циклическое повторение обеих стадий адсорбции приводит к образованию многослойных структур. Механизм формирования мультислоев определяется кислотно-основным взаимодействием между функциональными группами поликислот и полиоснований, которое сопровождается электростатическим взаимодействием (рисунок 3.10).

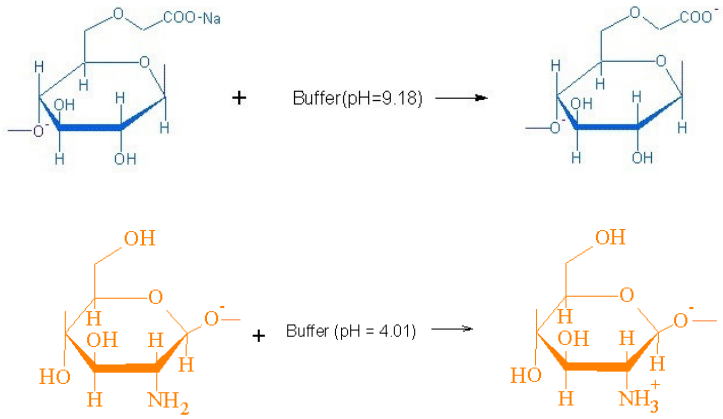


Рисунок 3.9 – Появление зарядов на макромолекулах полиэлектролитов в водном растворе при определенных значениях pH

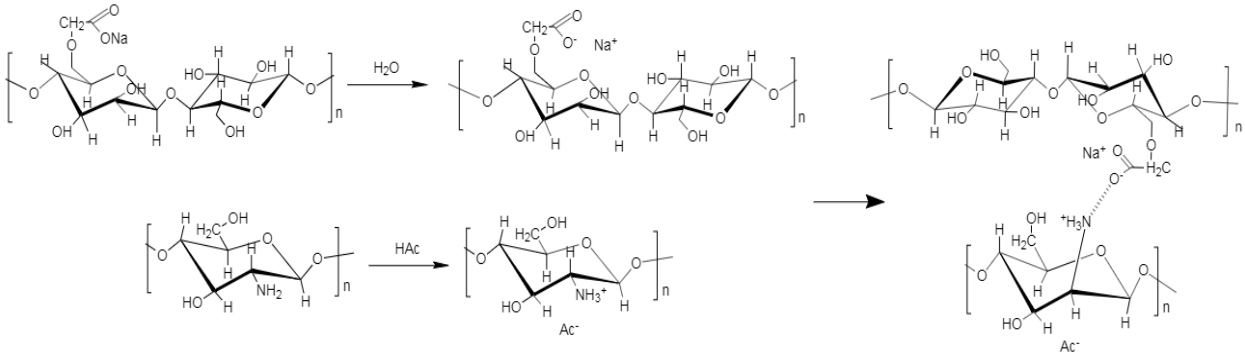


Рисунок 3.10 – Электростатическое взаимодействие между функциональными группами хитозана и натрий карбоксиметилцеллюлозой

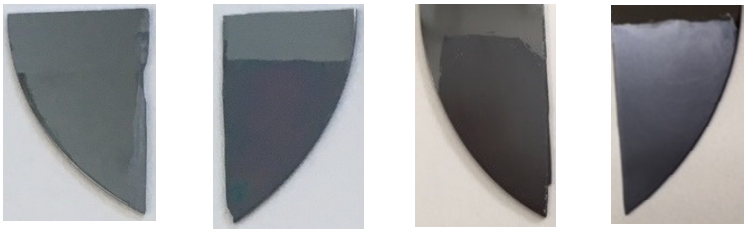
При этом, существенную роль могут играть и водородные связи образующиеся между гидроксильными группами. Однако, кислотно-основное взаимодействие, которое возникает между противоположно заряженными молекулами, по-видимому, является основной движущей силой процесса молекулярного наслаивания, так как является дальнодействующим и не накладывает стерических ограничений при образовании химических связей.

Несмотря на кажущуюся простоту технологии метода LbL, на процесс сборки влияют различные параметры, такие как концентрация полиэлектролитов, время адсорбции одного монослоя и методика реализации метода LbL.

Для получения тонких пленок в нашей работе был использован метод погружения. Получение ПЭМС проводили двумя различными способами: а) автоматическим погружением и выниманием подложки с заданной скоростью (0,001 м/с) без перемешивания; б) ручным погружением подложки в раствор с перемешиванием (рисунок 3.11).

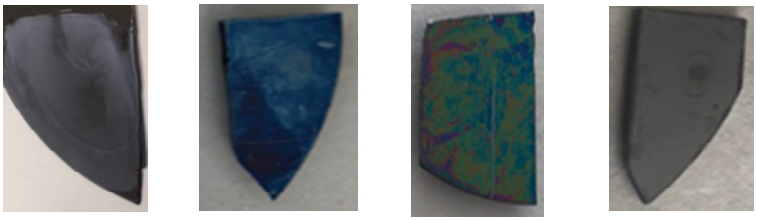
Процесс получения тонких пленок двумя способами проводили при одинаковых условиях (pH и концентрация) для оценки влияния методики на процесс самосборки. Покрытия первого типа (рисунок 3.11 (а)) были получены с помощью полуавтоматического метода погружения, в ходе которого

подложки погружаются (и вынимаются) в раствор (и раствора) с заданной скоростью и выдерживаются в растворе в течение определенного времени без перемешивания. Предполагается, что случайные соударения частиц с подлодкой приводят к равномерному закреплению молекул полиэлектролитов на поверхности твердой подложки. В этом методе важным моментом является выбор скорости погружения и вынимания подложки, так как при высоких скоростях (>0,001 м/с) раствор быстро стекает с поверхности подложки и последующая сушка приведет к неравномерному распределению слоя полиэлектролита и к неровностям на поверхности. При скорости вынимания и погружения менее <0,001 м/с по краям твердой подложки застывают капли раствора, что при дальнейшем наслаивании приводит к получению грубого покрытия на краях подложки.



5 10 15 30

а)



5 10 15 30

б)

а) полуавтоматическое погружение; б) ручное погружение.

Рисунок 3.11 – Покрытия ХЗ/КМЦ, содержащие разное количество бислоев (от пяти до тридцати), полученных двумя видами погружения

Так как качество пленок и однородность их поверхности играют важную роль при высвобождении антибактериального препарата, то необходимо выбрать условия нанесения покрытий. Было экспериментально установлено, что оптимальная скорость погружения исследуемых образцов составляет ~ 0,001 м/с. Результаты исследований показали, что внешний вид покрытий, полученных в этих условиях, свидетельствует о монотонном росте однородной пленки, являющейся результатом равномерного наслаивания. При ручном перемешивании наблюдается неравномерное распределение слоя по поверхности и мультислои имеют различную окраску вследствие эффекта интерференции, что свидетельствует о плохом качестве пленки. Это объясняется концентрационной неравномерностью в при поверхностном слое

раствора, возникающей при ручном перемешивании, которая и приводит к образованию дефектов в слоях и их неравномерному наложению друг на друга. Однозначно, такие покрытия не могут являться потенциальной антибактериальной системой из-за наличия дефектов в структуре. Кроме того, как показывают экспериментальные данные, несмотря на термическую обработку, такие пленки легко отслаиваются от поверхности и быстро стираются этиловым спиртом, что крайне нежелательно при создании покрытий для имплантируемых систем, так как любая хирургическая операция, как правило, не обходится без использования этилового спирта.

Таким образом сравнительный анализ двух способов нанесения дает возможность сделать следующие выводы:

– В результате использования полуавтоматической методики погружения (с помощью аппарата «dip coater») обе стороны твердой подложки покрываются равномерным слоем, так как подложка в растворе находится в вертикальном положении, тогда как при ручном погружении с перемешиванием покрывается только лицевая сторона из-за того, что подложка в растворе находится в горизонтальном положении;

– Время осаждения одного монослоя при ручном перемешивании составляло около 15 мин; использование полуавтоматического метода погружения дает возможность уменьшить время нанесения одного монослоя до 5 мин за счет сушки после каждого этапа получения монослоя, и тем самым увеличивая продуктивность.

Таким образом, в дальнейшем в работе был использован полуавтоматический метод погружения.

Далее нами было исследовано влияние начальной концентрации полиэлектролитов на равномерность распределения пленки по поверхности подложки, что является важнейшим требованием медико-биологической прикладной технологии. Пленки были получены при концентрациях полиэлектролитов равных 0,1 М, 0,01 М и 0,001 М. Остальные параметры (pH, способ нанесения, количество бислоев) во всех экспериментах были идентичными. Данные о влиянии концентрации на изменение параметров поверхности приведены в таблице 3.9.

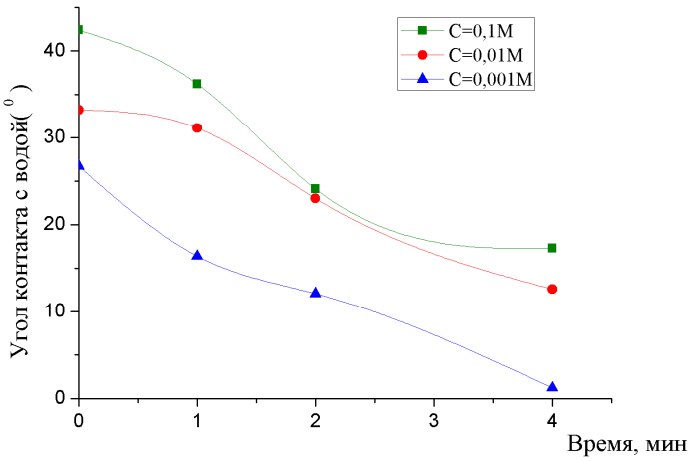
Таблица 3.9 – Шероховатость пленок $(ХЗ/КМЦ)_{10}$ собранных при различных концентрациях полиэлектролитов

Концентрация полиэлектролитов, М	0,1	0,01	0,001
Шероховатость, Ra, нм	15,24	9,4	3,2

При высоких концентрациях наблюдается быстрый, нелинейный рост толщины пленок, который приводит к образованию шероховатой поверхности, а использование более низкой концентрации приводит к уменьшению шероховатости мультислоев.

Как оказалось, концентрация полиэлектролитов оказывает влияние и на значение угла смачиваемости. Покрытия были нанесены на поверхности

кремниевых пластин, так как они имеют ровную поверхность по сравнению с имплантатами, что дает более точный результат при измерении угла контакта с водой. Данные результаты были получены при определенном времени выдержки капли воды на поверхностях покрытий, полученных с использованием различных концентрации полиэлектролитов. Как видно из рисунка 3.12, использование растворов с более высокой концентрацией (0,1 М) приводит к относительно высокому значению угла контакта с водой, что является результатом образования вязких растворов, препятствующих смачиванию и растеканию раствора по поверхности, а также такая тенденция проявляется за счет уменьшения межфазного натяжения капли раствора на подложке. Поэтому, для получения гладких пленок предпочтительным является использование растворов с более низкой концентрацией. Однако, следует отметить, что использование сильно разбавленного раствора (0,001 М и более) проявляет деструктивное влияние на целостность структуры пленки, из-за недостаточного количества растворенного вещества, необходимого для образования интегрированной тонкой твердой пленки [20]. Кроме того, при очень низких концентрациях наблюдается низкое значение угла смачивания. Это свидетельствует о том, что практически на поверхности не образовалось покрытия или очень малая площадь охвачена пленкой. Следует заметить, что высокая концентрация приводят к долгой сушке пленок, тогда как при более низких концентрациях, из-за высокого испарения, пленки сушатся быстрее.

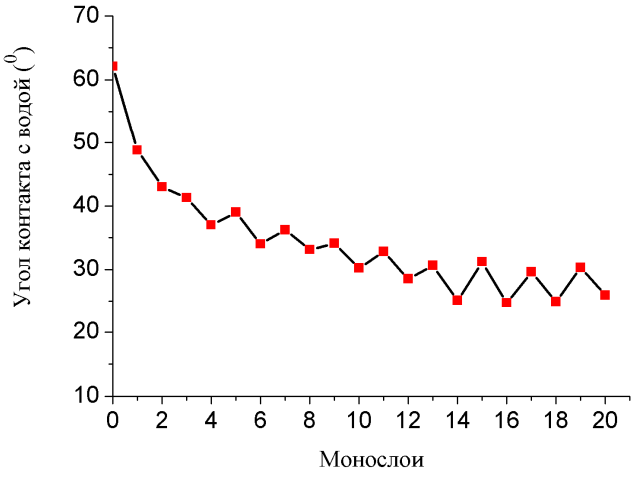


Угол контакта пленки с водой был определен после выдержки капли воды на поверхности от 1 до 4 минут.

Рисунок 3.12 – Изменение угла контакта пленки $(ХЗ/КМЦ)_{10}$ (полученный при pH=5) с водой

Следовательно, в диапазоне изученных параметров, оптимальной концентрацией полиэлектролитов для получения гладких и равномерных пленок является раствор полиэлектролитов с концентрацией 0,01 М.

Для более детального понимания процесса получения многослойной пленки на основе полиэлектролитов на стальных имплантатах необходимо было рассмотреть, как меняется угол контакта поверхности пленки с дистиллированной водой в каждом наружном слое, полученном нанесением бислоя на поверхность. Стальные подложки имеют плохую адгезию по сравнению с кремниевыми и стеклянными пластинами. Как видно из рисунка 3.13, угол смачивания чистого имплантата после подготовки поверхности составляет 62,1°, и это значение уменьшается после последовательного нанесения монослоев хитозана и Na-КМЦ до 48,8° и 43°, соответственно.



Покрытия были получены на поверхности стальных имплантатов при каждом нанесении монослоя полиэлектролитов.

Рисунок 3.13 – Изменение угла контакта покрытий ХЗ/КМЦ (собранный при pH=5) с водой

Резкое уменьшение угла смачивания наблюдается при нанесении первых 10 монослоев, после осаждения 12 монослоев наблюдается периодическое изменение данного значения от 31,2° до 24,9 °. В дальнейшем аналогичное изменение данного параметра является результатом перестройки слоев до наложения 6 бислоев. Различие между значениями угла смачивания, наблюдающееся после осаждения ХЗ и Na-КМЦ, и показывающее пропорциональное монотонное изменение параметра, который очень чувствителен к составу внешнего слоя, вызвано различной гидрофильностью двух полиэлектролитов [102]. Исходя из этого следует сделать вывод о том, что данное исследование дает информацию о минимальном количестве бислоев, необходимых для полного покрытия поверхности подложки.

Таким образом, полученные экспериментальные данные необходимо учитывать при получении тонких покрытий на твердых подложках, а также при установлении условия процесса мультислойной сборки на основе полисахаридов и биоактивных реагентов.

3.4 Исследование ПЭМС покрытий на основе ХЗ/ПАК и ХЗ/Na-КМЦ

Для получения покрытий на поверхности твердых подложек были использованы слабые полиэлектролиты. При осаждении слабых полиэлектролитов, контроль над толщиной и молекулярной архитектурой пленок может быть достигнуто путем оптимизации pH раствора [169]. Впервые Декером и его коллегами было показано [170] что толщину пленок можно точно контролировать на молекулярном уровне изменением величины pH. Для этой цели были проведены исследования по определению зависимости конформации молекул, плотности полимеров и взаимодействия двух молекул от pH раствора. Это влияние связано с переменой конформацией и взаимодействием между полиэлектролитами на каждом двойном слое. Кроме того, значение pH оказывает влияние не только на плотность заряда адсорбирующего полимера, но и на плотность ранее адсорбированного полимерного слоя. Толщина пленок, полученных в интервале pH=2-7, была определена с помощью эллипсиометрии и АСМ. Узкая область pH системы объясняется тем, что при низких значениях pH ХЗ и ПАК гидролизуются, тогда как при высоких значениях ХЗ больше не заряжается. Перед тем как показать зависимость толщины от pH системы следует рассмотреть степень ионизации слабых полиэлектролитов, вызванной изменением pH (рисунок 3.14) [171].

На рисунке 3.14 показано, что в кислой среде ХЗ (pKa = 6,5) находится практически полностью (степень ионизации ~100 %) в ионизированном виде, в то время как в нейтральной среде, лишь ~ 20 % аминогрупп являются заряженными (в форме аммонийных групп). Кроме того, как было показано Рубнером и его коллегами [169], при описании системы ПАА (поли (аллиламин гидрохлорид)/ПАК), степень ионизации полианиона доходит до 100 % с увеличением pH вплоть до нейтральной среды. При этом молекулы ПАК начинают терять протоны (и становятся менее ионизированными) в щелочной среде. То же характерно для ПАК и Na-КМЦ.

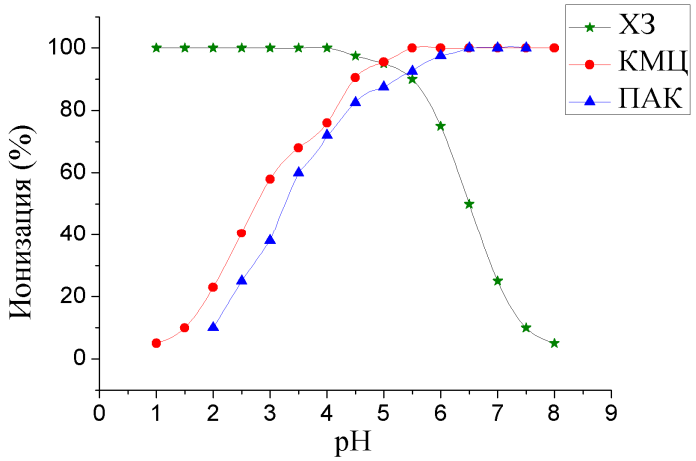
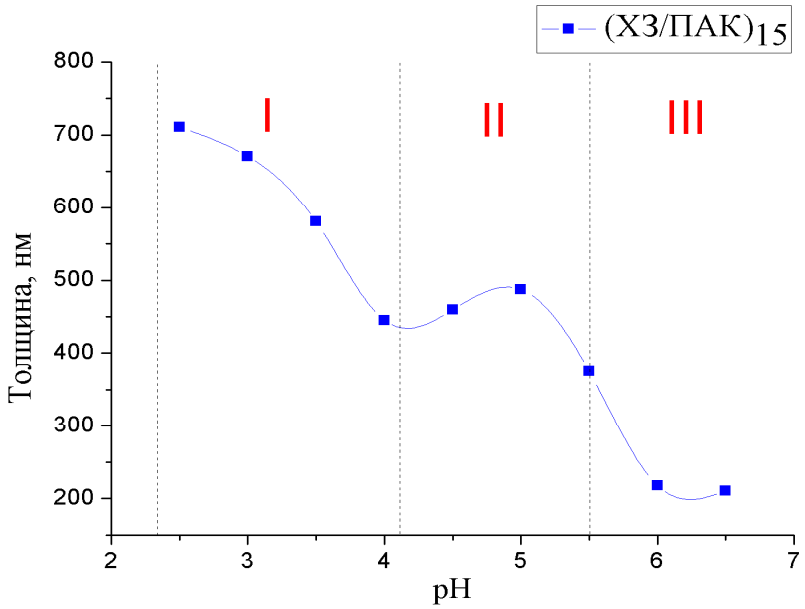


Рисунок 3.14 – Кривые ионизации полиэлектролитов в зависимости от pH раствора

Таким образом, информация о степени ионизации в зависимости от pH среды позволяет найти адекватное объяснение ряду полученных закономерно-

стей. Нами было исследовано два типа систем: ХЗ/ПАК и ХЗ/КМЦ. Изменение толщины в зависмости от pH для каждой системы проанализировано отдельно, так как для них наблюдаются различные закономерности.

Как видно из рисунка 3.15, при нанесении слоев ХЗ/ПАК толщина слоя изменяется неравномерно с ростом pH. Во всех областях pH толщина слоев ПАК заметно выражено меняться, нежели чем ХЗ, поскольку жесткость цепей уменьшает влияние pH на конформацию полимера, но что касается поликатиона такие изменения в цепи не наблюдаются. Также, это связано с тем, что резкое изменение степени ионизации ХЗ не зависит от увеличения pH.



15-количество бислоев.

Рисунок 3.15 – Зависимость толщины сухой пленки $(ХЗ/ПАК)_{15}$ от pH раствора полиэлектролитов

На кривой зависимости толщины пленки от pH (рисунок 3.15) можно выделить три области: I) pH=2,5-4, наблюдается монотонное уменьшение толщины пленки. Образование самой толстой области покрытия, при pH=2,5, объясняется тем, что слой ХЗ, на который адсорбируется ПАК, имеет высокую плотность заряда, что облегчает диффузию внутрь и наружу цепей полианиона через мультислои, до тех пор пока не будет достигнута компенсация заряда. Этот усиленный диффузионный процесс, возможно, приводит к адсорбции большего количества монослоев ПАК, в ходе одного цикла [172]. Дальнейшее уменьшение толщины может быть связано с разницей в значениях степени ионизации, в области pH=3-4, что не слишком отличается, по сравнению с значением степени ионизации при pH=2,5, и это следовательно приводит к незначительному изменению толщины. Однако, изображение пленки на рисунке 3.16 (а) свидетельствует об образовании более тонкой равномерной

пленки, по сравнению с пленками собранными при более высоких pH (рисунок 3.16 (б));

(II) pH=4,5-5,5, где вместо монотонного уменьшения толщины с увеличением pH, наблюдается небольшое скачкообразное изменение толщины, при pH=5 (487,1 нм), а также внешний вид покрытий, свидетельствует о резком изменение цвета пленки при переходе от pH=4 до pH=5.



а) б) в)

а) pH=4; б) pH=5; в) pH=6.

Рисунок 3.16 – Изображения сухих покрытий $(ХЗ/ПАК)_{15}$ (15-количество бислоев), полученные при различных pH

Объяснение таких аномальных изменений с точки зрения лишь степени ионизации недостаточно, поэтому Баретом и его коллегами была выдвинута термодинамическая модель, которая дает возможность объяснять такие эспериментальные данные [173]. В целом, модель указывает, что при критически высокой плотности поверхностного заряда энтропийный «штраф» за распространение цепи в плоской конформации на поверхности преодолевается энтальпийным приростом свободной энергии адсорбции. Однако, при уменьшении плотности поверхностного заряда ниже этой точки выигрыш в энергии, для распространения цепи по поверхности, недостаточен для преодоления потери конфигурационной энергии, и происходит резкий переход к более толстому слою.

