Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК 620.3:606(043)

На правах рукописи

ТАЛИПОВА АЙЖАН БЕРИККЫЗЫ

Биоактивный композитный материал на основе бактериальной целлюлозы, гидроксиапатита и наноантисептиков: структура и свойства

6D074000 – Наноматериалы и нанотехнологии

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант:
Савицкая И.С., д.б.н., профессор

Зарубежный научный консультант:
Погребняк А.Д., д.ф.-м.н., профессор
Сумского государственного
университета

Республика Казахстан
Алматы, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ……..... 4
ВВЕДЕНИЕ..... 5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ…… 10
1.1 Синтез, свойства и биомедицинское применение нанокомпозитных антисептиков на основе бактериальной целлюлозы, MXene и гидроксиапатита…… 10
1.1.1 Бактериальная наноцеллюлоза - биополимер в биомедицинских приложениях…… 11
1.1.2 Гидроксиапатит…….. 14
1.1.3 MXene – новый класс наноантисептиков…… 16
1.2 Биомедицинские применения нанокомпозитов из бактериальной целлюлозы, функционализированной ГАП или MXenes…… 23
1.2.1 Проводящие гидрогели……. 24
1.2.2 Утилизация активных форм кислорода……..... 28
1.2.3 Доставка лекарств……..... 31
1.2.4 Фототермическая терапия…… 32
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ……... 36
2.1 Объекты исследований……. 36
2.2 Методы исследований…….. 36
2.2.1 Получение БЦ в поверхностных условиях культивирования…….. 36
2.2.2 Синтез Ti_3C_2TxMxene……..... 37
2.2.3 Получение наночастиц ГАП……. 37
2.2.4 Создание композита ГАП/Mxene……. 37
2.2.5 Получение композита БЦ/ГАП методом *in situ*……..... 37
2.2.6 Получение композитов БЦ/Mxene и БЦ/ГАП методом *ex situ*..... 37
2.2.7 Сборка композита БЦ/ГАП/Mxene..... 38
2.2.8 Определение структурных и химических свойств БЦ и композитов..... 38
2.2.8.1 Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)…….. 38
2.2.8.2 Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)……. 38
2.2.8.3 Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДС)…… 39
2.2.8.4 Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье……. 39
2.2.8.5 Рентгеноструктурный анализ (XRD)……..... 39
2.2.8.6 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (XPS)……. 39
2.2.9 Определение физических свойств композитов…….. 40
2.2.10 Методы стерилизации композитного материала…….. 41
2.2.11 Оценка биологической активности композитных материалов……. 42
2.2.11.1 Определение антибактериальной активности гибридов……... 42
2.2.11.2 Изучение антибиопленочной активности……... 43
2.2.11.3 Анализ биосовместимости и цитотоксичности материалов в условиях *in vitro*……. 44

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ……. 47
3.1 Получение комплексного наноматериала БЦ/ГАП/MXene…….. 47
3.1.1 Синтез БЦ - несущей матрицы гибридного материала……. 48
3.1.1.1 Модификация состава классической питательной среды Гестри и Шрамма (HS) для повышения целлюлозосинтетической активности штамма *Komagataeibacter xylinus* С-3……..….. 18
3.1.1.2 Разработка питательной среды из производственных отходов для продуцентов бактериальной целлюлозы …….. 53
3.1.1.3 Оптимизация состава ферментационной среды для получения бактериальной целлюлозы со стандартными структурно-механическими свойствами……..... 57
3.1.1.4 Экономическая оценка эффективности производственных сред…. 59
3.1.2 Синтез функциональных составляющих композита: $Ti_3C_2T_x$MXene и ГАП……..... 61
3.1.3 Получение комплексного наноматериала БЦ/ГАП/MXene…….. 67
3.2 Исследование физическо-химических свойств композитных материалов……. 79
3.2.1 Структурные особенности композитных материалов……. 79
3.2.2 Морфология и микроструктура композитных материалов……. 82
3.2.3 Исследование механических свойств композиционных материалов…… 86
3.2.4 Поверхностные и сорбционные свойства композитных материалов……. 88
3.3 Подбор способа стерилизации для наноструктурированных биоматериалов…….. 91
3.4 Исследование биологической активности композитных материалов……. 98
3.4.1 Антибактериальное действие…….. 98
3.4.2 Оценка антибиопленочной активности композитных материалов……. 106
3.4.3 Исследование биосовместимости и цитотоксичности материалов в условиях *in vitro*……. 114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ…… 123
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ……..... 125
ПРИЛОЖЕНИЕ А…… 148

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БЦ	бактериальная целлюлоза
ГАП	гидроксиапатит
БЦ/ГАП	бактериальная целлюлоза/гидроксиапатит
БЦ/MXene	бактериальная целлюлоза/MXene
БЦ/ГАП/MXene	бактериальная целлюлоза/гидроксиапатит/ MXene
ЦНВ	целлюлозные нановолокна
л	литр
мкм, μм	микрометр
мл	миллилитр
МПа	мегапаскаль
об/мин	оборотов в минуту
об./об.	объемное процентное содержание компонента по отношению к общему объему
масс./об.	массовое процентное содержание компонента по отношению к общему объему
см	сантиметр
мм	миллиметр
мг	миллиграмм
мкг	микрограмм
нм	нанометр
нч	наночастица
ПС	питательная среда
АК	аскорбиновая кислота
HS	питательная среда S. Hestrin, M. Schramm
ЖСА	питательная среда желточно-солевой агар
АФК	активные формы кислорода
ЛПУ	лечебно-профилактическое учереждение
МЛУ	множественная лекарственная устойчивость
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
ПЭМ	Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)
ЭДС	Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия
РФЭС	Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия
ФТТ	Фототермическая терапия
УЗ	Ультразвук

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика диссертационной работы.

Работа посвящена экспериментальной разработке метода получения композитных материалов на основе гидрогелевой нанофибриллярной пленки бактериальной целлюлозы (БЦ) с внедренными наночастицами $Ti_3C_2T_x$MXene и гидроксиапатита (ГАП). Исследуется структурно-фазовое состояние полученных нанокомпозитов, их морфологические характеристики, особенности антибактериального действия и биосовместимость в условиях *in vitro*.

Актуальность темы исследования.

Текущий этап развития наноматериалов и биомедицинской инженерии характеризуется активной разработкой антимикробных конструкций, сочетающих функциональную эффективность и биосовместимость. Особенно это касается материалов, предназначенных для борьбы с раневыми инфекциями, связанными с антибиотикорезистентными патогенами, образующими биопленки [1, 2]. Инновационный подходом к созданию таких нанокомпозитных материалов, предусматривает применение новых неорганических антисептических компонентов или модификация биоматериалов биоактивными ионами для обеспечения не только антимикробной активности, но и инициирования контролируемой реакции в тканях, способствующей ранозаживлению [3]. Предметом многих разработок в этой области стали раневые покрытия на основе гидрогеля из БЦ – биополимера, имеющего сверхтонкую трехмерную наносетчатую структуру [4, 5]. Однако, БЦ создает лишь физический барьер для раневой инфекции, поэтому нужна альтернативная стратегия, направленная на разработку бифункциональной платформы, препятствующей образованию и/или распаду биопленок в месте раны, и при этом стимулирующей кожную регенерацию. Одним из компонентов такой платформы могут быть MXenes - двухмерные (2D) наноматериалы, относящиеся к семейству карбидов, нитридов и карбо-нитридов переходных металлов [6]. Имеются обнадеживающие сведения о том, что MXenes или материалы с ними препятствуют образованию биопленок и даже способствуют их деструкции [7, 8].

С другой стороны, есть информация, что MXenes могут проявлять цитотоксичность в высоких концентрациях [9], что ограничивает их использование в некоторых медицинских приложениях. Проблему соблюдения баланса между эффективностью и биосовместимостью может решить добавление в композит ГАП, который может обеспечить снижение цитотоксичности и ускорение заживления ран посредством кальций-опосредованной коагуляции, необходимой для регенерации тканей, регулируя инфильтрацию воспалительных клеток, активируя пролиферацию фибробластов и миграцию макрофагов [10–13]. Представляется, что интеграция MXene и ГАП в каркас БЦ объединит антибактериальное действие MXene с биоактивностью ГАП, формируя многофункциональную платформу.

Несмотря на активные исследования в данной области, информация о композитах, состоящих из БЦ с включенными в нее наночастицами ГАП и MXene, отсутствует. Ранее сообщалось лишь о двукомпонентных системах БЦ/MXene, БЦ/ГАП и и ГАП/MXene [14–18].

В связи с этим необходима разработка способа синтеза гибридного наноматериала БЦ/MXene/ГАП, что требует тщательной оптимизации всех этапов процесса. Особое внимание должно быть уделено выбору условий формирования каждого компонента, их последовательности введения и обеспечению устойчивого взаимодействия между органической матрицей и неорганическими нанофазами. При этом способ получения композита должен предусматривать сохранение гелевой формы БЦ с её нанофибриллярной структурой, так как именно в этом состоянии материал может проявлять свои характерные физико-химические свойства.

Цель работы: Разработать и охарактеризовать структурные и антимикробные свойства трехкомпонентного нанокомпозитного материала из бактериальной целлюлозы, MXene и гидроксиапатита.

Задачи исследования:

- провести анализ структурных и механических свойств гель-пленок БЦ, полученной на питательной среде с мелассой;
- получить композитные материалы на основе БЦ с армирующими компонентами: Mxene и гидроксиапатитом;
- исследовать элементный, фазовый, функциональный составы и морфологию нано-гель-пленки БЦ после интеркаляции в нее нанокомплексов MXene и гидроксиапатита;
- подобрать способ стерилизации композитного гидрогеля, обеспечивающий сохранение его структурных и функциональных свойств;
- изучить особенности проявления антимикробного и антибиоплёночного действия трёхкомпонентного композитного материала в Time-kill тесте и на модели хронической раневой биоплёнки (LCWB);
- определить цитотоксичность и биосовместимость трехкомпонентного композитного материала в условиях *in vitro*.

Объекты исследования: Гель-пленки БЦ, композиты БЦ/ГАП, БЦ/Mxene и БЦ/ГАП/MXene.

Методы исследования: Получение БЦ – поверхностное культивирование; $Ti_3C_2T_x$ – химическое травление; ГАП – химическое осаждение; БЦ/ГАП – in situ и ex situ модификации; ГАП/MXene – физико-химическая гибридизация; Композиты БЦ/ГАП/MXene и БЦ/MXene – метод погружения (*ex situ*). Морфология плёнок и композитов – сканирующая электронная микроскопия (JSM-7800F); Структурно-фазовое состояние – просвечивающая электронная микроскопия, рентгеноструктурный анализ; Функциональный состав – ИК-спектроскопия (Bruker Alpha II FTIR); Элементный состав и пространственное распределение – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (JEOL JED-2300T CENTURIO SDD); Кристаллическая структура композитов – рентгеновская дифракция (XRD)

(PANalytical Empyrean (Malvern Panalytical); Химический состав – высокоразрешающая рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (HR-XPS); Прочность плёнок – разрывная машина «Instron»; Атибактериальная активность – Time-kill тест; Антибиоплёночная активность – метод микропланшетов, *in vitro* модель хронической раневой биоплёнки (LCWB); Биосовместимость – жизнеспособность, адгезивные свойства, метаболическая активность, морфология и пролиферация клеток мышиных фибробластов NIH-3T3.

Научная новизна результатов исследования.

Получен новый нанокомпозитный материал БЦ/ГАП/MXene, предназначенный для создания многофункционального раневого покрытия, обладающего антисептическим, антибиопленочным и антиоксидантным действием.

Впервые показано, что включение комплекса ГАП/Mxene в матрицу БЦ методом ex situ минимизирует окисление двумерного карбида титана и сохраняет нановолокнистую гидрогелевую структуру БЦ.

Впервые предложен и оптимизирован состав экономичной питательной среды на основе мелассы, обеспечивающий сохранение нанофибриллярной структуры и механической прочности БЦ с повышенным уровнем ее биосинтеза.

Теоретическая значимость исследований. Теоретически и экспериментально обоснован выбор состава нанокомпозитного материала, в котором антимикробное и антибиоплёночное действие определяется взаимодействием функциональных нанофаз.

Обозначены пути экономически эффективного способа получения БЦ и ее функционализации неорганическими биоактивными компонентами: MXene и ГАП для получения биосовместимого композитного материала с высокой антимикробной активностью, низкой цитотоксичностью и прорегенеративными свойствами.

Представлены возможные механизмы антимикробного действия фукциональных компонентов композита, связанные с генерацией MXene-ами активных форм кислорода и опосредованным ГАП ингибированием полимеризации фибрина, разрушающим структуру биопленки.

Практическая ценность исследования. Синергетическое взаимодействие двумерных наноструктур MXene и наночастиц ГАП, интегрированных в трёхмерный нанофибриллярный БЦ-скаффолд, имитирующий внеклеточный матрикс, формирует перспективный материал нового поколения для лечения хронических ран, инфицированных микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью.

Оптимизированная питательная среда на основе отходов сахарного производства, а также подобранные технологические параметры культивирования штамма-продуцента обеспечивают получение БЦ с воспроизводимой нанофибриллярной структурой и стабильными физико-механическими характеристиками. Она может использоваться при

масштабируемом промышленном синтезе БЦ как наноструктурированной матрицы для создания функциональных нанокомпозитных материалов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- БЦ, синтезированная на модифицированной питательной среде с добавлением 2% мелассы, характеризуется иерархически организованной нанофибриллярной архитектурой, представленной трёхмерной сетчатой матрицей из плотно переплетённых целлюлозных фибрилл наноразмерного диаметра, которая обуславливает пористую структуру материала и его высокую механическую прочность (37,12 ± 0,2 МПа).

- формирование наноструктурированного композитного материала с однородным распределением армирующих наночастиц обусловлено включением в матрицу БЦ методом ex situ предварительно сформированного путём физико-химической гибридизации нанокомплекса ГАП/MXene .

- БЦ, функционализированная Mxene, генерирующими активные формы кислорода, приобретает антимикробное свойства, а опосредованное ГАП ингибирование полимеризации фибрина и Ca^{2+} зависимой инактивации Bap белка ускоряет процесс ранозаживления.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа была выполнена в рамках проектов: 1) 2679/ГФ4 «Разработка биокомпозиционных материалов на основе бактериальной целлюлозы для создания трансдермальных терапевтических систем»; 2) AP23488697 «Стратегия создания гидрогелевой фототермической платформы с усиленными антибактериальными и регенерационными свойствами для лечения инфицированных ран».

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на следующих конференциях:

- V Международные фарабиевские чтения. Материалы междунар. науч. конференции студентов и молодых ученых «Фараби әлемі». Алматы. – 10-11 апреля, 2018;

- XV Международная научно-практическая экологическая конференция «Биологический вид в структурно-функциональной иерархии биосферы». – Белгород, Россия. – 8–12 октября, 2018;

- VI Международные фарабиевские чтения. Материалы междунар. науч. конференции студентов и молодых ученых «Фараби әлемі». Алматы. – 2-12 апреля, 2019;

- Nanomaterials in Biomedical Application and Biosensors (NAP-2019). Springer Proceedings in Physics, Springer, Singapore. – 2020;

The IEEE International Conference on «Nanomaterials: Applications & Properties». – 9-10 November 2020, Odesa, Ukraine;

- X Международные фарабиевские чтения. Материалы междунар. науч. конференции студентов и молодых ученых «Фараби әлемі». - 6-8 апреля 2023;

-The IEEE International Conference «Nanomaterials: Applications and Properties». – 7-12 September 2025, Bratislava, Slovakia.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 11 печатных работах, включая 4 статьи в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 3 статьи в республиканских научных журналах, включенных в перечень КОКСНВО МНВО РК, 4 тезисов в материалах международных конференций.

Личный вклад автора заключается в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований, анализе, интерпретации и оформлении полученных результатов, подготовке рукописей публикаций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 148 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, список использованных источников из 285 наименований. Работа включает 11 таблиц, 41 рисунков и 1 приложение.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Синтез, свойства и биомедицинское применение нанокомпозитных антисептиков на основе бактериальной целлюлозы, MXene и гидроксиапатита

Антисептика — это совокупность методов и средств, направленных на уничтожение или подавление роста микроорганизмов (бактерий, грибов, вирусов) в ранах, на коже, слизистых оболочках и в тканях организма для предупреждения или лечения инфекции. В современном научном и технологическом пространстве наблюдается активное развитие новых антимикробных материалов, направленных на создание более эффективных и универсальных антисептических решений. Особый интерес вызывают наноструктурированные системы, обладающие многофакторным механизмом действия не только на микроорганизмы, но и организм хозяина.

В связи с этим особый интерес представляет поиск альтернативных антимикробных наноматериалов, способных обеспечить высокую эффективность при снижении риска развития резистентности. Одним из таких перспективных кандидатов являются MXene. Как правило, их включают в качестве одного из функциональных агентов в гибридный или композитный материал.

Для создания композитных материалов могут применяться как природные и синтетические полимеры, так и ряд неорганических соединений. Такие системы, как правило, состоят из двух ключевых компонентов: матрицы и наполнителя (армирующий элемент). Матрица выполняет роль структурного основания, удерживающего и распределяющего наполнитель, тогда как армирующий элемент вносит вклад в улучшение физико-химических и биологических характеристик всей системы. Благодаря широкому выбору возможных комбинаций матричных и армирующих материалов удаётся получать композиты с заданными свойствами [19]. Важным преимуществом подобных систем является сочетание (синергизм) базовых свойств биополимерной матрицы — таких как гидрофильность, биосовместимость и пролонгированное действие, — с уникальными свойствами функционального наполнителя. В последние десятилетия бактериальная целлюлоза (БЦ), также называемая бактериальной наноцеллюлозой (БНЦ), привлекает внимание как универсальная основа для разработки композитов, где её свойства успешно комбинируются с уникальными характеристиками наноматериалов, включая коллоидное серебро, оксид графена, фуллерены и т.д.

Одним из направлений использования нанокомпозитов в качестве антисептиков является регенеративная медицина. Она занимается различными типами повреждённых тканей, которые можно разделить на твёрдые и мягкие. Первую группу представляют кости, тогда как список мягких тканей более обширен и включает кожу, мышцы, нервы. Регенерация кожной ткани долгое время была загадкой в медицинской сфере и до сих пор

привлекает внимание множества ученых и практиков. Это связано с тем, что кожа является первой линией защиты организма, она должна быть способна реагировать на повреждения различной степени тяжести, чтобы поддерживать постоянное равновесие организма. Однако способность кожи к регенерации ограничена. В таких случаях обычно наблюдаются два сценария: хронические раны и образование рубцовой ткани. Восстановление кожных тканей становится особенно сложной задачей, если у пациента есть хроническое заболевание, которое может нарушить процесс заживления. Такие раны подвержены действию инфекционных агентов, способных образовывать биопленки, которые особенно трудно поддаются лечению. И тут нужны «особые» антисептики. Под этим подразумевается, что современное направление их использования акцентируется на совершенствовании естественного механизма регенерации тканей. Поэтому оно направлено на создание структур, восстанавливающих и улучшающих состояние повреждённых тканей путём стимулирования их способности к регенерации. Этого можно достичь, создав искусственную структуру, называемую скаффолдом, которая содержит антисептические компоненты, служит матрицей для прикрепления и роста клеток, а также для формирования новой ткани. Разработка скаффолда требует тщательного подхода: он должен максимально точно имитировать среду целевой ткани. Материал должен обладать антимикробной активностью, необходимой «жёсткостью» живой ткани-мишени, способствовать взаимодействию между клетками и внеклеточным матриксом, а также способствовать адгезии, пролиферации и дифференцировке клеток.

Ткани человека состоят из биокомпозитов [20]. Следовательно, композитные материалы, используемые для каркасов, должны быть биосовместимыми, биоактивными, биоразлагаемыми, иметь соответствующие поверхностные характеристики, структурное и механическое сходство и, желательно, иметь доступную технологию производства [21, 22]. Поскольку они призваны имитировать морфологические, механические и биохимические характеристики тканей, биоматериалы считаются более подходящими для этой цели [23]. Современные биоматериалы не «заменяют» живые ткани, а целенаправленно разрабатываются для стимуляции клеточных реакций на молекулярном уровне, способствуя восстановлению тканей. Целью данного обзора является структурированный анализ последних достижений в области биокомпозитов на основе БЦ, MXene и ГАП, начиная с обсуждения каждого отдельного материала. Затем рассматривается их совокупный потенциал, для восстановительной медицины и тканевой инженерии.

1.1.1 Бактериальная наноцеллюлоза - биополимер в биомедицинских приложениях

Бактериальная целлюлоза (БЦ) - полисахарид, который синтезируется микроорганизмами. БЦ состоит из β(1,4)-глюкопиранозных цепей,

стабилизированных меж- и внутрицепочечными водородными связями, а также гидрофобными и Ван-дер-Ваальсовскими взаимодействиями, случайным образом распределенными в микрофибриллах. Волокна БЦ примерно в 100 раз тоньше своего растительного аналога, диаметром от 20 до 100 нм и длиной от 100 до 1000 нм [24, 25]. Европейская комиссия и International Organization for Standardization (ISO) относят к наноматериалам вещества, где частицы/структурные элементы имеют хотя бы одно измерение в диапазоне ~1-100 нм (или материал имеет внутреннюю/поверхностную наноструктуру) [26]. Бактериальная целлюлоза (БЦ) как раз удовлетворяет этому критерию [27, 28]. Рецензированные обзоры и экспериментальные работы сообщают, что БЦ формируется бактериями сразу в виде нановолокон (фибрилл) порядка 10-100 нм по диаметру (AFM/SEM/TEM) [29–31]. Это прямое попадание в «нано»-масштаб. Классические и современные обзоры систематически используют термин Bacterial Nanocellulose (БНЦ) применительно к БЦ именно из-за её нанофибриллярной природы и методов получения/применения как наноматериала [32, 33]. Помимо непрерывной наносети, БЦ рутинно переводится в нанокристаллы целлюлозы (НКЦ) кислотным гидролизом и в дисперсии нанофибрилл (НФ) механическими/энзимными методами [34, 35]. Именно наноразмер фибрилл даёт:

- очень высокую удельную поверхность (легкая функционализация, сорбция, интерфейсы) [36, 37];
- высокую кристалличность и жёсткость отдельных элементов (превосходное армирование в композитах/плёнках) [38, 39];
- биосовместимость и биодеградацию, важные для биомедицинских применений [40, 41].

Эти признаки типичны для наноматериалов и систематически подчёркнуты в обзорах по наноцеллюлозе/БЦ [42, 43]. Современные обзоры по биомедицине, электрохимическим устройствам, упаковке и др. рассматривают БЦ именно в парадигме наноматериалов (наносети, нановолокна, композиты с наночастицами), что отражает и её эксплуатационные преимущества, и методики характеризации на наноуровне [44, 45].

Таким образом, бактериальная целлюлоза является наноматериалом, поскольку синтезируется бактериями сразу в виде нановолокон диаметром ~10-100 нм, широко выделяется в формы нанофибрилл и нанокристаллов, а её наноразмерная архитектура обуславливает высокую удельную поверхность, кристалличность и набор «нано-свойств», подтверждённых в рецензируемой литературе.

На практике этот биополимер получают путем ферментации *Komagataeibacter xylinus*. Процесс синтеза целлюлозы представляет собой сложный биологический процесс, в ходе которого некоторые штаммы бактерий ферментативно преобразуют простые сахара в целлюлозу. Образование целлюлозы начинается с синтеза микрофибрилл, которые затем

собираются в плотную сеть. На конечный продукт и его выход влияет множество факторов, таких как доступность питательных веществ, уровень pH, температура, уровень кислорода, скорость перемешивания и период инкубации. Можно повысить производительность, используя генную инженерию ферментов, участвующих в этом процессе, тем самым увеличивая скорость биосинтеза целлюлозы [46]. Биосинтез бактериальной целлюлозы осуществляется опероном целлюлозосинтазы, включающем гены, действующие как основной каталитический комплекс, инициируя синтез, используя в качестве субстрата уридиндифосфатглюкозу. В то же время гены БЦsC и БЦsD способствуют экструзии и кристаллизации целлюлозных фибрилл за пределы клеточной мембраны [47]. Манипулируя экспрессией таких генов, можно оптимизировать выход бактериальной целлюлозы.

Существуют различные протоколы, различающиеся этапами инкубации и последующей обработки. Протокол можно модифицировать, заменив источник углерода более дешёвыми альтернативами, такими как глицерин и фруктоза. Кроме того, важную роль играет способ ферментации (статическая/с перемешиванием): статическая инкубация позволяет получать высокочистые целлюлозные плёнки, тогда как ферментация с перемешиванием способна увеличить производительность и создавать сферические формы целлюлозы [46].

Бактериальная целлюлоза химически чистый полимер - не содержит лигнина и гемицеллюлозы, что делает ее источником очень чистой целлюлозы. БЦ не требует дополнительных этапов обработки, что снижает трудоемкость и нагрузку на окружающую среду. Хотя структура целлюлозной субъединицы остается неизменной, бактериальная целлюлоза проявляет другие физические и химические свойства, часто считающиеся более совершенными [49]. БЦ имеет высокий индекс кристалличности, она термостабильна и эластична. Среди отличительных свойств - большая площадь поверхности, пористость и высокая механическая прочность (модуль Юнга 118 ГПа, в аналогичном диапазоне, что и у стали), высокое содержание воды >90% и высокая биосовместимость.

Можно без преувеличения сказать, что контексте биомедицинских применений бактериальная целлюлоза – восходящая звезда среди других видов целлюлозы. Будучи неаллергенной, безопасной (имеет статус GRAS) и поддающейся стерилизации, БЦ стала чрезвычайно популярным биоматериалом для медицинского применения, особенно для регенерации ран [50]. Благодаря своей прозрачности и превосходному прилеганию к месту раны, БЦ часто используется в качестве искусственной кожи при лечении обширных ожогов. Процесс заживления ран ускоряется за счет поддержания высокого содержания кислорода и влажной среды в ране, а также поглощения избыточного тканевого экссудата [51]. Тем не менее, большинство повязок на основе БЦ для заживления ран просто способствуют лучшей регидратации тканей, но не гарантирует уменьшение инфекций в этой области.

1.1.2 Гидроксиапатит

Гидроксиапатит (ГАП) - одна из форм фосфата кальция с формулой $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ [52, 53]. Это один из важнейших биоминералов, демонстрирующий, как природные минералы могут интегрироваться в живые ткани. Он имеет структурное сходство с минеральной фазой кости и легко интегрирует в костную ткань [54–56]. Гидроксиапатит обладает превосходной биосовместимостью, биоразлагаемостью и биоактивностью, поэтому он широко применяется в биомедицинской области для реконструкции костей и зубов, создания костных трансплантатов, доставки лекарств [57, 58].

Гидроксиапатит имеет разнообразные морфологические структуры, включая игольчатые, стержневые и сферические [59]. Форма ГАП оказывает существенное влияние на его электростатические свойства. Например, игольчатый ГАП имеет положительно заряженные концы и отрицательно заряженную оставшуюся часть [59]. Гидроксиапатит обладает кристаллической структурой с весьма специфической упаковкой атомов и междоузлиями. Кристаллическая структура гидроксиапатита соответствует гранецентрированной кубической (ГЦК). Этот тип пространственного расположения имеет тетраэдрические и октаэдрические позиции, занятые преимущественно ионами фосфата (PO_4^{3-}) и ионы кальция (Ca^{2+}) соответственно. Фосфат-ионы (PO_4^{3-}) движутся вдоль оси с кристаллической структуры, тогда как ионы кальция (Ca^{2+}) занимают два места, поэтому обозначают их как Ca I (расположены при z = 0 и z = 1/2) и Ca II (расположены вдоль оси c, образуя фосфат-ионы (OH^-) каналы) [) занимают два места, поэтому обозначают их как Ca I (расположены при z = 0 и z = 1/2) и Ca II (расположены вдоль оси c, образуя фосфат-ионы (OH^-) каналы) [60, 61]. Такое ионное положение критически важно для стабильности и функциональности гидроксиапатита. Имеются подтверждающие данные об эпигенетическом поведении наногидроксиапатита, наблюдаемом по его способности стимулировать остеогенез [62, 63]. Кроме того, наногидроксиапатит может быть использован для доставки лекарств благодаря его улучшенной площади поверхности [53].