(III) медленный рост ПЭМС $(ХЗ/ПАК)_{15}$ был зафиксирован при pH≥6. Из графика можно наблюдать образование тонкой пленки, толщина которой, ~ 217,9 нм, в два раза меньше чем при pH=5. В этих условиях плотности заряда адсорбированных цепей ХЗ относительно меньше, что приводит к ингибированию взаимной диффузии ПАК через многослойную структуру. Как видно из рисунка 3.16(в), покрытия, полученные при этих условиях, отличаются от остальных своей внешностью, тем самым можно видеть что при переходе pH полиэлектролитов от 5 на 6 также наблюдается изменение внешнего вида покрытий. Полученные результаты хорошо согласуются с работами Бикера [171, с. 5054] и Ричерта [174], в которых было проведено исследование систем ПЭИ(ПАК/ПСС) и ХЗ/ГК, соответственно.

Кроме того, метод спектральной эллипсиометрии дает возможность определить не только толщину, но и косвенно оценить качество пленки. В качестве примера приведено описание только одного образца, так как для других образцов получены аналогичные зависимости.

Данные о системе $\{ХЗ(6)/ПАК(6)\}_{15}$ (здесь и далее в скобках после обозначения слоя приведены значения pH, при которых был нанесен этот слой, подстрочным индексом обозначено количество бислоев) и результаты эллипсометрических измерений для дальнейших расчетов, приведены в таблице 3.10.

Таблица 3.10 – Данные эллипсометрических измерений: толщина слоя d, показатель преломления слоя n, параметры модели Коши a,b,c и среднеквадратичное отклонение σ (%)

Сведения об образце	Кол-во моно-слоев	Данные спектроэллипсометрии					
		d, нм	n, (λ = 632,8 нм)	Параметры модели Коши			σ
				A	b, ($\times10^{-4}$)	c, ($\times10^{-9}$)	
ХЗ(6)/ПАК(6)	30	217,9	1,537	1,525	0,453	0,038	1,31

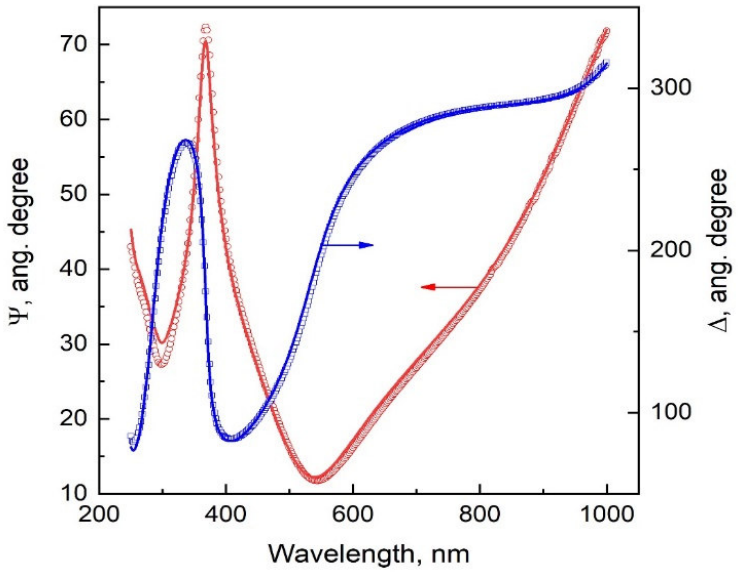
Как уже было показано в экспериментальной части, a, b и c являются коэффициентами. Значение зависимости показателя преломления от длины волны в дальнейшем было использовано для описания дисперсии образца. Также следует отметить, что низкое значение σ, приведенное в таблице 3.10, свидетельствуют о соответствии образца использованной модели однородной изотропной прозрачной пленки на поглощающей подложке.

Измеренные типичные зависимости эллипсомерических углов $\Psi(\lambda)$ и $\Delta(\lambda)$ от длины волны света для образца $\{ХЗ(6)/ПАК(6)\}_{15}$ (таблица 3.10) показаны на рисунке 3.17. Как показывают результаты, спектральные зависимости $\Psi(\lambda)$ и $\Delta(\lambda)$ имеют характерный вид для спектров прозрачных тонких пленок, нанесенных на поглощающие подложки. Кроме того, эллипсометрический анализ показал, что пленки хорошо описываются дисперсионной моделью Коши в рамках модели однослойной отражающей системы (рисунок 3.17, пунктирные линии). (Параметры модели Коши для пленки приведены в таблице 3.10).

Также на рисунке 3.18 показана зависимость показателя преломления (n) от длины волны (λ) для исследованного образца, описывающая дисперсию пленок.

Как видно из данных рисунка 3.18, рассчитанная дисперсионная зависимость уменьшается монотонно. Значение показателя преломления пленки при λ = 632,8 нм составляет ~ 1,537 и соответствует значениям, характерным для прозрачных полимерных пленок, так как значения показателя преломления у органических пленок (если это не окрашенные соединения, типа красителей или соединений с сопряженными двойными связями) должны быть в диапазоне 1,4-1,55 [175].

Нами были исследованы, методом эллипсометрии, сухие пленки системы ХЗ/ПАК с разным количеством бислоев. Как показано на рисунке 3.19, когда pH полиэлектролитов которая было проведено сборка составило 6 наблюдается линейное изменение толщины с увеличением числа циклов нанесения, несмотря на тот факт, что для слабых полиэлектролитов обычно характерен экспоненциальный рост. Это объясняется тем, что толщина каждого бислоя совпадает с толщиной следующего адсорбированного бислоя. А во время сборки, при pH=3-5, наблюдается характерный экспоненциальный рост, так как для компенсации поликатиона требуется больше ПАК имеющий петлистую конформацию.



Экспериментальные (светлые точки) и расчетные (сплошные линии) зависимости $\Psi(\lambda)$, $\Delta(\lambda)$, полученные для системы $\{ХЗ(6)/ПАК(6)\}_{15}$ при расчете по модели однослойной отражающей системы с использованием дисперсионной модели Коши.

Рисунок 3.17 – Зависимость эллипсомерических углов $\Psi(\lambda)$ и $\Delta(\lambda)$ от длины волны света для $\{ХЗ(6)/ПАК(6)\}_{15}$

Цель следующего этапа исследования состояла в исследовании роста пленок, полученных при разных значениях pH полиэлектролитов. Главная суть проведенного эксперимента заключалась в рассмотрении мультислойной пленки ХЗ/ПАК в роли системы, которая даст возможность включить в состав ПЭМС антибактериальный препарат. Раннее данная система была рассмотрена в качестве доставщика и хранилища ЛП - пропранолола (бета-блокатора, который обычно используется для лечения проблем гипертонии) [176]. Аналогичное исследование было проведено для системы ПАК/ХЗ и ПАК/ПЭИ для внедрения положительно и отрицательно заряженных антисептиков: метиленового синего и бриллиантового зеленого [177].

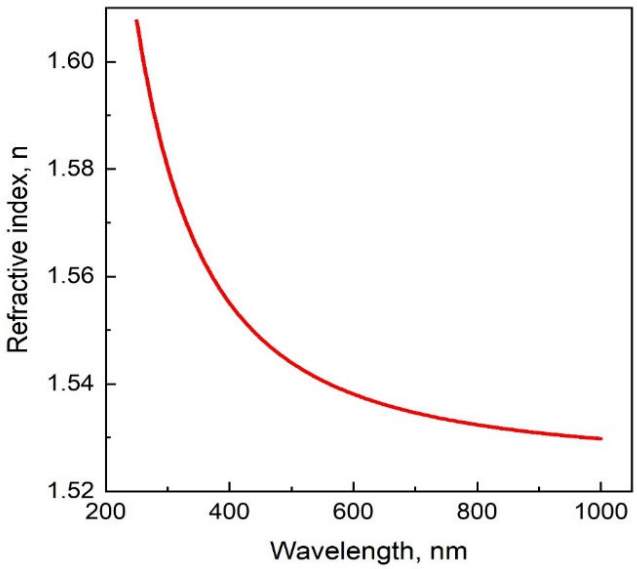


Рисунок 3.18 – Дисперсионная зависимость показателя преломления пленок

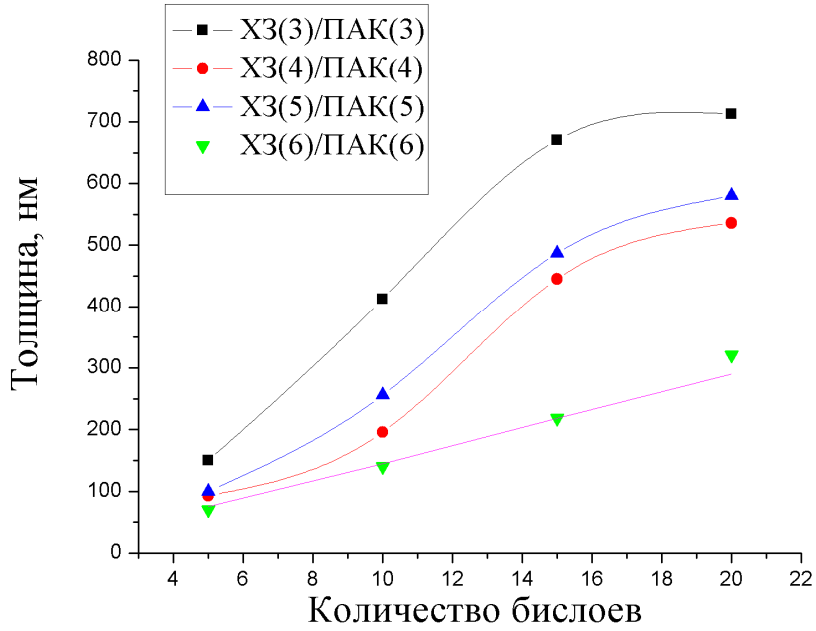
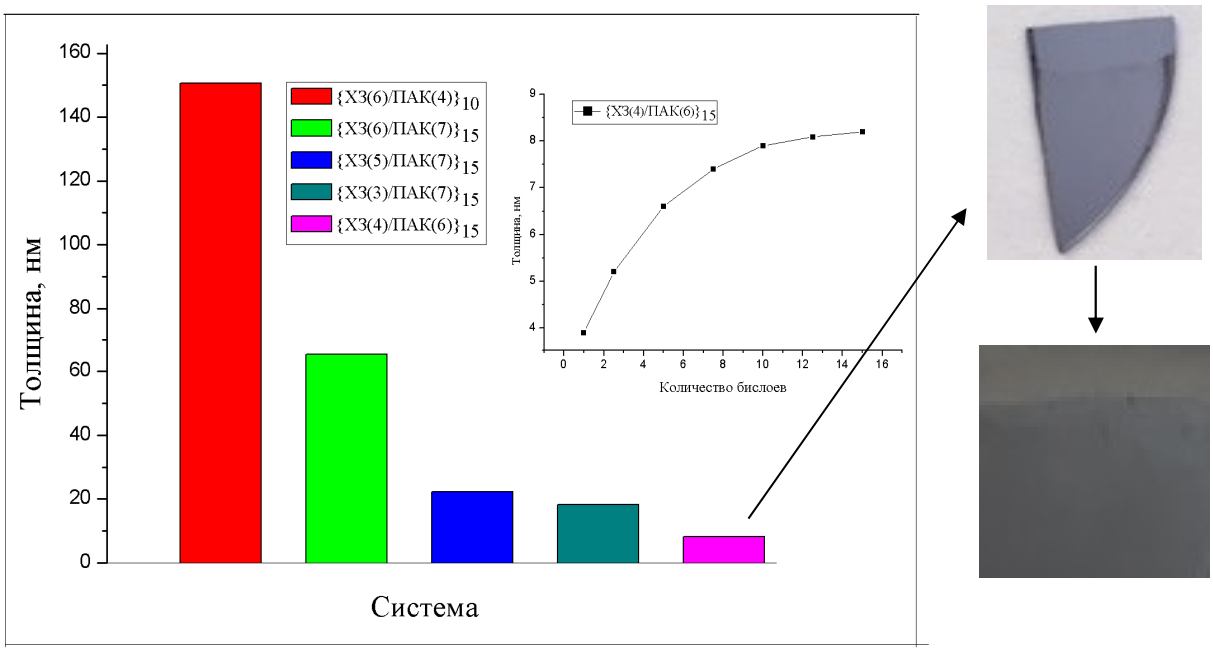


Рисунок 3.19 – Рост пленок при различных значениях pH системы ХЗ/ПАК

Как видно из рисунка 3.20 практический при всех комбинациях pH ПАК находится в полном ионизированном состоянии. Как уже известно, выше значения pK_a полианионы принимают расширенную конформацию из-за высоких электростатических отталкиваний между полимерными сегментами. Однако, в случаях более низкого значения pH, менее заряженные цепи полианионов ведут себя иначе, принимая более глобулярные конформации. Поэтому, при адсорбировании цепи ПАК на слой ХЗ, при высоком pH (6,5-7), степень ионизации цепей в растворе высока, и в процессе осаждения они будут взаимодействовать с цепями ХЗ в попытке нейтрализовать положительно заряженную поверхность. При pH=2 в растворе ХЗ больше полимерных сегментов станут заряженными и, следовательно, больше цепей ПАК смогут

взаимодействовать со слоем ХЗ. Напротив, если pH раствора ХЗ выше (pH=5,5), меньше полимерных сегментов останутся заряженными, и за счет этого поменяется плотность полимера, что сильно сказывается на длине цепи следующего адсорбирующегося полианиона.



Пленки были собраны при различных значениях pH полиэлектролитов.

Рисунок 3.20 – Толщина сухой пленки ХЗ/ПАК

Наиболее тонкие пленки образуются в случае когда значения степени ионизации обоих полиэлектролитов (ХЗ(4)/ПАК(6)) становятся одинаковыми. В этом случае вследствие высокой степени ионизации полиэлектролитов образуются высокосшитые пленки. Также, можно отметить, что рост данной пленки не значителен, о чем свидетельствует изображение пленки, на котором трудно отличить границы раздела пленки (рисунок 3.20(б)). Однако, данная пленка, из-за архитектурной особенности, ограничена набуханием и взаимопроникновением ионов или заряженных молекул в объем.

Для полной характеризации морфологических свойств ПЭМС исследования были дополнены АСМ анализом. Как было указано выше, физико-химические характеристики тонких пленок оказывают влияние на биологические свойства. Исследования морфологии и средней шероховатости были проведены методом АСМ в полуконтактном режиме. Измерения проводились в атмосфере воздуха на площади 5×5 мкм^2. Так как поверхность образцов является неоднородной, то для достижения повторяемости результатов проводили сканирование различных участков образцов. Поскольку средняя шероховатость (R_a) и среднеквадратичная шероховатость (R_q) являются наиболее широко используемыми параметрами, характеризующими поверхность, при изучении многослойных пленок были проанализированы эти параметры. Для срав-

нения приведены не только 2D изображения, но и в том числе 3D изображения и профиль поверхности (рисунок 3.21).

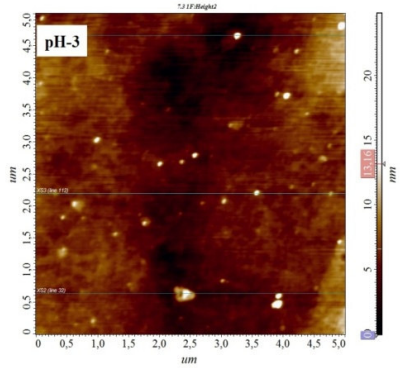
Как видно из рисунка, рельеф поверхности всех покрытий, полученных на поверхности кремниевых пластинок, характеризуется наноразмерным масштабом. Значение pH раствора оказывает влияние не только на толщину, но и на морфологию пленок. Было обнаружено, что при увеличении pH до 5 средняя шероховатость сначала возрастет, а затем уменьшается. Также с изменением pH наблюдается изменение морфологии многослойных пленок. Подложка с пленкой, показанная на рисунке 3.21 (а), обладала среднеквадратичной шероховатостью (R_q) ~ 5,82±0,1 нм, тогда как образцы, показанные на рисунках 3.21 (б и в), характеризуются относительно более высокими значениями R_q, равными 11,2±1,0 и 15,3 ± 1,4 нм, соответственно (таблица 3.11). Так как значение R_q сильно зависит от площади сканирования, нельзя исключить тот факт, что при изменении масштаба R_q может тоже измениться.

Таблица 3.11 – Среднеквадратичная шероховатость ПЭМС покрытий системы $(ХЗ/ПАК)_{15}$

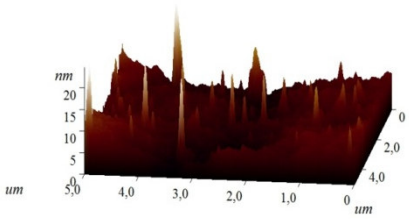
Образцы	Среднеквадратическая шероховатость (R_q), нм
$\{ХЗ(3)/ПАК(3)\}_{15}$	5,82 ± 0,1
$\{ХЗ(4)/ПАК(4)\}_{15}$	11,2 ± 1,0
$\{ХЗ(5)/ПАК(5)\}_{15}$	15,3 ± 1,4
$\{ХЗ(6)/ПАК(6)\}_{15}$	4,1 ± 0,1

Как видно из 3D-изображения пленки, полученной при pH=3, рисунок 3.21 ($а_1$), на поверхности имеются неровности в виде узких и высоких пиков, распределенных по поверхности, высота этих пиков составляет ~ 20 нм, что и сказывается на значении средней квадратической шероховатости. При дальнейшем увеличении pH наблюдается развитие поверхности: неровности становятся все выше и шире. Однако при увеличении pH до 6 наблюдается другая тенденция: неровности уменьшаются и становятся приблизительно одинаковыми по высоте, становятся шире и равномерно распределяются по поверхности. Такие изменения могут быть связаны с процессом перестройки на поверхности, приводящая к агрегации маленьких доменов.

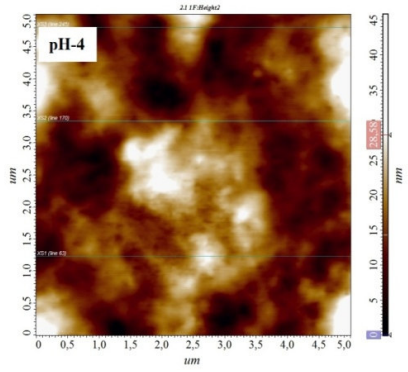
Кроме того, в работе Фери [178] и его коллег показано, что шероховатость поверхности в многослойных пленках может быть вызвана изменениями концентрации соли во время промывки. При промывке водой ионы соли, которые первоначально представляли компенсирующие заряды в пленках, удаляются, вызывая структурные перестройки внутри слоев.



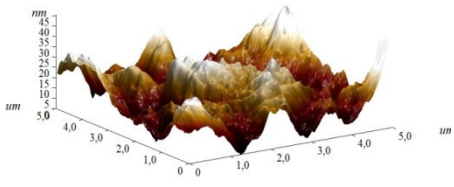
а



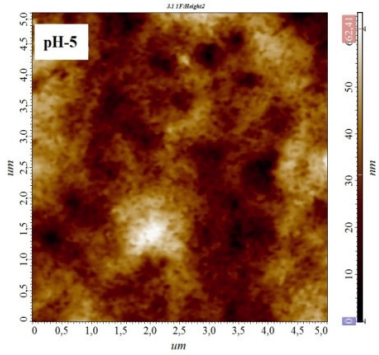
$а_1$



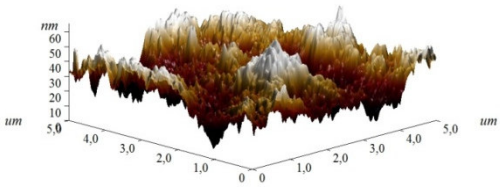
б



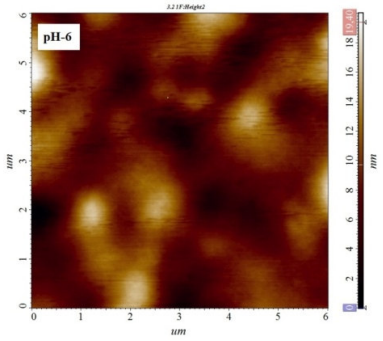
$б_1$



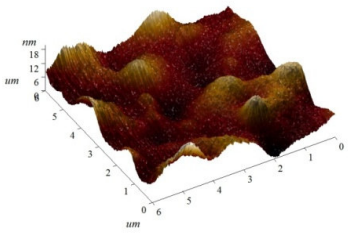
в



$в_1$



г



$г_1$

Размер сканирование - 5×5 мкм^2 и 6×6 мкм^2

Рисунок 3.21 – Топографические АСМ изображения покрытий $(ХЗ/ПАК)_{15}$

Помимо системы $(ХЗ/ПАК)_{15}$ нами было исследовано изменение толщины пленки $(ХЗ/Na\text{-}КМЦ)_{10}$ в зависимости от pH (рисунок 3.22).

Как видно из рисунка 3.22, покрытия, полученные при pH=5 характеризуются меньшей толщиной по сравнению с пленками, полученными при pH=3, 4 и 6. Такое поведение объясняется значениями pK_a полиэлектролитов (pK_a(ХЗ)=6,5, pK_a(КМЦ)=2,0-4,0): при pH=5 они ведут себя как сильные полиэлектролиты, и за счет электростатического взаимодействия между зарядами и межмолекулярных взаимодействий образуются относительно ровные и тонкие пленки. Однако, по сравнению с системой ХЗ/ПАК, можно наблюдать небольшое отличие, отражающееся на общей картине зависимости, так как это связано с химической структурой полианионов.