Гидроксиапатит может быть синтезирован химическим методом или экстракцией из нейтральных источников. Соотношение Ca и P, форма кристаллов ГАП и морфологическая структура существенно зависят от метода синтеза [55]. Природными источниками ГАП в основном являются отходы, такие как кости млекопитающих, части водной флоры и фауны, растения, водоросли и минералы, такие как известняк [55]. Из-за замены атомов кальция ГАП, извлеченный из природных источников, содержит следовые количества ионов металлов, таких как Na^+ и Mg^{2+}. Нечистый ГАП имитирует минералы человеческой кости; его присутствие влияет на биоактивность и необходимо для регенерации костной ткани [64]. Первым этапом экстракции является предварительная очистка материала от грязи,

жиров, белков и т. д. Далее следуют процессы прокалки или химической обработки [55]. Из млекопитающих чаще всего используется бычья кость. При прокаливании кость нагревается в печи при температуре до 1400°C, где CO_2 и фазы фосфата кальция, золы и гидроксида кальция. С повышением температуры кристалличность ГАП также увеличивается. Щелочная обработка предполагает использование раствора, например, NaOH, для удаления органического вещества из кости, а оставшееся неорганическое вещество подвергается процессам фильтрации и разделения, в результате чего образуются фазы фосфата кальция. Ферментативный гидролиз использует ферменты, обычно протеазы, для гидролиза органических компонентов, после чего ГАП собирают центрифугированием. Однако щелочная обработка и ферментативный гидролиз дают чистый ГАП с более низкой кристалличностью, что сужает область его применения [55].

Химический синтез ГАП позволяет получить чистый ГАП без следов металлов, что является недостатком в контексте биомедицинских применений. Чистый ГАП обладает низкими механическими и химическими свойствами [64]. Sawada и соавторы представили метод синтеза чистого ГАП с использованием коллоида аморфного карбоната кальция (АКК), не требующего стадий очистки, необходимых при синтезе через прекурсоры солей кальция. Для синтеза коллоид ААК подвергали реакции с раствором ортофосфорной кислоты (которая играет роль источника фосфата) в ацетоновой системе при комнатной температуре с последующим прокаливанием. Ацетоновая система ингибирует фосфорилирование ААК, приводящее к образованию кальцита, что в конечном итоге предотвращает образование кристаллического карбоната кальция [52].

Хотя синтез ГАП в растениях не получил широкого распространения, интерес к потенциалу «зелёного» синтеза ГАП растёт. Среди растений, Моринга масличная листья которой представляют потенциал для синтеза ГАП, поскольку содержат большое количество кальция и фосфата, а также других микроэлементов. Различные отходы, такие как картофель, миндаль и т. д., также предлагаются в качестве предшественников ГАП. Синтез из растительных источников осуществляется методом влажного синтеза, что обеспечивает некоторую гибкость в отношении размера и морфологии ГАП. Однако фитотоксины требуют тщательного изучения, поскольку некоторые соединения могут образовывать токсины, например цианиды, посредством гидролиза цианогенных гликозидов [65]. Кроме того, для синтеза, осуществляемого растениями, могут потребоваться дополнительные предшественники кальция и фосфата [55]. Яичная скорлупа также богата $CaCO_3$, что делает их потенциальным предшественником для производства ГАП [66]. Они требуют дополнительной очистки отбеливателем с последующим прокаливанием и осаждением [55]. Sultana и соавторы разработали метод твердофазного синтеза с использованием УФ излучения из яичной скорлупы при комнатной температуре. Сначала скорлупу

обрабатывают в шаровых мельницах, а затем подвергают УФ-облучению [54].

Среди множества материалов, используемых в тканевой инженерии, гидроксиапатит занимает особое место благодаря своим биологическим свойствам, таким как высокая биосовместимость, низкая токсичность, отсутствие иммунной и воспалительной реакции и широким возможностям применения. Помимо уже традиционного использования ГАП для остеогенеза и регенерации костной ткани, появляется сведения о стимулировании этим минералом процесса ранозаживления. В исследованиях Okabayashi и др. и Ribeiro и др. показано, что ГАП ускоряет заживление ран, реэпителизацию, формирование матрикса, улучшает ангиогенез и активирует клеточную миграцию [10, 11]. Доказано, ГАП привлекает макрофаги и фибробласты в область раны, они в свою очередь выделяют ангиогенные факторы (VEGF, FGF), которые стимулируют формирование новых кровеносных сосудов, улучшая таким образом кровоснабжение и обеспечивая тканям необходимое количество кислорода и питательных веществ для заживления [67]. В 2021 году было проведено исследование регенеративных свойств ГАП, в котором было показано, что это вещество обладает способностью не только ускорять заживление ран, улучшать ангиогенез и стимулировать миграцию клеток но и подавлять рост бактерий. Бактерицидные свойства наночастиц ГАП которые обусловлены образованием высокореактивных форм кислорода, таких как OH-, H_2O_2 и O_2^- - [68]. Эта информация свидетельствует о том, что в настоящее время свойства ГАП, способствующие заживлению ран, находятся в активной фазе исследования.

1.1.3 MXene – новый класс наноантисептиков

MXenes - это большой класс переходных металлов - карбидов, карбонитридов и нитридов, которые были открыты в 2011 году [69]. Структурная формула MXene описывается как $M_{n+1}XnT_x$, где M - переходный металл (чаще всего титан, ванадий или ниобий), X - углерод и/или азот, а T_x обозначает функциональные группы, такие как –OH, –F и =O, формирующиеся на поверхности в результате процесса травления [70].

При синтезе необходимо учитывать множество факторов, поскольку множественные валентные состояния переходных металлов и обилие поверхностных терминаторов могут привести к определенным нестабильностям, таким как атомные вакансии, поры, спонтанная интеркаляция ионов и т. д. [71]. В целом их синтез достаточно вариативен. Идея синтеза «сверху вниз» основана на преобразовании объёмного материала в наночастицы посредством физических, химических или механических процессов. В свою очередь, синтез «снизу вверх» основан на «построении» наночастицы на атомном уровне. Хотя метод синтеза сверху вниз имеет преимущество в популярности [72], доступны как методы синтеза «сверху вниз», так и «снизу вверх». В процессе синтеза «сверху вниз»

исходная MAX-фаза подвергается расслоению, достигаемому за счёт разрыва ван-дер-ваальсовых связей между слоями в результате химических и электрохимических реакций [73]. Синтез MXenes сверху вниз проходит три этапа: синтез MAX-фазы, травление слоя A и расслоение многослойного MXene.

MAX-фазы представляют собой семейство тройных слоистых соединений с формальной стехиометрией $M_{n+1}AX_n$, где M - переходный металл, A - группа 13-16 элементов, а X - углерод и/или азот [74]. Например, травлением фторводородной кислотой (HF) карбида Ti_3AlC_2 удаляют алюминий (A-слой), в результате образуется карбид Ti_3C_2 с поверхностными группами –OH, =O и –F (обозначаемый $Ti_3C_2T_x$). Полученный материал имеет структуру многослойного «аккордеона», из которого отдельные атомарно тонкие слои MXene затем эксфолиируют механическим ультразвуковым воздействием или с помощью интеркаляторов. Каждый слой MXene толщиной несколько нанометров состоит из двух слоёв металла M, между которыми находится слой атомов углерода или азота (X); при этом поверхность слоёв покрыта функциональными группами (–OH, –O, –F и др.), возникающими в процессе травления. Такая структура придаёт MXene уникальные свойства: большое отношение поверхности к объёму, высокую электронную проводимость, гидрофильность и химическую активность поверхности. В этом методе жидкофазное травление предполагает использование опасных, токсичных растворов, содержащих плавиковую кислоту (HF). Травление слоя A достигается благодаря слабым металлическим связям элементов MA по сравнению с ионными связями MX, которые остаются нетронутыми травителем. Для успешного травления наиболее подходят слабые связи MA и особенно сильные связи MX, они также требуют наименьшего количества энергии отслаивания [75].

MAX-фазу обычно получают двумя способами. Во-первых, путём приготовления смеси чистых элементарных порошков. Во-вторых, путём комбинирования карбидных/нитридных порошков (MX и/или AX) с дополнительным чистым элементным порошком. Для травления можно использовать HF, а также заменить её менее токсичной смесью HCl (соляной кислоты) и LiF. Такая замена также позволила получить более качественные продукты с меньшим количеством дефектов. Отшелушивание с помощью LiF-HCl способствует равномерному распределению поверхностных групп [76], улучшить термическую стабильность [77], и обеспечивают более легкое расслаивание [78]. В настоящее время существует около 150 доступных вариаций MAX-фаз, что обеспечивает большую гибкость метода «сверху вниз» [79]. Кроме того, метод синтеза существенно влияет на конечный продукт. Даже если полученные Mxenes имеют одинаковый атомный состав, структурные и функциональные свойства будут различаться [80]. Жидкофазное отшелушивание в основном используется из-за своей простоты, эффективности, доступности сырья и возможности масштабирования производства. Метод «снизу вверх» позволяет получать

однослойные материалы путем прямого синтеза из нескольких прекурсоров, вызывая химические реакции и инкапсулируя методы синтеза, такие как химическое осаждение из паровой фазы (CVD) и влажный химический синтез [81]. Поскольку в этом методе синтез начинается на атомном уровне, обеспечивается лучший контроль морфологии, структуры и поведения MXene. Однако масштабирование с помощью этого метода может оказаться невозможным, поскольку условия реакции, такие как высокая температура, могут быть не соблюдены, что ещё больше снижает качество продукта и эффективность процесса [79].

Более полные протоколы синтеза MXene были подробно описаны Ю. Гогоци и др. в своей публикации [82]. К настоящему времени синтезировано свыше 30 разных MXene (в том числе на основе Ti, V, Nb, Mo и др.), наиболее изученным является карбид титана $Ti_3 C_2 T_x$. Наиболее изученной является фаза $Ti_3C_2T_x$, получаемая путем селективного травления алюминия из Ti_3AlC_2 в растворе фторводородной кислоты или с использованием смеси LiF и HCl. Альтернативные щадящие методы модификации, такие как использование аммония фторида, исследуются для снижения токсичности процесса [83].

Физико-химические свойства MXene делают его привлекательным для биомедицинских применений. Наноматериал обладает высокой удельной поверхностью и адсорбционной способностью, может обмениваться ионами и электронами, устойчив в водных средах. В отличие от гидрофобного графена, поверхности MXene гидрофильны за счёт полярных групп T_x, что облегчает диспергирование в воде и биорастворах. Гидрофильный характер MXene определяется соотношением гидрофильных (–O и –OH) и гидрофобных (–F) поверхностных терминаторов. Гидрофильная природа MXenes способствует легкому образованию связей с другими веществами. Так же, композиты MXenes-полимер могут быть разработаны путем удаления воды и групп –OH в случае гидрофобных полимеров [77]. Таким образом, поверхностные свойства наноматериала MXene способны способствовать различным биологическим процессам.

Однако MXenes проявляют нестабильность в жидких условиях и молекулярном кислороде, что ограничивает область их применения [84]. Для решения проблемы потенциальной переукладки и повторной агломерации все больше исследований направлено на модификацию поверхностных терминаторов, поскольку поведение MXenes в значительной степени зависит от взаимодействий, создаваемых поверхностными терминаторами. Например, функциональная группа –F увеличивает гидрофильность, а поверхностные терминаторы –O улучшают фотокаталитическую активность. Слой T чаще всего концентрируется с функциональными группами –O, –OH, –F и/или –Cl, и их можно модифицировать в процессе синтеза [85]. В процессе синтеза сверху вниз травильный реагент будет определять обилие функциональных групп. Поверхностные терминаторы –O и –F становятся более обильными после отшелушивания фторидсодержащим травителем, в

то время как газовый гидролиз уменьшает количество функциональных групп –F [85]. Другие параметры, такие как концентрация реагентов, продолжительность реакции и последующая обработка, например, термический отжиг и химические реакции, также будут влиять на слой T [86]. Стабильность MXene также зависит от слоя переходного металла с элементом X, поскольку карбиды начинают реагировать с ним при воздействии кислорода, нарушая структурную целостность [85].

MXenes проявляют металлическую электропроводность, нетипичное свойство для 2D-материалов [76]. Проводимость – один из факторов, способствующих регенерации ран и тканей. Отсюда и высокая эффективность MXenes. Пластинчатая структура и высокая электропроводность MXene обуславливают его использование в биосенсорах и электроактивных имплантатах. проводимость демонстрирует потенциал для улучшения заживления острых, хронических и инфицированных ран [87]. Кроме того, Li и др. связали проводящую природу MXenes с созреванием нейронных цепей и улучшением производительности и интеграции регенерированных нервных тканей [88].

MXenes также изучались на предмет их антибактериальной активности. Rasool и др. провели исследование антибактериальной способности $Ti_3C_2T_x$ MXenes против кишечной палочки и *B. subtilis*, которые являются грам (−) и грам (+) видами бактерий, соответственно [6]. Они наблюдали зависимость антибактериальной активности от дозы и времени и определили, что Ti_3C_2TxMXenes продемонстрировал 99% эффективность при 0,2 кг/м3. Прогрессирование повреждения клеток наблюдалось при концентрации 0,05 кг/м^3 концентрация MXene, а также 0,1 кг/м^3, все виды бактерий подверглись лизису клеток. Гидрофильные свойства $Ti_3C_2T_x$ MXenes усиливает адгезию к мембранам бактериальных клеток, повреждая их путем образования агломератов. Высокая восстановительная активность $Ti_3C_2T_x$ способствует выработке активных форм кислорода (АФК), тем самым увеличивая окислительный стресс в клетке [6]. Обнаружена антимикробная активность в отношении таких стандартных моделей патогенов как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* и др. [89-91].

К настоящему времени расшифрованы основные биоцидные механизмы: 1) Нано-нож – способны разрезать клеточную стенку бактерий; 2) Генераторы АФК - вызывают окислительный стресс у микроорганизмов; 3) Нанотермические лезвия - инактивация бактерий за счет генерации тепла при воздействии света [92].

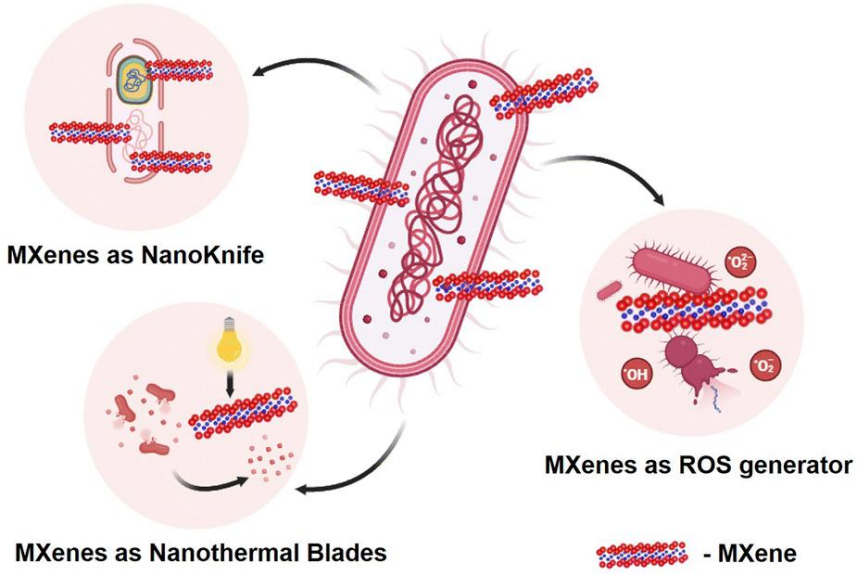


Рисунок 1 – Основные механизмы антимикробного действия MXene [93]

Нано-нож. В новаторском исследовании антимикробной активности MXenes Rasool и др. [6] предположили, что антибактериальный механизм двумерных нанолистов $Ti_3C_2T_x$ обусловлен повреждениями, вызванными их острыми краями, называемыми “нано-ножами”. Прямой контакт между MXene и бактериальными клетками разрушает клеточную мембрану бактерий, что приводит к повреждению клеток и их гибели. Используя сканирующую электронную микроскопию (SEM), просвечивающую электронную микроскопию (TEM) и анализы высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH), Rasool подтвердил, что прямой контакт с MXenes вызывает повреждение мембран и высвобождение клеточного содержимого [6]. Было обнаружено, что антибактериальная активность $Ti_3C_2T_x$ MXene зависит от концентрации, при этом 200 мкг/мл $Ti_3C_2T_x$ приводит к потере жизнеспособности бактериальных клеток более чем на 98 % после 4-часового воздействия. При более высоких концентрациях MXene бактерии попадали в ловушку или инкапсулировались в тонкие чешуйки MXene, образуя агрегаты [6]. Shamsabadi и др. [94] провели подробное исследование антибактериального механизма нанолистов $Ti_3C_2T_x$, сосредоточив внимание на повреждении клеточных стенок бактерий их острыми краями. Используя анализ серийных разведений, они продемонстрировали, что прямое физическое взаимодействие между острыми краями нанолистов и бактериальной мембраной является ключом к их антибактериальным свойствам. Нанолисты MXene за короткий промежуток времени вызвали значительное повреждение бактериальных клеток, что привело к высвобождению бактериальной ДНК и диспергированию клеток. На антибактериальную активность влияли поперечный размер нанолистов и время воздействия, при этом нанолисты меньшего размера демонстрировали более высокую эффективность против *E. coli* и *B. subtilis*. Предполагаемый антибактериальный механизм

предполагает, что острые края нанолистов толщиной около 1 нм проникают через бактериальную мембрану, толщина которой составляет около 20-50 нм. Нанолисты меньшего размера могут проникать через прямое физическое взаимодействие или эндоцитоз, что приводит к фрагментации ДНК и гибели клеток. Исследование также показало, что нанолисты MXene вызывают значительное окислительное повреждение грамположительных бактерий (*B. subtilis*), в то время как двухслойная мембрана грамотрицательных бактерий (*E. coli*) обеспечивает повышенную устойчивость.

Наряду с острыми концами, другие элементы также имеют решающее значение для антибактериальной активности $Ti_3C_2T_x$, которая включает в себя: 1) высокую гидрофильность и негативную природу $Ti_3C_2T_x$, что увеличивает скорость прямого уничтожения бактерий путем их инактивации; 2) H-связывание между оксигенатными группами Mxene и липополисахаридными внешней мембраны грамотрицательных бактерий, что останавливает питание бактерий.

Генераторы АФК. Активные формы кислорода (АФК) — это высокореактивные молекулы кислорода с неспаренными электронами, которые могут убивать бактерии [95], вызывают гибель бактерий несколькими путями, включая повреждение ДНК, нарушение обмена веществ и нарушение дыхательной цепи. Ключевые типы АФК включают супероксид-анион-радикалы, пероксид водорода, синглетный кислород и гидроксильные радикалы. MXenes, обладающие богатыми электронными свойствами, служат генераторами АФК, способствуя уничтожению бактерий в результате окислительного стресса [96]. Активные центры Ti-O на нанолистах $Ti_3C_2T_x$ способствуют образованию электронно-дырочных пар под действием светового излучения. Поверхностные окончания и хорошая проводимость MXenes предотвращают рекомбинацию электронов и дырок, усиливая фотокаталитическую активность и генерацию АФК. Такие факторы, как количество слоев MXene, расположение нанолистов, размер, дефекты и легирование, влияют на генерацию АФК [97]. Свет необходим для эффективного производства АФК, поскольку в темноте генерация ограничена. При рентгеновском облучении нанолисты MXene демонстрируют более высокую радиочувствительность по сравнению с оксидом графена (GO), с более высокой внутриклеточной выработкой АФК (MX = 75,2 %, GO = 65,2 %) [98]. Кроме того, тип и дозировка MXenes влияют на уровень АФК. Исследования *in vitro* показали, что нанолисты Nb_2C проявляют эффективную фототермическую антибактериальную активность в ближнем инфракрасном диапазоне (NIR) против *S. aureus* и *E. coli*, что объясняется окислительным повреждением мембран бактериальных клеток АФК, генерируемыми MXenes [99]. Более того, некоторые MXenes способны разрушать внутриклеточный глутатион (GSH), важнейший антиоксидант, который защищает бактерии от АФК. Истощение запасов GSH еще больше усугубляет окислительный стресс в бактериальных клетках,

усиливая повреждения, вызванные АФК, и повышая антибактериальную эффективность [100].

Нанотермические лезвия. В связи с высокой способностью MXene к фототермическому преобразованию энергии, была выдвинута гипотеза, что одним из процессов, лежащих в основе их биоцидной активности, является способность убивать бактерии фототермическим путем при воздействии света [101]. Этот антибактериальный механизм в первую очередь обусловлен способностью MXenes эффективно поглощать ближний инфракрасный свет (800-1500 нм) и преобразовывать его в тепло посредством поверхностного плазмонного резонанса или межзонных переходов, в зависимости от их металлической или полупроводниковой природы. При облучении ближним инфракрасным светом MXenes с высокой фототермической эффективностью выделяют тепло, нанося серьезный ущерб близлежащим бактериальным клеткам. Клеточная мембрана бактерий, состоящая из липидов, белков и полисахаридов, очень чувствительна к изменениям проницаемости, вызванным нагревом, и нарушениям внутриклеточного гомеостаза. Нагревание также может вызывать денатурацию ДНК и белков, что приводит к инактивации бактерий [102]. В частности, повышенные температуры (≥50-60°C) нарушают текучесть липидного бислоя, денатурируют мембранные белки и вызывают утечку цитоплазматического содержимого. Одновременно внутриклеточные белки и ферменты теряют структурную целостность, а нуклеиновые кислоты подвергаются необратимому повреждению, снижающему жизнеспособность микроорганизмов. Концепция “нанотермических лезвий” описывает двойное антибактериальное действие MXenes, которое заключается как в их острых краях, так и в выделении тепла. Экспериментальное моделирование и молекулярная динамика показали, что гидрофильные нанолисты $Ti_3C_2T_x$ MXenes могут проникать через гидрофобную липидную мембрану бактерий [103]. По сравнению с другими наноматериалами, такими как наночастицы золота, углеродные нанотрубки и графен, MXenes требуется больше энергии для проникновения через клеточную мембрану из-за их более высокой гидрофильности и большей площади контакта. Сильные ван-дер-ваальсовые и водородные связи усиливают адгезию MXene к клеточной мембране, способствуя значительному теплопередаче при световом облучении. Такая теплопередача повышает температуру мембраны, нарушая ее целостность и приводит к гибели клеток. В некоторых случаях фототермический процесс может также сопровождаться образованием АФК, что еще больше усугубляет повреждение бактерий в результате окислительного стресса [104].

MXene демонстрирует синергетические антимикробные свойства как благодаря химическому, так и физическому воздействию. Острые края нанолистов MXene, которые используются в качестве нано-ножей, обеспечивают прямой физический контакт с микробными мембранами, что приводит к разрыву мембран бактериальных клеток и утечке цитоплазмы. Кроме того, химическая инактивация бактерий облегчается фототермическим

эффектом MXenes и образованием активных форм кислорода (АФК). В совокупности эти механизмы обеспечивают превосходные бактерицидные свойства нанолистов MXene.

1.2 Биомедицинские применения нанокомпозитов из бактериальной целлюлозы, функционализированной ГАП или MXenes

Создание передовых материалов для биомедицинских применений в последние годы сосредоточено на исследованиях, направленных на улучшение терапевтических результатов в различных областях медицины. Среди передовых материалов для биомедицинского применения выделяются бактериальная целлюлоза, гидроксиапатит и MXene благодаря своим исключительным свойствам и многофункциональному применению. Нановолокнистая структура и водоудерживающие свойства бактериальной целлюлозы делают её идеальным материалом для регенеративной медицины. Гидроксиапатит функционирует как естественный структурный элемент кости, способствующий остеоинтеграции с биологическими сигналами, в то время как MXene, как новые двумерные материалы, обеспечивают электропроводность и фототермическую эффективность для различных целей. Основная информация об имеющихся разработках таких материалов и их биомедицинском применении суммирована в таблице 1.

Таблица 1 – Композиты на основе БЦ, ГАП и MXene для регенерации ран и костной ткани

Композит	Синтез	Применение	Эффект	Характер инновации	Источник
AgNP /БЦ/ГАП гидрогель	Композит получали методом биоминерализации бактериальной целлюлозы с последующей ионной модификацией.	Регенерация кости (GBR)	Эффективное антибактериальное действие, улучшенная прочность на растяжение, костная регенерация	Двойное покрытие AgNP и ГАП в гидрогеле БЦ для регенерации кости и антибактериального эффекта	[105]
ГАП/MXene/g-C_3N_4 каркас	Композиционный материал получали методом гидротермального синтеза ГАП с последующей инфильтрацией хитозан–ГА суспензий в меламиновую пену и кальцинацией, после чего вводили MXene (*ex situ*).	Регенерация костей, терапия остеосаркомы	Усиление регенерации кости, ингибирование раковых клеток за счёт фото-термической/фото-динамической терапии	Комбинация ГАП, MXene и g-C_3N_4 для одновременного восстановления кости и противоопухолевого эффекта	[106]
ПВА/БЦ/ MXene гидрогель	Композитный РВМ-гидрогель получали посредством HF-травления MAX-фазы (получение MXene) и последующего	Эпидермальный сенсор	Высокая чувствительность, самовосстановлени, экологичность	Создание MXene-основанного РВМ-гидрогеля с высокой чувствительност	[107]

	формирования борно-сшитой PVA/БЦ/MXene структуры методом циклического замораживания–оттаивания..			ью для сенсорных применений	
БЦ/MXene гидрогели	Регенерированную бактериальную целлюлозу (рБЦ) растворяли с добавлением MXene-наноматериала для улучшения электропроводности и механической прочности.	Регенерация кожи, заживление ран	Повышенная электропроводност, улучшенное заживление	Интеграция MXene в матрицу БЦ для повышения проводимости и биосовместимости	[108]
БЦ/ГАП композитный каркас	Гидрогели БЦ/ГАП получали методом биомиметической минерализации с последующей лиофилизацией	Регенерация костной ткани	Имитация природной костной ткани, усиленная биоминерализаци, улучшенная адгезия, пролиферация и дифференцировка клеток	Функционализация материала для улучшения взаимодействия с клетками и гемосовместимости	[109]

В этом разделе рассматриваются пять ключевых биомедицинских областей, в том числе проводящие гидрогели для реабилитации мягких тканей, пьезоэлектрические каркасы, воспроизводящие электромеханические среды тканей, системы доставки лекарств с пространственно-временным контролем, стратегии нейтрализации активных форм кислорода (ROS) против окислительного стресса при хронических заболеваниях и методы фототермической терапии для неинвазивного разрушения опухолей.