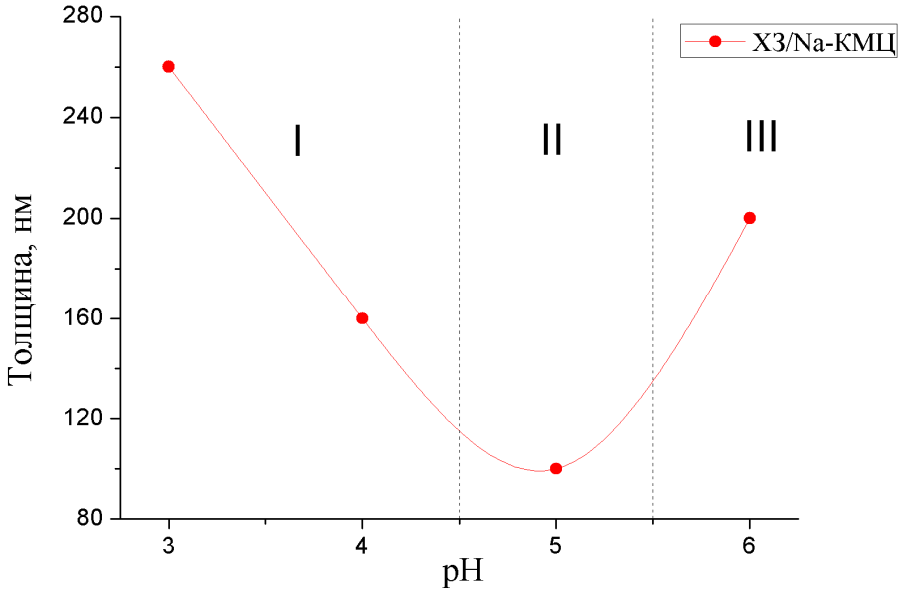
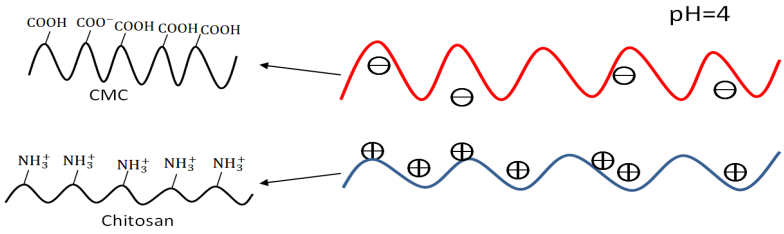


Рисунок 3.22 – Зависимость толщины покрытий ХЗ/Na-КМЦ от значения pH полиэлектролитов, во время сборки

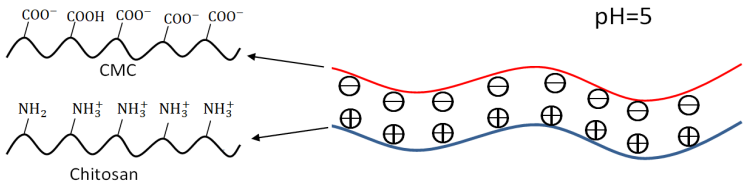
Кроме того, такое поведение полиэлектролитов сильно сказывается на характере их упаковки в ПЭМС, что схематически показано на рисунке 3.23.

При низких значениях pH, из-за петлистой конформации, большую часть толщины составляет Na-КМЦ, так как для нейтрализации ХЗ требуется больше сегментов Na-КМЦ. В нейтральной области pH наблюдается такая же картина, но функциональные группы хитозана в этих условиях менее заряжены за счет депротонизации, электростатическое взаимодействие так же ослабевает, петлистую форму и проникновение во внутрь ПЭМС уже идет за счет функциональных групп хитозана (рисунок 3.23).

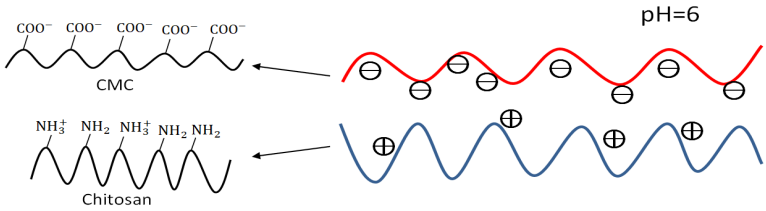
Для полного понимания процессов, протекающих в системе ХЗ/Na-КМЦ, было изучено изменение морфологии поверхности пленок по мере увеличения числа бислоев. Для этого на поверхность модельных подложек (стеклянные пластины) были нанесены 1 и 5 бислоев. На рисунке 3.24 показаны 2D и 3D АСМ изображения очищенного модифицированного стекла (рисунок 3.24 (а, $а_1$)), одного бислоя (рисунок 3.24 (б, $б_1$)) и пяти бислоев на стеклянной подложке (рисунок 3.24 (в, $в_1$)).



а)



б)



в)

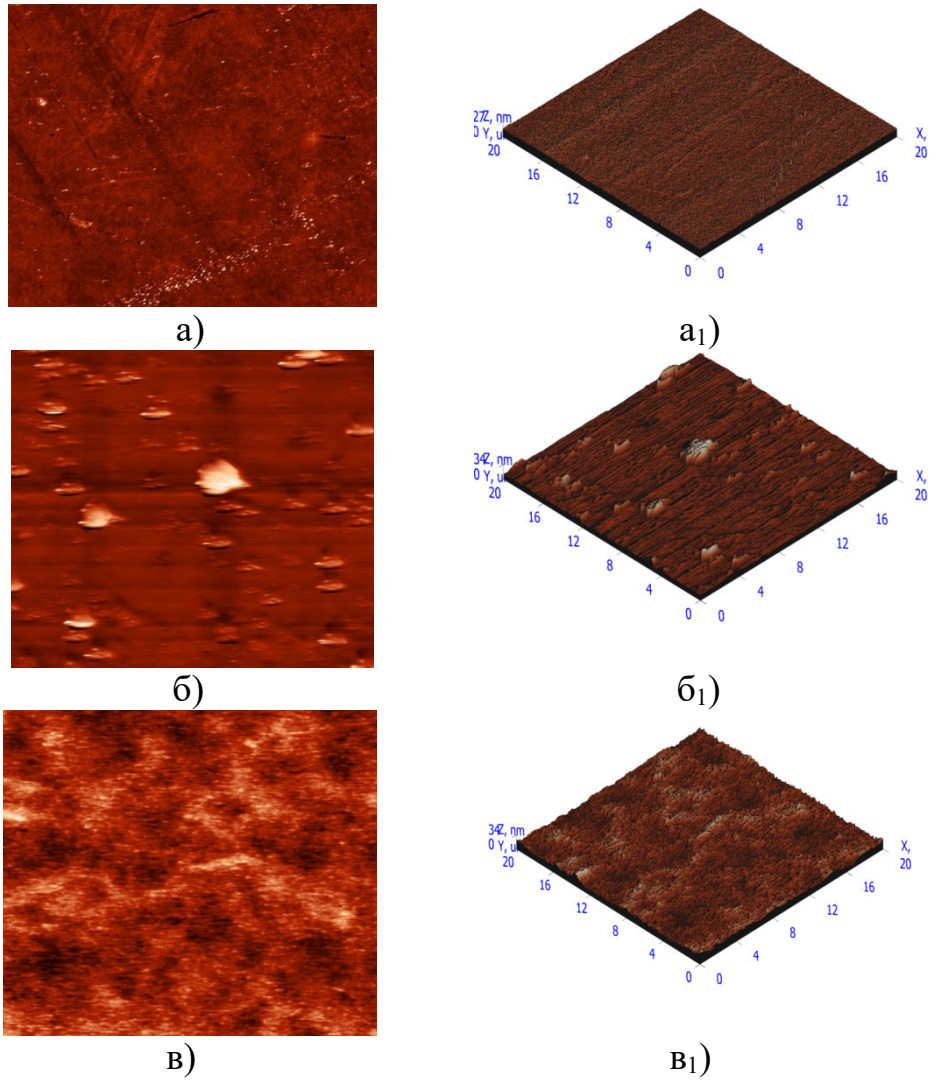
Рисунок 3.23 – Конформация полиэлектролитов при различных значениях pH

Средняя квадратическая шероховатость поверхности модифицированной стеклянной подложки и покрытий из 1 и 5 бислоев составляют 0,340, 2,783 и 3,582 нм, соответственно. Изображения АСМ чистого стекла (рисунок 3.24 (а, $а_1$)) были получены контактным методом, а для съемки одного и пяти бислоев был использован полуконтактный метод. Изображение АСМ чистого стекла используется как контрольный снимок для сравнения и оценки морфологии поверхности нанесенных образцов. После осаждения полиэлектролита на поверхности стекла наблюдали значительное изменение морфологии по мере увеличения числа бислоев, а также этапов формирования покрытий. Из рисунка 3.24 (б, $б_1$) следует, что распределение первого бислоя было неравномерным, наблюдался послойно-островковый вид роста. Как уже упоминалось выше, после осаждения ПЭИ являющий предшественником на него адсорбируется Na-КМЦ, который не покрывает полностью поверхность, так как на этот процесс сильно влияет pH раствора, от которого зависит форма нахождения функциональных групп обоих полиэлектролитов. Наложение следующего монослоя в результате привело к образованию больших островков, а последующее увеличение бислоев заполняет пространство между островками, и при этом уже не наблюдается резкого перепада пиков (рисунок 3.24 (в, $в_1$)).

Полученные результаты хорошо согласуются с данными, полученными в работе [90] методом АСМ и демонстрирующими зависимость шероховатости и морфологии поверхности от pH для системы ХЗ/КМЦ, при этом существенно меняются характеристики материала, включая клеточную, бактериальную и биомолекулярную адгезию.

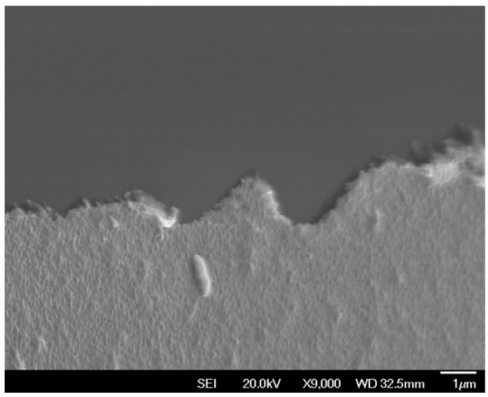
Также, для дополнения информации о качестве пленок нами были сняты СЭМ изображения пленок на основе ХЗ/Na-КМЦ (рисунок 3.25).

Приведенные рисунки показывают, как меняется морфология пленок в зависимости от условий нанесения. Как видно из рисунка 3.25 (а) и (б) образуются различные покрытия, отличающиеся незначительной шероховатостью. Также, рисунок 3.25 (в) дает информацию о наслаивании пленок друг на друга, и показывающий строго слоистую структуру.

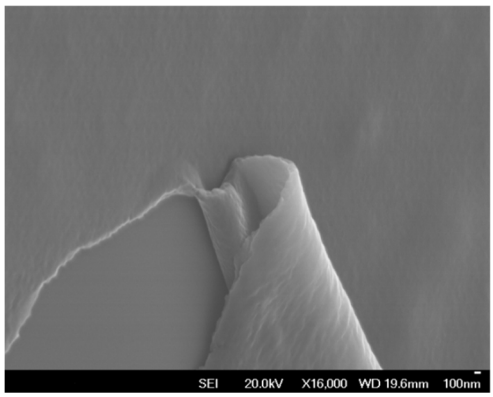


а, $а_1$) поверхность чистого стекла, б, $б_1$, в, $в_1$) покрытия состоящие из 1 и 5 бислоя. Размер сканирования - 20×20 мкм^2.

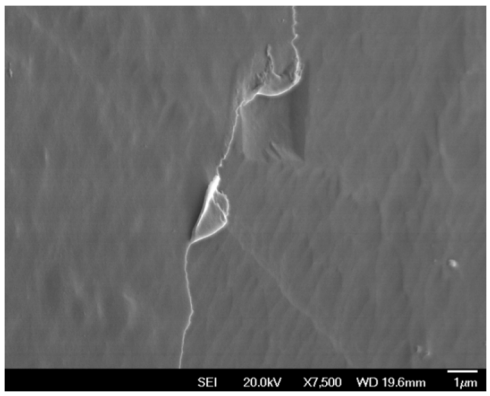
Рисунок 3.24 – Изображения снимков АСМ пленок ХЗ/КМЦ при pH=4



а)



б)



в)

а) Покрытия (ХЗ/Na-КМЦ)$_{15}$ полученные при pH= 4; б, в) покрытия (ХЗ/Na-КМЦ)$_{15}$ полученные при pH= 5.

Рисунок 3.25 – Изображения СЭМ снимков пленок

3.5 Установление условий нанесения антибактериальных агентов на пленки

Большинство мембран бактериальных клеток заряжены отрицательно, поскольку состоят из кислых полисахаридов. Поэтому самым простым решением этой проблемы является разработка мультислойной покрытий с положительно заряженной поверхностью, то есть завершить сборку пленки поликатионным слоем. В отличие от монослойного катионного покрытия данный тип покрытий дает большое количество положительных зарядов, которые проявляют «контактно-убивающие» свойства. Как показал литературный обзор, в этом направлении авторами было проделано множество работ. Нами также была предпринята попытка получить покрытия, проявляющих «контактно-убивающую» активность на основе природного полимера – хитозана в паре с КМЦ. Как уже известно, хитозан является слабым полиэлектролитом, и поэтому pH раствора является важным критерием его поведения в растворе. В предыдущем разделе показано влияние значения pH среды на физико-химические свойства слоев ХЗ/Na-КМЦ. Поэтому для достижения высокой концентрации свободных аммониевых групп NH_3^+, покрытия были получены при pH=3. Предварительно проверили антибактериальную активность пленки

на основе ХЗ/Na-КМЦ, где верхний слой пленки составлял хитозан, рисунок 3.26.

Как видно из рисунка 3.26 после 24 часов инкубации, образец показал зону угнетения равной 12 мм. Проявление антибактериальной активности покрытиями данного типа заключается в том, что разрушение внешнего слоя бактерий идет за счет связывания хитозана с отрицательными группами полисахаридов, которые являются основой бактерий. Несмотря на простоту технологии сборки, покрытия такого типа не могут существовать долгое время, так как они действуют только на раннем этапе адгезии и для того чтобы справиться с биопленками необходимо внедрение антибактериального препарата (АП). Также, как указано в литературном обзоре настоящей работы, покрытия состоящие только из полиэлектролитов могут проявлять либо «контактно убивающие» или антиадгезионные свойства в зависимости от природы поверхностного слоя. Но активность таких покрытий ограничена только функционализацией поверхности, за счет проявления определенных зарядов или приданием гидрофильности, и покрытия не эффективны при подавлении или уничтожении планктонных бактерий вокруг имплантатов. Поэтому, для замедления роста микроорганизмов и их уничтожения, для предотвращения дальнейшего заражения бактериями, следует включать в состав пленок антибиотики или антисептики.

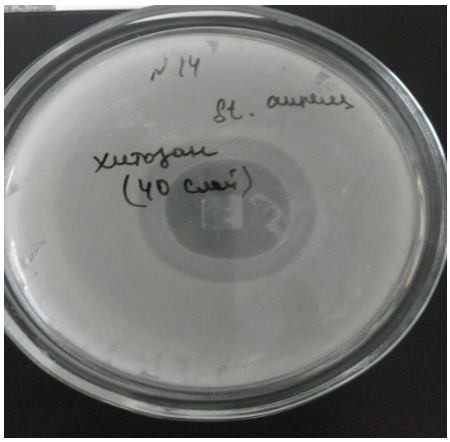


Рисунок 3.26 – Изучение антимикробной активности многослойных пленок $(ХЗ/КМЦ)_{40,5}$ методом диффузии

Полиэлектролитные мультислои, полученные путем электростатического взаимодействия полиэлектролитов, комбинирующие в себе свойства характерные как для высокомолекулярных, так и для низкомолекулярных соединений, могут быть потенциальными «резервуарами», для доставки антибактериальных средств. В данном исследовании в качестве антибактериального агента был использован низкомолекулярный антисептик – хлоргексидин биглюконат, так как он является антисептиком «золотого стандарта», который активен против грамположительных/грамотрицательных бактерий, а также в отличие от антибиотиков не проявляет резистентность после длительного использования.

Низкомолекулярный хлоргексидин имеет в своей структуре четыре иминные группы (C=NH), шесть вторичных аминогрупп (C–NH) и два ароматических кольца (рисунок 3.27). Как уже сообщалось ранее, для хлоргексидина известно два значения pKa: 10,3 и 2,2 [107]. В интервале pH= 4-8 хлоргексидин ведет себя как бикатионное (+2) соединение. Поэтому, на сновании квантово-химических расчетов предполагается, что он встраивается в ПЭМС за счет электростатического взаимодействия. Водные растворы хлоргексидина наиболее стабильны в диапазоне pH=4-8. Это связано с тем, что при pH>8,0 осаждается основание хлоргексидина, и в более кислых условиях наблюдается постепенное ухудшение активности, поскольку соединение становится менее стабильным.

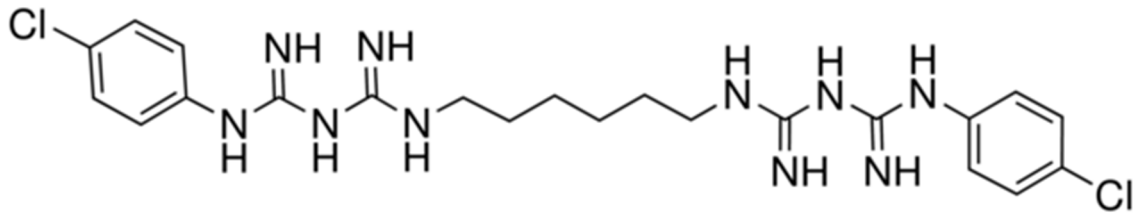


Рисунок 3.27– Химическая структура хлоргексидина

Однако, в отличие от полиэлектролитов, прямое введение низкомолекулярного соединения в состав покрытий затруднительно из-за его неполимерного характера. Для этой цели были применены хорошо изученные методики включения ХГ в состав пленки:

(а) прямое осаждение молекул ХГ, в виде ассоциата с одним из полиэлектролитов, являющегося одним из компонентов многослойных покрытий;

(б) введение антисептика из раствора в готовые пленки методом погружения.

Поскольку загрузка и высвобождение антибактериального агента зависит от различных факторов, таких как условия получения «резервуара», природа резервуара и т.д. Поэтому для каждого подхода была разработана отдельная система с различными комбинациями pH. Кроме того, каждый подход будет рассмотрен нами отдельно.

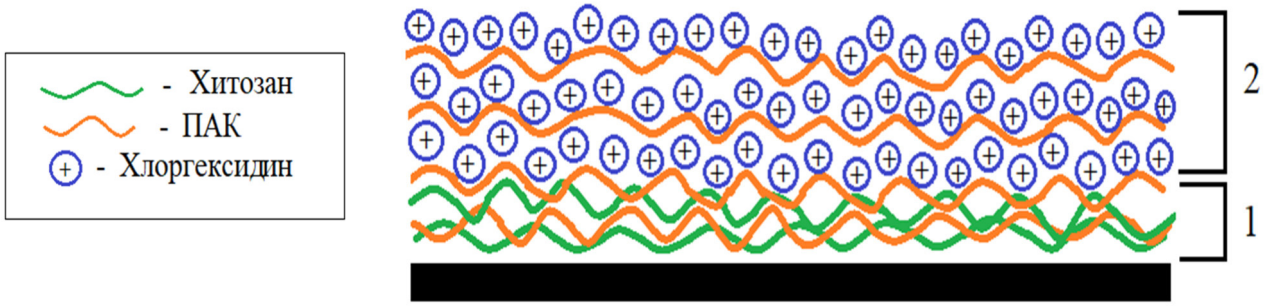
Природа пленки («резервуара») является немаловажным параметром для введения и высвобождения ХГ. Поэтому, в ряду исследованных систем для введения ХГ во время сборки пленки была выбрана система ХЗ/ПАК, так как ПАК может образовывать диффузионные барьеры внутри полимерных многослойных пленок [179], тем самым продлевая высвобождение относительно небольших молекул из пленок.

Концентрация ХГ играет важную роль, так как по информации «Центра по управлению и санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США», повязки содержащие 0,05 % ХГ уже проявляют цитотоксичность. Кроме того, высокая концентрация АП может привести к образованию агломератов внутри слоя. В связи с вышесказанным, концентрация ХГ в

растворе была взята равной 0,1 мМ. Рассмотрим результаты, полученным двумя разными способами введения ХГ в состав пленок.

3.5.1 Включение ХГ в состав пленки во время сборки

Для внедрения ХГ в пленку с помощью первого метода сначала была получена обычная пленка {ХЗ(6)/ПАК(5}$_{10}$, которая служила в качестве основы («фундамента») для дальнейшего осаждения ХГ и ПАК методом LbL, и тем самым исследовано возможное образование многослойных покрытий из высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений. Процесс заканчивали осаждением ХГ в течение 3 часов для обеспечения адсорбции большого количества ХГ в последнем слое. В целом покрытия состояла из 2 частей: нижней и верхней (рисунок 3.28).



1) нижележащая часть; 2) верхнележащая часть.

Рисунок 3.28 – Общая схема получения покрытий, с внедренным в структуру ХГ во время сборки

Как показано на рисунке 3.29, толщина пленки (ХЗ/ПАК)$_{10}$-(ХГ/ПАК)$_{10}$ (130,6 нм) была значительно больше, чем у пленки, состоящей только из (ХЗ/ПАК)$_{10}$ (63,1 нм), что свидетельствует об успешной последовательной адсорбции низкомолекулярной и высокомолекулярной молекулы. Кроме того, пленка (ХЗ/ПАК)$_{10}$ является прозрачной, однако после осаждения 10 бислоев (ХГ/ПАК)$_{10}$ пленка приобретает светло-серый цвет, что также указывает на успешное осаждение данных веществ.