1.2.1 Проводящие гидрогели

Естественная проводимость кожной ткани нарушается после её повреждения. В результате эндогенное электрическое поле меняет своё направление от краев раны к её центру, управляя миграцией клеток. В частности, оно влияет на фибробласты и кератиноциты, которые обладают электровозбудимостью и играют важную роль в регенерации раны [110]. Эти клетки мигрируют из-за сильного однонаправленного электростатического притяжения к центру раны. Некоторые бактериальные виды также могут подвергаться воздействию этой силы, поэтому дезинфекция ран имеет важное значение [111]. Изменённое эндогенное электрическое поле создаётся взаимодействием положительного заряда раны и отрицательного заряда вокруг кожи. Проще говоря, это происходит из-за утечки ионов из поврежденной клетки. В целом изменение электрического поля играет важную роль в процессе заживления ран [112]. Отсюда следует, что использование электрического поля позволяет управлять процессом заживления. Можно ускорить процесс заживления ран с помощью электростимуляции, что делает Mxenes подходящими для этой роли

благодаря их проводящим свойствам [113, 114]. Электрический ток, генерируемый электростимуляцией, приводит к высвобождению внутриклеточных ионов кальция, которые, в свою очередь, стимулируют цитоскелетный кальмодулин. Он участвует в пролиферации клеток, экспрессии генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и трансформирующего фактора роста (TGF) [115]. Раны заживают лучше во влажной среде, поскольку она способствует оттоку избытка экссудата, межклеточному взаимодействию и миграции кератиноцитов. При использовании влажных повязок наблюдалось уменьшение боли и рубцевания, а также предотвращалось усиление воспаления [116]. Соответственно, раневые повязки на основе гидрогеля обладают множеством преимуществ, поскольку они создают влажную среду вокруг раны, способствуют адгезии клеток, имитируют естественный внеклеточный матрикс и обладают высокой проницаемостью для кислорода. Некоторые опасения, связанные с проводящими гидрогелями, связаны с механической жёсткостью, способностью к набуханию и пористостью. Важно создать повязку, которая будет достаточно пористой и гибкой для лучшей функциональности и износостойкости [111]. Трехмерные структуры, такие как гидрогели, обладают необходимыми структурными качествами (пористостью, гидрофильностью) для улучшения регенерации тканей [113].

Матрица биоматериала должна быть похожа на внеклеточный матрикс: чем выше биосовместимость, тем лучше восстановление. В связи с этим при создании проводящих биоматериалов следующими три соображения. Во-первых, матрица раневой повязки должна обладать соответствующей биосовместимостью, биоразлагаемостью и биоактивностью. Поэтому к выбору между натуральными и синтетическими полимерами следует подходить со всей тщательностью. Во-вторых, структурная морфология биоматериала должна обеспечивать способность к регенерации ран и тканей. И наконец, выбор проводящего материала. В биомедицинских целях выбор проводящего материала также зависит от других свойств, таких как антибактериальные, оптические, термические и т. д. [113].

Реакция проводящих биоматериалов на электрическую стимуляцию повышает их потенциал в реагирующих каркасах [112]. Эти скаффолды активируются при восприятии определённых стимулов, таких как pH, электрическое поле, колебания температуры, свет, активные формы кислорода (ROS) и ферменты. Проводящие биоматериалы, чувствительные к электричеству, подходят для создания систем доставки лекарств, стимулируемых электротоком. Биоактивные молекулы часто рассматриваются для заживления ран и тканей. Системы доставки лекарств обеспечивают локализованное, точное и контролируемое высвобождение лекарств, тем самым повышая эффективность и уменьшая побочные эффекты [117].

Биоматериалы могут быть использованы в качестве наноносителей лекарственных средств для поддержки регенерации тканей. Высвобождение

лекарств под действием электрической стимуляции также является интересной областью исследований. Восстановление высвобождает отрицательно заряженные лекарства, а окисление — положительно заряженные [112]. Эффективность гидрогелей для заживления ран может быть значительно улучшена путем добавления БЦ из-за его высокопористой структуры [118], биосовместимости, гибкости, гидрофильных свойств и механической прочности [119]. Например, Yang и др. разработали гидрогель, чувствительный к pH, для лечения инфицированных или хронических ран [120]. Целлюлозные нановолокна (ЦНВ) были вплетены в сетку поливинилового спирта (ПС) для устранения механических ограничений. Перед синтезом гидрогеля к целлюлозе было привито природное соединение ресвератрол (РСВ) для интеграции антиоксидантных и антибактериальных свойств. Механические испытания показали увеличение прочности гидрогеля, армированного РСВ. Примечательно, что гидрогель продемонстрировал кумулятивное высвобождение РСВ при pH 5,4, что в 2,33 раза выше, чем при pH 7,4. Такое поведение связано с кислой микросредой инфицированных ран. Гидрогель продемонстрировал сильный антибактериальный эффект против *S. aureus* и ускоренное заживление ран за счет стимуляции отложения коллагена, ангиогенеза и реэпителизации. Кроме того, было продемонстрировано, что гидрогель БЦ/акриловой кислоты (АА) может одновременно выполнять функцию носителя клеток и защитного покрытия для ран [121]. Loh и соавторы исследовали способность такого композита на основе ВС переносить человеческие эпидермальные кератиноциты (EK) и дермальные фибробласты (DF) для заживления ран на всю толщину [121]. Показано, что более 80% клеток прикрепились через 4 часа после посева. Следовательно, это было оптимальное время экспозиции гидрогеля на ране. Композит БЦ/АА поддерживал жизнеспособность EK и DF до семи дней, но не способствовал активной пролиферации. Это поведение согласуется с его предназначением как временного носителя клеток. Исследования *in vivo* продемонстрировали ускоренное заживление обработанных ран, как с предварительно засеянными клетками, так и без них. Гистологический и иммуногистохимический анализы подтвердили усиление реэпителизации и формирование грануляционной ткани в обеих группах, хотя гидрогели с клеточной нагрузкой продемонстрировали незначительное улучшение организации коллагена и эпидермальной стратификации. Эти результаты позволяют считать гидрогель БЦ/АА практически пригодным для лечения острых и хронических ран, обеспечивая баланс между жизнеспособностью клеток и контролируемой кинетикой доставки.

Включение гидроксиапатита в гидрогель может быть ограничено его керамической природой, которая делает его изначально жёстким и хрупким, что противоречит требуемым эластичным свойствам. Однако эту проблему можно решить, используя высокогибкие сверхдлинные гидроксиапатитовые нанопроволоки (UHANW) с переплетённой структурой. Следуя этой идее,

Zhu и соавторы синтезировали гибридную раневую повязку, сочетающую биобумагу на основе сверхдлинных гидроксиапатитовых нанопроволок и гидрогель альгината кальция (HAP-Alg) для лечения острых ран [122]. Гибкая сеть гидроксиапатитовых нанопроволок отвечала за улучшенные механические и защитные характеристики. Функция альгинатной матрицы заключалась в поддержании влажной среды, благоприятствующей регенерации кожи. Такая структура продемонстрировала надежные антибактериальные свойства и механическую стабильность с минимальным отеком или усадкой в физиологических условиях. Гидрогель HAP-Alg увеличивал внутриклеточный приток кальция и способствовал миграции фибробластов и пролиферации клеток. Заживление ран, отложение коллагена и неоваскуляризация были улучшены по сравнению с контрольными группами. Эти результаты свидетельствуют о том, что интеграция структурных преимуществ гибких сверхдлинных гидроксиапатитовых нанопроволок с биоактивными преимуществами кальциевой сигнализации позволила минимизировать механическую хрупкость и пассивную функциональность.

Кроме того, Hao и др. продемонстрировали возможность использования гиалуроновой кислоты в регенерации костной ткани [123]. Сверхдлинные нанопроволоки гидроксиапатита были включены в различных концентрациях в дипептидные гидрогелевые каркасы для повышения механической прочности и биоактивности. Анализ синтезированных композитов показал значительное увеличение модуля упругости (G') по сравнению с исходным дипептидным каркасом, что указывает на улучшение механических характеристик. Кроме того, клетки C_2C_{12}, выращенные на гидрогелевых каркасах с плотностью отлично пролифелировали. Анализ результатов имплантации гибридных гидрогелей в дефекты свода черепа крыс показал, что регенеративный потенциал гибридных гидрогелей значительно возрос по сравнению как с нелеченными дефектами, так и с дефектами, обработанными чистыми дипептидными гидрогелями. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что гидроксиапатит стимулирует клеточную пролиферацию и обладает остеокондуктивным и остеоиндуктивным эффектами.

Комбинированная повязка V-Os, разработанная Ren и соавторами, содержит метакрилированный желатин (GelMA), $Ti_3C_2T_x$MXene и рекомбинантный антимикробный пептид (V-Os) [115]. Они сообщили о присутствии MXene аггломерации на поверхности гидрогеля, предположительно служащие местом адгезии клеток. Гидрогели GelMA и GelMA/V-Os сами по себе не обладали электропроводностью, что свидетельствует о проводящих свойствах MXenes. В числе наблюдений авторы оценили $Ti_3C_2T_x$MXene антибактериальный эффект, цитотоксичность, биосовместимость и проводимость MXenes. В этом исследовании они продемонстрировали определённый бактерицидный эффект, предположительно, за счёт разрушения клеточной стенки бактерий.

Предполагается, что разрушение происходит из-за нарушения поступления питательных веществ, вызванного TiO_2. Они образуются в результате окисления $Ti_3C_2T_x$MXene. Очень важно, что не было выявлено значительной токсичности для небактериальных клеток, даже наблюдалось улучшение пролиферации клеток под действием электростимуляции. Значительное увеличение пролиферации клеток с помощью гидрогелей, содержащих $Ti_3C_2T_x$MXene привело к убеждению, что MXenes создают среду, которая способствует пролиферации клеток и экспрессии гена VEGF, а также уменьшает воспаление [115].

Zhou и др. использовали проводящую способность MXenes в качестве неантибиотической контрмеры против метициллин-резистентных золотистых стафилококков (MRSA) [124]. Функционально основной компонент гидрогеля, нанолисты MXene, обеспечивали скаффолду антибактериальную активность, электропроводность, термостабильность и адгезивные свойства к тканям. Скаффолд обладал бактерицидным действием в отношении кишечной палочки и *S. aureus* - 98,0% и 99,9% соответственно. Наиболее важным является их антибактериальный эффект против MRSA (99,03%), сопоставимый с действием антибиотика ванкомицина (98,9%), и значительно более высокая эффективность, чем у ампициллина (44,8%). Предполагается, что антибактериальный механизм действия MXene/PDA реализуется за счет разрушения бактериальной клеточной мембраны, вызванного более высокой концентрацией белка (разрушение клеточной мембраны приводит к утечке содержимого клетки, включая белки). Многофункциональные скаффолды продемонстрировали превосходную биосовместимость и биоразлагаемость при гистологических, *in vitro* и *in vivo* исследованиях.

1.4 Утилизация активных форм кислорода

Воспаление - одна из основных защитных реакций организма, направленных на нейтрализацию патогенов и обеспечивающих восстановление тканей. Тем не менее, нарушение регуляции или длительная стимуляция воспалительных путей может нанести вред организму, приводя к аутоиммунным заболеваниям, раку и сепсису. В связи с этим сигнальные молекулы, регулирующие воспалительные процессы, стали важными мишенями для лекарственной терапии. Активные формы кислорода (АФК), такие как анионы (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильные радикалы (–OH) – это молекулы, образующиеся в результате неполного восстановления кислорода [125]. Продукция АФК приводит к окислительному повреждению мембран и белков, вызывает дисфункцию клеток и усугубляет воспаление. В ответ на это разрабатываются и совершенствуются биоматериалы, нейтрализующие АФК, для уменьшения воспаления и защиты тканей от окислительного повреждения при нарушении регуляции иммунного ответа [126].

Известно, что MXene обладают способностью генерировать АФК как один из механизмов антибактериального действия. Композиты, содержащие

MXenes, обладают потенциалом для реализации локальной, стимулирующей АФК антимикробной активности, за счёт усиления окислительного стресса в данной области.

С другой стороны, помимо способности генерировать АФК, MXene также продемонстрировали способность нейтрализовать эти формы. Хотя наличие АФК может быть полезным для раневой поверхности, предотвращая инфицирование и стимулируя экспрессию коллагеназы и эластазы, было показано, что их чрезмерное количество нарушает регенерацию тканей из-за окислительного стресса, который не является избирательным. Поэтому технологии нейтрализации АФК также широко исследуются, что открывает возможности для MXene в этой потенциальной роли [114]. Способность MXenes поглощать АФК можно объяснить большой площадью поверхности, что является общей характеристикой для всех 2D-наноматериалов, изменяющейся валентностью переходных металлов, проводимостью, поверхностными терминаторами и т. д. MXenes имеют дефектные участки на краях, которые действуют как центры восстановительной реакции для свободных радикалов, которые захватывают атомы водорода с поверхностных терминаторов [127]. Исследование Hou и др. показало, что нанолисты $Ti_3C_2T_x$MXene способны снимать окислительный стресс, вызванный чрезмерным количеством АФК при воспалительных заболеваниях кишечника [128]. Они успешно намеревались применять их в качестве пероральных препаратов и подтвердили стабильность и антиоксидантную активность MXene. В другом исследовании Lui и соавторы исследовали способность $Ti_3C_2T_x$MXenes поглощать АФК в клетках печени мыши [127]. Они сообщили о высокой реактивности между H_2O_2 и $Ti_3C_2T_x$MXenes: наблюдалось изменение цвета раствора с чёрного на ярко-жёлтый под воздействием MXenes. Это изменение происходило при комнатной температуре с выделением газа и тепла. Полученные реагенты были идентифицированы как, возможно, пероксид титана (который и обеспечивал ярко-жёлтый цвет), оксид графита, вода, газообразный кислород, оксид углерода и диоксид углерода. Интересно, что эта реакционная связь наблюдалась исключительно с H_2O_2. Поэтому Lui и др. предположили, что эта реакция изменения цвета может быть использована для обнаружения перекиси водорода благодаря её чувствительности и достаточности. Более того, Lui и его коллеги подтвердили способность MXene нейтрализовать свободные радикалы. Механизм действия был объяснен обилием электронов на MXene, что приводит к образованию пар неспаренных электронов свободных радикалов [127]. Избыток АФК также связывают с нарушением процесса заживления ран у пациентов с диабетом. Li и соавторы разработали композитный инъекционный гидрогель, состоящий из гиалуроновой кислоты-дофамин (HA-DA) и покрытый $Ti_3C_2T_x$MXenes-полидофамином (MXene/PDA) [130]. Гидрогели на основе MXene были специально изучены на предмет их способности поглощать свободные радикалы, а также их общей пригодности для заживления ран. Было отмечено, что как MXene, так

и MXene/PDA обладают лучшей способностью поглощать свободные радикалы по сравнению с обычным антиоксидантом Н-ацетилцистеином. Они подчеркнули превосходные антиоксидантные свойства нанолистов MXene, покрытых PDA, обусловленные совокупным эффектом PDA и нанолистов MXene. Другое исследование, проведенное Geng и соавторами, было посвящено потенциалу $Ti_3C_2T_x$MXenes в снятии окислительного стресса. [130]. Они пришли к выводу, что нанолисты обладают более мощной и широкой антиоксидантной активностью, чем традиционные антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и витамин Е. Было показано, что их активность в отношении свободных радикалов зависит от концентрации, что означает, что степень очистки также увеличивается при более высокой дозировке нанолистов MXene. Структурные изменения в $Ti_3C_2T_x$MXenes были обнаружены при наблюдении за их антиоксидантной активностью. Утановлено, что $Ti_3C_2T_x$MXenes подвергается градиентному окислению, это изменяет его восстановительную способность после очищающей активности [130]. Группа под руководством Geng решила проблему структурной нестабильности MXene, модифицировав его биосовместимой молекулой - полиэтиленгликоль. Новые $Ti_3C_2T_x$MXenes/ПЭГ нанолисты продемонстрировали превосходную биосовместимость в исследовании с клетками NIH-3T3, но они отметили снижение антиоксидантной активности Ti_3C_2-ПЭГ нанолистов ПЭГ в сравнении с $Ti_3C_2T_x$MXene нанолистами, сохраняя при этом эффективную и широкую поглощающую активность [130].

Бактериальная целлюлоза обладает дополнительными преимуществами при лечении ран, такими как механическая прочность, взаимодействие с полимерами и эффективная биодеградация. В отличие от MXenes, сама бактериальная целлюлоза не обладает свойствами, связывающими АФК и антимикробными свойствами [131]. Тем не менее, она является исключительным каркасом для регенерации тканей благодаря своей высокой биосовместимости, пористости и способности удерживать влагу в раневой среде. Недавние исследования предлагают комбинировать БЦ с антиоксидантами или антимикробными агентами для создания многофункциональных повязок. Например, включенные в БЦ фенольные соединения и ферменты продемонстрировали повышенную способность нейтрализовать АФК и осуществлять дополнительную структурную поддержку пролиферации клеток [132].

Роль БЦ в поддержании антиоксидантной активности супероксиддисмутазы (СОД) была описана Pinmani и соавторами [133]. СОД – это антиоксидантный фермент, синтезируемый из *Saccharomyces cerevisiae* TBRC657, который нейтрализует супероксидные радикалы, но страдает от нестабильности при физиологическом стрессе. Иммобилизация СОД на БЦ повысила ее стабильность на 40% при высоких pH и температуре по сравнению со свободной СОД, которая быстро разлагалась. Пористая структура БЦ сохраняла каталитическую активность СОД, одновременно

защищая её от денатурации. В анализах окислительного стресса жизнеспособность фибробластов достигала 78,46% при предварительной обработке БЦ/СОД перед H_2O_2 воздействием, которое превосходило воздействие свободной SOD и чистой БЦ. Это улучшение было подкреплено способностью бактериальной целлюлозы локализовать СОД в месте повреждения, обеспечивая устойчивую очистку от O_2–. Такое предотвращение нарушения окислительно-восстановительной сигнализации, критически важно для заживления. Эта селективность делает БЦ/SOD индивидуальным решением для лечения хронических ран, характеризующихся преимущественно супероксид-зависимым воспалением.

ГАП также продемонстрировал потенциал в лечении окислительного стресса при заживлении ран, связанных с костной тканью. Несмотря на то, что гидроксиапатит не обладает выраженной способностью поглощать АФК, он широко используется в качестве компонента биоматериалов для подобных целей благодаря своей остеопроводимости и биосовместимости [134]. ГАП можно комбинировать с различными материалами, такими как оксид графена или антиоксидантные соединения (дубильная кислота, витамин С, чёрное рисовое вино), для создания композитов с улучшенной способностью нейтрализовать АФК. Yu и соавторы предприняли попытку улучшить адгезию и остеоинтеграцию путём покрытия поверхности титановых имплантатов наночастицами полидофамина, функционализированными гидроксиапатитом (ГА/nPDA) [135]. Использовалась технология одностадийного соосаждения с дофамином. Для создания композита HA/nPDA наночастицы PDA замачивали в растворе, имитирующем биологическую жидкость (SBF). Результаты показали, что покрытия nPDA и HA/nPDA нейтрализовали около 40% свободных радикалов. Полученные значения скорости поглощения АФК находились на оптимальном уровне, что свидетельствует о балансе между устранением избыточных АФК после операции и поддержанием необходимого уровня АФК для клеточной защиты и сигнализации. Таким образом, покрытия воздействовали только на вредный окислительный стресс, не нарушая полезные физиологические процессы.

1.2.3 Доставка лекарств

На рану часто наносят средства, способствующие восстановлению кожной ткани. Они часто содержат антибиотики, факторы роста, противовоспалительные препараты и т. д. Проблема, возникающая при добавлении этих препаратов, заключается в их возможной нестабильности, низкой абсорбции и потенциальных побочных эффектах. Эту проблему можно решить, включив эти препараты в биоматериалы, которые будут обеспечивать контролируемое высвобождение этих молекул [136]. Большая площадь поверхности MXenes делает их перспективными для производства систем доставки лекарств с контролируемым высвобождением [137]. Zhang и др. создали нанолисты MXene-Se-DOX, состоящие из нанолистов Mxene, химиотерапевтического препарата DOX (доксорубицин) [137]. Такие

наноносители лекарственных средств на основе MXene обладают множеством преимуществ, таких как предотвращение непредвиденного высвобождения DOX и контролируемое высвобождение препарата под воздействием стимулов, в частности АФК и pH, а также присущая MXene антибактериальная активность. Система MXene-Se-DOX продемонстрировала превосходную антибактериальную активность против *E. coli* и *B. subtilis*. MXenes как наноносители не инкапсулируют лекарственное средство, а просто образуют химические связи. Их большая площадь поверхности в данном случае является преимуществом. Однако это также делает их непригодными для использования в больших дозах лекарственных средств и может привести к трудностям с высвобождением препарата (образованную связь может быть сложнее разорвать/контролировать степень разрыва, что может привести к неконтролируемому высвобождению препарата) [138].

БЦ обладает большим потенциалом для доставки лекарств. Её нанопористая структура позволяет загружать лекарственные средства и использовать их в качестве системы доставки. Кроме того, БЦ может быть модифицированный, чтобы быть подходящим для конкретного типа препарата [116]. Это биосовместимый материал с выдающимися механическими свойствами, обеспечивающими стабильность и длительное высвобождение лекарственных средств. Более того, гибкость модификаций биополимера позволяет получить адаптируемые свойства, выгодные для конкретных случаев высвобождения лекарственных средств [37].

Гидроксиапатит также считается наноносителем лекарственных препаратов. Хотя наногидроксиапатит (nГАП) является превосходным биоматериалом, обладающим необходимой биосовместимостью, биоактивностью и структурным сходством с костными минералами, он также обладает такими недостатками, как быстрое высвобождение препарата, низкая механическая прочность и ограниченная способность к таргетированию.

1.2.4 Фототермическая терапия

Фототермическая терапия (ФТТ) является распространенным вариантом лечения рака, основанным на выработке тепла посредством процесса фототермического преобразования [139]. В нём используется ближний инфракрасный (БИК) свет, который поглощается фототермическими материалами с последующим выделением тепла. ФТТ — это эффективный, но малоинвазивный метод, который наносит минимальный вред окружающим здоровым тканям [140]. Фототермические агенты могут быть токсичными и вести себя нестабильно. Поэтому требуется тщательный выбор таких материалов. MXenes являются отличными кандидатами в качестве фототермических агентов. Szuplewska и др. изучали потенциал композитов MXene/PEG для применения в ФТТ против раковых клеток [141]. Подчеркивается селективность MXenes в отношении злокачественных

клеток, поскольку они локализуются на поверхности клеток. Их применимость в качестве фототермических агентов была оценена с помощью облучения ближнего инфракрасного лазера после 24-часового воздействия на клетки. Материал MXene/PEG успешно продемонстрировал свою пригодность в качестве фототермических агентов и селективный эффект в отношении злокачественных клеток во время лечения ФТТ [141].

В аналогичном исследовании Kyrylenko и др. $Ti_3C_2T_x$MXene обрабатывали клеточные линий для исследования фототермических эффектов облучения импульсным лазером ближнего инфракрасного диапазона в окне NIR-II (1064 нм) [142]. Они сравнивалась активность двух типов клеток с различными концентрациями MXene и продолжительностью абляции. Диапазон концентраций MXene, по-видимому, оказывает цитотоксическое действие за счет затемненного состояния клеток и снижения популяции клеток.

Du и др. изучали потенциальные антибактериальные, фототермические и остеоиндуктивные эффекты $Ti_3C_2T_x$MXene путем покрытия имплантатов из сульфированного углеродного волокна, армированного полиэфирэфиркетоном (ПЭЭК) [143]. $Ti_3C_2T_x$MXene был стабилизирован полидофомином (PDA). С помощью ЭДС было подтверждено, что слой находится на поверхности имплантируемого материала. Дальнейшие исследования подтвердили его положительный эффект, повышая гидрофильность и биосовместимость. За счет высокой степени связывания Ca^{2+} $Ti_3C_2T_x$MXene. Эффективность имплантируемого материала как фототермического агента также улучшилась благодаря PDA/ $Ti_3C_2T_x$MXene. Абляция ближнего инфракрасного лазера также улучшила антибактериальный эффект, достигнув 100% уровня стерилизации против *E. coli* и *S. aureus* при концентрации 0,0025 кг/м^3.

Другим фототераностическим биоматериалом, подходящим для ФТТ, является ГАП, особенно в его наноструктурированной форме. В исследовании Chang и соавторов [144], был обнаружен эффект наностержней ГАП. Композит ГАП/IR-780 показал высокую эффективность фототермического преобразования, около 69,3%. В частности, деградация IR-780 под действием непрерывного облучения ближнего ИК-лазера (длина волны 808 нм, плотность мощности 2 Вт/см^2) наблюдалось только после 10 циклов в присутствии ГАП, по сравнению с 4 циклами с использованием только чистого IR-780. Повышенная генерация АФК в клетках MCF-7 во время ближнего ИК-облучения, указывали на оксигенацию внутри опухоли, что в конечном итоге приводило к гибели таких клеток. Этот эффект был подтвержден в ходе экспериментов *in vivo* у мышей. Кроме того, была также тщательно изучена возможность применения ГАП в форме наночастиц для целенаправленного фототермического лечения рака. Для этого флуоресцентные в ближнем ИК-диапазоне наночастицы ГАП были функционализированы ближним ИК-флуорофором P800SO3, специфичным для костной ткани, и покрыты биосовместимым полиэтиленгликолем

(ГАП800-PEG [145]) или бычьим сывороточным альбумином для воздействия на опухоль. Примечательно, что предложенный процесс синтеза не содержал токсичных химических веществ. Этот композит на основе ГАП продемонстрировал наиболее сильное подавление прогрессирования опухоли, что подтверждает его потенциал в качестве эффективной терапевтической стратегии.

Несмотря на исключительную биосовместимость с биологическими системами и уникальные свойства, БЦ до сих пор не получила широкого распространения в фототермической терапии рака. Однако Hong и соавторы предложили новый биосовместимый и воспроизводимый препарат для ФТТ на основе БЦ. Это инъекционный нанокомпозит, сочетающий БЦ и наночастицы берлинской лазури (ІБЦ-РВ) [146]. Композит продемонстрировал мощный фототермический эффект, уничтожив более 82% раковых клеток и подавив рост опухолей на 71,5% за 18 дней. В отличие от традиционных наночастиц берлинской лазури, ІБЦ-РВ сохранял локализацию до семи дней после инъекции, что позволяло проводить повторные лазерные процедуры. Более того, композиты продемонстрировали в 34 раза более широкое окно безопасности и в 26,5 раз более высокий терапевтический индекс. Таким образом, включение бактериальной целлюлозы приводит к созданию более безопасного и эффективного агента ФТТ, демонстрируя его многообещающий потенциал для лечения рака.

Приведенная в обзоре информация позволяет заключить, что в настоящее время отсутствуют исследования трёхкомпонентного композита БЦ/ГАП/ MXene. Однако имеются успешные свидетельства эффективности отдельных и гибридных материалов на основе этих компонентов, а также экспериментальные данные, подтверждающие антисептическую эффективность их собственных свойств и стимулирования регенерации кожи и костной ткани. Существующие различные гибридные материалы подтверждают их совместимость, что подтверждает возможность успешной интеграции в единый многофункциональный композит. Стратегии получения композита БЦ/ГАП/MXene требуют тщательной оптимизация процесса. Гибридизация этих трехкомпонентов, может быть, в первую очередь обусловлена обильным количеством гидроксильных (–OH) групп на БЦ, образованием водородных связей и возможными электростатическими взаимодействиями с отрицательно заряженными поверхностями MXene и кальциевыми центрами в ГАП. Поверхностные функциональные группы MXene (–O, –OH) способны вступать во взаимодействие как с БЦ, так и с ГАП, тем самым повышая межфазную совместимость в составе композита.

Имеющиеся данные подтверждают потенциал таких композитов для биомедицинского применения. Однако данных клинических испытаний недостаточно, что упоминается большинством авторов, предлагающих свои биоматериалы [147]. Этот пробел в исследованиях особенно заметен в случае MXenes, по которым на данный момент отсутствуют данные о клинической оценке из-за общей новизны этого наноматериала [147]. Однако

наноматериалы постоянно демонстрируют подходящую биосовместимость, антибактериальную активность, улучшенные электрические и оптические свойства, а также другие качества, способствующие пролиферации и дифференциации клеток (включая композитные материалы) [148].

2 ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты и материалы исследования

1. Штамм *Komagataeibacter xylinus* С-3 – продуцент БЦ;
2. Гель-пленка БЦ;
3. Двумерный материал $Ti_3C_2T_x$Mxene;
4. Гидроксиапатит (ГАП);
4. Композитные материалы БЦ/MXene, БЦ/ГАП, БЦ/ГАП/Mxene;
5. 2 штамма тест-организмов (*Pseudomonas aeruginosa* FQRPA и *Staphylococcus aureus* MRSA), выделенных из ожоговых ран.

2.2 Методы исследований

2.2.1 Получение БЦ в поверхностных условиях культивирования

Продуцент бактериальной целлюлозы *Komagataeibacter xylinus* С-3 культивировали при статических условиях на среде Хестрина–Шрамма (HS) (2% глюкозы, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% пептона, 0,27% Na_2HPO_4 и 1,5% лимонной кислоты) [149] 3–7 дней при 29–30°С [48]. Полученные плёнки бактериальной целлюлозы предварительно промывали деионизированной водой для удаления остатков компонентов питательной среды, затем обрабатывали 5%-ным раствором $NaHCO_3$ в течение 3 суток, проводя процесс в четыре последовательных этапа с чередованием щелочной обработки и промывки деионизированной водой для удаления примесей, включая эндотоксины продуцента [150].

Предварительная обработка сырой мелассы

Мелассу разбавляли водой в количестве 1:10 и удаляли взвешенные вещества с помощью центрифугирования при 6000 об/мин в течение 20 мин; выдерживали в течение 24 ч в 1N растворе H_2SO_4, снова центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин; и обрабатывали 1% раствором $Ca_3(PO_4)_2$ [151].

Питательные среды на основе промышленных отходов для выращивания штамма-продуцента бактериальной целлюлозы:

ПС-1 (г/л): молочная сыворотка – 20, гидрофосфат натрия – 2,7, пептон – 5, дрожжевой экстракт – 5, лимонная кислота – 1,15, этанол – 10;

ПС-2 (г/л): меласса – 20, гидрофосфат натрия – 2,7, пептон – 5, дрожжевой экстракт – 5, лимонная кислота – 1,15, этанол – 10;

ПС-3 (г/л): гидролизаты отходов переработки злаковых культур – 20, гидрофосфат натрия – 2,7, пептон – 5, дрожжевой экстракт – 5, лимонная кислота – 1,15, этанол – 10;

ПС-4 (г/л): глицерин – 20, пептон – 5, дрожжевой экстракт – 5, лимонная кислота – 1,15, этанол – 10.

Промышленные отходы служили источником углерода и азота в среде. В качестве восполнителя дефицита азота в среду вносили пептон, в качестве источника витаминов – дрожжевой экстракт.

Среды доводили до pH 6,5-7,0 ледяной уксусной кислотой и 6H NaOH.

Стерилизацию проводили автоклавиронием при 110 °C в течение 20 мин.

2.2.2 Синтез $Ti_3C_2T_x$Mxene

MXene ($Ti_3C_2T_x$) получали из предшественника MAX-фазы (Ti_3AlC_2, Carbon-Ukraine Ltd.) методом селективного травления алюминия [152]. Для этого 1 г Ti_3AlC_2 постепенно добавляли в 20 мл 32% раствора HCl, содержащего 1,6 г LiF, и инкубировали при 42°C в течение 48 ч с постоянным перемешиванием. Полученный продукт центрифугировали при 3500 об/мин и многократно промывали деионизированной водой до pH 5,0–5,5. Расслоение хлопьев Ti_3C_2Tx проводили ультразвуковой обработкой (5 мин, 900 Вт). Суспензию центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин для отделения расслоенных нанолистов от остаточного осадка [153]. Концентрацию Ti_3C_2Tx в коллоидном растворе определяли методом вакуумной фильтрации через мембрану PVdF (0,45 мкм) с последующей сушкой при 110°C в течение 12 ч. Концентрация составила 11,5 мг/мл.

2.2.3 Получение наночастиц ГАП

ГАП был получен из яичной скорлупы: 4 г яичной скорлупы отжигали при температуре 950 °C в течение 2-ух часов с образованием оксида кальция (CaO). Затем 2 г CaO смешивали с 40 мл 6% раствора H_3PO_4 при постоянном перемешивании в течение 1 ч. Смесь подвергали ультразвуковой обработке (32 кГц, 1 ч) в ледяной бане до полной гомогенизации [154].

2.2.4 Создание композита ГАП/Mxene

30.6 мг ГАП медленно добавляли в 4 мл (11.5 мг/мл) свежеприготовленного коллоидного раствора $Ti_3C_2T_x$Mxene. Смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение 2 ч, после чего центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин. Полученный осадок сушили при 100°C в вакууме в течение 12 ч [18, 153].

2.2.5 Получение композита БЦ/ГАП методом *in situ*

Инокулят *K. xylinus C-3* вносили в 100 мл среды ПС-2, в которую добавляли 3% ГАП. Систему инкубировали в статических условиях при 30°C в течение 5 и 7 суток. Далее пленки обрабатывали 5%-ным раствором $NaHCO_3$ в течение трёх суток в четыре последовательных цикла с чередованием стадий щелочной обработки и водной промывки. Массу пленок после высушивания определяли гравиметрически.

2.2.6 Получение композитов БЦ/Mxene и БЦ/ГАП методом *ex situ*

Для получения композитов использовали пленки БЦ одинаковой массы и толщины. Соотношение компонентов рассчитывали исходя из массы БЦ (сухой вес). Пленки БЦ погружали в свежеприготовленный коллоидный раствор $Ti_3C_2T_x$Mxene (2 мас.%), водный раствор ГАП (3 мас.%) и инкубировали при 37°C в течение 6 ч на орбитальном шейкере (140 об/мин).

Количество материалов, импрегнированных в бактериальную целлюлозу (БЦ), определяли гравиметрическим методом. Оставшийся после инкубации с БЦ мембранами раствор фильтровали методом вакуумной фильтрации. Массу осадка на фильтре измеряли после сушки при 110°C в течение 12 ч. Количество внедренных компонентов рассчитывали как разницу между начальной массой материала в растворе и массой осадка на фильтре.

2.2.7 Сборка композита БЦ/ГАП/Mxene

- вариант комбинации in situ-ex situ

Композит БЦ/ГАП, полученный вышеописанным способом (*in situ*), погружали в свежеприготовленный коллоидный раствор $Ti_3C_2T_x$Mxene (2 мас.%), инкубировали при 37°C в течение 6 ч на орбитальном шейкере (140 об/мин). Количество материалов, включенных в структуру БЦ, определяли гравиметрическим методом.

- *вариант, основанный на интеграции предварительно сформированного комплекса ГАП/MXene в БЦ*

Чистые пленки БЦ погружали в 5% суспензию ГАП/MXene. Систему выдерживали при 37°C в течение 6 ч на орбитальном шейкере (140 об/мин). Количество материала, зафиксированного в структуре БЦ, определяли гравиметрическим способом путём сравнения масс до и после модификации.

2.2.8 Определение структурных и химических свойств БЦ и композитов

2.2.8.1 Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Морфологию поверхности композитов исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа с полевой эмиссией (FE-SEM, JEOL JSM-7800F). Перед анализом образцы покрывали золотом толщиной ≈ 10 нм методом напыления. Элементный состав и пространственное распределение анализировали методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) с использованием кремниевого дрейфового детектора X-Max 50 мм². Для обеспечения репрезентативности данных количественная оценка элементов проводилась путем усреднения результатов, полученных из пяти отдельных областей образца, что позволило достоверно оценить однородность и интеграцию ГАП в матрице БЦ и MXene.

2.2.8.2 Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Микроструктуру композитов на основе ВС исследовали с помощью современной просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на микроскопе JEOL JEM-ARM200CF при напряжении 200 кВ. Электронно-прозрачный образец был подготовлен методом фрезерования с фокусированным ионным пучком (ФИП) на системе Zeiss Auriga 60 FIB-SEM с окончательной полировкой при напряжении 5 кВ и силе тока 240 пА для минимизации повреждения поверхности.

2.2.8.3 Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДС)

Распределение элементов анализировали методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии с использованием детектора JEOL JED-2300T CENTURIO SDD с большим телесным углом (до 0,98 ср) и активной площадью 100 мм², что позволило проводить высокочувствительное картирование Ti, C, O и F.

2.2.8.4 Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

ИК-спектры композитов измеряли с помощью спектрофотометра Bruker Alpha II FTIR. Образцы первоначально подвергали сушке и превращали в порошок. Затем порошок смешивали со спектрально чистым KBr и смесь прессовали. Перед использованием прессформу протирали этиловым спиртом, используя безворсовые салфетки. Порошок, помещенный в прессформу, непосредственно перед прессованием разравнивали с помощью шпателя для обеспечения равномерности распределения вещества в объеме прессформы во время прессования.

Сканирование выполнялось на персональном компьютере, который дополнительно генерирует ИК-спектр. Спектры были получены с разрешением 2 $см^{-1}$ и 50 сканов в диапазоне 4000-400 $см^{-1}$. Детектор отслеживает диапазон длин волн и передает сигнал на компьютер, который преобразует сигнал в спектр поглощения. Полученные спектры интерпретировали.

2.2.8.5 Рентгеноструктурный анализ (XRD)

Рентгеноструктурный анализ выполняли на дифрактометре PANalytical Empyrean (Malvern Panalytical, Нидерланды) с CuKα-излучением (λ = 1,5406 Å). Образцы высушивали и аккуратно фиксировали на держателе для получения ровной поверхности. Сканирование проводили в интервале 2θ = 5–80°, шаг 0,02°. Обработку данных осуществляли с помощью HighScore Plus (ICDD PDF-4+).

2.2.8.6 Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (XPS)

Анализ методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) композита БЦ/ГАП/MXene проводился с использованием полусферического анализатора энергии электронов PREVAC EA15, оснащенного двумерным многоканальным пластинчатым детектором и источником рентгеновского излучения Al Kα (1486,6 эВ, двуханодный PREVAC XR-40B), в условиях сверхвысокого вакуума $1{,}2 \times 10^{-9}$ Па. Обзорные спектры были получены при энергии пропускания 200 эВ и шаге 0,9 эВ, а спектры высокого разрешения — при энергии пропускания 100 эВ и шаге 0,05 эВ для повышения детализации спектра. Калибровка энергии связи проводилась по примесному углероду. Спектральная деконволюция проводилась с использованием программного обеспечения CASA XPS®, используя смешанную форму линии Гаусса (70%)/Лоренца (30%) для

подгонки пиков и поправку на фон Ширли для точного определения химических состояний внутри композита.

2.2.9 Определение физических свойств композитов

Определение механических свойств

Механические характеристики биокомпозитов определяли методом одноосного растяжения. Испытания проводили на универсальной испытательной машине Instron 3345 (Instron, США) при скорости деформации 5 мм/мин согласно стандарту ISO 527-1:2019. Перед испытанием образцы (10 × 50 мм, толщина ≈ 1 мм) кондиционировали при 23 ± 2 °C и относительной влажности 50 ± 5 % в течение 48 ч. По полученным диаграммам «напряжение–деформация» рассчитывали:

- модуль Юнга (E, МПа) — как наклон линейного участка кривой;
- прочность на растяжение (σ_u, МПа) — как максимальное напряжение перед разрывом.

Каждое измерение проводили в трёх повторностях. Средние значения и стандартные отклонения рассчитывали с использованием программного обеспечения OriginPro 2023b.

Определение гидрофильности композитов

Гидрофильность определяли по статическому углу контакта при температуре 25 °C. Измерения проводили на гониометре Contact Angle Goniometer (Ossila) методом падающей капли. На поверхность образцов наносили каплю дистиллированной воды объёмом 200 мкл и фиксировали угол контакта программным обеспечением прибора. Для каждого образца выполняли три измерения. Материал считался гидрофильным при значении угла контакта < 90°; значения < 30° соответствовали высокой гидрофильности, 30–70° — умеренной, а 70–90° — слабой гидрофильности.

Изучение водопоглощающей способности пленок

Образцы разрезали на кусочки размером 2 × 2 см, сушили до постоянного веса. Высушенные мембраны погружали в воду (или раневой экссудат) и выдерживали при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени (30-45 минут) излишки воды на поверхности целлюлозной мембраны удаляли с помощью фильтровальной бумаги и измеряли вес образца после проведенного эксперимента. Водопоглощающую способность пленок определяли гравиметрическим методом по разности веса образцов сухой и влажной пленки. Взвешивание производили на аналитических весах с точностью до 0,0001 г.

Определение пористости

Пористость (%) определяли гравиметрическим методом с использованием этанола в качестве несмачивающего агента.

Образцы предварительно подвергали лиофильной сушке для сохранения их пористой структуры и затем высушивали до постоянной массы (m_1). После этого образцы погружали в этанол на 24 ч и вновь взвешивали (m_2). Пористость (P, %) рассчитывали по формуле:

$P = m2 - m1 / \rho\ этанола \cdot V \times 100$

где V — объём образца, ρ — плотность этанола.

Электропроводность

Электропроводность (σ, S/cm) измеряли методом четырёхзондового контакта с использованием установки Keithley 2400 SourceMeter. Образцы вырезали в виде квадратов 10 × 10 мм и измеряли при 25 °C и влажности 50 %. Для калибровки применялись стандартные серебряные пасты для обеспечения надёжного контакта. Электропроводность рассчитывали по формуле:

$\sigma = I/V \cdot l/A$

где I — ток, V — падение напряжения, l — расстояние между зондами, A — площадь поперечного сечения образца.

Фототермическая активность

Фототермическую эффективность исследовали с использованием ИК-лазера 808 нм (интенсивность 1 Вт/см²). Повышение температуры поверхности измеряли инфракрасной камерой FLIR E6 (FLIR Systems, США) в режиме непрерывного облучения в течение 10 минут. Температурный отклик (ΔT) определяли как разницу между максимальной и исходной температурами поверхности. Параллельно регистрировали тепловые карты для визуализации распределения нагрева.

2.2.10 Методы стерилизации композитного материала

Перед стерилизацией образцы биокомпозита (плёнки толщиной ≈ 1 мм) были кондиционированы при 20 °C и влажности 50 % в течение 48 часов для выравнивания исходного влагосодержания и стабилизации структуры материала [155]. Далее использовали 6 методов стерилизации, описанных ниже:

Автоклавирование. Образцы помещали в герметичные пакеты из пергаментной бумаги и обрабатывали в автоклаве при 121 °C и давлении 1 атм в течение 20 минут в соответствии со стандартом ISO 17665:2024 [156]. После завершения цикла они высушивались при комнатной температуре до удаления конденсата.

Стерилизация этиленоксидом (EtO). Образцы помещались в герметичную камеру стерилизатора Steri-VAC 3M. Газ подавался при концентрации 450 мг/л, температуре 37 °C и влажности 60 % в течение 4 часов, затем проводилась аэрация при 40 °C в течение 12 часов для удаления остаточного EtO, согласно ISO 11135:2024 [157].

Стерилизация ультрафиолетовым (УФ) излучением. Образцы размещали в камере с бактерицидной лампой (254 нм, TUV G15T8, Philips) на расстоянии 20 см в течение 30 мин с каждой стороны при 25 °C [158].

Стерилизация озоном. Обработка выполнялась в озонаторе (генерация O_3 ≈ 10 г/ч) при 20 °C и относительной влажности 60 % в течение 30 мин. После экспозиции образцы аэрировались при комнатной температуре в течение 1 ч для удаления остаточного озона [159].

Стерилизация сверхкритическим CO_2 ($ScCO_2$). Процесс проводился в реакторе под давлением 38 МПа при 30 °C в течение 60 мин с использованием ко-растворителя этанола (5 об.%). После обработки камера медленно декомпрессировалась до атмосферного давления [160].

Стерилизация холодной плазмой. Стерилизация выполнялась в установке PICO Plasma System (Германия) при смеси O_2/Ar (1:1), давлении 0,2 мбар, мощности 50 Вт и экспозиции 15 мин при комнатной температуре [161].

Оценка эффективности стерилизации

Для оценки стерильности обработанных образцов использовали метод прямого высева на питательные среды. После стерилизации каждый образец (1×1 см) асептически переносили в чашку Петри с питательным агаром. Инкубацию проводили при 37 °C в течение 48 ч.

Наличие роста колоний фиксировали визуально. Отсутствие видимого роста колоний на поверхности агара свидетельствовало о полной стерильности образца. Для контроля использовали необработанные образцы и пустые чашки (отрицательный контроль).

Эффективность выражали как:

Эффективность стерилизации (%) = $(1-N_{опыт}/N_{контроль})\times 100$

где $N_{опыт}$ — количество колоний после обработки,

$N_{контроль}$ — на контрольных образцах.

2.2.11 Оценка биологической активности композитных материалов

2.2.11.1 Определение антибактериальной активности гибридов

Бактериологическое исследование ожоговых ран

Образцы отделяемого из ожоговых ран транспортировали в транспортной среде Кэри-Блэр (Copan, Италия) с соблюдением температурного режима (2–8°C). Срок доставки в лабораторию не превышал 7 часов при максимально допустимом интервале в 24 часа от момента забора материала. В рамках исследования оценивали: а) степень микробной контаминации (КОЕ/г ткани) с использованием количественного посева на кровяной агар (HiMedia, Индия) и агар МакКонки (BioRad, США); б) наличие полимикробных ассоциаций путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму, и анализа морфологии колоний. Идентификацию видов микроорганизмов и определение их антибиотикочувствительности проводили на автоматизированной системе VITEK® 2 Compact (bioMerieux, Франция).

Определение антибактериальной активности материалов методом Time-kill тест

Этот тест детально описан в документе CLSI M26 [162] . БЦ пленки и композиты на ее основе, каждая весом по 1 грамму, помещали в пробирки с жидкой питательной средой, инокулированной микроорганизмами-мишенями с концентрацией клеток 5 x 10^5 КОЕ/мл, а затем инкубировали в шейкере при 37°C в течение 24 часов. Контролем служила среда с тест-

штаммами без образцов. Через 0, 1, 6, 10 и 24 ч отбирали пробы (100 мкл), высевали на агар и после 48 ч инкубации подсчитывали КОЕ/мл. Антимикробную активность оценивали по формуле: R (%) = (A - B) / A × 100, где R - процент числа бактерий, A - количество бактерий в контрольной группе (без добавления целлюлозных материалов), а B - количество бактерий, выросших в пробирках с композитами.

Образование АФК

Уровень АФК, генерируемых исследуемыми материалами, определяли с использованием флуоресцентного зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA). Данный реагент после деацетилирования и окисления превращается во флуоресцентный продукт (DCF), что позволяет количественно оценивать интенсивность АФК. Бактериальные клетки стандартизировали до концентрации 10^5 КОЕ/мл и инкубировали с исследуемыми образцами при 37 °C в течение 0, 1, 6, 10 и 24 часов. После каждого временного промежутка суспензии центрифугировали при 4 °C (600 об/мин, 15 мин), затем полученный супернатант переносили в стерильные пробирки. К нему добавляли раствор DCFH-DA до конечной концентрации 100 мкМ и инкубировали в темноте при комнатной температуре 1 час. После чего регистрировали интенсивность флуоресценции (λ_ex = 485 нм, λ_em = 530 нм). Количество образовавшихся АФК оценивали по увеличению флуоресцентного сигнала относительно контрольных образцов.

2.2.11.2 Изучение антибиопленочной активности

Антибиопленочную активность БЦ, БЦ/ГАП, БЦ/MXene и БЦ/ГАП/ MXene в отношении метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) и фторхинолон-резистентного *Pseudomonas aeruginosa* (FQRPA) оценивали по методу Saeizing et al. с модификациям.

Исследуемые материалы помещали в лунки 24-луночного планшета (Costar) и инкубировали с 2 мл бактериальной суспензии (10^5 КОЕ/мл) в триптиказо-соевом бульоне (TSB, HiMedia), содержащем 2% глюкозы. ВС использовали в качестве положительного контроля. Инкубацию проводили при 37°C в течение 24 ч в статических условиях. После удаления супернатанта материалы трижды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS).

Адгезированные на поверхности материала клетки окрашивали 0.1% раствором кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich). После удаления красителя материалы промывали дистиллированной водой и сушили при 30°C. Связанный с биопленкой краситель экстрагировали 95% этанолом. Оптическую плотность (ОП) измеряли при 570 нм на микропланшетном спектрофотометре BioTek Synergy H1.

Уровень образования биопленки оценивали по критериям: отрицательный: ОП < 0.1, слабо положительный: 0.1 ≤ ОП < 1, положительный: ОП ≥ 1.

Изучение антибиопленочной активности на модели LCWB

В данной работе антибиопленочная активность материалов оценивалась с использованием модифицированной модели LCWB (Lubbock chronic wound biofilm), разработанной Sun et al. [163]. Экспериментальный план представлен на Рис. 4. Двухвидовую биопленку формировали путем смешивания 10 мкл суспензий *Staphylococcus aureus* (MRSA, метициллин-резистентный штамм) и *Pseudomonas aeruginosa* (FQRPA, устойчивый к фторхинолонам) с концентрацией 10^6 КОЕ/мл. Смесь инокулировали в полистироловые пробирки, содержащие бульон Брукелла (BB), дополненный 0,1% бактериологического агара, 50% свиной плазмы, 5% эритроцитов и 2% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Для формирования биопленки на поверхности стерильные наконечники пипеток оставляли в среде, где они служили субстратом для адгезии и роста микроорганизмов. Инкубацию проводили в орбитальном шейкере при 37°C в течение 48 ч. После инкубации зрелую биопленку собирали с наконечников, промывали стерильным фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7.4) и переносили на искусственное «раневое ложе», состоящее из двухслойной агаризованной среды (бульон Болтона с 1,5% агара и 1% желатина) [164].

Для оценки антибиопленочного действия материалов BC, Mxene, HA и HA/Mxene их вводили в среду на этапе созревания биопленки. Пробирки инкубировали в течение 48 ч при 37 °C. После инкубации биопленку подвергали механической дезинтеграции: встряхивание (1 мин, 200 об/мин), ультразвуковая обработка (3 мин, 40 кГц, мощность 100 Вт) и повторное встряхивание (1 мин). Серийные разведения суспензии высевали на селективные среды: Mannitol Salt Agar (MSA) для *S. Aureus* и Cetrimide Agar (CET) для *P. aeruginosa*. Чашки инкубировали 24 ч при 37°C. Антибиопленочную активность выражали как процент снижения числа КОЕ/мг биопленки относительно контроля.

Для анализа влияния композитов (БЦ, БЦ/Mxene, БЦ/ГАП, БЦ/ГАП/Mxene) на зрелую биопленку использовали методологию Kučerová et al. [165]. Раневое ложе с биопленкой покрывали материалами и инкубировали 48 ч при 37°C. После обработки биопленку дезинтегрировали, как описано выше. Серийные разведения (10^1–10^6) высевали на MSA и CET с последующим подсчетом колоний.

2.2.11.3 Анализ биосовместимости и цитотоксичности материалов в условиях *in vitro*

Цитотоксичность материалов исследовалась на культуре клеток мышиных фибробластов NIH-3T3, полученных из лаборатории биомедицинской инженерии Аахенского Университета прикладных наук (Германия). Клетки культивировали в модифицированной среде DMEM (Gibco), обогащенной 10% эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (FBS, HyClone), 1% L-глутамином (PanEco), 2 мг/л гидролизата лактальбумина (Sigma-Aldrich) и антибиотиками (100 ЕД/мл пенициллина,

100 мкг/мл стрептомицина). Инкубацию проводили при 37°C в атмосфере 5% CO_2. Среду заменяли каждые 4 дня. Клетки выращивали до 75–85% конфлюэнтности, после чего диссоциировали 0,25% раствором трипсина-ЭДТА (PanEco) и ресуспендировали в концентрации 10^4 клеток/мл.

Биосовместимость материалов анализировали по следующим параметрам: жизнеспособность, адгезия, морфология и пролиферация клеток в соответствии с ISO 10993-5:2023 [166].

Жизнеспособность клеток определяли через 72 и 120 ч инкубации с материалом. Клетки окрашивали 0,4% раствором трипанового синего (Sigma-Aldrich) в соотношении 1:1. Живые (неокрашенные) клетки подсчитывали на автоматическом счетчике Bio-Rad TC20.

Для определения метаболической активности клеток использовался метод MTT. Клетки высевали в 96-луночные планшеты (5×10^4 клеток/лунку) и инкубировали 24 ч. Образцы материала (площадь 1 см²) помещали в лунки и инкубировали 24, 48 и 72 ч. После удаления материала добавляли 100 мкл раствора MTT (0,5 мг/мл в среде) и инкубировали 2 ч. Формазан растворяли в 100 мкл лизирующего буфера (10% SDS, 40% DMSO, 50% изопропанола). Оптическую плотность измеряли при 570 нм на микропланшетном спектрофотометре BioTek PowerWave 340.

Адгезивные свойства, морфология и пролиферация клеток фибробластов, инкубированных с материалами, оценивали с помощью инвертированного микроскопа Zeiss AxioVert 25. Флуоресцентные изображения получали 3-й и на 5-й день культивирования. Образцы предварительно фиксировали 4% раствором формальдегида, затем окрашивали флуоресцентным красителем DHR-123, который обеспечивает зеленую флуоресценцию в метаболически активных клетках. Для окрашивания актиновых филаментов цитоскелета клеток NIH-3T3 (зеленый цвет) использовали краситель Alexa Fluor® 488 фаллоидин (1:20, Invitrogen, США). Возбуждение флуорофоров, меченных фаллоидином Alexa Fluor® 488, проводили при длине волны 488 нм с использованием полосового фильтра 505-530 нм.

Определение антиоксидантной (радикал-подавляющей) активности композита БЦ/ГАП/MXene

Подготовка образцов

Композитные плёнки БЦ/ГАП/MXene измельчали до фрагментов (~2×2 мм) и экстрагировали в 50% этаноле (масс-объёмно: 0,10 г на 10 мл) при 25 °C в темноте на качалке в течение 24 ч. Полученную суспензию центрифугировали (8000 g, 10 мин), супернатант собирали и использовали как «экстракт». Перед анализом готовили серию разведений. В качестве положительного контроля использовали Trolox (сток 1 мМ в этаноле). Отрицательным контролем служил соответствующий растворитель/буфер.

Поскольку MXene и ГАП вносили вклад в собственное поглощение/рассеяние, для всех измерений дополнительно регистрировали

«бланк образца» (реакционная смесь без радикала/реагента) и проводили поправку сигнала вычитанием.

Тест DPPH

Раствор радикала DPPH (0,10 мМ) готовили в метаноле в день анализа и доводили до исходной оптической плотности $A_0 \approx 0{,}70–0{,}90$ при 517 нм. В 96-луночных планшетах в каждую лунку вносили 100 мкл раствора DPPH и 100 мкл образца либо стандарта Trolox. Смеси инкубировали 30 мин при 25 °C в темноте и регистрировали A_{517} на спектрофотометре.