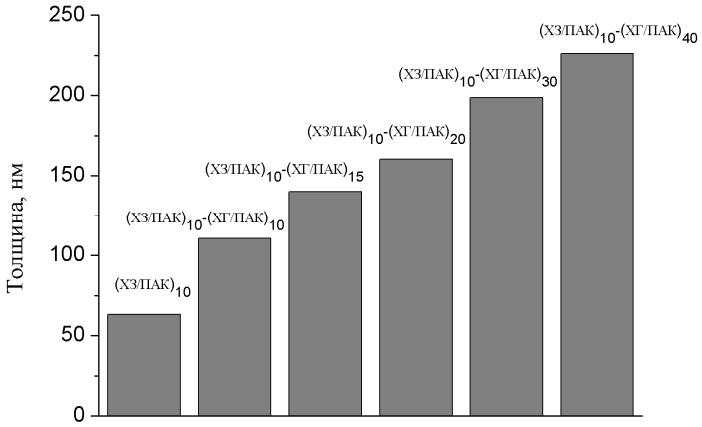
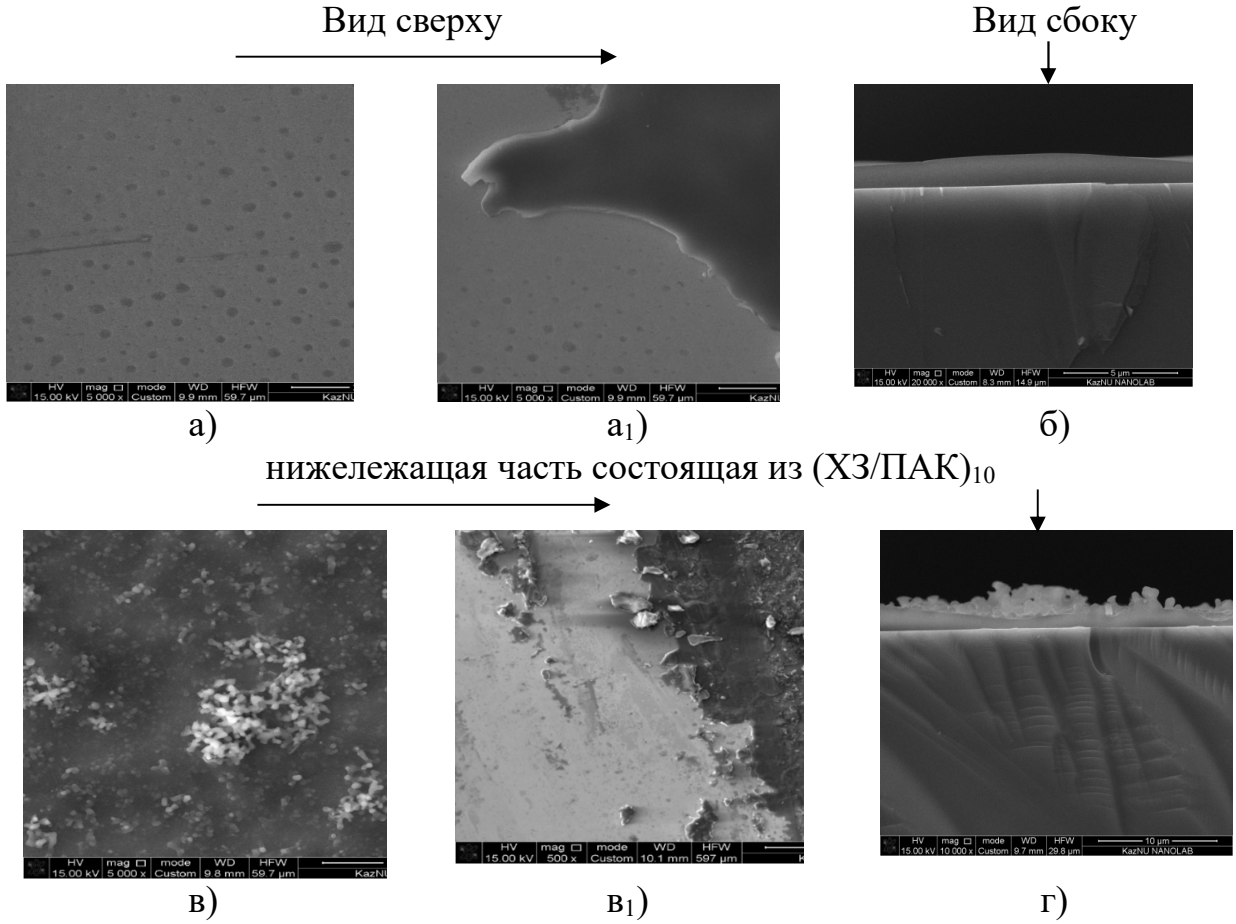


Рисунок 3.29 – Толщина ПЭМС покрытий со структурой (ХЗ/ПАК)$_{10}$ и (ХЗ/ПАК)$_{10}$-(ХГ/ПАК)$_n$, n = количество бислоев

Взаимодействие между ПАК и ХГ носит исключительно электростатический характер. Однако каждый последующий цикл осаждения ХГ на ПАК приводит к экспоненциальному росту толщины пленки. Это может быть результатом диффундирования небольшой катионной молекулы в объем растущей многослойной пленки, а также адсорбции на растущей границе раздела пленки. Тем не менее, нелинейный характер роста ПЭМС наблюдался до достижения пороговой толщины, из-за диффузионного ограничения проникновения ХГ в растущую многослойную систему. Примечательным следствием этой интерпретации является то, что концентрация продиффундировавших малых молекул будет наибольшей в диффузионной зоне пленки (то есть в самых внешних областях) что сказывается на кинетике высвобождении ХГ из пленки.

Структура покрытий $(ХЗ/ПАК)_{10}$ и $(ХЗ/ПАК)_{10}$-$(ХГ/ПАК)_{10}$ была изучена методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Снимки СЭМ были получены при различных положениях (вид сверху и вид сбоку) (рисунок 3.30).



а, в) топографические снимки общей поверхности, $а_1$, $в_1$) границы покрытых и непокрытых областей, б, г) поперечные снимки.

Рисунок 3.30– СЭМ изображения пленок из $(ХЗ/ПАК)_{10}$-$(ХГ/ПАК)_{7,5}$

Пленка, состоящая только из ХЗ-ПАК (нижележащая часть), из-за полимерного состава, имеет однородный характер по толщине, что объясняется ограничением степени проникновения полимера в соседние слои из-за высокой ионизации обоих полиэлектролитов. Однако, осаждение гетероструктуры из 10,5 бислоев на основе $(ХГ/ПАК)_{10,5}$ на твердую подложку привело к значительному изменению визуально наблюдаемой картины, в частности увеличению шероховатости поверхности. Это может быть связано с сильной адсорбцией и абсорбцией ХГ на начальном этапе роста пленки.

Результаты измерения толщины пленок и снимки СЭМ однозначно подтвердили получение мультислоев, содержащие в своем составе хлоргексидин.

Нами было исследовано высвобождение ХГ из пленки перед определением ее антибактериальной активности по отношению к музейному штамму *E.coli*. Несмотря на то, что ХГ адсорбируется и на границе и в объеме, нельзя исключить тот факт, что концентрация введенных молекул будет больше на самых внешних областях. Поэтому, высвобождение в первое время будет происходить с более высокой скоростью, замедляясь со временем. Как показано на рисунке 3.31, из 50,5 бислойного покрытия, состава $(ХЗ/ПАК)_{10}$ - $(ХГ/ПАК)_{40,5}$ в течение первых 24 часов в раствор высвобождалось 0,45 мг/мл ХГ. За следующие 24 часа это значение упало в ~ 2,5 раза, после чего скорость высвобождения изменялась не столь заметно. Высвобождение наблюдалось только в течение первых 7 дней (половина постоперационного периода).

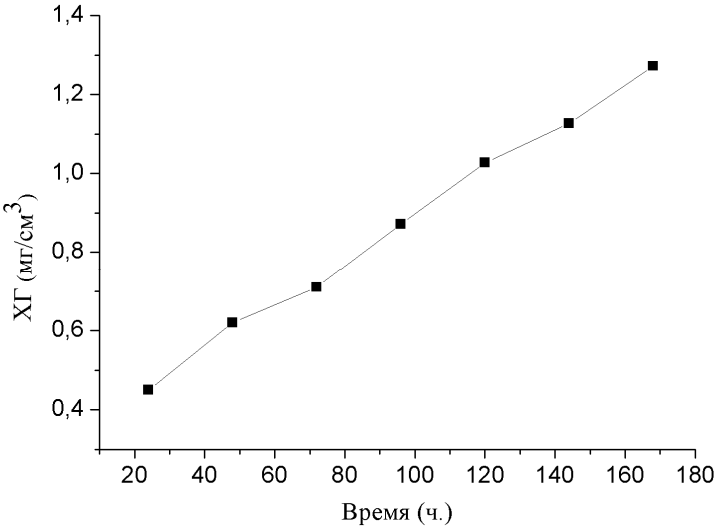


Рисунок 3.31 – Высвобождение ХГ из пленок в натрий-фосфатном буферном растворе из ПЭМС $(ХЗ/ПАК)_{10}$ - $(ХГ/ПАК)_{40,5}$, полученные на кремниевых пластинках

Результаты по дальнейшему исследованию антибактериальной активности пленки $(ХЗ/ПАК)_{10}$-$(ХГ/ПАК)_{10,5}$ показаны на рисунке 3.32.

Как и следовало ожидать, из-за сильного проникновения ХГ во внутрь слоев, образуется неровная зона отталкивания вокруг образца, также, это возможно связано с непропорциональным высвобождением ХГ в течение 24 ч. Однако,

нами не была исследована кинетика высвобождения ХГ в течение 24 ч. (например высвобождение после каждого часа). Также, наблюдается неполное разложение пленки в течение одних суток (было зафиксировано изменение окраски покрытия только в центре), что приводит к проявлению ЗУ со средним значением равной лишь 3,1±0,1 мм ЗУ. Проявление антибактериальной активности покрытий связано с высвобождением ХГ. Процесс образования биопленки сопровождается понижением pH вблизи пленки, что приводит к ослабеванию связи между ПАК и ХГ, тем самым поддерживая диффузию ХГ в раствор. Одновременно ПАК образует диффузионный барьер внутри пленок, что приводит к замедленному высвобождению ХГ, поэтому в течение 24 ч проявляется слабая антибактериальная активность. Незначительное уменьшение pH вблизи имплантата, в результате образования биопленки, не приводит к сильному ослабеванию связи между ХГ и ПАК, и большинство молекулы в пленке, скорее всего, остается связанном виде.

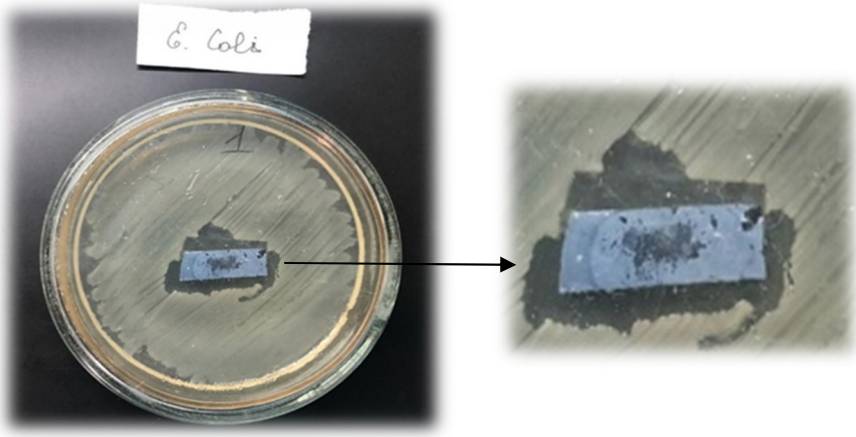


Рисунок 3.32 – Образование зоны угнетения (ЗУ) вокруг покрытий $(ХЗ/ПАК)_{10}$ - $(ХГ/ПАК)_{10,5}$

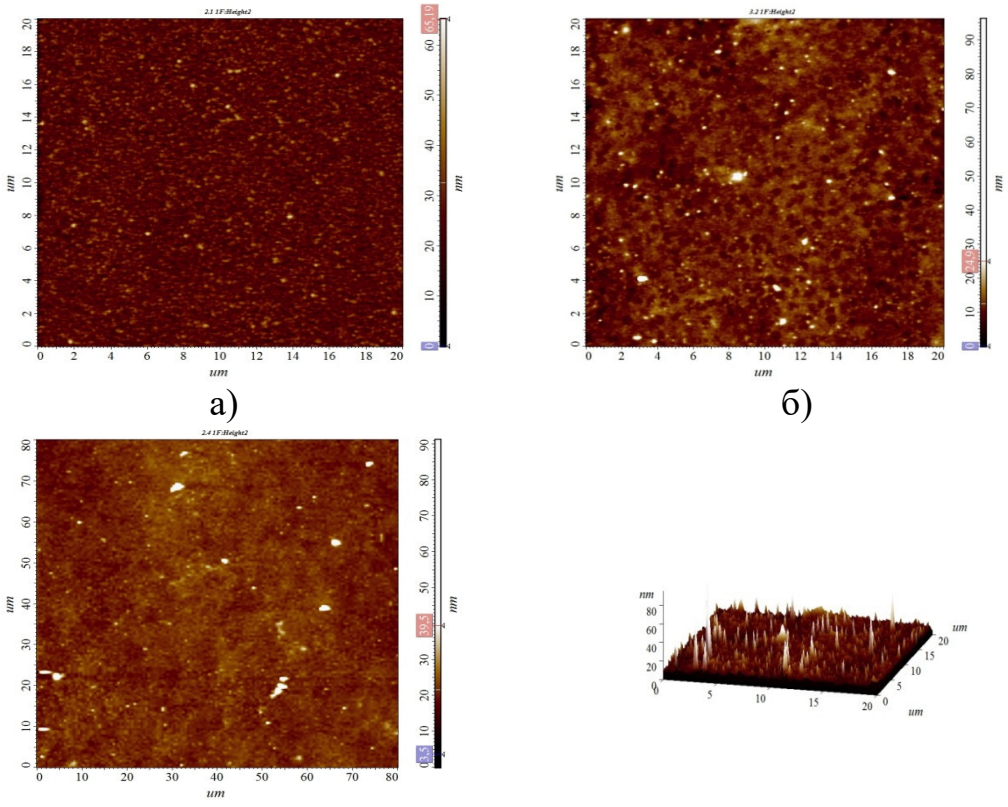
3.5.2 Включение ХГ в готовую пленку

В качестве второго метода, было исследовано включение ХГ в структуру готовой пленки после ее получения. Большую роль при получении пленки-«резервуара», являющейся носителем антибактериального агента, играет значение pH, при котором наносятся пленки. Поэтому, для введения ХГ по второму методу, была выбрана система – ХЗ(4)/КМЦ(4), так как именно в этом случае слой КМЦ занимает 60 % от толщины бислоя в многослойной пленке. В данном случае взаимопроникающий бислой содержит большое количество незаряженных сегментов КМЦ, которые неэлектростатически связаны с хитозаном в ПЭМС. Когда такой многослойный материал вводят в раствор хлоргексидина, pH=6, группы -COOH депротонируются, и за счет этого полимерная цепь в целом будет иметь отрицательный заряд.

Как показано в экспериментальной части, введение ХГ было достигнуто путем выдержки подложки с пленкой $(ХЗ/КМЦ)_{20}$ в растворе ХГ в течение 48 ч. Покрытия состояли из 20 бислоев, поскольку полное установления устойчивой

структуры внутри пленки может произойти только после нанесения минимального количества слоев. Как было указано выше, поверхность полностью покрывается лишь после нанесения 12 монослоев, о чем свидетельствует постоянство значений угла смачивания поверхности водой. Ранее под руководством Декера были проведены исследования, показывающие, что до достижения этого минимального количества может произойти взаимопроникновение между слоями, приводящее к неравномерному осаждению в первых слоях наноструктуры, и, таким образом, для адгезии ХГ доступны менее заряженные сегменты цепи. Следовательно, после определенного количества адсорбированных бислоев внутренняя часть покрытий разрыхляется, тем самым создавая благоприятные условия для равномерного включения ХГ.

Для оценки включения ХГ в пленки был сделан топографический снимок с помощью АСМ (рисунок 3.33).



а) б)

в) г)

а) до включения ХГ в пленки $(ХЗ/КМЦ)_{10}$; б, в, г) 2D (20×20 мкм^2 и 80×80 мкм^2) и 3D рисунки после включения ХГ

Рисунок 3.33 – АСМ изображения пленки $(ХЗ/КМЦ)_{10}$ до включения и после включения ХГ

На рисунке 3.33 (а) показано АСМ изображение пленки, не имеющей в составе ХГ. Сравнительный анализ двух изображений (3.33 (а и б)), характеризующих морфологию поверхности, дает возможность сделать вывод о том, что добавление ХГ приводит к появлению белых точек, соответствующих

островкам из молекул ХГ, что свидетельствует о включении низкомолекулярного соединения в слой. Адсорбция ХГ приводит к изменению соотношения между светлыми и темными участками, при этом увеличивается доля светлых участков. Светлые участки соответствуют высоким пикам, а темные зоны образуют впадины. Это свидетельствует о большем концентрировании ХГ на внешнем слое, из-за ограниченного пространства во внутренних слоях покрытий. Однако, АСМ не дает информации об изменении морфологии внутри пленки. Также, несмотря на то, что АСМ является единственным методом, позволяющим определить шероховатость, он имеет ряд недостатков, одним из которых является сканирование маленьких областей. Для этой цели, как видно из рисунка, было сделано сканирование поверхности при различных масштабах, таких как 80×80 мкм^2 и 20×20 мкм^2. Сравнительный анализ показал, что средняя шероховатость и распределение молекул хлоргексидина существенно не отличаются.

Поскольку основной задачей исследования является получение антибактериального покрытия $(ХЗ/КМЦ)_n$-(хлоргексидин) для медико-имплантируемых систем, очень важно было показать активность пленок по отношению к штамму *S.aureus,* (наиболее распространенным микроорганизмам, участвующим в инфицировании при ортопедических имплантациях), грамотрицательным бактериям *E.coli* и бактериям *K.pneumonia*. Было показано, что пленки проявляют активность не только к грамотрицательным и грамположительным бактериям, но и к дикому штамму *K.pneumonia* (рисунок 3.34). Покрытия пропитанные растворами $AgNO_3$ и KI были выбраны в качестве контрольных образцов.

Изучение антимикробной активности покрытий методом диффузии и сравнении с контрольным опытом показали, что самая большая зона угнетения наблюдается в отношении музейного штамма *E. coli* ATCC25922, в то время как самая слабая противобактериальная активность была проявлена против дикого штамма *P. Aeruginosa*. Поскольку ХГ более эффективен против грамположительных, по сравнению с грамотрицательными бактериями, покрытия показали большую активность против *S.aureus*, по сравнению с контрольными образцами. Разница ЗУ между 30- и 40-бислойными покрытиями, полученная в экспериментами с *S.aureus*, может быть связана с различной природой твердых подложек. Как видно из рисунка, 30 бислойное покрытие было нанесено на кремниевую подложку в то время 40 бислойное покрытие было получено на поверхности титановых имплантатов. Также, следует иметь ввиду, что практически во всех образцах покрытие $(ХЗ/КМЦ)_{40}$ дало более широкую зону угнетения, в сравнении с покрытием $(ХЗ/КМЦ)_{30}$. Помимо этого, на рисунке наблюдается ровная округлая зона отталкивания вблизи имплантата, что свидетельствует о более равномерном перераспределении ХГ внутри покрытий. В случае, когда ХГ вводили в структуру пленки непосредственно во время сборки, вокруг твердой подложки образовался ЗУ неправильной формы.

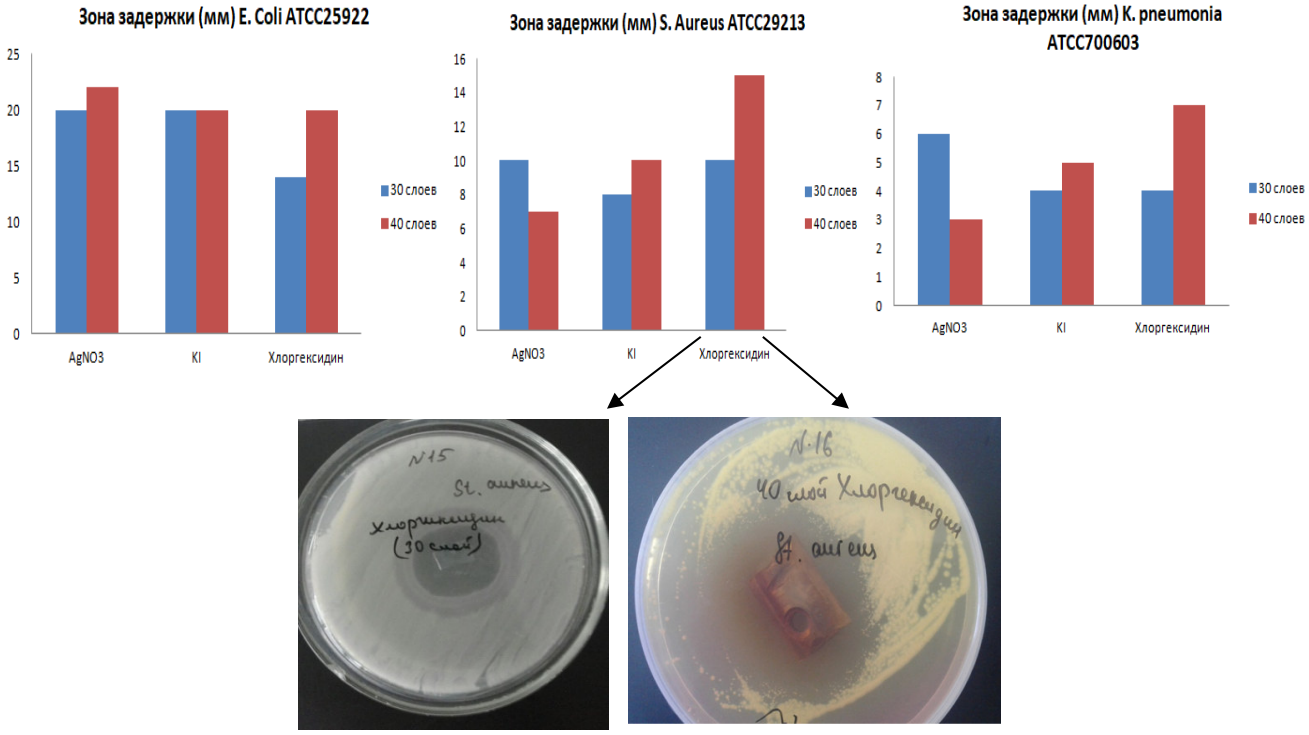


Рисунок 3.34 – Изучение антимикробной активности многослойных покрытий $(ХЗ/КМЦ)_n$ имеющий различные антибактериальные препараты

Проявление антибактериальной активности напрямую связано с высвобождением низкомолекулярного соединения из покрытий. В пленке КМЦ предпочтительнее связывается с ХЗ, а не с ХГ, то есть доля заряженных групп, которая приходится на связывание ХГ довольно мала, в результате ХГ легко диффундирует через покрытие.

Таким образом, сравнительный анализ двух методов показал, что по сравнению со вторым подходом, при включении ХГ во время сборки, можно манипулировать количеством ХГ в ПЭМС, так как суммарное количество ХГ зависит от общего количества бислоев. Также, с помощью первого подхода можно ввести большее количество ХГ, однако это оказывает незначительное влияние на антибактериальную активность.

В настоящей работе в качестве другого антибактериального агента, включенного в состав мультислоев, был использован триклозан, обладающий высокоэффективной антибактериальной активностью, но уступающий по этому показателю хлоргексидину.

Триклозан представляет собой 2,4,4"-трихлоро-2"-гидроксифенил эфир. В химической структуре триклозана имеются атомы хлора, которые, вероятно, и обусловливают активность и эффективность антибактериальных свойств соединения (рисунок 3.35).

Так как триклозан был выбран антибактериальным агентом, было изучено влияние pH, температура на водные растворы триклозана. Как показали экспериментальные данные, в области значений pH от 10 до 13 химическая природа триклозана не меняется, а ниже 10 выпадает осадок и поэтому, при pH<10 «посадку» триклозана на мультислои проводить нельзя.

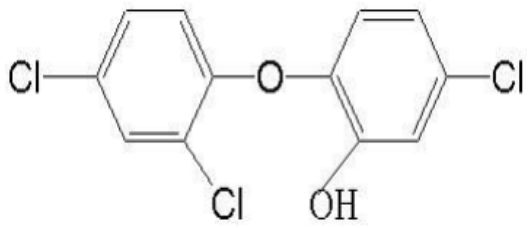


Рисунок 3.35 – Химическая структура триклозана

Использование триклозана как антибактериального агента предполагает возможность его взаимодействия с полиэлектролитами мультислоев и поэтому было интересно изучить взаимодействие в двойной системе: КМЦ-триклозан. С этой целью были составлены различные соотношения компонентов и измерены pH. При этом для всех соотношений незначительно менялась pH раствора, но визуальных изменений не наблюдалось, т.е. не выпадал осадок, На основании этих данных можно сделать вывод, что между компонентами идет чисто электростатическое взаимодействие, что также надо учитывать при определении условий получения полислоев с антибактериальными свойствами.

Аналогичные исследования были проведены и для системы хитозан-триклозан при различных их соотношениях, результаты этих исследований показали, что осадок не выпадает при избытке соотношении k=1:9 при pH>11, однако при остальных соотношениях наблюдается выпадение, вероятно, осадка самого хитозана, что однозначно указывают на необходимость учета этого фактора при составлении схемы образования полислоев и антибактериальный агент должен находится на поверхности КМЦ, а не хитозана.

Таким образом полученные результаты указывают на то, что антибактериальный агент-триклозан должен находиться на поверхности КМЦ, а не хитозана, при включении его в состав покрытий.

Так как триклозан (ТК) является гидрофобным, для облегчения включения его в гидрофильный мультислой сначала пленки $(ХЗ(6,5)/КМЦ(7))_n$ подвергаются кислотной обработке с последующим удалением воды. В результате образуются пленки, имеющие шероховатую структуру, что облегчает диффузию и адсорбцию триклозана (рисунок 3.36).

Прямое введение гидрофобного препарата достигается однократным процессом методом пропитки при длительном контакте. После насыщения пленок антибактериальным агентом пленки сушатся при температуре 100-110°С, для удаления влаги.

Антибактериальная активность покрытий $(ХЗ/КМЦ/)_n$-триклозан была определена методом диффузии. В качестве модельных бактерий были выбраны *E. coli* и *S. aureus*. Как видно на рисунке 3.37, после 24 ч инкубации покрытие $(ХЗ/КМЦ/)_n$- триклозан давало четко видимую зону ингибирования как для E. *coli*, так и для *S. aureus*, что указывает на то, что высвобождаемый триклозан эффективен при ингибировании роста как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. Зона ингибирования по отношению к *E.coli* составляет 14 мм, несмотря на то, что покрытия состояли всего лишь из 10

бислоев, в то время как данное значение для *S.aureus* составляло 20 мм. Высвобождение триклозана из пленки скорее всего связано с изменением влажности, что приводит к вытеснению гидрофобного антисептика из пленки, которая содержит воду. Кроме того, активность триклозана обуславливается связыванием с бактериальным ферментом, который в свою очередь, ингибирует синтез жирных кислот, необходимых для размножения и создания клеточных мембран бактерий.

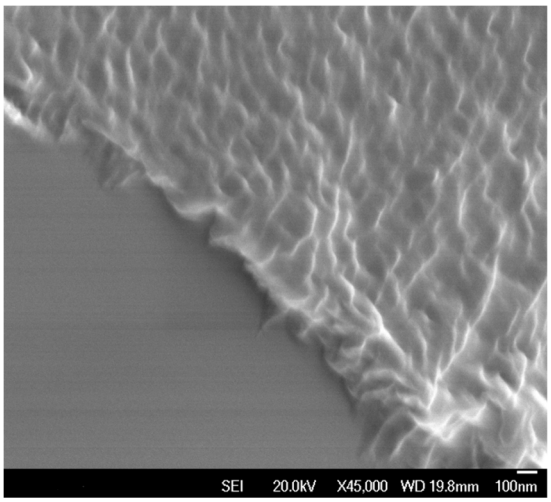


Рисунок 3.36 – Внешний вид поверхности пленки $(ХЗ/КМЦ)_{15}$ после кислотной обработки

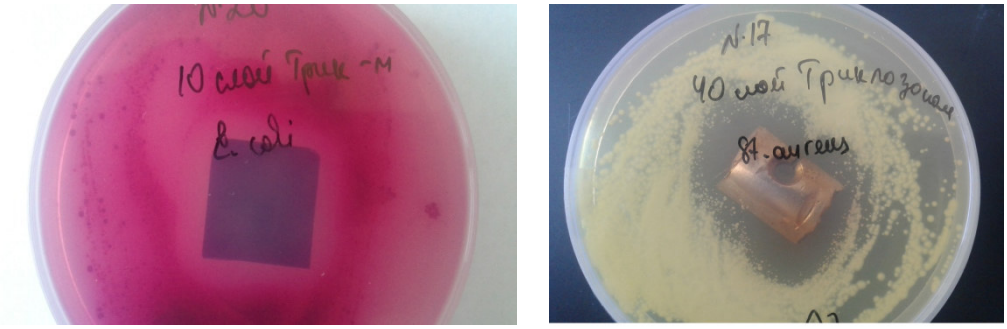


Рисунок 3.37 – Изучение антимикробной активности многослойных покрытий $(ХЗ/КМЦ)_n$ с триклозаном методом диффузии

Таким образом, включение триклозана в мультислои было успешно достигнуто с помощью предварительной модификации, и они показали антибактериальную активность.

3.6 Установление условий получения антибактериальных покрытий с НЧAg

Возрастающий интерес к покрытиям с антибактериальными свойствами является одной из причин бурного развития этой области науки. Среди различных решений этой проблемы, именно НЧAg, встроенные в полимерную матрицу, вызывают большой интерес из-за большой площади поверхности контакта с бактериями и уникальных физико-химических свойств, зависящих от

размера/формы НЧ. Кроме того, полиэлектролиты, которые способны образовать покрытия с разнообразной структурой и морфологией, обладают ярко выраженным потенциалом ингибирования агрегации НЧAg и контроля процесса высвобождения ионов серебра, тем самым обеспечивая устойчивый антибактериальный эффект и снижение цитотоксичности.

Исследование, проведенное в настоящей работе, было направлено на синтез и введение НЧAg в структуру тонких пленок с использованием двух альтернативных подходов:

а) внедрения НЧ во время сборки;

б) внедрение после сборки, с дальнейшим восстановлением «in situ». Каждый подход был проанализирован по отдельности, а также проведено сравнительное исследование обоих процессов, для установки различия в размере и распределения НЧ в покрытиях, полученных методом LbL.

Первый способ основан на постепенном включении НЧAg из внутренних слоев к внешней поверхности пленки. Процесс включает в себя следующие последовательные этапы: а) предварительное получение НЧAg в растворе хитозана, (далее в тексте ХЗ-НЧAg); б) поскольку ХЗ-НЧAg все еще имеет положительный заряд, то полученный комплекс напрямую адсорбировали в КМЦ, с целью создания ПЭМС. Покрытия были получены в случае, когда pH обоих полиэлектролитов было равно 4,0.

Как упоминалось ранее, способ внедрения НЧAg в структуру пленок, во время сборки, состоит из нескольких последовательных процедур, одним из первых этапов является приготовление раствора нитрата серебра в хитозане. Результат этого внешне простого процесса существенно зависит от концентрации серебра и соотношения неорганических и органических веществ в растворе (рисунок 3.38).

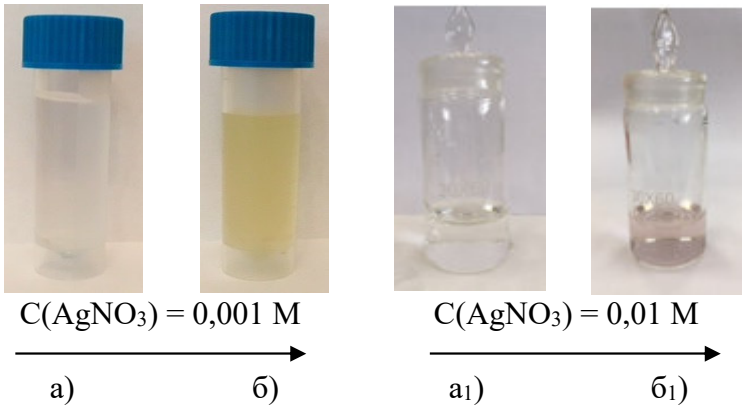


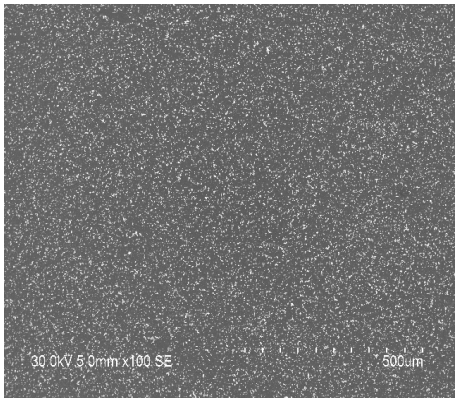
Рисунок 3.38 – Изменение цвета раствора ХЗ-$AgNO_3$ по истечению времени

В проведенных исследованиях значения концентрации $AgNO_3$ в начальном растворе составили 1 мМ и 10 мМ. При концентрации $AgNO_3$, в растворе ХЗ, равной 1 мМ наблюдается переход цвета от бесцветного к светло-желтому (рисунок 3.38), после 30 минут постоянного перемешивания, а в случае, когда кон-

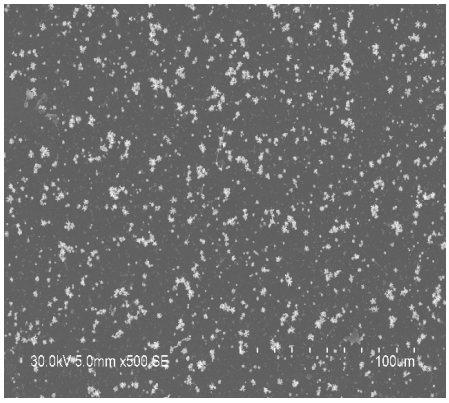
центрация была равной 10 мМ цвет раствора постепенно изменился на темно фиолетовый (рисунок 3.38), после 3 часов перемешивания, что свидетельствует об образовании НЧAg с размером от 100 нм. Причинами этих эффектов могут быть высокая концентрация нитрата серебра в растворе или влияние ХЗ. Тем не менее, при дальнейшей выдержке цвет раствора в каждом случае оставался постоянным.

С использованием данных растворов были получены покрытия, состоящие из 5 бислоев. Для оценки формы, размера и распределения НЧAg по поверхности был сделан снимок, с использованием сканирующего электронного микроскопа (рисунок 3.39).

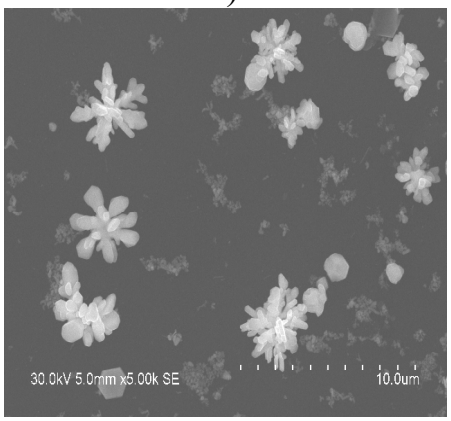
Как и следовало ожидать, при высоких концентрациях (образцы серии I) можно наблюдать образование трех различных форм частиц Ag, таких как сферические, дендриты (рисунок 3.39 (в)) и агрегаты (рисунок 3.39 (г)). Однако, при уменьшении концентрации нитрата серебра до 1 мМ (образцы серии II), можно наблюдать уменьшение количества НЧAg, распределенных по поверхности, а также не наблюдается скопление частиц, из-за меньшей концентрации иона серебра в начальном растворе.



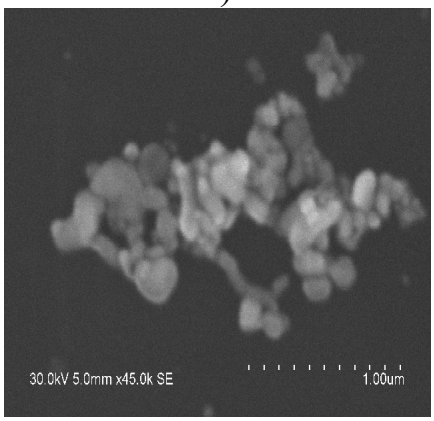
а)



б)



в)

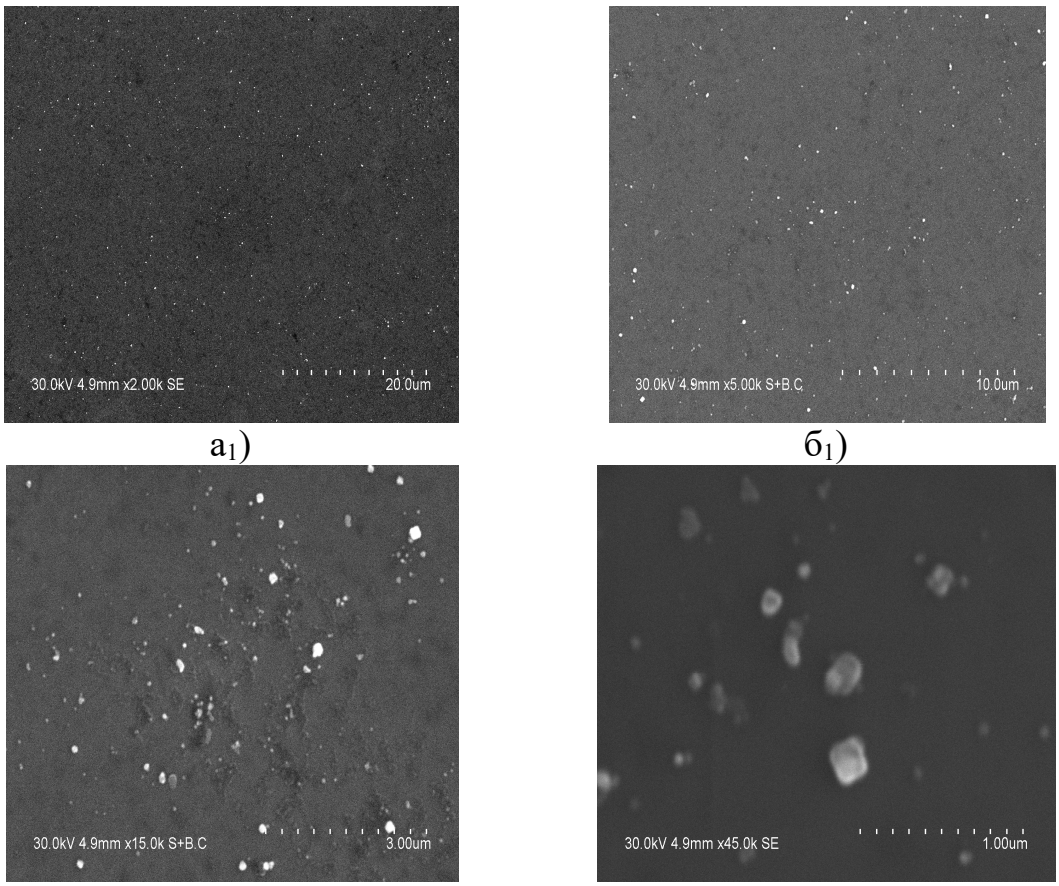


г)

I серия

I серия - $C(AgNO_3)$ = 10мМ; II серия - $C(AgNO_3)$ = 1мМ.

Рисунок 3.39 – СЭМ изображения пленок $(НЧAg\text{-}ХЗ/КМЦ)_5$, полученных при различных концентрациях нитрата серебра, лист 1



а$_1$) б$_1$)

в$_1$) г$_1$)

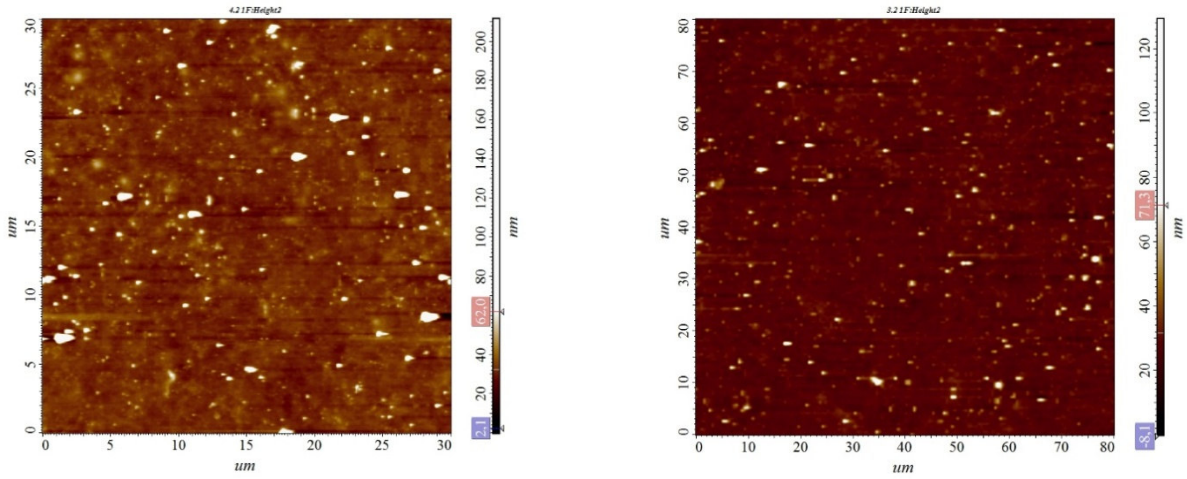
I серия - C($AgNO_3$) = 10мМ; II серия - C($AgNO_3$) = 1мМ.

Рисунок 3.39, лист 2

Еще одним важным аспектом является то, что по сравнению с образцами I серии, как видно из рисунка, образцы II серии имеют большее количество частиц имеющих размер меньше 100 нм. Однако, в определенных зонах, были обнаружены НЧ переменного размера со случайным распределением по поверхности.

НЧAg также были получены с помощью второго подхода, когда твердые подложки с готовыми покрытиями погружались в раствор нитрата серебра с концентрацией 10 мМ и 1 мМ $AgNO_3$ с дальнейшем восстановлением «in situ» (рисунок 3.40).

Схема всего процесса представлена на рисунке 3.41. Как видно из рисунка, часть карбоксильных групп остается в протонированном виде -COOH, а часть ионизированных групп, ответственных за электростатическое взаимодействие с положительными группами ХЗ, образуют ионные пары, связывающие последовательно адсорбированные многослойные слои при сборке методом LbL. Выдержка пленки в растворе нитрата серебра непосредственно приводит к замене протонов кислоты на катионы металлов.



а) б)

а) мелкомасштабных (30×30 мкм^2); б) крупномасштабных размерах (80×80 мкм^2).