Для учёта собственного поглощения образца параллельно готовили: (а) «радикал-бланк» (DPPH + растворитель) и (б) «бланк образца» (образец + метанол без DPPH). Исправленную оптическую плотность образца рассчитывали как $A_s^{corr} = A_s - A_{blank\ sample}$. Исправленную плотность контроля принимали равной $A_0^{corr} = A_{radical\ blank}$. Процент подавления радикала вычисляли по формуле:

$$\%\ \text{ингибирования} = (1 - A_s^{corr}/A_0^{corr}) \times 100\%.$$

Для каждого образца строили зависимость «% ингибирования – концентрация». Значение IC_{50} определяли на основании точки 50 % ингибирования методом линейной интерполяции между ближайшими экспериментальными концентрациями. Все измерения проводили минимум в трёх независимых повторах ($n \geq 3$) и представляли как среднее ± SD.

2.2.12 Статистический анализ

Если не указано иное, все экспериментальные группы анализировали в трех повторностях. Экспериментальные измерения представлены как среднее значение и стандартное отклонение (среднее ± SD). Разницу между группами анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Тьюки. Весь статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения SPSS (версия 28.0, IBM Corp., Армонк, Нью-Йорк, США). Значение $p<0{,}05$ считалось статистически значимым.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Получение комплексного наноматериала БЦ/ГАП/MXene

Композитные материалы устраняют ограничения, наблюдаемые в системах на основе одного ингридиента. Интеграция двух или более компонентов позволяет создать материал с превосходными свойствами, такими как механическая прочность, контролируемая биоразлагаемость и антимикробная активность, что ещё больше расширяет область его применения. Преимущество композитных материалов заключается в их пластичности, что позволяет адаптировать их под конкретные потребности, например, для создания биоактивных антисептических покрытий инфицированных ран. Предполагается, что композит будет демонстрировать функциональные возможности каждого компонента, способствуя тем самым не только уничтожению микробов, но и регенерации тканей.

Бактериальная целлюлоза – уникальный тип наноцеллюлозы, находящий применение в разных отраслях. В том числе и в медицине. Однако материалы медицинского нахзначения из чистой БЦ имеют ряд ограничений, о которых упоминалось ранее. Типичный способ их устранения - интеграция дополнительных компонентов в матрицу БЦ, что позволяет создавать гибридные материалы с расширенным спектром свойств. Мы предлагаем новый композит на основе БЦ с добавлением MXene и ГАП. Отдельные составляющие такого композитного материала проявляют различные биомедицинские свойства (например, антибактериальные, регенеративные), которые обсуждались в обзоре литературы. Более того, ожидается синергетическое взаимодействие между компонентами в составе композита. Некоторые ранее изученные комбинации, обобщенные в таблице 1, обосновывают эту возможность.

В связи с этим мы намерены разработать новый композитный наноматериал, объединяющий структурные и функциональные качества каждого ингридиента. Пористая матрица на основе биополимера БЦ будет одновременно служить структурной основой композита и поддерживать биологическую активность, имитируя внеклеточное пространство. Структура будет усилена добавлением MXene, что обеспечит не только антибактериальную, но и расширит спектр возможных терапевтических мер. ГАП в этом композитном материале служит источником ионов кальция (Ca^{2+}), который модулирует иммунную систему, меняет уровень экспрессии про- и противоспалительных цитокинов, стимулирует пролиферацию эпидермальных клеток.

Биоактивность материала матрицы имеет решающее значение для изучения его влияния на молекулярные взаимодействия и клеточные процессы в целом. Высокая плотность гидроксильных групп (-OH) в БЦ способствует установлению электростатических взаимодействий между ее волокнами, аддитивными ионами или частицами [167]. Пористая природа БЦ также играет роль в захвате армирующих компонентов, таких как MXenes, и

облегчает диффузию ионов [168]. Кроме того, большая площадь поверхности MXenes и наличие различных функциональных групп на их поверхности также способствуют ионным взаимодействиям. Включение ГАП позволяет ионам кальция (Ca^{2+}) высвобождаться в окружающую ткань, действуя как вторичные посредники в различных внутриклеточных сигнальных путях, важных для регенерации тканей [169].

На момент проведения нашего исследования в литературе не было обнаружено композитов MXene/ГАП на основе БЦ. В связи с этим одна из главных задач проводимого исследования состояла в подборе наиболее адекватного способа получения такого композита, разработке которого посвящен данный раздел.

3.1.1 Синтез БЦ - несущей матрицы гибридного материала

3.1.1.1 Модификация состава классической питательной среды Гестри и Шрамма (HS) для повышения целлюлозосинтетической активности штамма *Komagataeibacter xylinus* C-3

Продуктивность бактериального синтеза в значительной степени определяется как составом питательной среды, так и условиями культивирования. Это особенно важно для бактерий, способных продуцировать бактериальную целлюлозу (БЦ), поскольку скорость роста клеточной биомассы напрямую связана с интенсивностью биосинтеза полимера. Среди множества факторов, регулирующих выход и качество БЦ, решающую роль играет источник углерода.

Большинство целлюлозосинтезирующих бактерий используют глюкозу в качестве основного субстрата, что обусловлено её прямым включением в метаболический путь образования целлюлозы. Именно поэтому стандартная среда Хестрина-Шрамма (HS) содержит глюкозу в качестве базового компонента. Однако в ряде исследований сообщалось о возможности замены глюкозы другими углеродными источниками, такими как сахароза, фруктоза, галактоза, маннит и глицерин [170].

Сравнительный анализ показал, что наиболее высокий выход БЦ достигается при использовании сахарозы, далее по эффективности следуют глицерин, маннит, глюкоза и фруктоза. Галактоза же продемонстрировала наименьшую пригодность для синтеза целлюлозы. Исследователи объясняют эти различия скорее всего связаны с тем, что большинство бактерий способны преобразовывать различные сахара в глюкозу, которая затем служит непосредственным предшественником в биосинтезе целлюлозы [171]. Таким образом, эффективность источника углерода определяется скоростью и энергетической выгодностью его конверсии в глюкозу.

При использовании маннита, фруктозы и глюкозы наблюдается устойчивая скорость синтеза целлюлозы, что связано с эффективным транспортом этих соединений через клеточную мембрану (маннит предварительно окисляется до фруктозы). Напротив, галактоза проникает в

клетку слабо, что приводит к низкой скорости её утилизации и, следовательно, к снижению выхода целлюлозы.

Несмотря на широкое применение глюкозы в качестве основного субстрата для синтеза БЦ, её использование имеет и негативные стороны. При активном метаболизме глюкозы возможна побочная реакция с образованием глюконовой кислоты, что приводит к снижению pH среды и, как следствие, к ингибированию биосинтетической активности бактерий [171]. Поэтому концентрация глюкозы в среде является критическим параметром, требующим оптимизации.

В связи с этим было исследовано влияние различных концентраций глюкозы (от 0,5 до 3,5%) в среде HS на продуктивность штамма *Komagataeibacter xylinus* C-3 (Рисунок 2).

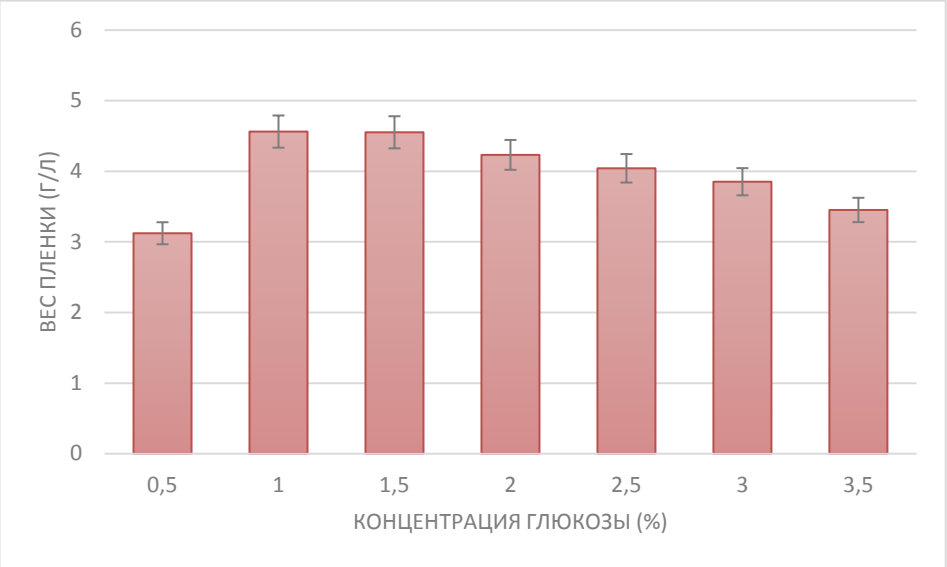


Рисунок 2 – Влияние концентрации глюкозы на продуктивность штамма *Komagataeibacter xylinus* C-3

В результате оказалось, что повышение концентрации глюкозы выше 1% приводит к снижению выхода БЦ, что, вероятно, связано с усиленным образованием глюконовой кислоты и сдвигом метаболизма от синтеза полимера к побочным продуктам. Подобную зависимость ранее отмечали и другие исследователи [172]. Наиболее высокий выход БЦ наблюдался при 1% глюкозы, а минимальный - при 3% и 3,5%.

Таким образом, можно предположить, что оптимальная концентрация глюкозы обеспечивает баланс между доступностью субстрата и метаболической нагрузкой на клетку. При её избытке бактерии, вероятно, активируют альтернативные пути окисления углеводов, уменьшая эффективность полимеризации целлюлозы.

Производительность биосинтеза бактериальной целлюлозы (БЦ) во многом определяется не только составом базовой питательной среды, но и наличием дополнительных источников органических соединений, способных

активировать метаболизм продуцента. Например, использование органических добавок, таких как дрожжевой экстракт, меласса, кокосовое молоко и пивное сусло, способствует интенсификации синтеза БЦ за счёт улучшения энергетического обмена и снабжения клеток дополнительными факторами роста [173].

Учитывая, что в Алматы функционирует ряд пивоваренных предприятий, в качестве местного и экономически выгодного субстрата было решено попробовать применить пивное сусло. Для оценки его влияния были выбраны три концентрации (0,1–0,2%) с шагом 0,05%.

Еще один дополнительный элемент – этанол. Известно, что этанол способен выступать не только в роли дополнительного источника углерода, но и как регулятор редокс-потенциала среды. При его присутствии формируется восстановительная форма NADH, способствующая активации ферментов целлюлозосинтетического комплекса. Кроме того, добавление этанола может снижать частоту спонтанных Cel-мутаций и тем самым поддерживать стабильность высокопродуктивных клонов [174].

С этой целью этанол был включён в состав среды в концентрациях 0,5–1,0% с шагом 0,25%. Комбинация пивного сусла и этанола в различных соотношениях была протестирована по плану полного факторного эксперимента. Для инокуляции использовали 3 мл трёхсуточной культуры *Komagataeibacter xylinus* С-3. После пяти суток статического культивирования в колбах был оценен выход БЦ (Рисунок 3).

С этой целью этанол был включён в состав среды в концентрациях 0,5–1,0% с шагом 0,25%. Комбинация пивного сусла и этанола в различных соотношениях была протестирована по плану полного факторного эксперимента. Для инокуляции использовали 3 мл трёхсуточной культуры *Komagataeibacter xylinus* С-3. После пяти суток статического культивирования в колбах был оценен выход БЦ.

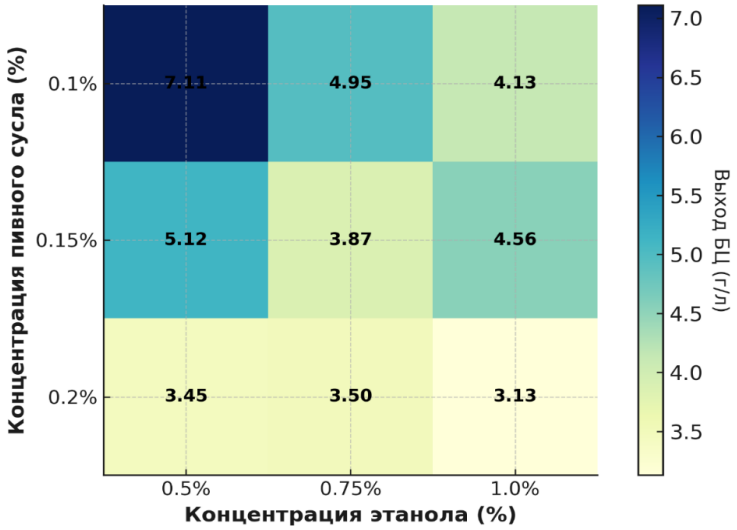


Рисунок 3 – Продуктивность синтеза БЦ (г/л) штаммом С-3 на среде HS с добавлением пивного сусла и этанола

Максимальный выход БЦ (7,11 г/л) зафиксирован при сочетании 0,1% пивного сусла и 0,5% этанола. Это указывает на синергетический эффект между углеродными и редокс-активными компонентами, что может быть связано с оптимизацией метаболического потока по направлению к целлюлозному биосинтезу.

Предположительно, при более высоких концентрациях этанола активируется стрессовый ответ бактерий, сопровождающийся торможением роста и изменением активности фермента целлюлозосинтазы. В то же время, избыток пивного сусла может повышать осмотическое давление среды, что также снижает продуктивность.

Таким образом, можно заключить, что умеренные дозы пивного сусла (0,1%) и этанола (0,5%) создают благоприятные условия для биосинтеза БЦ**,** обеспечивая баланс между энергетическим обменом и стабильностью ферментативной активности клеток.

Для количественной оценки эффективности биосинтетического процесса и сравнения производительности различных питательных сред был рассчитан экономический коэффициент, отражающий степень использования углеродного субстрата для формирования целевого продукта — бактериальной целлюлозы (БЦ). Этот показатель демонстрирует, насколько эффективно энергия, заключённая в углеводном источнике (глюкозе), конвертируется в биомассу и полисахаридный продукт (Таблица 2, Рисунок 4).

Таблица 2 – Расчет параметров эффективности биотехнологического производства бактериальной целлюлозы

Питательная среда	Сухой вес клеток, г/л (X)	Сухой вес пленки, г/л (P)	Утилизированная глюкоза, г/л (S)	P/X, %	P/S, %	Экономический коэф., X/S, %
Классическая HS среда	1,47±0,11[a]	4,56±0,03[a]	14±1,01[a]	310,2	32,6	10,50
Модифицированная HS среда	2,94±0,08[b]	7,11±0,02[b]	18±0,07[b]	241,8	39,5	16,33
Примечание: буквенные обозначения показывают статистически значимые различия ($p<0,05$) между группами						

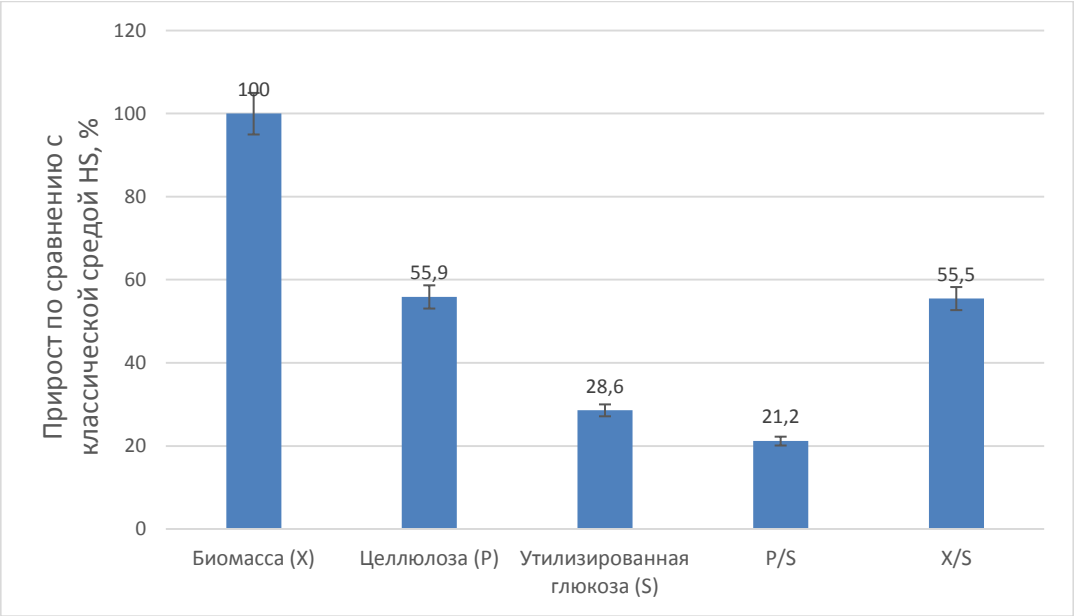


Рисунок 4 – Показатели эффективности биотехнологического производстваБЦ на модифицированной HS среде

Максимальные значения всех ключевых показателей (урожайность плёнки 7,11 г/л и экономический коэффициент 16,33 %) были получены на модифицированной среде HS, с добавлением 0,5 % этанола и 0,1 % пивного сусла. Эти параметры свидетельствуют о повышении метаболической эффективности клеток и улучшении распределения потоков углерода между ростом биомассы и синтезом экзополисахарида.

Расчёт показателей биосинтетической эффективности проводился на основе соотношений массы целлюлозы (P), клеточной биомассы (X) и утилизированной глюкозы (S). Экономический коэффициент (X/S) отражал степень конверсии субстрата в клеточную биомассу, а параметры P/X и P/S характеризовали выход целлюлозы относительно биомассы и израсходованного субстрата соответственно. Максимальные значения X/S (16,33 %) и P/S (39,5 %) указывают на то, что клетки использовали глюкозу более рационально, снижая потери углерода на побочные метаболиты и повышая степень конверсии субстрата в целевой продукт.

Удвоение сухого веса клеточной биомассы (2,94 г/л против 1,47 г/л в контроле) подтверждает, что введение органических добавок не только стимулировало образование БЦ, но и обеспечило более активное размножение продуцента. Анализ соотношений P/X и P/S показал, что при модификации среды доля полисахарида, приходящаяся на единицу клеточной массы, несколько снизилась, в то время как выход целлюлозы на единицу утилизированной глюкозы, напротив, возрос. Это свидетельствует о перераспределении метаболической энергии в пользу устойчивого клеточного роста и более продолжительного биосинтетического цикла.

Подобная тенденция была описана и другими исследователями: добавление этанола или органических экстрактов в питательные среды для

Komagataeibacter xylinus приводит к смещению катаболических потоков в сторону усиления окислительно-восстановительных реакций, что благоприятствует синтезу структурных биополимеров [175].

С практической точки зрения, применение пивного сусла и этанола в качестве модифицирующих компонентов среды не только повышает продуктивность биотехнологического процесса, но и соответствует принципам циркулярной биоэкономики, поскольку позволяет эффективно утилизировать пищевые отходы и использовать их в производстве биоматериалов с высокой добавленной стоимостью.

3.1.1.2 Разработка питательной среды из производственных отходов для продуцентов бактериальной целлюлозы

Одним из ключевых факторов, ограничивающих промышленное производство бактериальной целлюлозы (БЦ), является её высокая себестоимость. По данным литературы, расходы на питательную среду составляют 30–50 % от общей стоимости конечного продукта, что делает выбор углеродного субстрата решающим при микробных ферментациях. Питательная среда не только определяет экономическую эффективность процесса, но и напрямую влияет на качество и морфологические свойства получаемой БЦ.

Несмотря на наличие большого числа публикаций, посвящённых использованию дешёвого сырья для синтеза БЦ [176], подбор состава среды остаётся индивидуальной задачей для каждого штамма-продуцента, поскольку оптимальные параметры не могут быть универсально перенесены из одной системы в другую. Это связано с различиями в метаболических путях, активности целлюлозосинтетазных комплексов и регуляции углеродного обмена.

Одним из перспективных направлений оптимизации является замена чистых субстратов на промышленные или агропищевые отходы, которые могут служить источниками углерода, азота и витаминов. В качестве таких субстратов успешно применяли сухой коньячный экстракт, фруктовые соки, кленовый сироп, сок сахарного тростника и сточные воды от производства рисового вина, виноградный жмых [177], а также побочные продукты кондитерского и спиртового производства — мелассу, кукурузный ликёр, молочную и соевую сыворотку [178]. Среди сельскохозяйственных отходов особое внимание уделено пшеничной соломе и побочным продуктам биодизельного производства — глицерину и ацетон-бутанол-этанольным ферментатам [179].

В Республике Казахстан, где хорошо развиты молочное и сахарное производства, наиболее доступными субстратами являются молочная сыворотка, меласса, а также оболочки злаковых культур — отходы переработки пшеницы, овса, ячменя и риса. Эти компоненты представляют собой ежегодно возобновляемое сырьё с нулевой себестоимостью, что делает их привлекательными для промышленного биосинтеза.

Кроме того, глицерин, образующийся в больших объёмах при производстве биотоплива и спирта, также может быть использован как источник углерода.

В рамках работы для штамма *Komagataeibacter xylinus* С-3 были испытаны среды на основе отходов – молочная сыворотка (ПС-1), меласса (ПС-2), гидролизаты оболочек злаков (ПС-3) и глицерин (ПС-4). В качестве контроля использовалась стандартная среда HS (Рисунок 5).

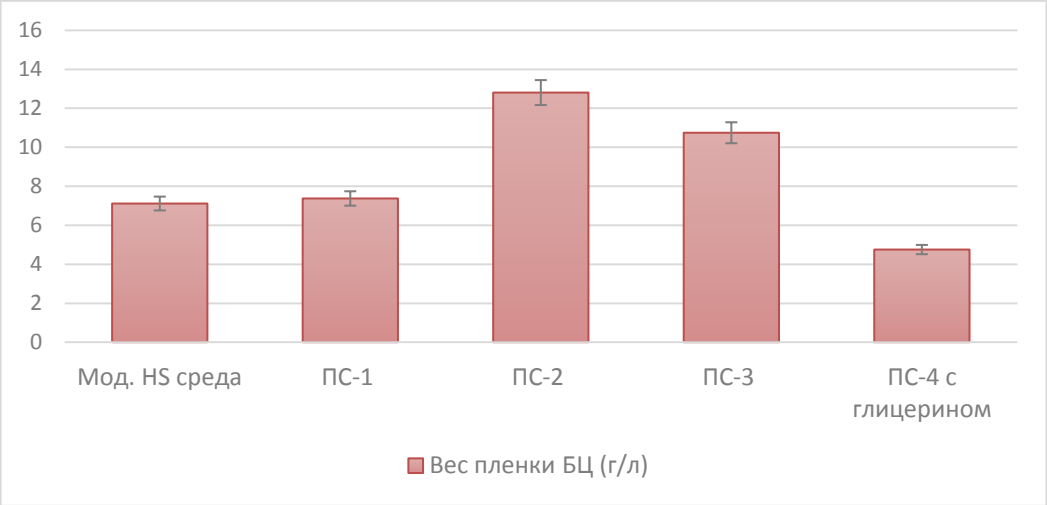


Рисунок 5 – Продуктивность штамма *Komagataeibacter xylinus* С-3 на классической среде HS и средах на основе отходов

Анализ полученных данных показал, что продуктивность штамма на среде с молочной сывороткой (ПС-1) сопоставима с результатами, достигнутыми на стандартной среде HS. Однако при использовании гидролизатов злаковых оболочек (ПС-3) выход полимера достигал 10,74 ± 0,01 г/л, что существенно превышает показатели других сред.

Несмотря на схожие концентрации редуцирующих сахаров (43,8 г/л в гидролизате и 47,4 г/л в сыворотке), их качественный состав различается. Так, молочная сыворотка содержит лактозу, которая расщепляется на глюкозу и галактозу. Последняя, как известно, плохо усваивается целлюлозосинтезирующими бактериями из-за низкой эффективности её транспорта через клеточную мембрану [171]. Кроме того, молочная сыворотка является скоропортящимся продуктом, что снижает её технологическую ценность при промышленном использовании.

На глицериновой среде (ПС-4) зафиксирован наименьший выход БЦ — 4,75 ± 0,12 г/л, что на 33 % ниже, чем на среде HS, что согласуется с результатами других исследователей [179]. Максимальная эффективность - выход целлюлозы 12,8 ± 0,02 г/л, что в 1,8 раза превышает показатели стандартной HS-среды (7,11 ± 0,02 г/л) обнаружена при выращивании продуцента в среде ПС-2 на основе мелассы. Это можно объяснить тем, что меласса содержит смесь простых сахаров: глюкозу, фруктозу и сахарозу, которые последовательно утилизируются бактериями. Такая “поэтапная”

метаболизация предотвращает резкие скачки кислотности и обеспечивает длительное поддержание роста культуры.

Известно, что уксуснокислые бактерии окисляют глюкозу до глюконовой кислоты, что снижает pH культурального бульона и ингибирует синтез БЦ. Однако при культивировании на мелассе интенсивного образования глюконовой кислоты не наблюдалось, и уровень pH оставался стабильным. Это связано с присутствием в мелассе фенольных соединений с гвайацильными и сирингильными структурами, аналогичными фрагментам лигнина [180], которые замедляют метаболизм углеводов и стабилизируют кислотность среды.

Дополнительно меласса содержит белки, аминокислоты, нуклеотиды и витамины, что делает её самодостаточным источником азота и снижает потребность в добавлении пептона. Предварительная обработка мелассы растворами H_2SO_4 и $Ca_3(PO_4)_2$ позволила удалить тяжёлые металлы и взвешенные примеси, улучшив качество субстрата и повысив ферментативную активность клеток [181].

Таким образом, использование мелассы в качестве углеродного источника обеспечивает не только высокий выход целлюлозы, но и стабильность метаболических процессов, что делает её оптимальным компонентом для производственных ферментационных сред.

Что касается подбора условий культивирования, то одним из ключевых параметров, влияющих на рост и метаболическую активность бактерий, продуцирующих целлюлозу, является температура. Результаты этих эесперименов представленвы на рисунке (рисунок 6).

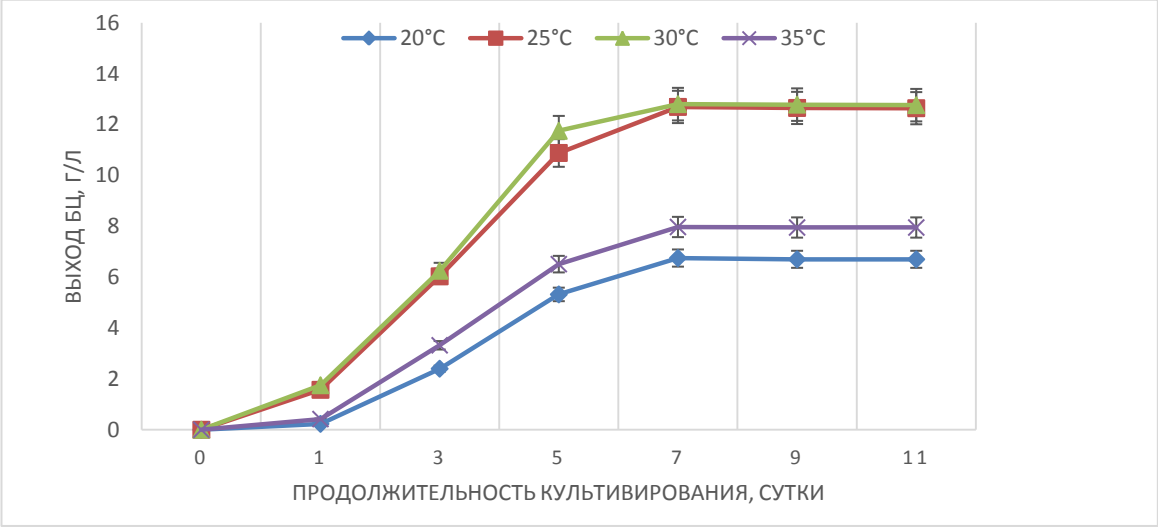


Рисунок 6 – Зависимость выхода БЦ от температуры культивирования *Komagataeibacter xylinus* С-3

Штамм сохранял жизнеспособность и синтетическую активность в при температурном диапазоне от 20 до 35 °С. Однако максимальный выход продукта (12,69–12,80 г/л) отмечен при темпеатурном режиме 25–30 °С. При

повышении температуры до 35 °C продуктивность резко падала — до 7,97 г/л, что в ~1,6 раза ниже максимума. Это обусловлено термической денатурацией или неактивностью ферментов целлюлозосинтеза, нарушением целостности мембран или изменением структуры белковых комплексов, участвующих в полимеризации.