Рисунок 3.40 – АСМ изображения покрытий (НЧAg-ХЗ/КМЦ)$_5$, полученные при концентрации C($AgNO_3$) = 10мМ

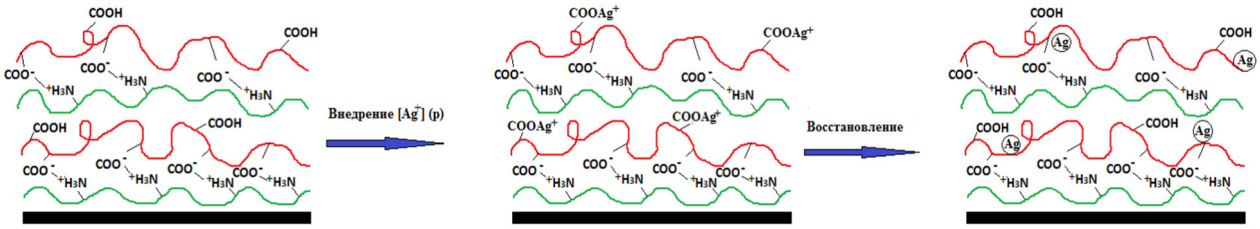


Рисунок 3.41 – «In situ» восстановление ионов серебра до НЧAg в ПЭМС покрытий

После иммобилизации ионов серебра в пленке, проводили химическое восстановление «in situ» ионов серебра до НЧ с помощью погружения пленки в раствор аскорбиновой кислоты. В результате реакции карбоксильные группы регенерируются и приобретают способность к повторному связыванию катионов. Восстановление ионов серебра именно аскорбиновой кислотой (при концентрации 1 мМ) объясняется ее низкой токсичностью и происходит по реакции:

$$2Ag^+ + C_6H_8O_6 \rightarrow 2Ag^0 + C_6H_6O_6 + 2H^+$$

Так как ПЭМС пленка используется в качестве «резервуара» НЧAg, то значение pH раствора полиэлектролитов, используемых при нанесении покрытий, сильно влияет на количество НЧAg внедренных в полимерную матрицу. Для интерпретации данных по влиянию типа «резервуара», образующегося при различных условиях, на процесс внедрения ионов Ag^+ в полимерную матрицу и их дальнейшее восстановление, было проведено многократное погружение покрытий в раствор соли (рисунок 3.42). Поэтапное изменение цвета

стеклянной пластины связано с количеством циклов введение/восстановление и указывает на протекание «in situ» процесса восстановление катионов серебра до НЧAg в полимерной пленке. Как было сказано выше, покрытия ХЗ/КМЦ нанесенная при pH=2,5 содержит много сегментов для ионообмена, так как практически ~ 55 % карбоксильных групп остаются свободными (не связанными с аминогруппами) и имеют «петлистую» конформацию. В результате уже после второго цикла включение/восстановление цвет стеклянной пластины резко меняется на темно-желтый (рисунок 3.42).

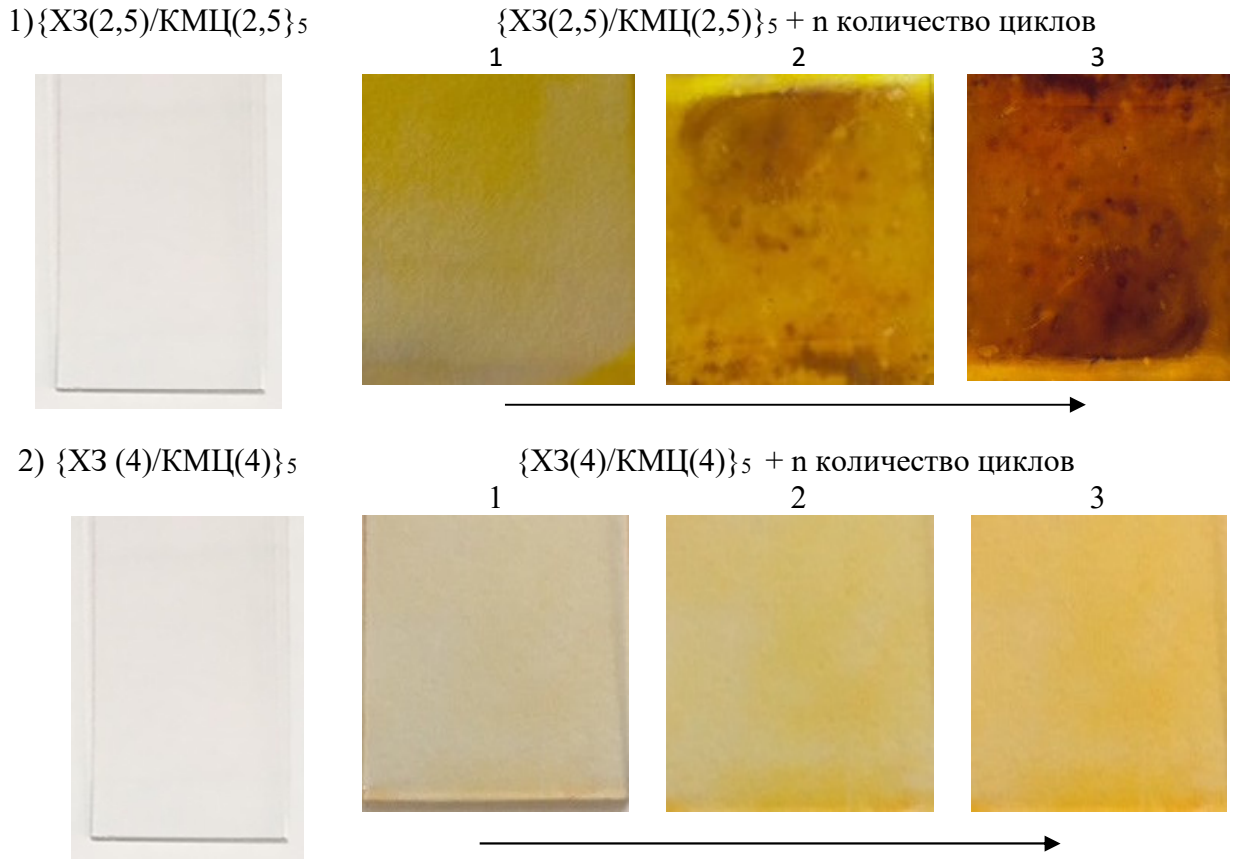
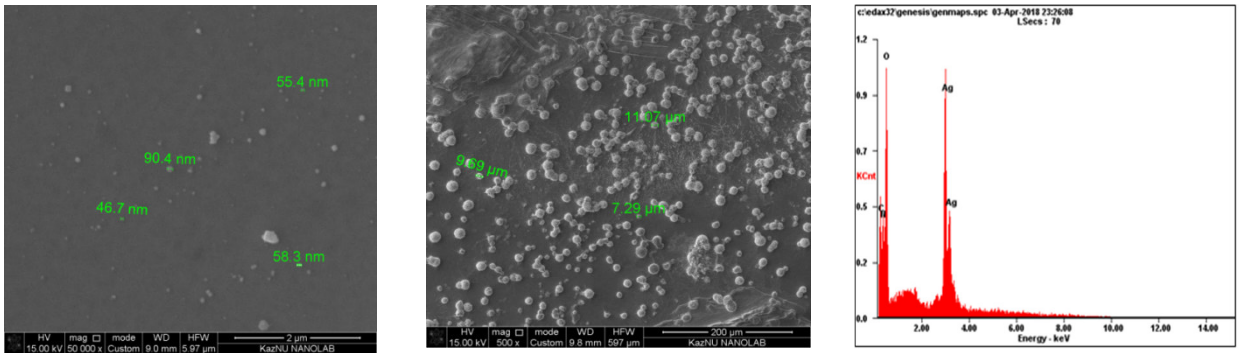


Рисунок 3.42 – Изменение цвета покрытий с НЧAg зависимости от количества циклов включение/восстановление и pH сборки, соответственно

Также можно наблюдать, что твердая подложка не равномерно покрыта из-за сильного проникновение цепей КМЦ внутрь и наружу пленки и в результате этого местами цвет переходит из желтого в коричневый. А в случае когда сборка было проведено при pH - 4,0 около 25 % карбоксильной группы КМЦ в покрытий находятся в кислотной форме, а больше часть депротонированных групп КМЦ связывается с аминогруппами ХЗ и следовательно, это приводит к меньшему количеству иммобилизированных Ag^+ в пленке, о чем свидетельствует эволюция цвета с переходом из 1 цикла на 3. Тем не менее это благоприятно повлияло на образование более равномерной пленки за счет изменения конформации КМЦ. В обоих случаях не рассматривается связывание Ag^+ со свободными аминогруппами ХЗ, которые способны также координировать катионы металлов, но в интервале исследуемого pH хитозан имеет высокую ионизацию и не доступен для связывания с Me^+.

Также, было исследовано влияние концентрации нитрата серебра на формы и размеры частиц. Как видно из рисунка 3.43 после 3 цикла включение/восстановление, при концентрации 1 мМ размеры частиц варьируются в интервале 40-130 нм, что связано со спонтанным «in situ» восстановлением. Этот процесс является трудно контролируемым, в результате происходит образование случайно распределенных частиц со средним размером ~ 70 нм. Однако с ростом концентрации до 10 мМ размеры частиц достигают микронных размеров. Это связано с тем, что с увеличением концентрации в ионообмен вступает большое количество ионов серебра и образовавшиеся большие частицы являются центрами зародышеобразования и рекристаллизации НЧAg. Поскольку не только размеры частиц, но и распределение частиц по поверхности является важным, из рисунка 3.43 (а) можно наблюдать что при низких концентрациях поверхность не полностью покрывается НЧAg, что желательно для получения покрытий с наименьшей цитотоксичностью. Однако увеличение концентрации приводит не только к скоплению НЧAg, также можно видеть очень большое количество частиц микронного размера, распределенных по поверхности, которые способствуют проявлению меньшей антибактериальной активности из-за уменьшения контактирующей с бактериями площади поверхности. Кроме того, процесс агрегации частиц объясняется наличием более высокого объемного содержания НЧAg, что приводит к их более эффективному укрупнению.



а) б) в)

а) $C(AgNO_3)=10^{-3}$ М); б) $C(AgNO_3)=10^{-2}$ М; в) EDX-спектр образца.

Рисунок 3.43 – СЭМ изображения поверхности пленки $(ХЗ/КМЦ)_5$ с НЧAg

По данным авторов работы [180], различные формы НЧAg, такие как: треугольная, сферическая и стержнеобразная оказывают различное биоцидное действие НЧAg из-за отличия активности различных граней даже при одинаковых значениях среднего размера и площади поверхности частиц. В нашем случае происходит образование более однородных НЧAg сферической формы.

Результаты, полученные методом EDX-спектроскопии (рисунок 3.43 (с)), также указывают на то, что, в состав мультислоя, нанесенного на поверхность имплантанта, входит серебро. Однако так как данный метод дает информацию только об элементном составе, то возможно, кроме металлического серебра в образце может присутствовать и оксид серебра.

Таким образом, размер НЧ в мультислоях и их распределение по поверхности можно регулировать путем выбора начальной концентрации $AgNO_3$.

Так как ионы серебра подавляют образование биопленки бактерий, также нам интересно было исследовать высвобождение антибактериального препарата в фосфатном буфере в присутствии физиологического раствора в течение 14 суток, так как хирургическая рана заживает в течение 10-14 дней (рисунок 3.44). Как видно из рисунка, максимальное количество ионов серебра высвобождается в течение 24 часов, что очень желательно в после операционном периоде. Дальнейшее высвобождение ионов серебра уменьшается, что является положительным фактором, так как постоянное выделение серебра не рекомендуется из-за цитотоксичности к клеткам-хозяевам. Высвобождение ионов серебра из покрытий с НЧAg объясняется тем, что в аэробных растворах металлическое серебро переходит в Ag_2O. Затем метаболизм бактерии создает кислую среду для перехода серебра в ионную форму.

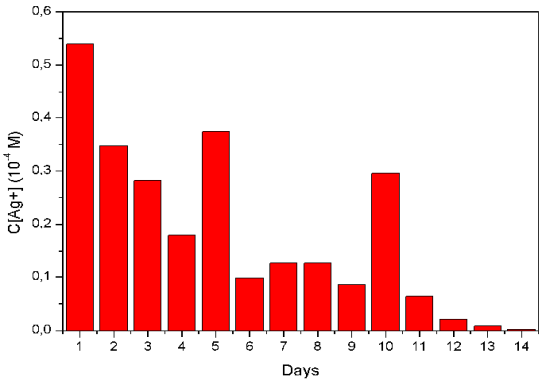
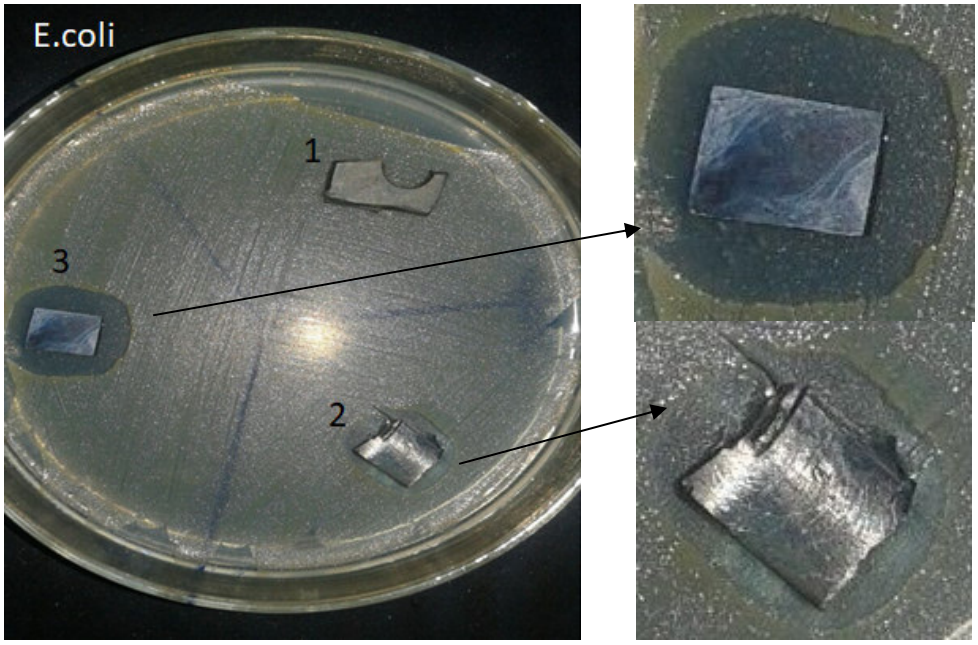


Рисунок 3.44 – Высвобождение ионов серебра из мультислойной покрытий ХЗ/КМЦ с НЧAg в фосфатном буфере в присутствии физиологического раствора

Высвобождение ионов серебра в растворе не является монотонным, что объясняется как наличием агрегатов на поверхности, так и неравномерным распределением НЧ в пространстве между отдельными слоями, что приводит к различной кинетике миграции ионов. Однако следует иметь ввиду, что в течение постоперационного времени из покрытия высвобождается не все количество ионов серебра. Первоначальное большое количество высвобождаемых ионов серебра препятствует немедленной колонизации бактерий на поверхности Ti после операции имплантации. Затем необходимо поддерживать устойчивый уровень высвобождение Ag, чтобы противостоять бактериальной инвазии от внешних краев раны до заживления слизистой оболочки.

Для апробации работы были получены мультислои на поверхности титановых и стальных имплантатов, содержащих НЧAg и определена антибактериальная активность полученных образцов на музейном штамме бактерии *Staphylococcus aureus*.

На рисунке 3.45 показаны результаты, иллюстрирующие антибактериальную активность образцов после выдержки в течение 24 ч. Зона угнетения (ЗУ) вокруг оригинальных титановых имплантатов полностью отсутствует (образец 1). Несмотря на меньшую восприимчивость НЧAg к грамположительным бактериям из-за толстой пептидогликановый клеточной стенки, вокруг образцов 2 и 3 наблюдается зона ингибирования, причем для образца покрытого слоями ХЗ/Na-КМЦ она составляет 3,8 мм, в то время как для образца ХЗ/КМЦ с НЧAg размер зоны увеличивается до 7,1 ± 0,03 мм. Проявление зоны угнетения (ЗУ) вокруг 2 образца возможно благодаря присутствию положительного заряда на верхнем слое, что в дальнейшем привело к уничтожению микроорганизмов за счет контактно-убивающих свойств. Для обоих образцов (2,3) появление ЗУ связано с присутствием пленочного покрытия. Тем не менее, следует обратить внимание (3 образец) на то, что покрытия с НЧAg были нанесен не на титановые имплантаты а на кремниевые пластинки. Антибактериальный эффект в 3 образце можно преимущественно объяснить тем, что Ag^+ связывается с отрицательно заряженным пептидогликаном (специфическим слоем бактериальной клеточной стенки), что приводит к неправильному сворачиванию белков, метаболизирующих кислород, и гибели бактерий.



Антибактериальная активность по отношению к бактериям E. Coli: 1) оригинального имплантата; 2) имплантатов с многослойными покрытиями $(ХЗ/Na\text{-}КМЦ)_{10,5}$; 3) $(ХЗ/Na\text{-}КМЦ)_{10}$ – НЧAg.

Рисунок 3.45 – Антибактериальная активность по отношению к бактериям E. coli

На основе вышеприведенного сравнительного анализа двух подходов, можно сделать следующие выводы:

– Размеры НЧAg введенных поэтапным методом больше, чем, размер частиц, полученных с помощью второго подхода при восстановление ионов серебра «in situ»;

– При использовании обоих подходов наблюдается равномерное распределение НЧAg по поверхности;

– Преимуществом второго подхода, введения НЧAg в полимерную матрицу после сборки, является то, что ионный обмен и восстановление катионов серебра до НЧAg можно многократно повторять для увеличения концентрации металла в пленке. При этом карбоновые кислоты подвергаются регенерации вследствие депротонирования. Используя этот подход, можно увеличить на порядок объемную долю НЧAg в ПЭМС;

– Второй подход дает возможность контроля количества ионов серебра, введенных в пленку с помощью количественного анализа раствора до и после использования, в то время как при использовании первого подхода трудно провести систематический контроль концентрации частиц в пленке как в процессе сборки, так в полученной пленке после сборки.

– Таким образом, несмотря на различие подходов, НЧAg образуются как на внешней поверхности мультислоя, так и внутри бислоев. Так как полиэлектролиты являются хорошими комплексообразователями, то частицы серебра, вероятно, образуют координационные связи с аминогруппами хитозана или карбоксильными группами поликислоты. В результате, система хитозан-карбоксиметилцеллюлоза выполняет роль резевуара для НЧAg. Можно предположить, что в этом случае ПЭМС представляют собой «умную» структуру, которая может при определенных условиях порциями выдавать антибактериальный агент. Кроме того, такое «умное» покрытие, полученное методом LbL отличается тем, что после полного высвобождения активного компонента (НЧAg) полиэлектролиты подвергаются биодеградации за счет ферментов, и при этом сами проявляют антибактериальный эффект.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам диссертационного исследования сделаны следующие выводы:

1 На основании квантово-химических расчетов структурных и энергетических характеристик проведен научно-обоснованный выбор полимерных матриц: хитозана, карбоксиметилцеллюлозы натрия, альгината и антибактериальных агентов из числа перспективных антисептиков, какими являются триклозан, хлоргексидин. Результаты этих исследований позволили теоретически предсказать и обосновать природу активных центров электростатического взаимодействия выбранных полиэлектролитов и антибактериальных агентов: хлоргексидина и триклозана с полимерными матрицами предполагаемых мультислоев.

2 Разработаны условия очистки, подготовки и активации поверхности стандартных пластинок (кремниевые и стеклянные) и ортопедических имплантатов. На основании физико-химических методов были исследованы морфология и гидрофильность поверхностей и установлено, что:

- травление поверхности титановых, стальных имплантатов органическими растворителями с последующей обработкой в ультразвуковой ванне и раствором «пиранья» значительно уменьшает углы смачивания до 62° и обеспечивает гидрофильность поверхности носителей;

- для кремниевых и стеклянных носителей наиболее приемлемы обработка раствором серной кислоты с добавлением перекиси водорода. Полученные в результате обработки многочисленные микротрещины являются активными центрами и согласно теории Тейлора, способствуют хорошей и равномерной адсорбции функциональных групп полиэлектролитов.

3 Установлены условия получения нанопокрытий на поверхности твердых подложек. Охарактеризованы условия метода «погружения»: а) автоматическое погружение и вынимание с заданной скоростью (0,001 м/с) без перемешивания; б) ручное погружение подложки в раствор с перемешиванием. Установлено, что использование полуавтоматического «dip coater» позволяет получать монотонно растущую пленку на обе стороны твердой подложки, в то время как ручное погружение подложки в раствор с перемешиванием приводит к хаотичному наложению слоев нанопленки и образование дефектов в результате случайной диффузии. Изучение влияния начальной концентрации полиэлектролитов на качество пленки показало, что в диапазоне изученных параметров оптимальной концентрацией полиэлектролитов для получения более гладкой пленки является 0,01 М.

Показано влияние pH растворов наносимых полиэлектролитов на толщину, шероховатость и морфологию пленок ХЗ/ПАК и ХЗ/КМЦ. Выявлено что толщина пленок зависит от числа бислоев линейно, степень ионизации и конформация полиэлектролитов, вызванной изменением pH системы, является критерием образование тонкой прозрачной и толстой непрозрачной пленки. Для полной характеризации морфологических свойств покрытий ХЗ/ПАК, полученных в интервале pH 3-6, были определены среднеквадратичная шеро-

ховатость (R_q) с помощью полуконтактного режима АСМ. Относительно большое значение R_q, равное 15,3 ± 1,4 нм, получено для образца при pH-5, в то время как изменение pH на единицу приводит к уменьшении значения R_q, до 4,1 ± 0,1. Показатель преломления (n), практически для всех образцов пленок, при λ = 632,8 нм, находится в диапазоне 1,4-1,55, что является характерным для прозрачных полимерных пленок. Результаты эллипсометрического анализа показали, что полученные пленки хорошо описываются дисперсионной моделью Коши в рамках модели однослойной отражающей системы.

4 Обосновано два метода нанесения антибактериального агента – хлоргексидина в мультислоиные покрытия: 1) прямое осаждение молекул ХГ, путем ассоциации с одним из полиэлектролитов, принимая его в качестве одного из многослойных компонентов; 2) погружение и пропитка предварительно собранных пленок в раствор антисептика. Для каждого подхода был выбран свой «резервуар» для доставки антибактериального агента. Была разработана схема формирования антибактериального покрытия в пленках, так называемый «нижележащей и верхнележащей части». Установлена кинетика высвобождения ХГ из пленки $(ХЗ/ПАК)_{10}$ – $(ХГ/ПАК)_{40,5}$, согласно которой в первые 24 часа высвобождается 0,45 мг/мл, самая большая доза антисептика, а в последующие часы идет более медленное высвобождение. Выявлено, что образцы, полученные по двум методам, показали антибактериальную активность против *S.aureus* (являются наиболее распространенным микроорганизмам, участвующий в инфицировании, связанных с ортопедическими имплантациями), а также в отношении музейного штамма *E.coli* ATCC25922 и дикого штамма *P.Aeruginosa*. Установлено, что покрытия $(ХЗ/КМЦ)_{40}$ с ХГ показал 19 мм и 7 мм зоны угнетения против *E.coli* ATCC25922 и *P.Aeruginosa*.

5 Разработаны два метода (подхода) получения полиэлектролитных мультислоев, содержащих НЧAg. В первом подходе, основанно на поэтапном включении НЧAg в одну из полимерных матриц, установлено влияние начальной концентрации $AgNO_3$ на размер частиц. Выявлено образование НЧAg трех видов: такие как дендриты, сферические и агрегаты. Во втором подходе при получении НЧAg, обоснован механизм химического восстановления «in situ» ионов серебра до наночастиц, который основан на том, что пленки погружают в раствор аскорбиновой кислоты для восстановления ионов серебра до металлического, а затем освободившиеся карбоксильные группы регенерируются и снова готовы для повторного связывания катиона. На основании экспериментальных данных предложена общая схема формирования таких пленок. Размер НЧ в мультислоях и их распределение по поверхности можно регулировать путем выбора начальной концентрации $AgNO_3$ и оптимальная концентрация ионов серебра для получения наноразмерных сферических частиц составляет 0,001М.

Полученные нанопленки, содержащие в своем составе НЧAg, показали антибактериальную активность по отношению к музейным штаммам бактерии *Staphylococcus aureus*. Зона угнетения для образца ХЗ/КМЦ с НЧAg составляет 7,1 ± 0,03 мм.

Все вышеупомянутое позволило достичь цели диссертационного исследования – разработки условий получения антибактериальных пленок на основе биосовместимых, экологически безвредных полиэлектролитов для защиты изделий медико-биологического назначения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1 Arciola C. R., Campoccia D., Montanaro L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion //Nature Reviews Microbiology. – 2018. – Vol. 16, № 7. – P. 397.

2 Andersen O.Z., Offermanns V., Sillassen M., et al. Accelerated bone ingrowth by local delivery of strontium from surface functionalized titanium implants //Biomaterials. – 2013. – Vol. 34, № 24. – P. 5883-5890.

3 Osmon D.R., Berbari E.F., Berendt A.R., et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America //Clinical infectious diseases. – 2012. – Vol. 56, № 1. – P. e1-e25.

4 Arciola C.R., Campoccia D., Speziale P., et al. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials //Biomaterials. – 2012. – Vol. 33, № 26. – P. 5967-5982.

5 Monds R.D., O'Toole G.A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review //Trends in microbiology. – 2009. – Vol. 17, № 2. – P. 73-87.

6 Campoccia D., Montanaro L., Arciola C.R. A review of the clinical implications of anti-infective biomaterials and infection-resistant surfaces //Biomaterials. – 2013. – T. 34, № 33. – P. 8018-8029.

7 Anderson J.M. Future challenges in the in vitro and in vivo evaluation of biomaterial biocompatibility //Regenerative biomaterials. – 2016. – Vol. 3, № 2. – C. 73-77.

8 Camargo I.B., Van Sickels J.E. Surgical complications after implant placement //Dental Clinics. – 2015. – Vol. 59, № 1. – P. 57-72.

9 Darouiche R.O. Treatment of infections associated with surgical implants //New England Journal of Medicine. – 2004. – Vol. 350, № 14. – P. 1422-1429.

10 Scholz M.S., Blanchfield J.P., Bloom L.D., et al. The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices: A review //Composites Science and Technology. – 2011. – Vol. 71, № 16. – P. 1791-1803.

11 Savdenbekova B.E., Ospanova A.K., Uvarov N.F. Application of the multilayer assembly (LBL) method in engineering technologies for obtaining perspective composite materials with purpose properties// News of the Academy of sciences of the Republic of Kazakhstan. – 2018. – Vol. 1(427). – P. 31-37.

12 Kenawy E.R., Abdel-Hay F.I., El-Shanshoury A.E.R.R., et al. Biologically active polymers. V. Synthesis and antimicrobial activity of modified poly (glycidyl methacrylate-co-2-hydroxyethyl methacrylate) derivatives with quaternary ammonium and phosphonium salts //Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry. – 2002. – Vol. 40, № 14. – P. 2384-2393.

13 Kenawy E.R., Worley S.D., Broughton R. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review //Biomacromolecules. – 2007. – Vol. 8, № 5. – P. 1359-1384.

14 Asghari F., Samiei M., Adibkia K., et al. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review //Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. – 2017. – Vol. 45, № 2. – P. 185-192.

15 Liu X., Holzwarth J.M., Ma P.X. Functionalized synthetic biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering //Macromolecular bioscience. – 2012. – Vol. 12, № 7. – P. 911-919.

16 Huang K.S., Yang C.H., Huang S.L., et al. Recent advances in antimicrobial polymers: a mini-review //International journal of molecular sciences. – 2016. – Vol. 17, № 9. – P. 1578.

17 Francolini I., Vuotto C., Piozzi A., et al. Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview //Apmis. – 2017. – Vol. 125, № 4. – P. 392-417.

18 Muxika A., Etxabide A., Uranga J., et al. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications //International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – Vol. 105. – P. 1358-1368.

19 Bano I., Arshad M., Yasin T., et al. Chitosan: A potential biopolymer for wound management //International journal of biological macromolecules. – 2017. – Vol. 102. –P. 380-383.

20 Peng Z.X., Tu B., Shen Y., et al. Quaternized chitosan inhibits icaA transcription and biofilm formation by Staphylococcus on a titanium surface //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2011. – Vol. 55, № 2. – P. 860-866.

21 Jiang L., Lu Y., Liu X., et al. Layer-by-layer immobilization of quaternized carboxymethyl chitosan/organic rectorite and alginate onto nanofibrous mats and their antibacterial application //Carbohydrate polymers. – 2015. – Vol. 121. – P. 428-435.

22 Hernandez-Montelongo J., Lucchesi E.G., Gonzalez I., et al. Hyaluronan/chitosan nanofilms assembled layer-by-layer and their antibacterial effect: A study using Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2016. – Vol. 141. – P. 499-506.

23 Silva J.M., García J.R., Reis R.L., et al. Tuning cell adhesive properties via layer-by-layer assembly of chitosan and alginate //Acta biomaterialia. – 2017. – Vol. 51. – P. 279-293.

24 Corstens M.N., Berton-Carabin C.C., Kester A., et al. Destabilization of multilayered interfaces in digestive conditions limits their ability to prevent lipolysis in emulsions //Food structure. – 2017. – Vol. 12. – P. 54-63.

25 Kamburova K., Mitarova K., Radeva T. Polysaccharide-based nanocapsules for controlled release of indomethacin //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2017. – Vol. 519. – P. 199-204.

26 Abilova G.K., Kaldybekov D.B., Ozhmukhametova E.K., et al. Chitosan/poly (2-ethyl-2-oxazoline) films for ocular drug delivery: Formulation, miscibility, in vitro and in vivo studies //European Polymer Journal. – 2019. – Vol. 116. – P. 311-320.

27 Barros J., Dias A., Rodrigues M.A., et al. Antibiofilm and Antimicrobial Activity of Polyethylenimine: An Interesting Compound for Endodontic Treatment //The journal of contemporary dental practice. – 2015. – Vol. 16, № 6. – P. 427-432.

28 Bergen J.M., Park I.K., Horner P.J., et al. Nonviral approaches for neuronal delivery of nucleic acids //Pharmaceutical research. – 2008. – Vol. 25, № 5. – P. 983-998.

29 Nuzhdina A.V., Morozov A.S., Kopitsyna M.N., et al. Simple and versatile method for creation of non-leaching antimicrobial surfaces based on cross-linked alkylated polyethyleneimine derivatives //Materials Science and Engineering: C. – 2017. – Vol. 70. – P. 788-795.

30 Yew P.Y. M., Chee P.L., Cally O., et al. Quarternized Short Polyethylenimine Shows Good Activity against Drug-Resistant Bacteria //Macromolecular Materials and Engineering. – 2017. – Vol. 302, № 9. – P. 1700186.

31 Liu M., Li J., Li B. Mannose-modificated polyethylenimine: a specific and effective antibacterial agent against Escherichia coli //Langmuir. – 2018. – Vol. 34, № 4. – P. 1574-1580.

32 Hebeish A., Hashem M., El-Hady M.A., et al. Development of CMC hydrogels loaded with silver nano-particles for medical applications //Carbohydrate polymers. – 2013. – Vol. 92, № 1. – P. 407-413.

33 Kaczmarek H., Metzler M., Węgrzynowska-Drzymalska K. Effect of stabilizer type on the physicochemical properties of poly (acrylic acid)/silver nanocomposites for biomedical applications //Polymer Bulletin. – 2016. – Vol. 73, № 10. – P. 2927-2945.

34 Liu X., Tang C., Han W., Xuan H., Ren J., Zhang J., Ge L. Characterization and preservation effect of polyelectrolyte multilayer coating fabricated by carboxymethyl cellulose and chitosan //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2017. – Vol. 529. – P. 1016-1023.

35 Jiang L.Y., Li Y.B., Zhang L., Wang X.J. Preparation and characterization of a novel composite containing carboxymethyl cellulose used for bone repair //Materials Science and Engineering: C. – 2009. – Vol. 29, № 1. – P. 193-198.

36 Arnon H., Zaitsev Y., Porat R., Poverenov E. Effects of carboxymethyl cellulose and chitosan bilayer edible coating on postharvest quality of citrus fruit //Postharvest Biology and Technology. – 2014. – Vol. 87. – P. 21-26.

37 Kuhn H., Möbius D. Systems of monomolecular layers—Assembling and physico-chemical behavior //Angewandte Chemie International Edition in English. – 1971. – Vol. 10, № 9. – P. 620-637.

38 Netzer L., Sagiv J. A new approach to construction of artificial monolayer assemblies //Journal of the American Chemical Society. – 1983. – Vol. 105, № 3. – P. 674-676.

39 Decher G., Hong J.D. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: II. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles and polyelectrolytes on charged surfaces //Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie. – 1991. – Vol. 95, № 11. – P. 1430-1434.

40 Richardson J.J., Björnmalm M., Caruso F. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms //science. – 2015. – Vol. 348, № 6233. – P. aaa2491.

41 Lee D., Rubner M. F., Cohen R. E. All-nanoparticle thin-film coatings //Nano letters. – 2006. – Vol. 6, № 10. – P. 2305-2312.

42 Shim B.S., Podsiadlo P., Lilly D.G., et al. Nanostructured thin films made by dewetting method of layer-by-layer assembly //Nano letters. – 2007. – Vol. 7, № 11. – P. 3266-3273.

43 Richardson J.J., Liang K., Kempe K., Ejima H., Cui J., Caruso F. Immersive polymer assembly on immobilized particles for automated capsule preparation //Advanced Materials. – 2013. – Vol. 25, № 47. – P. 6874-6878.

44 Mateos A.J., Cain A.A., Grunlan J.C. Large-scale continuous immersion system for layer-by-layer deposition of flame retardant and conductive nanocoatings on fabric //Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2014. – Vol. 53, № 15. – P. 6409-6416.

45 Zhang J., Jiang K., Zhao W., Yang Zh., Nie H., Yao Zh. Large-area and transparent antifogging polymeric coatings via highly efficient and facile layer-by-layer assembly //Polymer Testing. – 2019. – Vol. 77. – P. 105907.

46 Varshney P., Mohapatra S.S. Durable and regenerable superhydrophobic coatings for brass surfaces with excellent self-cleaning and anti-fogging properties prepared by immersion technique //Tribology International. – 2018. – Vol. 123. – P. 17-25.

47 Zabihi F., Xie Y., Gao S., Eslamian M. Morphology, conductivity, and wetting characteristics of PEDOT: PSS thin films deposited by spin and spray coating //Applied Surface Science. – 2015. – Vol. 338. – P. 163-177.

48 Ma L., Cheng M., Jia G., et.al. Layer-by-layer self-assembly under high gravity field //Langmuir. – 2012. – Vol. 28, № 25. – P. 9849-9856.

49 Jiang C., Liu X., Luo C., Zhang Y., Shao L., Shi F. Controlled exponential growth in layer-by-layer multilayers using high gravity fields //Journal of Materials Chemistry A. – 2014. – Vol. 2, № 34. – P. 14048-14053.

50 Huang Y., Dan N., Dan W., et al. Facile fabrication of gelatin and polycaprolactone based bilayered membranes via spin coating method with antibacterial and cyto-compatible properties //International journal of biological macromolecules. – 2019. – Vol. 124. – P. 699-707.

51 Krogman K.C., Lowery J.L., Zacharia N.S., et al. Spraying asymmetry into functional membranes layer-by-layer //Nature materials. – 2009. – Vol. 8, № 6. – P. 512.

52 Merrill M.H., Sun C.T. Fast, simple and efficient assembly of nanolayered materials and devices //Nanotechnology. – 2009. – Vol. 20, № 7. – P. 075606.

53 Mulhearn W.D., Kim D.D., Gu Y., et al. Facilitated transport enhances spray layer-by-layer assembly of oppositely charged nanoparticles //Soft Matter. – 2012. – Vol. 8, № 40. – P. 10419-10427.

54 Alongi J., Carosia F., Frache A., et al. Layer by layer coatings assembled through dipping, vertical or horizontal spray for cotton flame retardancy //Carbohydrate polymers. – 2013. – Vol. 92, № 1. – P. 114-119.

55 Gittleson F.S, Kohn D,J, Li X., et al. Improving the assembly speed, quality, and tunability of thin conductive multilayers //ACS nano. – 2012. – Vol. 6, № 5. – P. 3703-3711.

56 Manoharan C. Pavithra G, Bououdina M., et al. Characterization and study of antibacterial activity of spray pyrolysed ZnO: Al thin films //Applied Nanoscience. – 2016. – Vol. 6, № 6. – P. 815-825.

57 Dhanapandian S., Arunachalam A., Manoharan C. Effect of deposition parameters on the properties of TiO 2 thin films prepared by spray pyrolysis //Journal of Sol-Gel Science and Technology. – 2016. – Vol. 77, № 1. – P. 119-135.

58 Bakhsheshi-Rad H.R. Hamzah E, Ismail A.F., et al. Preparation and characterization of NiCrAlY/nano-YSZ/PCL composite coatings obtained by combination of atmospheric plasma spraying and dip coating on Mg–Ca alloy //Journal of Alloys and Compounds. – 2016. – Vol. 658. – P. 440-452.

59 Wu X., Fu Q., Kumar D., et al. Mechanically robust superhydrophobic and superoleophobic coatings derived by sol–gel method //Materials & Design. – 2016. – Vol. 89. – P. 1302-1309.

60 Van Tassel P.R. Polyelectrolyte adsorption and layer-by-layer assembly: Electrochemical control //Current opinion in colloid & interface science. – 2012. – Vol. 17, № 2. – P. 106-113.

61 Zhang G. Dai L., Zhang L., et al. Effects of external electric field on film growth, morphology, and nanostructure of polyelectrolyte and nanohybrid multilayers onto insulating substrates //Langmuir. – 2011. – Vol. 27, № 6. – P. 2093-2098.

62 Richardson J.J., Ejima H., Lorcher S.L., et al. Preparation of nano-and microcapsules by electrophoretic polymer assembly //Angewandte Chemie International Edition. – 2013. – Vol. 52, № 25. – P. 6455-6458.

63 Wang H. Ishihara S., Ariga K., et al. All-metal layer-by-layer films: bimetallic alternate layers with accessible mesopores for enhanced electrocatalysis //Journal of the American Chemical Society. – 2012. – Vol. 134, № 26. – P. 10819-10821.

64 Ko Y.H., Kim Y.H., Park J., et al. Electric-field-assisted layer-by-layer assembly of weakly charged polyelectrolyte multilayers //Macromolecules. – 2011. – Vol. 44, № 8. – P. 2866-2872.

65 Omura Y., Kyung K.H., Shiratori S., et al. Effects of applied voltage and solution pH in fabricating multilayers of weakly charged polyelectrolytes and nanoparticles //Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2014. – Vol. 53, № 29. – P. 11727-11733.

66 Wang Z., Zhang X, Gu J., et al. Electrodeposition of alginate/chitosan layer-by-layer composite coatings on titanium substrates //Carbohydrate polymers. – 2014. – Vol. 103. – P. 38-45.

67 Liu Y. Li S., Zhang J. et al. Corrosion inhibition of biomimetic superhydrophobic electrodeposition coatings on copper substrate //Corrosion Science. – 2015. – Vol. 94. – P. 190-196.

68 Zhang X.S., Han M.D., Wang R., et al. Frequency-multiplication high-output triboelectric nanogenerator for sustainably powering biomedical microsystems //Nano letters. – 2013. – Vol. 13, № 3. – P. 1168-1172.

69 Traba C., Liang J.F. Bacteria responsive antibacterial surfaces for indwelling device infections //Journal of controlled release. – 2015. – Vol. 198. – P. 18-25.

70 Reisch A., Hemmerle J., Chassepot A., et al. Anti-fouling phosphorylcholine bearing polyelectrolyte multilayers: Cell adhesion resistance at rest and under stretching //Soft Matter. – 2010. – Vol. 6, № 7. – P. 1503-1512.

71 Lichter J.A. Thompson M.T., Delgadillo M., et al. Substrata mechanical stiffness can regulate adhesion of viable bacteria //Biomacromolecules. – 2008. – Vol. 9, № 6. – P. 1571-1578.

72 Kara F., Aksoy E.A., Calamak S., et al. Immobilization of heparin on chitosan-grafted polyurethane films to enhance anti-adhesive and antibacterial properties //Journal of Bioactive and Compatible Polymers. – 2016. – Vol. 31, № 1. – P. 72-90.

73 Gadenne V., Lebrun L., Jouenne T., et al. Antiadhesive activity of ulvan polysaccharides covalently immobilized onto titanium surface //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2013. – Vol. 112. – P. 229-236.

74 Shao P., Qin M., Han L., et al. Rheology and characteristics of sulfated polysaccharides from chlorophytan seaweeds Ulva fasciata //Carbohydrate polymers. – 2014. – Vol. 113. – P. 365-372.

75 Gadenne V., Lebrun L., Jouenne T., et al. Role of molecular properties of ulvans on their ability to elaborate antiadhesive surfaces //Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2015. – Vol. 103, № 3. – P. 1021-1028.

76 Xu G., Liu P., Pranantyo D., et al. Dextran-and Chitosan-Based Antifouling, Antimicrobial Adhesion, and Self-Polishing Multilayer Coatings from pH-Responsive Linkages-Enabled Layer-by-Layer Assembly //ACS Sustainable Chemistry & Engineering. – 2018. – Vol. 6, № 3. – P. 3916-3926.

77 Jang Y., Choi W.T., Johnson C.T., et al. Inhibition of bacterial adhesion on nanotextured stainless steel 316L by electrochemical etching //ACS biomaterials science & engineering. – 2017. – Vol. 4, № 1. – P. 90-97.

78 Liu L., Ercan B., Sun L., et al. Understanding the role of polymer surface nanoscale topography on inhibiting bacteria adhesion and growth //ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2015. – Vol. 2, № 1. – P. 122-130.

79 Yang W.J., Pranantyo D, Neoh K.G., et al. Layer-by-layer click deposition of functional polymer coatings for combating marine biofouling //Biomacromolecules. – 2012. – Vol. 13, № 9. – P. 2769-2780.

80 Оспанова А.К., Савденбекова Б.Е. Исследование процесса взаимодействия хитозана с альгинатом натрия// Материалы 4-ой международной Российско-Казахстанской научно-практической конференции “Химические технологии функциональных материалов”. – Алматы, 2018.

81 Illergård J., Romling U., Wagberg L., et al. Biointeractive antibacterial fibres using polyelectrolyte multilayer modification //Cellulose. – 2012. – Vol. 19, № 5. – P. 1731-1741.

82 Lichter J.A., Rubner M.F. Polyelectrolyte multilayers with intrinsic antimicrobial functionality: the importance of mobile polycations //Langmuir. – 2009. – Vol. 25, № 13. – P. 7686-7694.

83 Pinto M.S., Gahan M.E., Steiner W.W., et al. The use of the pseudo-polyelectrolyte, poly (4-vinylphenol), in multilayered films as an antimicrobial surface coating //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2011. – Vol. 377, № 1-3. – P. 182-186.

84 Cui D., Szarpak A., Pignot- Paintrand I., et al. Contact-Killing Polyelectrolyte Microcapsules Based on Chitosan Derivatives //Advanced Functional Materials. – 2010. – Vol. 20, № 19. – P. 3303-3312.

85 Xin S., Li X., Ma Z., Kei Z., et al. Cytotoxicity and antibacterial ability of scaffolds immobilized by polysaccharide/layered silicate composites //Carbohydrate polymers. – 2013. – Vol. 92, № 2. – P. 1880-1886.

86 Timofeeva L., Kleshcheva N. Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications //Applied microbiology and biotechnology. – 2011. – Vol. 89, № 3. – P. 475-492.

87 Francolini I., Vuotto C., Piozzi A., Donelli G. Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview //Apmis. – 2017. – Vol. 125, № 4. – P. 392-417.

88 Hernández-Montelongo J., Nasciento V.F., Murillo D., et al. Nanofilms of hyaluronan/chitosan assembled layer-by-layer: An antibacterial surface for Xylella fastidiosa //Carbohydrate polymers. – 2016. – Vol. 136. – P. 1-11.

89 Zhang S., Liu W., Liang J., et al. Buildup mechanism of carboxymethyl cellulose and chitosan self-assembled films //Cellulose. – 2013. – Vol. 20, № 3. – P. 1135-1143.