При нижней границе температурного диапазона (20 °C) выход БЦ снижался до 6,75 г/л — лишь 52,7 % от максимума. Обычно при температурах ниже 25 °C метаболизм микроорганизмов замедляется (эффект температуры по правилу Вант-Гоффа), что ограничивает скорость синтеза полимера.

Данные о температурной оптимальности 25–30 °C согласуются с публикациями для других штаммов *Komagataeibacter* и *Gluconacetobacter*, где часто указывается оптимальная температура в интервале 28–30 °C для максимальной продуктивности БЦ. Например, в работе Barshan и соавторов для *K. xylinus* оптимум был установлен около 28 °C, при более высоких температурах наблюдалось снижение продукции, что объяснялось термическим стрессом [182].

Таким образом, наш результат подтверждает общую тенденцию: для *K. xylinus C-3* оптимальная температура — 25–30 °C, и любые отклонения приводят к снижению синтетической активности. При разработке технологических режимов производства БЦ важно соблюдать температурный контроль внутри этого интервала, особенно при масштабировании процесса.

Еще одним важным параметром, определяющим метаболическую активность и продуктивность бактерий, является кислотность среды. Поэтому на следующем этапе исследования определялось влияние начального уровня pH в среде на биосинтез бактериальной целлюлозы (БЦ) штаммом *Komagataeibacter xylinus* C-3. (рисунок 7).

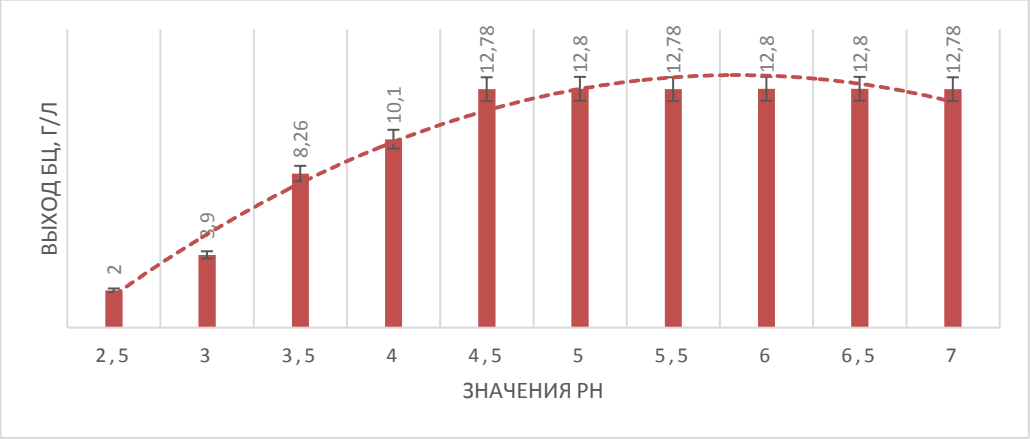


Рисунок 7 – Влияние pH на продуктивность штамма *Komagataeibacter xylinus* C-3

При значениях pH < 4.0 наблюдалось заметное снижение выхода БЦ, также при pH > 7.0 отмечалось ослабление синтетической активности.

Результаты согласуются с данными ряда авторов, показавших, что оптимальный диапазон pH для синтеза БЦ большинством штаммов рода *Komagataeibacter* и *Gluconacetobacter* лежит в пределах 4.0–6.5 [183]. Этот эффект вероятно связанн с инактивацией целлюлозосинтезирующего ферментного комплекса и нарушением обмена ионов в клетке. Превышение pH > 7.0 приводит к изменению соотношения NAD^+/NADH и замедлением переноса электронов в дыхательной цепи, необходимых для регенерации редуцирующих эквивалентов в процессе полисахаридогенеза.

Установлено, что оптимальный диапазон pH для роста продуцента и БЦ - от 4.5 до 7.0. Интересно, что способность *K. xylinus* С-3 сохранять рост при pH ≈ 2.5 превосходит большинство описанных штаммов — аналогичные значения ранее наблюдались только у кислотоустойчивых изолятов, выделенных из ферментированных напитков [183]. Это свойство делает данный штамм перспективным для промышленного применения, где колебания pH в ферментёрах неизбежны.

3.1.1.3 Оптимизация состава ферментационной среды для получения бактериальной целлюлозы со стандартными структурно-механическими свойствами

Состав ферментационной среды оказывает существенное влияние не только на продуктивность, но и на морфологию и структуру бактериальной целлюлозы (БЦ) [184]. Для выявления возможных различий в микроструктуре гель-пленок были проведены исследования методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рисунок 8).

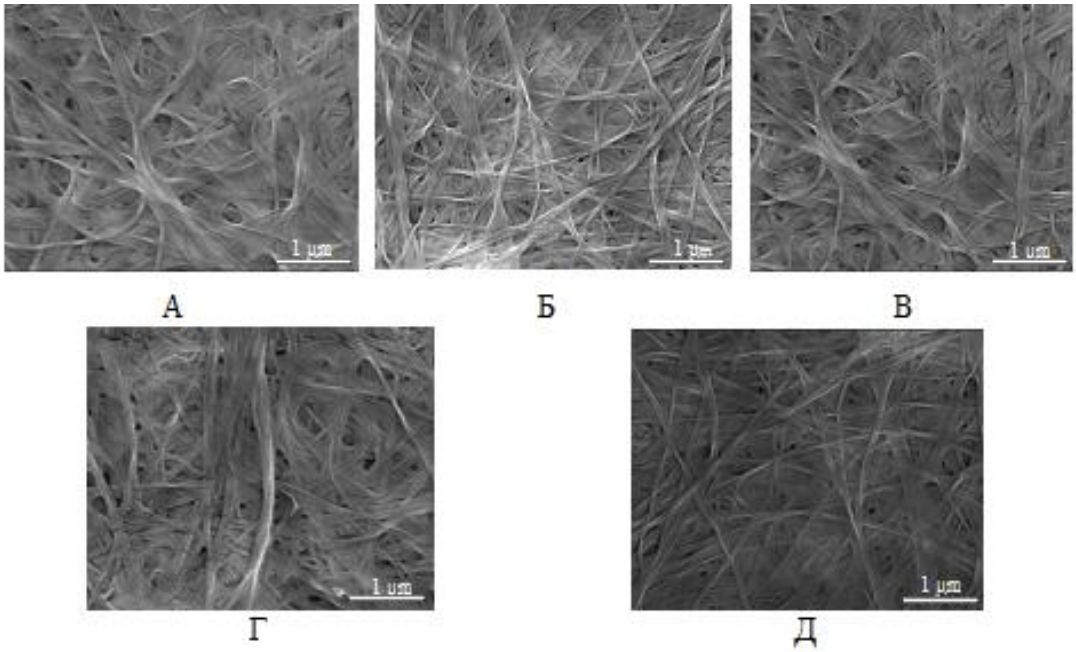


Рисунок 8 – СЭМ изображения пленок БЦ, синтезированной штаммом *Komagataeibacter xylinus* С-3 на среде: А – HS модифицированная; Б – ПС-1; В – ПС-2; Г- ПС-3; Д – ПС-4 (увеличение х25 000)

На СЭМ-изображениях (рис. 13 А–Д) отчётливо видна развитая нанофибриллярная структура, характерная для БЦ, синтезированной штаммом *Komagataeibacter xylinus C-3* на различных питательных средах.

Все образцы представляют собой плотные взаимосвязанные сети микрофибрилл, формирующие пористую матрицу с большой поверхностной площадью. Средний диаметр элементарных волокон, рассчитанный на основе не менее 100 измерений в программе OriginPro 9.1, составил 30 ± 5 нм, что в 100 раз меньше диаметра микрофибрилл растительной целлюлозы. Их толщина составляла 15–150 нм, что соответствует значениям, полученным другими авторами для БЦ, выращенной при статическом культивировании [41].

Поверхность всех пленок отличалась гладкостью и равномерной текстурой, что указывает на стабильные условия полимеризации и отсутствие грубых дефектов при формировании геля. Такая структура способствует высокой паропроницаемости и способности к удержанию биологически активных веществ внутри волоконной матрицы, что важно при разработке биомедицинских и упаковочных материалов.

Для количественной оценки прочностных характеристик гель-пленок БЦ использовали универсальную разрывную машину *Instron* в одноосном режиме. Были определены показатели прочности на разрыв (МПа) и относительного удлинения при разрыве (%) (Рисунок 9).

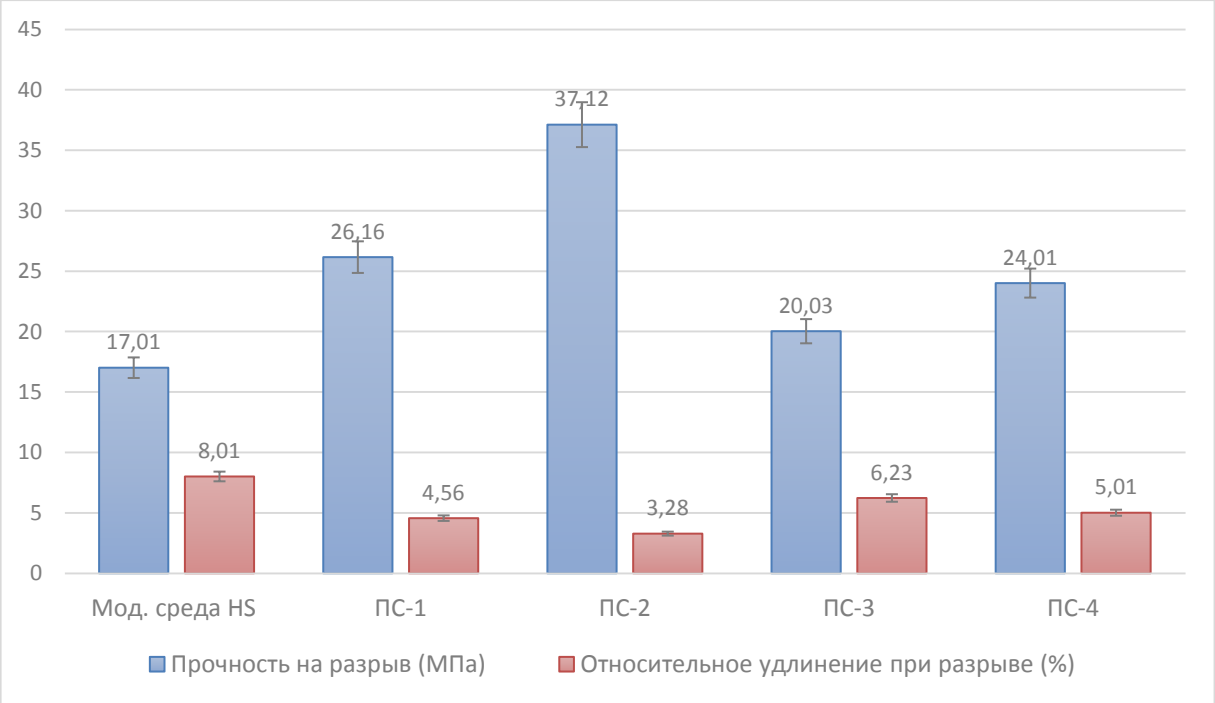


Рисунок 9 – Механические свойства БЦ, образованной на различных питательных средах

Из данных рисунка видно, что образцы, выращенные на среде с мелассой (ПС-2), демонстрировали наибольшую прочность на разрыв - 37,12

± 0,2 МПа, что в 2,2 раза выше, чем у пленок, полученных на модифицированной HS-среде. Однако при этом наблюдалось снижение относительного удлинения, что типично для материалов с высокой степенью кристалличности и плотной упаковкой микрофибрилл.

Для образцов, выращенных на среде с молочной сывороткой (ПС-1) и глицерином (ПС-4), прочностные характеристики были умеренными (26,16 и 24,01 МПа соответственно), что связано с менее упорядоченной укладкой волокон. Пленки, полученные на среде ПС-3 (гидролизаты злаков), обладали промежуточными свойствами — умеренной прочностью и эластичностью, что делает их перспективными для гибких био-покрытий.

Высокие значения прочности при использовании мелассы могут быть обусловлены образованием дополнительных водородных связей между гидроксильными группами целлюлозы и полифенольными соединениями, присутствующими в составе мелассы. Аналогичные результаты приведены в исследованиях Heydorn и др., где добавление сахарсодержащих побочных продуктов усиливало межфибриллярные взаимодействия и повышало кристалличность БЦ [185]. Согласно данным Hu и др. [170], механические свойства БЦ напрямую зависят от прочности водородной связи между нанофибриллами и плотностью их упаковки в матрице.

Таким образом, можно заключить, что среда на основе мелассы обеспечивает оптимальное сочетание высокой прочности и структурной целостности пленок БЦ, что делает её наиболее перспективной для промышленного и биомедицинского применения.

3.1.1.4 Экономическая оценка эффективности производственных сред

Одним из ключевых факторов масштабирования биотехнологического производства бактериальной целлюлозы (БЦ) является экономическая эффективность ферментационной среды, доля которой может составлять до 50 % себестоимости конечного продукта. В этой связи был проведён сравнительный анализ стоимости стандартной среды HS и модифицированной среды ПС-2 на основе мелассы (табл. 3).

Таблица 3 – Расчет стоимости сред (на конец 2025 года)

Наименование среды	Компоненты среды	Цена (в тг за 1 кг)	Количество ингредиентов (г/л)	Цена (в тг на 1 л среды)
Классическая среда HS	глюкоза	8 400	20	168
	гидрофосфат натрия	124 560	2,7	337
	пептон	58 530	5	293
	дрожжевой экстракт	31 680	5	158

	лимонная кислота	6 840	1,15	8
Итого	964 тг / л			
Среда ПС-2 с мелассой	меласса	0	20	0
	гидрофосфат натрия	124 560	2,7	337
	дрожжевой экстракт	31 680	5	158
	лимонная кислота	6 840	1,15	8
	этанол	2 400	10	24
Итого	527 тг / л			

Стоимость 1 л среды ПС-2 оказалась почти в два раза ниже, чем у стандартной HS (527 тг против 964 тг). Такое снижение объясняется использованием мелассы — побочного продукта сахарного производства, не требующего дополнительной очистки и доступного в больших объёмах.

Таблица 4 – Расчет себестоимости БЦ на разных средах

Среды	Выход БЦ на средах (г/л)	Стоимость среды (в тг за 1 л)	Себестоимость БЦ (в тг за 1 г/л)
Классическая среда HS	4,56	964	211,4 тг
Среда ПС-2 с мелассой	12,8	527	41,2 тг

Таким образом, себестоимость 1 г БЦ при использовании среды с мелассой составила всего 41 тг, что в 5 раз дешевле, чем при применении стандартной HS-среды. Это демонстрирует высокую экономическую и технологическую целесообразность замены коммерческих источников углерода на вторичные субстраты.

Снижение стоимости при одновременном росте выхода продукта соответствует данным, полученным в работах Sharma и др. [186] и Quijano и др. [187], где использование побочных продуктов сахарной, молочной и пивной промышленности позволило снизить себестоимость БЦ на 60–85 % при сохранении или повышении её качества.

Меласса является не только дешёвым источником углерода, но и дополнительным источником аминокислот, витаминов и микроэлементов, что стимулирует рост клеток *Komagataeibacter xylinus* без добавления пептона и дрожжевого экстракта [184]. Кроме того, благодаря естественному буферному эффекту мелассы, pH среды остаётся стабильным в течение культивации, что снижает затраты на коррекцию кислотности и уменьшает образование побочных продуктов (например, глюконовой кислоты).

Исследования Quijano и др. [187] подтверждают, что включение побочных продуктов агропищевой промышленности в состав ферментационных сред является важным направлением циркулярной биоэкономики, позволяющим сочетать снижение себестоимости с экологическими преимуществами — сокращением количества отходов и выбросов CO_2.

Таким образом, среда ПС-2 на основе мелассы обеспечивает не только высокий уровень биосинтеза БЦ (12,8 г/л), но и значительное снижение производственных затрат, что делает её наиболее перспективной для масштабного промышленного применения. Использование подобных отходов, доступных в Казахстане, открывает широкие перспективы для создания экономически и экологически устойчивых биотехнологических процессов, интегрированных в концепцию «Zero Waste Biomanufacturing».

3.1.2 Синтез функциональных составляющих композита: $Ti_3C_2T_x$MX и ГАП

Основная функция БЦ в раневых покрытиях заключается в изоляции повреждённой области и выполнении барьерной роли, но уникальная структура — пористая сеть нановолокон с большой удельной поверхностью делает её оптимальной платформой для включения антимикробных агентов и других функциональных компонентов, что сможет обеспечить формирование композитов с выраженными антисептическими и антибиоплёночными характеристиками.

Одним из компонентов такой платформы могут быть MXenes. Это двухмерные (2D) наноматериалы, относящиеся к семейству карбидов, нитридов и карбо-нитридов переходных металлов.

Начиная с 2016 года, когда в статье Rasool и др. [6] были впервые описаны антибактериальные свойства MXenes, с тех пор работы в этом направлении начали нарастать с каскадной скоростью. Информация о них суммирована в нескольких обзорах [92, 188, 189]. Имеются сведения о том, что MXenes или материалы с ними препятствуют образованию биопленок и даже способствуют их деструкции [7].

Среди всех других MXenes, $Ti_3C_2T_x$MXene является наиболее изученны $Ti_3C_2T_x$MXene. Двумерный карбид титана MXene ($Ti_3C_2T_x$MXene) был первым синтезированным MXene, о котором сообщили в 2011 году [190], и с тех пор с ним проводится более 70 % всех исследований MXene на сегодняшний день [191]. Поэтому именно такой тип MXene был получен в данной работе. Общая схема его синтеза представлена на рисунке 10.

Процесс включает несколько ключевых этапов: 1 - селективное удаление алюминия с помощью образующегося HF; 2 - формирование многослойных структур $Ti_3C_2T_x$; 3 - последующее расслоение до отдельных нанолистов под действием ультразвука.

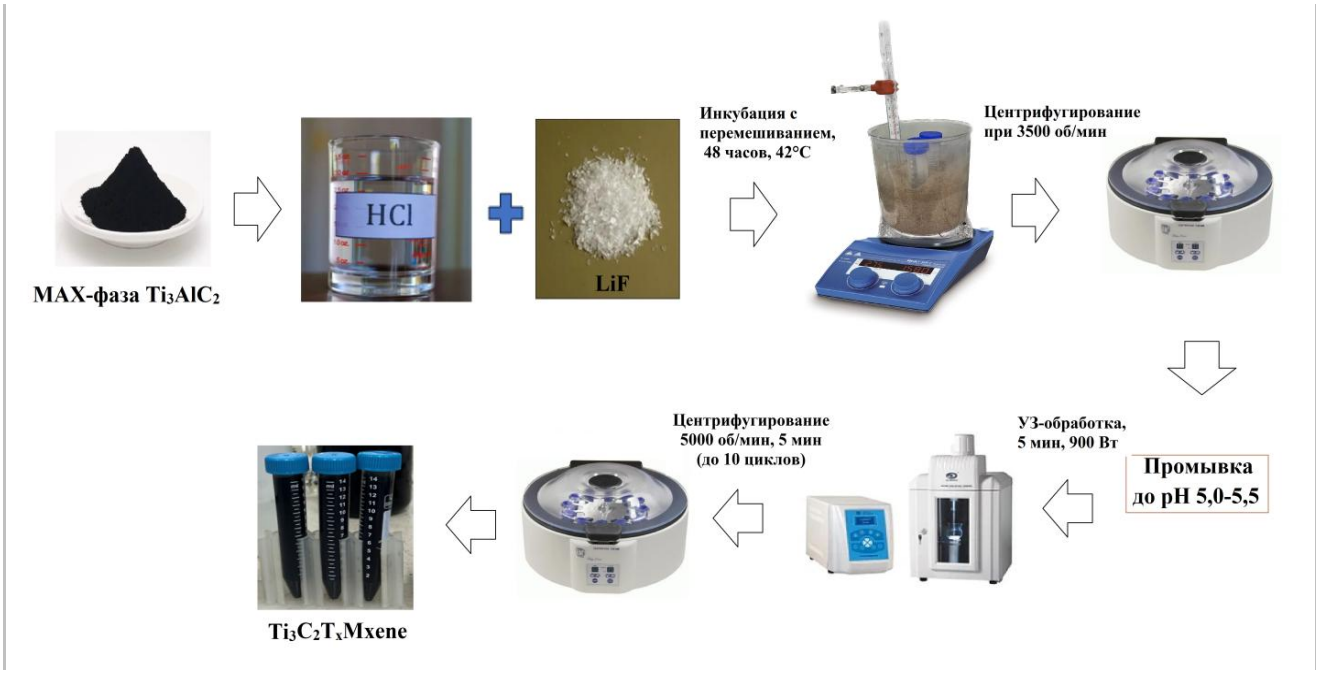


Рисунок 10 – Схема синтеза $Ti_3C_2T_x$MXene

На первой стадии слоистый карбид титана Ti_3C_2TxMXene был получен из MAX-фазы Ti_3AlC_2 (Carbon-Ukraine Ltd.) методом селективного химического травления. Для создания травящей среды использовали раствор, содержащий HCl и LiF. При взаимодействии LiF с HCl в растворе формировался активный травящий агент — HF. В классическом методе синтеза MXene алюминий вытравливают непосредственно в растворе HF, однако чистый HF не позволяет достичь полноценного расслоения MXene. Однако, при использовании комплекса HCl-LiF не требуется дальнейшее интеркалирование, поскольку Li^+ можно напрямую использовать в качестве расслаивающего агента, и после повышения pH до нейтрального можно получить однослойный чешуйчатый MXene с несколькими слоями [192].

На этапе химического травления структура MAX-фазы претерпевает трансформацию: алюминий удаляется из гексагональной решётки, и формируются многослойные «хлопья» $Ti_3C_2T_x$ с терминальными функциональными группами (–F, –O, –OH). Наличие этих функциональных групп у MXenes позволяет взаимодействовать с клеточными мембранами бактерий. Обильные гидроксильные группы на поверхности MXene могут образовывать водородные связи с мембранами бактериальных клеток, в то время как его поверхностный заряд может генерировать электростатические силы, которые усиливают контакт с бактериями, увеличивая вероятность уничтожения бактерий [193].

Полученный материал должен быть стабилизирован для предотвращения последующих структурных изменений. С этой целью проводили серию циклов центрифугирования с последовательным промыванием дистиллированной водой до достижения значения pH 5,0–5,5,

что свидетельствовало о полном удалении кислотных остатков и побочных ионов (например, Al^{3+} и Cl^{-}). Для расслоения хлопьев $Ti_3C_2T_x$ и получения отдельных нанолистов применяли ультразвуковую обработку. Под действием ультразвука возникают кавитационные процессы, приводящие к разрушению межслоевых связей и формированию отдельных нанолистов толщиной в несколько нанометров. Известно, что более эффективное предотвращение образования биопленок достигается за счет меньшего размера и более высокого соотношения площади поверхности к массе [194]. Например, в работе [195] сообщается, что антибактериальная активность MXenes сильно зависит от размера нанолистов, а применение ультразвука позволяет достичь их равномерного диспергирования.

Концентрацию полученного коллоидного раствора $Ti_3C_2T_x$ определяли методом вакуумной фильтрации через мембрану PVdF с диаметром пор 0,45 мкм, с последующей сушкой при 110 °C в течение 12 ч. [196]. Концентрация $Ti_3C_2T_x$ в дисперсии составила 11,5 мг/мл.

В совокупности этот методический протокол обеспечивает получение стабильной водной дисперсии MXene с высокими функциональными возможностями [196].

Важно отметить, что тип травителя и условия травления (такие как температура и время) играют важную роль в управлении кинетикой селективного травления фазы MAX и, таким образом, свойствами полученного MXene (размером чешуек, химией поверхности чешуек, электропроводностью) [197]. При вытравливании алюминия из структуры MAX-фазы с использованием кислотно-фторидной системы образуются дефекты и активные поверхности, обогащенные функциональными группами (–OH, –F, –O). Наличие таких участков значительно повышает химическую активность и ускоряет процессы окисления в водных суспензиях [198]. Титан в составе $Ti_3C_2T_x$MXene при окислении взаимодействует с кислородом, образуя устойчивую оксидную фазу TiO_2. Углеродные слои при этом окисляются до CO или CO_2 и удаляются, что приводит к полной переработке материала в диоксид титана.

Размер, форма и морфология поверхности $Ti_3C_2T_x$MXene и синтезированных TiO_2 были исследованы на СЭМ и представлены на рисунке 11 Б. На электронограммах отчётливо прослеживается изменение морфологии нанолистов $Ti_3C_2T_x$MXene в зависимости от времени наблюдения: в свежеприготовленном состоянии поверхность остаётся однородной, тогда как уже через 2 дня фиксируются признаки окисления, проявляющиеся в появлении наночастиц TiO_2 размером 90-100 нм на поверхности MXene.

Наличие TiO_2 было подтверждено также данными рамановской спектроскопии (рис.11). Появление сигналов TiO_2 в рамановском спектре свидетельствует об изменении структуры MXene в процессе хранения. Для свежеприготовленного образца спектр характеризуется сравнительно низкой интенсивностью и сглаженным профилем, что согласуется с литературными

данными для хорошо расслоенного $Ti_3C_2T_x$. Отсутствие выраженных полос в области 200–300 $см^{-1}$ указывает на минимальное содержание оксидных фаз. После выдерживания в течение двух суток (окисленный) наблюдается существенное изменение спектральной картины: регистрируется резкое увеличение интенсивности в области ~ 151$см^{-1}$, сопровождающееся появлением дополнительных полос в интервале 500–700 $см^{-1}$. Указанные частоты коррелируют с колебаниями Ti–O в структурах TiO_2 (анатаз или рутил), что позволяет интерпретировать данный эффект как результат поверхностного окисления MXene с образованием оксидной фазы титана.

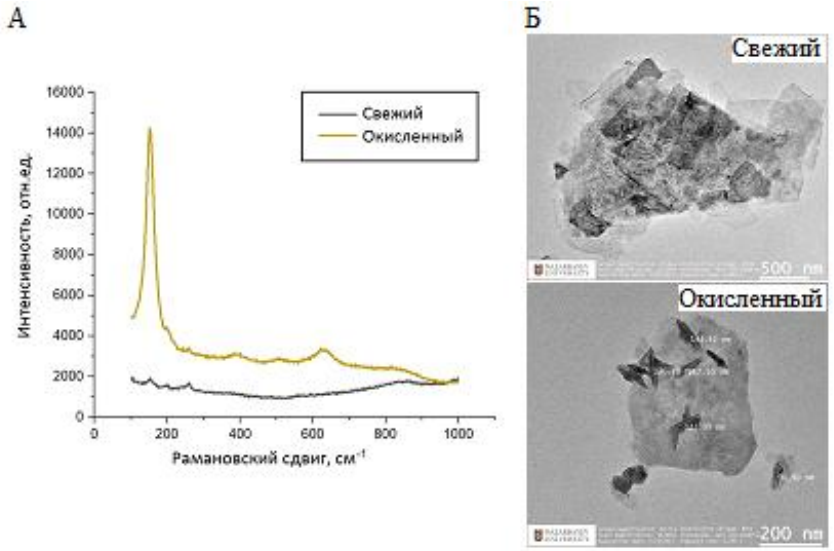


Рисунок 11 – Рамановская спектроскопия (А) и СЭМ изображения (Б) свежих и окисленных нанолистов $Ti_3C_2T_x$MXene

Таким образом, оба проведенных анализа подтверждают высокую химическую чувствительность $Ti_3C_2T_x$MXene к условиям хранения и его склонность к окислению. Формирование полос, характерных для TiO_2, свидетельствует о частичной деградации карбидной структуры, что необходимо учитывать при разработке технологий модификации MXene и его дальнейшего применения в составе композитных систем.

Интенсивное поверхностное преобразование MXene объясняется их высокой химической активностью, приводящей к постепенной деструкции материала. Подобные трансформации согласуются с литературными данными, где указывается на высокую чувствительность наночастиц к условиям окружающей среды и их склонность к постепенной модификации структуры при хранении [199].

Кроме того, есть информация, что MXenes могут проявлять цитотоксичность и повреждать клетки в высоких концентрациях, что ограничивает их использование в некоторых медицинских приложениях [200]. Это обьясняется тем, что на поверхности $Ti_3C_2T_x$Mxene при контакте с водой, физиологическими жидкостями и воздухом образуются свободные радикалы, в том числе супероксидные (O_{2-}) и пероксидные (H_2O_2). В связи с

этим в разрабатываемый композит целесообразно было включить материал, который способен не только модифицировать структуру и поверхность MXene, предотвращая процесс оксиления и агрегации, но и снижая его цитотоксичность засчет наличия антиоксидантной активности [201]. В принципе для минимизации процессов окисления $Ti_3C_2T_x$MXene могут применяться поливиниловый спирт, полистирол, полианилин, альгинат натрия, гидроксиапатит, в том числе и ГАП, который является стабилизатором [153]. Но не только, поскольку ГАП обладает несколькими видами биоактивности и способности к взаимодействию с биологическими системами.

Иными словами, включение ГАП вносит дополнительную функциональность в композит. Синтез ГАП может осуществляться несколькими способами: сухие методы (твердофазный синтез и механохимический процесс), «мокрые» методы (традиционное химическое осаждение, гидролитический, гидротермальный, эмульсионный, золь-гель и сонохимический), высокотемпературные процессы (метод горения и пиролиз), микроволновая обработка, синтез из биогенных источников, а также комбинированные подходы [202].

Метод химического осаждения наиболее популярен, поскольку он универсален и имеет определенные экономические преимущества [203]. В нем растворы кальциевых и фосфатных соединений смешиваются при контролируемом значении pH и температуры, что приводит к выпадению аморфного или малокристаллического осадка ГАП. Этот подход отличается технологической простотой и возможностью масштабирования, однако зачастую требует последующей термообработки для повышения степени кристалличности. Более однородную структуру можно получить при использовании золь-гель метода: в этом случае из органо-неорганических прекурсоров формируется золь, переходящий в гель, который после высушивания и прокаливания превращается в ГАП с контролируемой наноструктурой. Для получения высококристаллических частиц с заданной морфологией, например, в виде стержней или наноигл, применяется гидротермальный синтез, основанный на обработке реакционной смеси при повышенных давлении и температуре в автоклаве.

Высокотемпературным вариантом является твёрдофазный синтез, при котором порошки CaO и фосфатных соединений подвергаются прокаливанию при 800–1200 °C. Этот метод обеспечивает высокую термическую стабильность материала, но приводит к укрупнению частиц и ограниченному контролю морфологии. Более энергоёмким считается механохимический подход, при котором исходные реагенты подвергаются интенсивному измельчению в планетарной мельнице, что инициирует химическую реакцию без участия растворителей. В последние годы активно развиваются альтернативные энергоэффективные подходы, такие как микроволновой и ультразвуковой синтез. При микроволновом воздействии реакционная смесь нагревается объемно, что обеспечивает быструю

кристаллизацию материала. Ультразвуковое осаждение основано на кавитационных процессах, приводящих к локальным скачкам давления и температуры, способствующим формированию более мелких и однородных частиц.

При этом следует учитывать, что одной из ключевых тенденций современных исследований выступает разработка подходов к экологически обоснованной утилизации отходов и их трансформации в продукты с высокой добавленной стоимостью. Поэтому особый интерес представляют биогенные методы, базирующиеся на использовании природных источников кальция – яичной скорлупы, рыбьих костей или раковин моллюсков для получения ГАП [204, 205]. После растворения или кальцинации такого сырья полученный кальцийсодержащий прекурсор взаимодействует с фосфатами с образованием ГАП, что делает процесс экономичным и экологически ориентированным.

В данной работе синтез гидроксиапатита осуществлён традиционным методом химического осаждения с использованием яичной скорлупы в качестве исходного сырья.

Применение такого подхода обеспечивает рациональное использование биологических отходов, одновременно придавая процессу экологическую устойчивость и экономическую эффективность за счёт замены дорогостоящих химических реагентов.

Схема получения ГАП из яичной скорлупы методом химического осаждения представлена на рисунке 12.

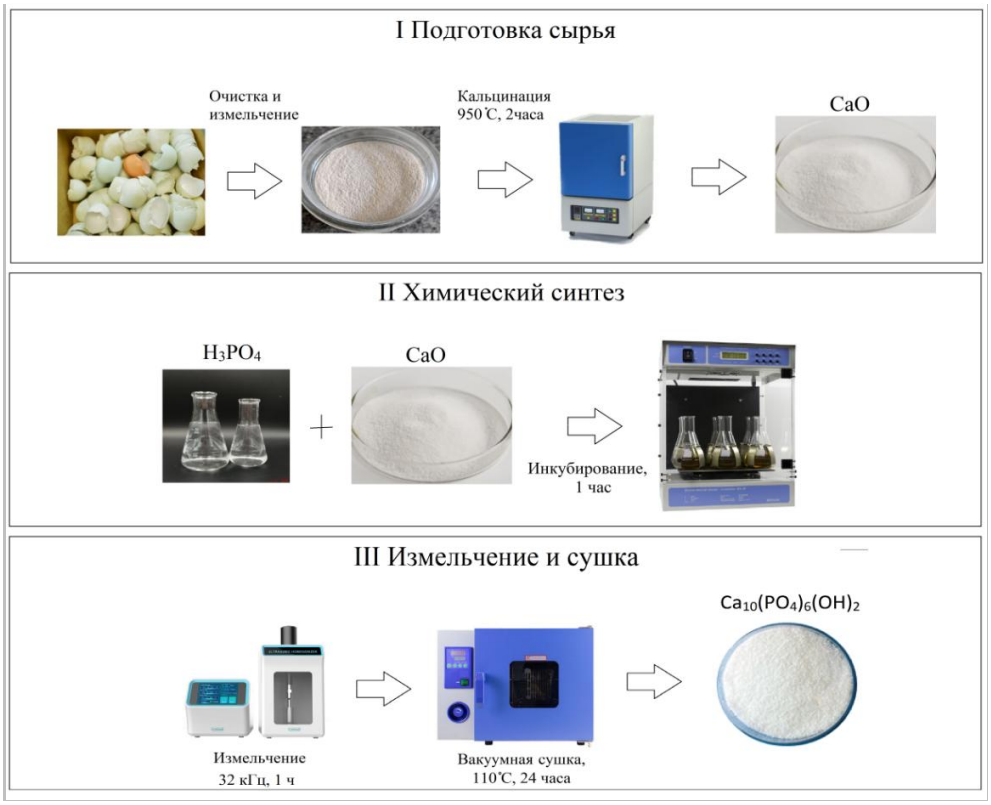


Рисунок 12 – Схема получения ГАП из яичной скорлупы

Для получения ГАП из этого сырья необходимо было удалить органические примеси и перевести присутствующий в яйцах кальций в активную форму - CaO. На этом этапе карбонат кальция превращали в оксид кальция. Для этого сырьё подвергали отжигу при 950 °C в течение двух часов, в результате чего $CaCO_3$ разлагался с образованием реакционноспособного оксида кальция (CaO) и выделением CO_2. Термообработка не только обеспечивает перевод кальция в активную форму, но и удаляет органические примеси, придавая материалу дополнительную чистоту и стерильность. Полученный оксид кальция диспергировали в водной среде и постепенно вводили раствор ортофосфорной кислоты. При взаимодействии CaO с H_3PO_4 происходит последовательное растворение оксида с образованием ионов Ca^{2+} и дальнейшая их реакция с фосфат- и гидроксид-ионами, присутствующими в растворе. В результате протекает реакция кристаллизации фазы гидроксиапатита по следующему общему уравнению: $10Ca(OH)_2 + 6\ H_3PO_4 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 18H_2O$. Таким образом, уже на втором этапе формируется малорастворимый осадок стехиометрического гидроксиапатита, обладающий высокой термодинамической стабильностью. На заключительном этапе для повышения эффективности процесса полученную смесь подвергали ультразвуковой обработке. Обработка УЗ способствует равномерному диспергированию и образованию мелкодисперсных однородных частиц гидроксиапатита. Конечный продукт сушили в вакууме при температуре 110 °C в течение 24 часа.

Таким образом, в результате проведенных исследований были получены два фунциональных агента, предназначенных для включения в матрицу БЦ: $Ti_3C_2T_x$MXene и ГАП.

3.1.3 Получение комплексного наноматериала БЦ/ГАП/MXene

Модификация, или как еще принято говорить «функционализация» БЦ осуществляется двумя способами. Стратегия «*in situ*» (в месте нахождения, естественной среде) предполагает добавление функционального агента в культуральную среду для продуцента, т.е. этот агент включается в созревающие волокна целлюлозы в процессе ее синтеза [206, 207]. Второй способ – «*ex situ*» (вне, за пределами исходного места) предполагает включение дополнительного агента в уже готовую БЦ. Она осуществляется либо химическими, либо физическими методами [41]. В случае химической модификации БЦ обычно сначала фосфорилируют, а затем модифицируют с помощью привитой сополимеризации или реакций сшивания [119]. Физическая модификация *ex situ* традиционно осуществляется посредством физической адсорбции - пористая матрица БЦ может быть заполнена растворами или суспензиями частиц. Успешность этого процесса обусловлена наличием обильных гидроксильных групп в целлюлозных цепях, что обеспечивает образование прочных водородных связей между молекулами БЦ и абсорбированными молекулами [208]. Поэтому стратегия

ex situ посредством адсорбции гораздо проще и универсальнее, чем метод модификации *in situ* [209].

На сегодняшний в доступной литературы не обнаружены композиты, объединяющие БЦ, ГАП и MXene. Ранее сообщалось лишь о двукомпонентных системах БЦ/MXene и БЦ/ГАП [14-17]. Материалы БЦ/MXene обычно получают методами вакуумной фильтрации, сублимационной сушки и термического отжига [48] . Эти подходы обеспечивают прочную фиксацию MXene в матрице БЦ, однако приводят к потере гидрогелевой формы материала. Сохранить гидратированную структуру возможно при использовании способов *in situ* и *ex situ*. Как правило, эти два процесса протекают в водной среде. Известно, что MXene склонны к окислению в присутствии воды и кислорода, что приводит к постепенному разрушению их структуры. Кроме того, прямое введение MXene в процессе биосинтеза (*in situ*) затруднено из-за его потенциальной антибактериальной активности, подавляющей рост продуцента БЦ. Учитывая это, предварительное введение стабилизирующего компонента (ГАП) в скаффолд, представляется необходимым для предотвращения структурных изменений MXene.

Структурированный материал БЦ/ГАП преимущественно получают и *in situ,* и *ex situ* путями. Комплексный материал БЦ с ГАП, предназначенный для регенерации костей созданный способом *ex situ* описан в целом ряде исследований [210- 212]. В них было продемонстрировано, что композитный материал БЦ/ГАП стимулировал пролиферацию остеобластов и дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток без использования внешних остеогенных факторов. Кроме того, Zimmermann и др. сообщили о синтезе пленок и трубок БЦ с гидроксиапатитом с дефицитом кальция (БЦ/ГАП) для применения в инженерии костной ткани [213]. Авторы показали, что наличие кристаллов на поверхности БЦ/ГАП приводит к увеличению адгезии остеогенных клеток-предшественников [213]. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что БЦ/ГАП является жизнеспособным вариантом материала для костного каркаса и заслуживает дальнейшего изучения [214].

В работе Nicoara и др. [215] сообщается о композите БЦ/ГА, полученным обоими способами: и *in situ,* и *ex situ*. Наиболее эффективными с точки зрения потенциальных биомедицинских применений были образцы, полученные в условиях *in situ*. Схожая комбинированная стратегия была предпринята и группой Orelma и др. [216]. Для модификации *in situ* КМЦ сначала добавляли в культуру БЦ для получения пленок БЦ/КМЦ. Полученный композит БЦ/КМЦ затем модифицировали *ex situ* путем ковалентной конъюгации с антителом против человеческого сывороточного альбумина (HSA) с помощью химии EDC/NHS. Кроме того, Van и соавторы использовали метод *in situ* для модификации БЦ хитозаном (ХС) для получения композита БЦ/ХС, который впоследствии был модифицирован *ex situ* путем химического связывания гепарина (Геп) с БЦ/ХС для получения

композита БЦ/ХС/Геп. Композит продемонстрировал превосходные антимикробные и антикоагулянтные свойства, а также высокую механическую прочность. Более того, анализы МТТ показали, что композит БЦ/ХС/Геп обладает превосходной биосовместимостью, что предполагает его потенциальное применение в тканевой инженерии [217]. Хотя эти исследования были разработано для обнаружения и разделения специфических целевых белков, а не специально для включения антимикробного материала в мембраны БЦ, подходы, которые использовались для введения антител в нативную БЦ, были полезны для создания композита БЦ/ГАП/MXene.

Отталкиваясь от этой информации, в нашей работе были использованы два способа сборки композита БЦ/ГАП/MXene. Первый - комбинация стратегии *in situ* и *ex situ*. Второй – включение комплекса ГАП/MXene в матрицу БЦ методом *ex situ*.

В первом случае, на начальном этапе был получен полимерно-керамический комплекс БЦ/ГАП, который в свою очередь, создавали тоже двумя методами: и *ex situ,* и *in situ.*

В варианте *ex situ* формирование композита осуществлялось путём пропитывания заранее синтезированной плёнки БЦ 3% суспензией ГАП (Рисунок 13). При этом происходит адсорбция и закрепление частиц ГАП на поверхности и внутри волокнистой сети БЦ. Это обусловлено физико-химическими взаимодействиями, главным образом водородными связями и электростатическим притяжением между гидроксильными группами целлюлозы и ионами кальция и фосфата.

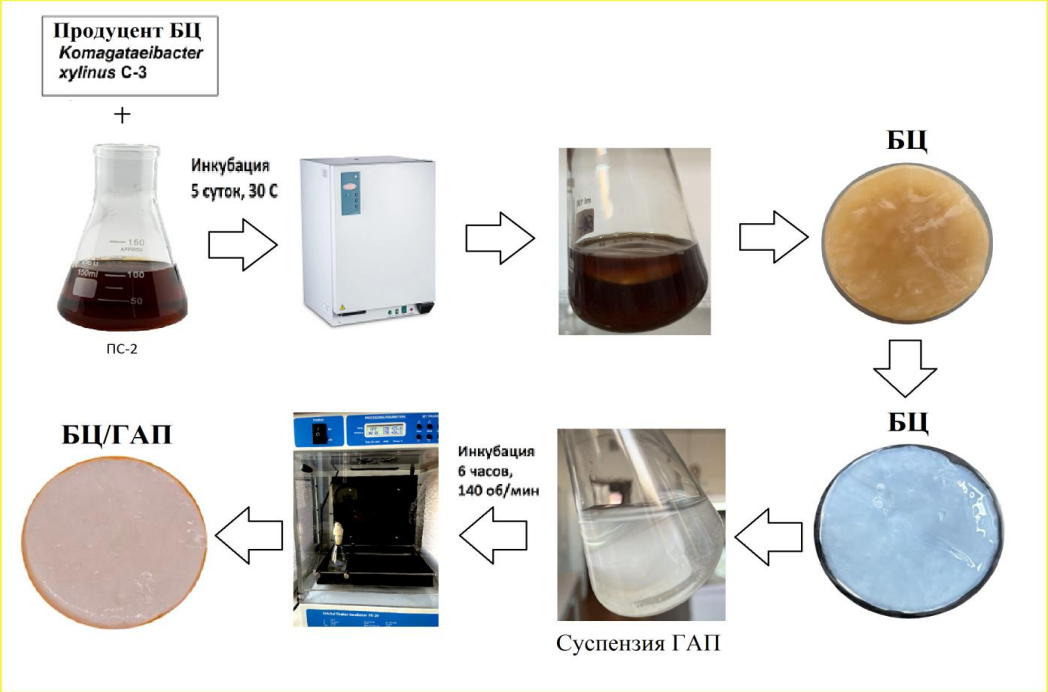


Рисунок 13 – Схема получения нано-гель-пленки БЦ/ГАП методом *ex situ*

В целом ряде исследований указывается, что такой методический подход позволяет целенаправленно регулировать структуру и свойства дополнительного компонента, а также более точно контролировать степень его взаимодействия с полимерной фазой и равномерность распределения в объёме композита [218-220].

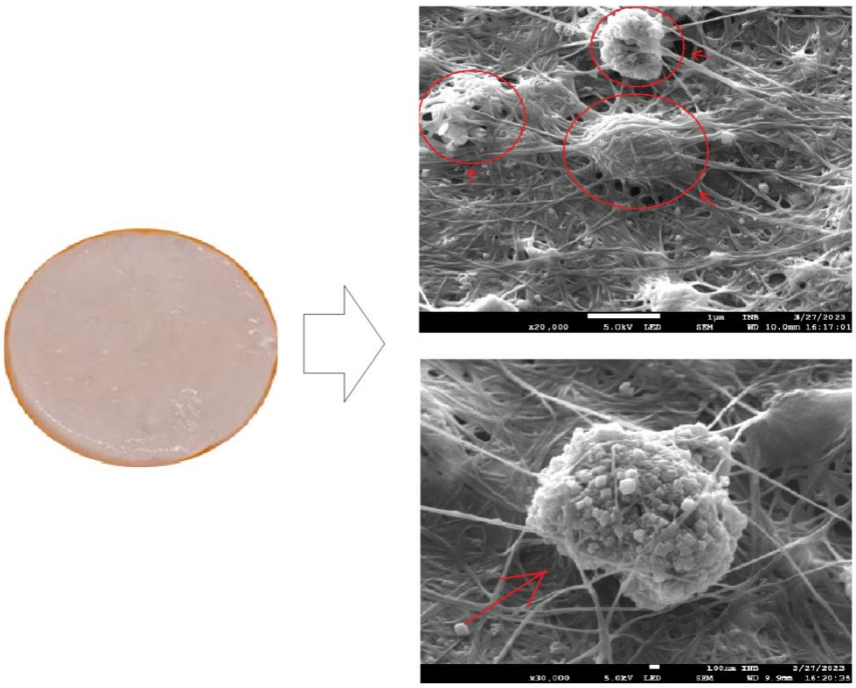


Рисунок 14 – Нано-гель-плёнка БЦ/ГАП, полученная методом *ex situ* и её микроструктура; агрегированные кластеры ГАП отмечены красным цветом

Однако в полученном этим способом материале БЦ/ГАП наблюдается агрегация частиц ГАП, формирующих кластеры различного размера (Рисунок 14). При этом снижается размер эффективной площади межфазного контакта ГАП с матрицей БЦ, что делает данный подход не подходящим. Неравномерное распределение частиц может затруднить внедрение дополнительного материала, снизить воспроизводимость свойств композита и ограничить эффективность интерфейсного взаимодействия компонентов.

В варианте *in situ* синтез БЦ осуществлялся в присутствии ГАП в питательной среде, при этом происходила его интеграция в формирующуюся гель-пленку в процессе статического культивирования. Т.е. в включение ГАП в волокна БЦ происходило в процессе их образования. По завершению биосинтеза полученные плёнки промывали деионизированной водой для удаления компонентов питательной среды, после чего подвергали обработке 5%-ным раствором $NaHCO_3$ в течение трёх суток в четыре этапа с поэтапным чередованием обработки раствором и промывки деионизированной водой (Рисунок 15).

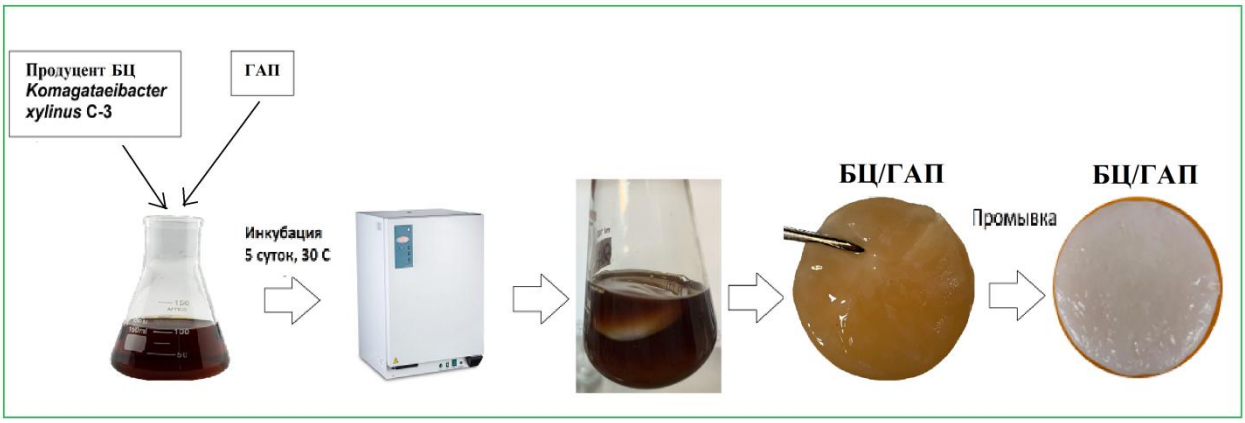


Рисунок 15 – Схема получения нано-гель-пленки БЦ/ГАП методом *in situ*

Включение ГАП в матрицу БЦ оценивалось гравиметрически (по изменению массы полученных образцов) (Рисунок 16).

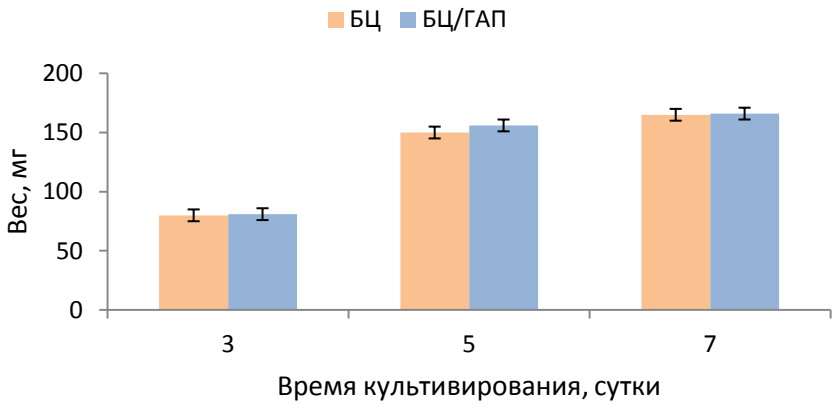


Рисунок 16 – Масса дегидратированной гель- пленки БЦ и БЦ/ГАП

Увеличение массы композита БЦ/ГАП свидетельствует об успешной интеграции неорганического компонента в БЦ. Оптимальным сроком культивирования для формирования композита является 5 суток, поскольку именно на этом этапе образуется менее плотная и более проницаемая структура БЦ. При дальнейшем удлинении периода культивирования (до 7 суток) матрица целлюлозы уплотняется, что ограничивает диффузию ионов ГАП.

Включение наночастиц ГАП в матрицу БЦ и их пространственное распределение были исследованы методом сканирующей электронной микроскопии (рисунок 17).

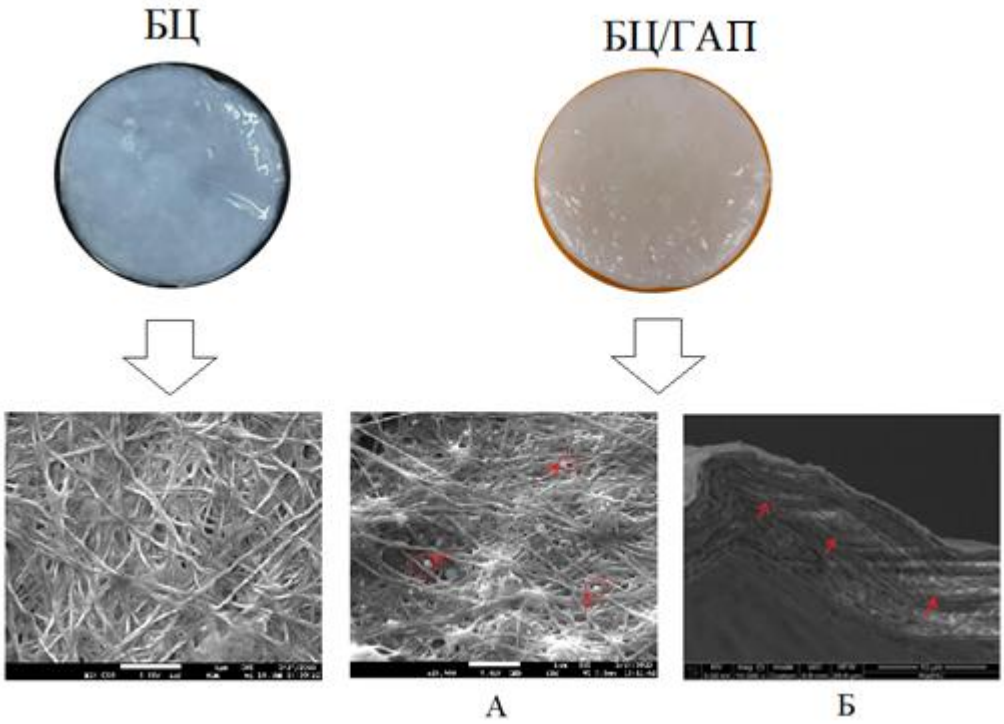


Рисунок 17 – Нано-гель-пленки БЦ и БЦ/ГАП и их СЭМ изображения, А – морфология поверхности, Б - морфология поперечного среза; наночастицы ГАП обозначены красным цветом

В результате со-культивирования БЦ с ГАП были получены гидрогелевые плёнки с нанофибриллярной трёхмерной структурой. Частицы ГАП располагаются как на поверхности фибрилл БЦ, так и в межфибриллярном пространстве (Рисунок 7В). Наблюдается различие в количестве и размерах кластеров наночастиц ГАП, адсорбированных на нижней и верхней поверхностях пленок, что связано с особенностями морфологии БЦ, формирующейся в процессе биосинтеза. Равномерное распределение ГАП в структуре БЦ, а также их размер являются важными факторами, определяющие однородность и воспроизводимость свойств полученного композита. Согласно данным СЭМ, размер наночастиц ГАП находится в диапазоне 50–100 нм, что соответствует нанометровому уровню. Такая дисперсность способствует улучшению взаимодействия ГАП с матрицей БЦ за счёт многочисленных межфазных контактов.