90 Ospanova A.K., Iskakova M.K., Omarova R.A., Zhartybaev R.N., Nussip B.Z., Abdikadyr A.S. Obtaining Thin-Films Based on Chitosan and Carboxymethylcellulose with Antibacterial Properties for Biomedical Devices// IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2017. – Vol. 230, № 1. – P. 012042.

91 Wong S.Y., Li Q., Veselinovic J., Kim B.S., Klibanov A.M., Hammond P.T. Bactericidal and virucidal ultrathin films assembled layer by layer from polycationic N-alkylated polyethylenimines and polyanions //Biomaterials. – 2010. – VOl. 31, № 14. – P. 4079-4087.

92 Ao H., Yang S., Fan Q., et al. Improved antibacterial properties of collagen I/hyaluronic acid/quaternized chitosan multilayer modified titanium coatings with both contact-killing and release-killing functions //Journal of Materials Chemistry B. – 2019. – Vol. 7, № 11. – P. 1951-1961.

93 Wang B., Ren K. F., Chang H., Wang, J.L., Ji J. Construction of degradable multilayer films for enhanced antibacterial properties //ACS applied materials & interfaces. – 2013. – Vol. 5, № 10. – P. 4136-4143.

94 Vaz J.M., Pezzoli D., Chevallier P., Campelo C.S., Candiani G., Mantovani D. Antibacterial coatings based on chitosan for pharmaceutical and biomedical applications //Current pharmaceutical design. – 2018. – Vol. 24, № 8. – P. 866-885.

95 Wong S.Y., Li Q., Veselinovic J., Kim B.S., Klibanov A.M., Hammond P.T. Bactericidal and virucidal ultrathin films assembled layer by layer from polycationic N-alkylated polyethylenimines and polyanions //Biomaterials. – 2010. – Vol. 31, № 14. – P. 4079-4087.

96 Zhao J., Ma L., Millians W., Wu T., Ming W. Dual-functional antifogging/antimicrobial polymer coating //ACS applied materials & interfaces. – 2016. – Vol. 8, № 13. – P. 8737-8742.

97 Amim J., Maia F.C., Miranda P.B., Urzúa M.D., Petri D. F. Structural aspects of polyanion and hydrophobically modified polycation multilayers on hydrophilic or hydrophobic surfaces //Soft Matter. – 2012. – Vol. 8, № 24. – P. 6462-6470.

98 Aslan S., Määttä J., Haznedaroglu B.Z., et al. Carbon nanotube bundling: influence on layer-by-layer assembly and antimicrobial activity //Soft Matter. – 2013. – Vol. 9, № 7. – P. 2136-2144.

99 Zhou B., Li Y., Deng,H., Hu Y., Li B. Antibacterial multilayer films fabricated by layer-by-layer immobilizing lysozyme and gold nanoparticles on nanofibers //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2014. – Vol. 116. – P. 432-438.

100 Pavlukhina S.V., Kaplan J.B., Xu L., et al. Noneluting enzymatic antibiofilm coatings //ACS applied materials & interfaces. – 2012. – Vol. 4, № 9. – P. 4708-4716.

101 Vaterrodt A., Thallinger B., Daumann K., Koch D., Guebitz G.M., Ulbricht M. Antifouling and antibacterial multifunctional polyzwitterion/enzyme coating on silicone catheter material prepared by electrostatic layer-by-layer assembly //Langmuir. – 2016. – Vol. 32, № 5. – P. 1347-1359.

102 Zhang X., Li Z., Yuan X., et al. Cytotoxicity and antibacterial property of titanium alloy coated with silver nanoparticle-containing polyelectrolyte multilayer //Materials Science and Engineering: C. – 2013. – Vol. 33, № 5. – P. 2816-2820.

103 Savdenbekova B.E., Ospanova A.K., Uvarov N.F. Obtaining of nanofilms based on Ag-chitosan/Na-carboxymethylcellulose on the surface of titanium implants//Abstracts of 5 International Conference “Fundamental Bases of Mechanochemical Technologies”. – Novosibirsk, 2018.

104 Harnet J.C., Le Guen E., Ball V., et al. Antibacterial protection of suture material by chlorhexidine-functionalized polyelectrolyte multilayer films //Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2009. – Vol. 20, № 1. – P. 185-193.

105 Urrutia A., Rivero P.J., Ruete L., Goicoechea J., Matías I.R., Arregui,F.J. Single-stage in situ synthesis of silver nanoparticles in antibacterial self-assembled overlays //Colloid and Polymer Science. – 2012. – Vol. 290, № 9. – P. 785-792.

106 Yin B., Liu T., Yin Y. Prolonging the duration of preventing bacterial adhesion of nanosilver-containing polymer films through hydrophobicity //Langmuir. – 2012. – Vol. 28, № 49. – P. 17019-17025.

107 Agarwal A., Nelson T.B., Kierski P.R., et al. Polymeric multilayers that localize the release of chlorhexidine from biologic wound dressings //Biomaterials. – 2012. – Vol. 33, № 28. – P. 6783-6792.

108 Moskowitz J. S., Blaisse M.R., Samuel R.E., et al. The effectiveness of the controlled release of gentamicin from polyelectrolyte multilayers in the treatment of Staphylococcus aureus infection in a rabbit bone model //Biomaterials. – 2010. – Vol. 31, № 23. – P. 6019-6030.

109 Shukla A., Avadhany S.N., Fang J.C., Hammond P.T. Tunable vancomycin releasing surfaces for biomedical applications //Small. – 2010. – Vol. 6, № 21. – P. 2392-2404.

110 Min J., Braatz R. D., Hammond P. T. Tunable staged release of therapeutics from layer-by-layer coatings with clay interlayer barrier //Biomaterials. – 2014. – Vol. 35, № 8. – P. 2507-2517.

111 Zhang Z., Nix C.A., Ercan U.K., et al. Calcium binding-mediated sustained release of minocycline from hydrophilic multilayer coatings targeting infection and inflammation //PloS one. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. e84360.

112 Schmidt D.J., Moskowitz J.S., Hammond P.T. Electrically triggered release of a small molecule drug from a polyelectrolyte multilayer coating //Chemistry of Materials. – 2010. – Vol. 22, № 23. – P. 6416-6425.

113 Anandhakumar S., Raichur A.M. Polyelectrolyte/silver nanocomposite multilayer films as multifunctional thin film platforms for remote activated protein and drug delivery //Acta biomaterialia. – 2013. – Vol. 9, № 11. – P. 8864-8874.

114 Sripriya J., Anandhakumar S., Achiraman S., Antony,J.J., Siva D., Raichur A.M. Laser receptive polyelectrolyte thin films doped with biosynthesized silver nanoparticles for antibacterial coatings and drug delivery applications //International journal of pharmaceutics. – 2013. – Vol. 457, № 1. – P. 206-213.

115 Liu J., Sonshine D.A., Shervani S., Hurt R.H. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces //ACS nano. – 2010. – Vol. 4, № 11. – P. 6903-6913.

116 AshaRani P.V., Low Kah Mun G., Hande M.P., Valiyaveettil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells //ACS nano. – 2008. – Vol. 3, № 2. – P. 279-290.

117 Liu J., Hurt R.H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids //Environmental science & technology. – 2010. – Vol. 44, № 6. – P. 2169-2175.

118 Urrutia A., Rivero P.J., Ruete L., Goicoechea J., Matías I R. Arregui F.J. Single-stage in situ synthesis of silver nanoparticles in antibacterial self-assembled overlays //Colloid and Polymer Science. – 2012. – Vol. 290, № 9. – P. 785-792.

119 Urrutia A., Rivero P.J., Ruete L., et al. An antibacterial surface coating composed of PAH/SiO2 nanostructurated films by layer by layer //physica status solidi c. – 2010. – Vol. 7, № 11-12. – P. 2774-2777.

120 Zhong X., Song Y., Yang P., et al. Titanium surface priming with phase-transited lysozyme to establish a silver nanoparticle-loaded chitosan/hyaluronic acid antibacterial multilayer via layer-by-layer self-assembly //PLoS One. – 2016. – Vol. 11, № 1. – P. e0146957.

121 Li W., Yang Y., Zhang H., et al. Improvements on biological and antimicrobial properties of titanium modified by AgNPs-loaded chitosan-heparin polyelectrolyte multilayers //Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2019. – Vol. 30, № 5. – P. 52.

122 Feng Y., Han Z., Peng, J., et al. Fabrication and characterization of multilayer films based on Keggin-type polyoxometalate and chitosan //Materials Letters. – 2006. – Vol. 60, № 13-14. – P. 1588-1593.

123 Yuan W., Ji J., Fu J., Shen J. A facile method to construct hybrid multilayered films as a strong and multifunctional antibacterial coating //Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2008. – Vol. 85, № 2. – P. 556-563.

124 Corbitt T.S., Sommer J R., Chemburu S., et al. Conjugated polyelectrolyte capsules: light-activated antimicrobial micro “roach motels” //ACS applied materials & interfaces. – 2008. – Vol. 1, № 1. – P. 48-52.

125 Tabary N., Martin A., Chai F., et al. Antimicrobial multilayer coating on a textile support based on a methylene blue: poly (cyclodextrin) complex. – 2019.

126 Jiang B., Li B. Tunable drug loading and release from polypeptide multilayer nanofilms //International journal of nanomedicine. – 2009. – Vol. 4. – P. 37.

127 Martin A., Tabary N., Chai F., et al. Build-up of an antimicrobial multilayer coating on a textile support based on a methylene blue–poly (cyclodextrin) complex //Biomedical Materials. – 2013. – Vol. 8, № 6. – P. 065006.

128 Chen X.C., Ren K.F., Zhang J.H., et al. Humidity-Triggered Self-Healing of Microporous Polyelectrolyte Multilayer Coatings for Hydrophobic Drug Delivery //Advanced Functional Materials. – 2015. – Vol. 25, № 48. – P. 7470-7477.

129 Wang X., Wang Y., Bi S., Wang Y., Chen X., Qiu L., Sun J. Optically transparent antibacterial films capable of healing multiple scratches //Advanced Functional Materials. – 2014. – Vol. 24, № 3. – P. 403-411.

130 Onat B., Bütün V., Banerjee S., Erel-Goktepe I. Bacterial anti-adhesive and pH-induced antibacterial agent releasing ultra-thin films of zwitterionic copolymer micelles //Acta biomaterialia. – 2016. – Vol. 40. – P. 293-309.

131 Xu Q., Liu H., Ye Z., Nan K., Lin S., Chen H., Wang B. Antimicrobial efficiency of PAA/(PVP/CHI) erodible polysaccharide multilayer through loading and controlled release of antibiotics //Carbohydrate polymers. – 2017. – Vol. 161. – P. 53-62.

132 Min J., Choi K.Y., Dreaden E.C., Padera R.F., Braatz R.D., Spector M., Hammond,P.T. Designer dual therapy nanolayered implant coatings eradicate biofilms and accelerate bone tissue repair //ACS nano. – 2016. – Vol. 10, № 4. – P. 4441-4450.

133 Utku F.S., Seckin E., Goller G., Tamerler C., Urgen M. Electrochemically designed interfaces: Hydroxyapatite coated macro-mesoporous titania surfaces //Applied Surface Science. – 2015. – Vol. 350. – P. 62-68.

134 Li K., Liu J., Lei T., Xiao T. Optimization of process factors for self-healing vanadium-based conversion coating on AZ31 magnesium alloy //Applied Surface Science. – 2015. – Vol. 353. – P. 811-819.

135 Liu L., Li P., Zou Y., Luo K., Zhang F., Zeng R.C., Li S. In vitro corrosion and antibacterial performance of polysiloxane and poly (acrylic acid)/gentamicin sulfate composite coatings on AZ31 alloy //Surface and Coatings Technology. – 2016. – Vol. 291. – P. 7-14.

136 Zhang X., Ba Z., Wang Z., He X., Shen C., Wang Q. Influence of silver addition on microstructure and corrosion behavior of Mg–Nd–Zn–Zr alloys for biomedical application //Materials Letters. – 2013. – Vol. 100. – P. 188-191.

137 Campoccia D., Montanaro L., Von Eiff C., et al. Cluster analysis of ribotyping profiles of Staphylococcus epidermidis isolates recovered from foreign body-associated orthopedic infections //Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for

Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2009. – Vol. 88, № 3. – P. 664-672.

138 Campoccia D., Baldassarri L., Pirini V., et al. Molecular epidemiology of Staphylococcus aureus from implant orthopaedic infections: ribotypes, agr polymorphism, leukocidal toxins and antibiotic resistance //Biomaterials. – 2008. – Vol. 29, № 30. – P. 4108-4116.

139 Dwivedi A., Mazumder A., Nasongkla N. Layer-by-layer nanocoating of antibacterial niosome on orthopedic implant //International journal of pharmaceutics. – 2018. – Vol. 547, № 1-2. – P. 235-243.

140 Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America //Clinical infectious diseases. – 2009. – Vol. 48, № 1. – P. 1-12.

141 Anandhakumar S., Debapriya M., Nagaraja V., Raichur A. M. Polyelectrolyte microcapsules for sustained delivery of water-soluble drugs //Materials Science and Engineering: C. – 2011. – Vol. 31, № 2. – P. 342-349.

142 Lee H. S., Dastgheyb S.S., Hickok N.J., et al. Targeted release of tobramycin from a pH-responsive grafted bilayer challenged with S. aureus //Biomacromolecules. – 2015. – Vol. 16, № 2. – P. 650-659.

143 Li B., Webster T.J. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associated orthopedic infections //Journal of Orthopaedic Research®. – 2018. – Vol. 36, № 1. – P. 22-32.

144 Gomes A. P., Mano J.F., Queiroz J.A., Gouveia I.C. Incorporation of antimicrobial peptides on functionalized cotton gauzes for medical applications //Carbohydrate polymers. – 2015. – Vol. 127. – P. 451-461.

145 Shukla A., Fleming K.E., Chuang H.F., et al. Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces //Biomaterials. – 2010. – Vol. 31, № 8. – P. 2348-2357.

146 Karlsson A.J., Flessner R.M., Gellman S.H., et al. Polyelectrolyte multilayers fabricated from antifungal β-peptides: design of surfaces that exhibit antifungal activity against Candida albicans //Biomacromolecules. – 2010. – Vol. 11, № 9. – P. 2321-2328.

147 Faure E., Lecomte P., Lenoir S., et al. Sustainable and bio-inspired chemistry for robust antibacterial activity of stainless steel //Journal of Materials Chemistry. – 2011. – Vol. 21, № 22. – P. 7901-7904.

148 Cado G., Aslam R., Séon L., et al. Self-defensive biomaterial coating against bacteria and yeasts: polysaccharide multilayer film with embedded antimicrobial peptide //Advanced Functional Materials. – 2013. – Vol. 23, № 38. – P. 4801-4809.

149 Raman N., Lee M.R., Palecek S.P., et al. Polymer multilayers loaded with antifungal β-peptides kill planktonic Candida albicans and reduce formation of fungal biofilms on the surfaces of flexible catheter tubes //Journal of controlled release. – 2014. – Vol. 191. – P. 54-62.

150 Pavlukhina S., Lu Y., Patimetha A., Libera M., Sukhishvili S. Polymer multilayers with pH-triggered release of antibacterial agents //Biomacromolecules. – 2010. – Vol. 11, № 12. – P. 3448-3456.

151 Zhuk I., Jariwala F., Attygalle A.B., et al. Self-defensive layer-by-layer films with bacteria-triggered antibiotic release //ACS nano. – 2014. – Vol. 8, № 8. – P. 7733-7745.

152 Pavlukhina S., Zhuk I., Mentbayeva A., et al. Small-molecule-hosting nanocomposite films with multiple bacteria-triggered responses //NPG Asia Materials. – 2014. – Vol. 6, № 8. – P. e121.

153 Lu Y., Wu Y., Liang J., Libera M.R., Sukhishvili S.A. Self-defensive antibacterial layer-by-layer hydrogel coatings with pH-triggered hydrophobicity //Biomaterials. – 2015. – Vol. 45. – P. 64-71.

154 Cado G., Aslam R., Séon L., et al. Self-defensive biomaterial coating against bacteria and yeasts: polysaccharide multilayer film with embedded antimicrobial peptide //Advanced Functional Materials. – 2013. – Vol. 23, № 38. – P. 4801-4809.

155 Mentbayeva A., Ospanova A., Tashmuhambetova Z., et al. Polymer–metal complexes in polyelectrolyte multilayer films as catalysts for oxidation of toluene //Langmuir. – 2012. – Vol. 28, № 32. – P. 11948-11955.

156 Омарова Р.А., Оспанова А.К., Савденбекова Б.Е., Искакова М.К. Квантово-химическое обоснование биологической активности имидазола и его пройзводных// Вестник КазНМУ. – 2018. – Т. – С. 264-269.

157 Savdenbekova B.E., Ospanova A.K., Omarova R.A., Uvarov N.F., Iskakova M.K. Quantum-chemical substantiation of the structure and properties of chlorhexidine and its boron derivatives as antibacterial additives for nanofilms of medical purposes. //Journal of Chemical Technology & Metallurgy. – 2019. – Vol. 54, № 3. – P.496-502.

158 Sul Y.T., Johansson C.B., Petronis S., et al. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown:: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition //Biomaterials. – 2002. – Vol. 23, № 2. – P. 491-501.

159 Yeo I.S. Reality of dental implant surface modification: a short literature review //The open biomedical engineering journal. – 2014. – Vol. 8. – P. 114.

160 Buxadera-Palomero J., Canal C., Torrent-Camarero S., et al. Antifouling coatings for dental implants: Polyethylene glycol-like coatings on titanium by plasma polymerization //Biointerphases. – 2015. – Vol. 10, № 2. – P. 029505.

161 Winterton L.C., Qiu Y., Lally J.M., et al. Method for modifying a surface : пат. 6719929 США. – 2004.

162 Оспанова А.К., Савденбекова Б.Е., Везенцев А.И., Попов М.В., Максатова А.М., Жумат А., Абишева Ж., Карл Ө. Получение пористой платформы на основе диатомита с каталитическими и сорбционными свойствами// Известия НАН РК, серия химии и технологии. – 2017. – Т. 2(422). – С. 29-37.

163 Bagno A., Di Bello C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials //Journal of materials science: materials in medicine. – 2004. – Vol. 15, № 9. – P. 935-949.

164 Buser D., Broggini N., Wieland M., et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface //Journal of dental research. – 2004. – Vol. 83, № 7. – P. 529-533.

165 Ehrenfest D.M.D., Coelho P.G., Kang B.S., et al. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography //Trends in biotechnology. – 2010. – Vol. 28, № 4. – P. 198-206.

166 Mohedano M., Guzman R., Arrabal R., et al. Bioactive plasma electrolytic oxidation coatings—The role of the composition, microstructure, and electrochemical stability //Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2013. – Vol. 101, № 8. – P. 1524-1537.

167 Милехин А. Г. Инфракрасная спектроскопия кремниевых сращённых пластин //Физика и техника полупроводников. – 2006. – Т. 40, № 11. – С. 1338-1348.

168 Шангереева Б. А., Муртазалиев А. И., Шангереев Ю. П. Способ очистки поверхности кремниевых пластин для изготовления мощных транзисторов //Инновационная наука. – 2015. – № 11-2. – Р.133-135.

169 Савденбекова Б.Е., Оспанова А.К., Уваров Н.Ф. Изучение влияние толщины мультислоев на рост и морфологию пленок на основе Na-КМЦ/хитозан//Abstracts of the 4 All-Russian with International Participation Bakeyev Conference “Macromolecular nanoobjects and polymer nanocomposites”. – Moscow, 2018.

170 Decher G., Schmitt J. Fine-tuning of the film thickness of ultrathin multilayer films composed of consecutively alternating layers of anionic and cationic polyelectrolytes //Trends in Colloid and Interface Science VI. – Steinkopff, 1992. – С. 160-164.

171 Bieker P., Schönhoff M. Linear and exponential growth regimes of multilayers of weak polyelectrolytes in dependence on pH //Macromolecules. – 2010. – Т. 43. – №. 11. – С. 5052-5059.

172 Lavalle P., Picart C., Mutterer J., et al. Modeling the buildup of polyelectrolyte multilayer films having exponential growth //The Journal of Physical Chemistry B. – 2004. – Т. 108. – №. 2. – С. 635-648.

173 Mendelsohn J.D., Barrett C.J., Chan, V.V., et al. Fabrication of microporous thin films from polyelectrolyte multilayers //Langmuir. – 2000. – Т. 16. – №. 11. – С. 5017-5023.

174 Richert L., Lavalle P., Payan E., et al. Layer by layer buildup of polysaccharide films: physical chemistry and cellular adhesion aspects //Langmuir. – 2004. – Т. 20. – №. 2. – С. 448-458.

175 Bazaka K., Jacob M. Effects of iodine doping on optoelectronic and chemical properties of polyterpenol thin films //Nanomaterials. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 11.

176 Guzmán E., Cavallo J.A., Chuliá-Jordán R., et al. pH-induced changes in the fabrication of multilayers of poly (acrylic acid) and chitosan: fabrication, properties, and tests as a drug storage and delivery system //Langmuir. – 2011. – Т. 27. – №. 11. – С. 6836-6845.

177 Baburaj M.S., Aravindakumar C.T., Sreedhanya S., et al. Treatment of model textile effluents with PAA/CHI and PAA/PEI composite membranes //Desalination. – 2012. – T. 288. – C. 72-79.

178 Fery A., Schöler B., Cassagneau T., Caruso F. Nanoporous thin films formed by salt-induced structural changes in multilayers of poly (acrylic acid) and poly (allylamine) //Langmuir. – 2001. – T. 17. – №. 13. – C. 3779-3783.

179 Salomäki M., Kankare J. Influence of Synthetic Polyelectrolytes on the Growth and Properties of Hyaluronan− Chitosan Multilayers //Biomacromolecules. – 2009. – T. 10. – №. 2. – C. 294-301.

180 Pal S., Tak Y. K., Song J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli //Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – T. 73. – №. 6. – C. 1712-1720