Учитывая эти недостатки, для дальнейшего этапа исследования был выбран композит, полученный методом *in situ*, в котором наблюдается равномерное распределение ГАП. Этот гибридный материал был исследован методом ИК-спектроскопии Фурье для подтверждения химического взаимодействия между БЦ и ГАП (рисунок 18).

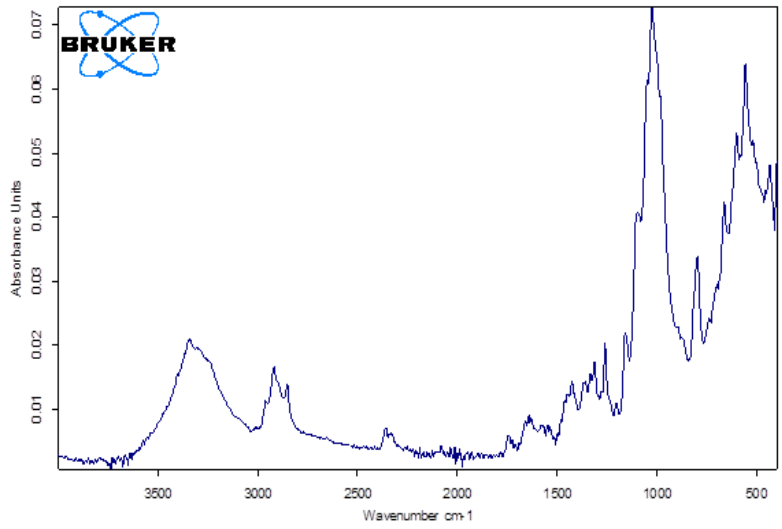


Рисунок 18 – ИК-спектр композита БЦ/ГАП

ИК-спектр двукомпонентной системы БЦ/ГАП демонстрирует совокупность характерных полос обоих компонентов, подтверждая их совместное присутствие в структуре. Широкая интенсивная полоса в области 3600–3200 $см^{-1}$ соответствует валентным колебаниям гидроксильных групп (О–Н), присутствующих в структуре БЦ, а также связанных с водой и гидроксильными группами ГАП. Слабые пики в диапазоне 2950–2850 $см^{-1}$ относятся к растяжению связей С–Н в метиленовых и метиновых группах целлюлозы, что подтверждает наличие полисахаридной матрицы. Полоса около 1640 $см^{-1}$ отражает деформационные колебания Н–О–Н адсорбированной воды. Наиболее информативные изменения наблюдаются в диапазоне 1200–900 $см^{-1}$, где фиксируются интенсивные полосы при 1030 и 960 $см^{-1}$, соответствующие симметричным (ν_1) и асимметричным (ν_3) валентным колебаниям фосфатных групп (PO_4^{3-}), характерным для ГАП. Дополнительные пики при 603 и 563 $см^{-1}$ относятся к деформационным колебаниям $\nu_4(PO_4^{3-})$, также типичным для фосфатных соединений кальция.

Наличие указанных полос подтверждает успешное включение частиц гидроксиапатита в структуру БЦ. При этом смещение полосы О–Н указывает на образование водородных связей между гидроксильными группами целлюлозы и фосфатными группами ГАП, что свидетельствует о хорошем межфазном взаимодействии между компонентами композита. Таким образом, данные FTIR-анализа подтверждают, что синтезированный материал БЦ/ГАП представляет собой композит с прочным взаимодействием между органической (БЦ) и неорганической (ГАП) фазами.

На следующем этапе получали трехкомпонентный материал БЦ/ГА/MXene. Для этого нано-гель-пленки БЦ/ГАП погружали в 2% коллоидный раствор MXene и инкубировали при комнатной температуре в течение 6 часов на орбитальном шейкере. Затем пленки промывали в

дистиллированной воде для удаления несвязавшихся наночастиц MXene (Рисунок 19).

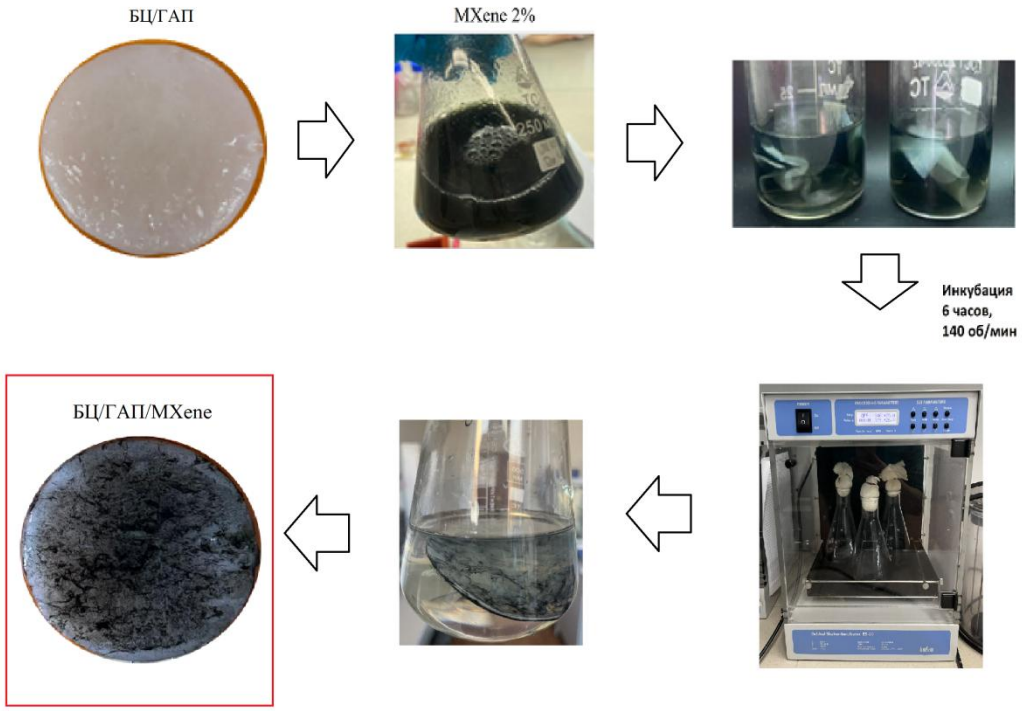


Рисунок 19 – Схема получения композитного материала БЦ/ГА/MXene путем комбинации *in situ* и *ex situ*

Однако, при формировании материала этим способом обнаружено неравномерное распределение MXene и формирование агрегатов на поверхности матрицы в виде тёмных скоплений, характерных для MXene. Что указывает на их недостаточную стабилизацию в полимерной среде (рис.19). Это может негативно влиять на равномерность распределения активных центров в композите, что, в свою очередь, способно снижать его антибактериальные свойства и ухудшать физико-механические характеристики. В частности, такие скопления могут препятствовать эффективному взаимодействию наночастиц с микробными клетками. Известно, что агрегированные частицы, например AgNPs, могут снижать антибактериальную активность по сравнению с отдельными частицами. Считается, что агрегация уменьшает площадь поверхности, что, вероятно, снижает эффективность высвобождения активных ионов Ag+ и взаимодействие с клеточной стенкой бактерий, приводя к ослаблению антимикробного эффекта. Это особенно актуально в физиологических условиях или в биопленках, где белки, соли и другие биомолекулы могут вызывать кластеризацию наночастиц [221, 222].

Возможно, наблюдаемая агрегация связана с тем, что в процессе инкубирования пленки БЦ/ГАП в коллоидном растворе MXene, расположенные на поверхности ГАП ионы Ca^{2+} высвобождаются из матрицы. В присутствии ионов кальция происходит частичная нейтрализация

отрицательного заряда MXene [223]. Это приводит к дестабилизации электростатического отталкивания между нанолистами MXene и их слипанию. Наряду с этим, MXene могут связываться с отдельными кластерам ГАП и оседать неравномерно на их поверхностях, формируя агломераты. Наночастицы ГАП и MXene обладают высоким сродством друг к другу и связываются за счет высокой поверхностной энергии и выраженными Ван-дер-Ваальсовыми и электростатическими взаимодействиями. Многочисленные терминальные концы (-F, =O, -OH) MXene связываются с активными гидроксильными группами (-OH) ГА, образуя водородные связи. Например, в работе [18], сообщается о сильном взаимодействии между ГАП и нанолистами MXene за счет водородных связей и сил Ван-дер-Ваальса. Существенную роль в этом комплексе играет присутствие ионов Ca^{2+}, которые благодаря высокому сродству к TiN_xO_γ [224] активно адсорбируются на поверхности MXene.

Таким образом, возникает необходимость разработки альтернативной стратегии, которая позволит сохранить равномерное распределение наностиц в матрице и минимизировать риск агрегации. В этом случае процесс получения композита был организован по другой схеме, при которой на первом этапе формировался устойчивый композит на основе наночастиц ГАП и MXene, а лишь затем полученная система вводилась в матрицу БЦ.

Несмотря на большую популярность ГАП, лишь несколько публикаций посвящены конструированию композитов ГАП/MX: создание имплантата для костной регенерации [18] и адсорбента ядерных отходов [153]. Согласно литературным данным, соотношение ГАП к MXene в композитных материалах варьируется от 5% до 80%. Композиты с соотношением 10:90 (ГАП/MXene) нашли применение в области костной инженерии благодаря своей биосовместимости и остеокондуктивности, тогда как соотношение 60:40 (ГАП/MXene) рассматривалось с позиции повышения стабильности структуры MXene. Такое соотношение использовалась и в данной работе. Для этого в 4 мл коллоидного раствора MXene добавляли 40,6 мг ГАП. Эту взвесь выдерживали на магнитной мешалке 2 ч для достижения равномерного распределения компонентов. Твердую фазу отделяли от дисперсионной среды и высушивали до постоянной массы. Контакт между ГАП и MXene происходит преимущественно за счёт высокой поверхностной энергии и совокупности Ван-дер-Ваальсовых и электростатических взаимодействий, что обеспечивает их эффективное связывание [153]. Функциональные группы поверхности MXene (–F, =O, –OH) активно взаимодействуют с гидроксильными концами (–OH) ГАП, формируя сеть водородных связей. Помимо этого, важную роль в формировании данного комплекса играет наличие ионов Ca^{2+}, которые, обладая высоким сродством к TiN_xO_γ [225], активно адсорбируются на поверхности MXene.

Параллельно осуществлялся синтез БЦ по традиционной методике в процессе статического культивирования, как описано в разделе 3.1.1.1. На втором этапе готовые гель-пленки БЦ погружали в 3% раствор ГА/MXene и

инкубировали на орбитальной шейкере, после чего образцы тщательно промывали дистиллированной водой для удаления несвязанных наночастиц. Схема получения композита БЦ/ГАП/MXene этим способом представлена на рисунке 20.

При использовании данного подхода был получен однородный композит БЦ/ГАП/MXene без признаков агрегации на поверхности матрицы. При предварительном синтезе ГАП/MXene частицы ГАП осаждаются на поверхности MXene и экранируют активные группы (–O, –OH, –F). Это уменьшает прямой контакт свободного $Ti_3C_2T_x$ с ионами Ca^{2+}, что исключает дальнейшую их коагуляцию [223]. После интеграции гибридного материала ГАП/MXene в БЦ масса образца увеличилась на 5%. Это указывает на успешное насыщение матрицы комплексом ГАП/MXene.

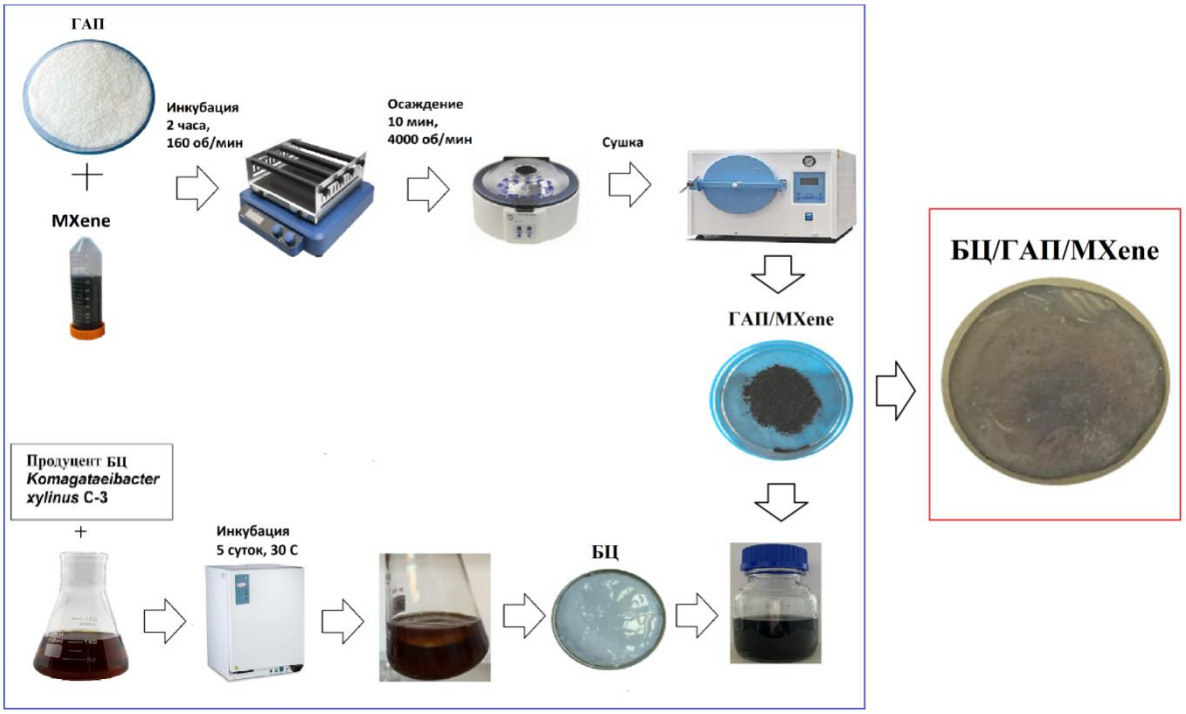


Рисунок 20 – Схема получения композита БЦ/ГАП/MXene методом *ex situ*

Полученный этим способом композит БЦ/ГАП/MXene был исследован сканирующей электронной микроскопией (Рисунок 21).

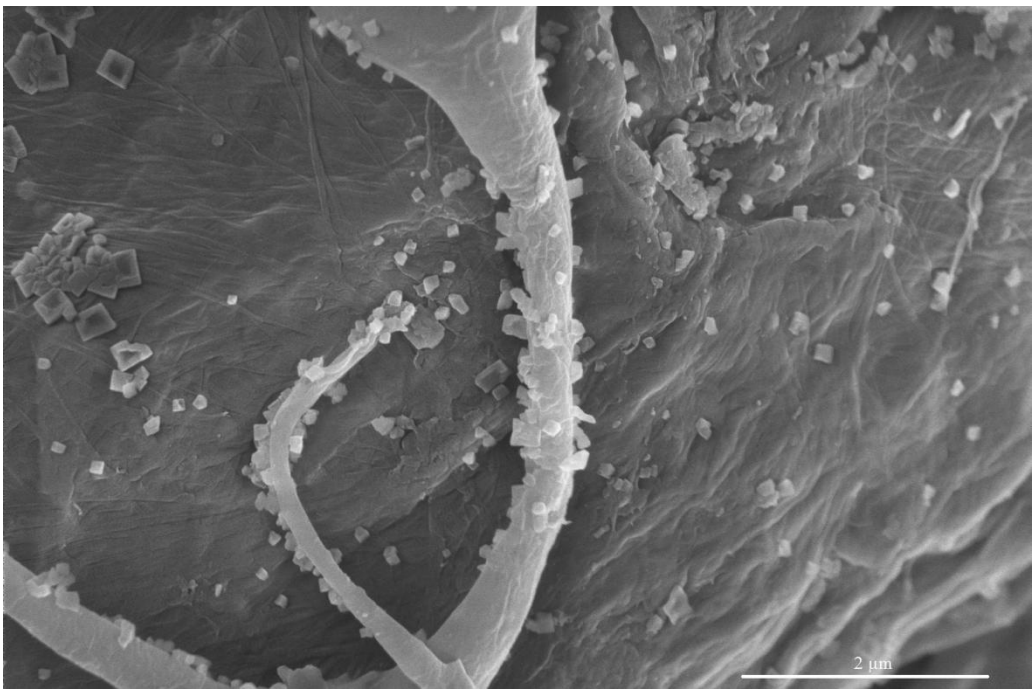


Рисунок 21 – СЭМ-изображения поверхности композита БЦ/ГАП/MXene

На микрофотографиях (Рисунок 21) наблюдается характерная для БЦ трёхмерная нанофибриллярная структура, формирующая плотную сетчатую сеть. На поверхности волокон БЦ отчётливо просматриваются включения ГАП и MXene. Наноструктуры ГАП преимущественно имеют сферическую форму и прочно зафиксированы в целлюлозной матрице. Введение MXene привело к появлению тонких пластинчатых структур, плотно сопряжённых с волокнами БЦ и частицами ГАП. Они расположены преимущественно вдоль фибрилл БЦ, формируя локальные скопления без образования крупных конгломератов. Такой характер распределения указывает на эффективные межфазные взаимодействия между гидрофильными группами БЦ и функциональными терминальными группами $Ti_3C_2T_x$ (–OH, –O, –F), описанные ранее для гибридов MXene с полисахаридами [14]. Подобная организация усиливает экспонирование активной поверхности MXene, что важно для антибактериальных и адсорбционных свойств композита.

Наногибридный материал БЦ/ГАП/MXene был исследован методом ИК-спектроскопии Фурье для подтверждения химического взаимодействия между наноматериалами (рисунок 22).

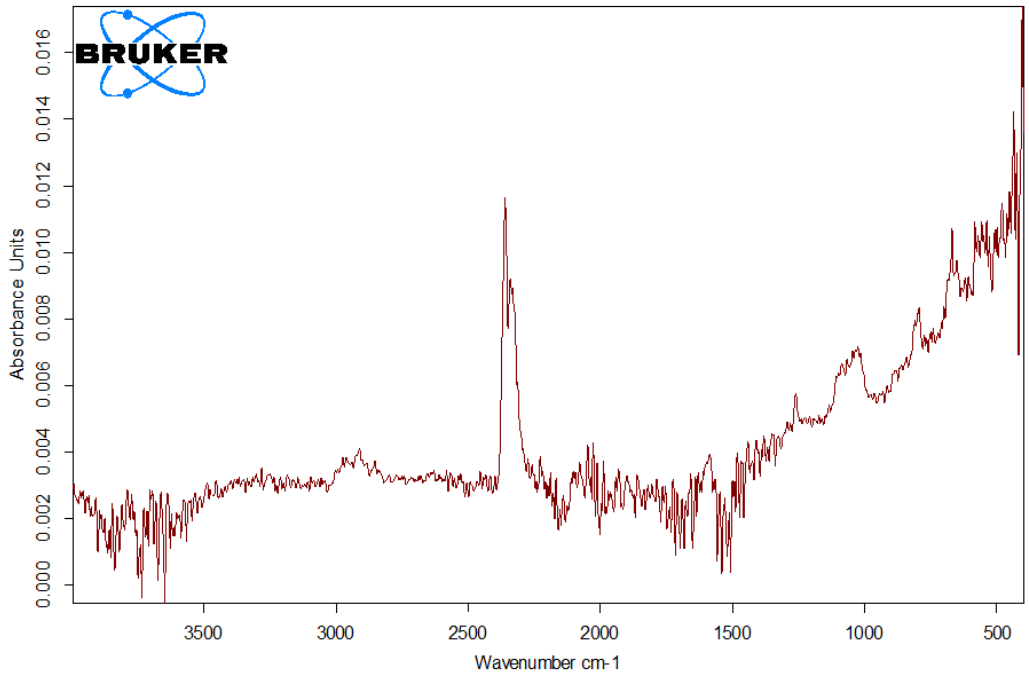


Рисунок 22 – ИК-спектр композита БЦ/ГАП/MXene

ИК-спектр комплекса БЦ/ГАП/MXene демонстрирует совокупность полос поглощения, характерных для всех трёх компонентов. Широкая интенсивная полоса в области 3300–3400 $см^{-1}$ соответствует валентным колебаниям гидроксильных групп (O–H), присутствующих как в структуре целлюлозных волокон, так и на поверхности MXene и ГАП. Слабовыраженная полоса при ~2900 $см^{-1}$ обусловлена колебаниями связей C–H в глюкозных звеньях БЦ. Выраженный пик при ~1030–1090 $см^{-1}$ соответствует валентным колебаниям фосфатных групп (PO_4^{3-}) ГАП, что свидетельствует о включении минеральной фазы в матрицу БЦ. Дополнительные полосы при ~560–600 $см^{-1}$ связаны с деформационными колебаниями PO_4^{3-}, характерными для кристаллического ГАП. В области ~600–800 $см^{-1}$ наблюдаются полосы, соответствующие колебаниям Ti–O и Ti–C, что указывает на присутствие MXene в композите. Отсюда следует, что совокупность характерных полос поглощения подтверждает успешное сочетание органической матрицы БЦ с неорганическими компонентами ГАП и MXene.

Таким образом, основываясь на природе БЦ, ГА и MXene и данных, представленных в литературе, можно заключить, что создание композита БЦ/ГА/MXene опиралось на принципы взаимодействия, реализованные в ранее изученных системах БЦ/ГА, БЦ/MXene и ГА/MXene. В сборке композита БЦ/ГА ключевую роль в формировании прочных взаимодействии играют водородные связи между гидроксильными группами БЦ и ионной поверхностью ГАП. Подобные связи формируются и между БЦ и MXene вследствие водородных и электростатических контактов между гидроксильными группами БЦ и терминальными концами MXene (–OH, –O,

–F). Кроме того, функциональные группы MXenes взаимодействуют как с БЦ, так и с ГАП. В связи с тем, что MXene склонен к окислению, рационально рассматривались два возможных пути формирования композита. В первом случае при последовательном включении наночастиц ГАП и MXene в БЦ наблюдалась их агрегация на матрице, что существенно снижало бы функциональные возможности материала, поэтому данный метод был признан неэффективным. Во втором случае процесс получения композита был организован по другой схеме. Согласно ей, сначала был получен устойчивый комплекс БЦ/ГАП, который впоследствии был внедрен в матрицу БЦ. Такой подход позволил обеспечить более равномерное распределение компонентов и избежать их агрегации.

3.2 Исследование физическо-химических свойств композитных материалов

3.2.1 Структурные особенности композитных материалов

Комплексное изучение структурных параметров композита БЦ/ГАП/MXene позволяет раскрыть особенности его формирования, оценить распределение фаз и определить характер межфазного взаимодействия. Эти параметры определяют физико-химические свойства, механическую устойчивость и биологическую активность материалов, что имеет ключевое значение при разработке эффективных раневых покрытий. Стабилизирующие свойства ГАП были изучены в составе композита БЦ/ГАП/Mxene путем сопоставления его характеристик с системой БЦ/Mxene. Такое сравнение позволяет выявить роль ГАП в повышении устойчивости MXene к окислению и оценить влияние взаимодействия между компонентами на структурную целостность композита. Для этого были изучены химический состав и поверхностные состояния элементов в композитах методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии высокого разрешения (HR-XPS). Данный метод позволяет установить типы химических связей, степень окисления элементов и особенности их взаимодействия в поверхностных слоях материала. Полученные результаты проясняют межфазные взаимодействия в композитах БЦ/MXene и БЦ/ГА/MXene (рис. 23, таблица 5).

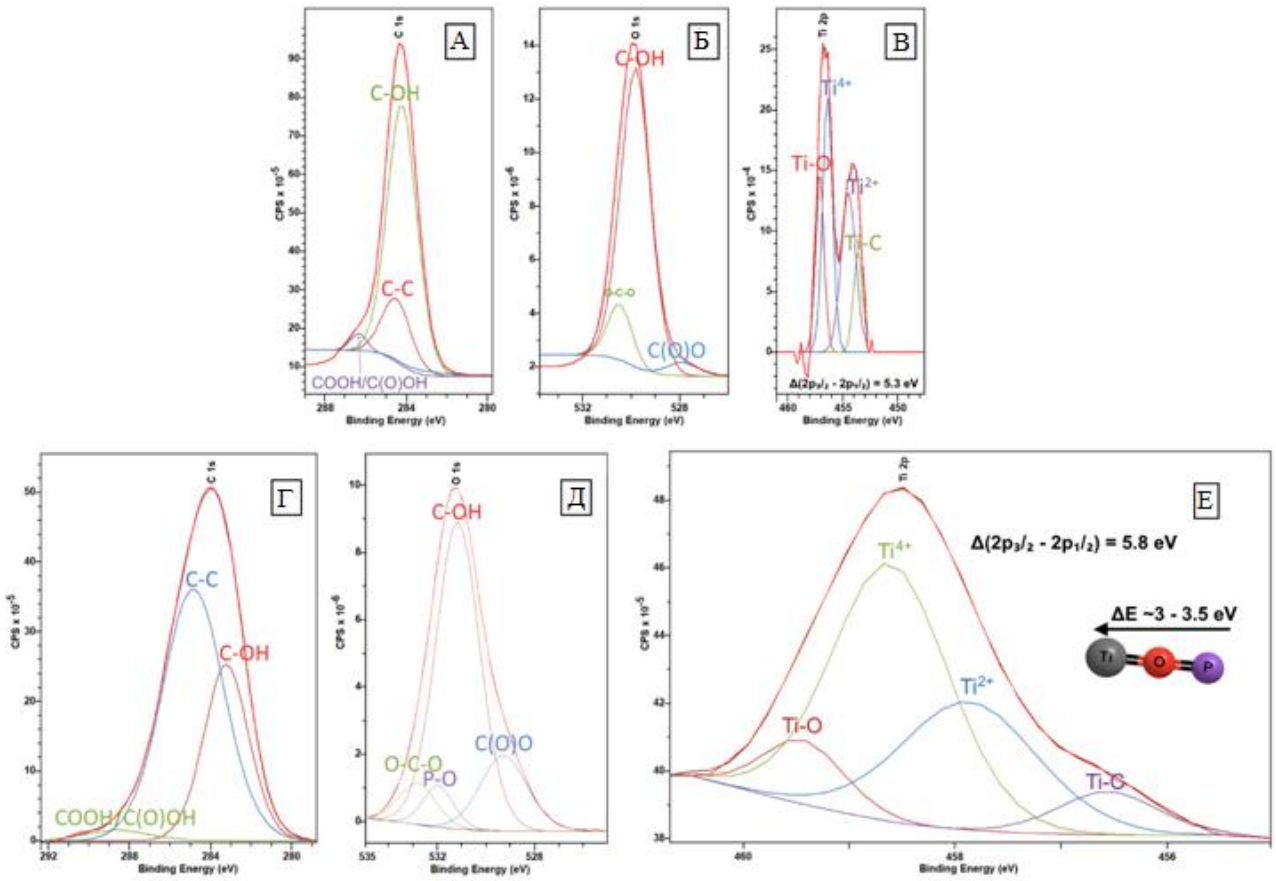


Рисунок 23 – Спектры рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии высокого разрешения А - C 1s, Б - O 1s и В – Ti 2p для БЦ/MXene, и Г – C 1s, Д – O 1s, и Е – Ti 2p для композита БЦ/ГАП/MXene

Спектры C 1s БЦ/MXene (рис. 23, А) показывают характерные пики при 284,8 эВ (C-C, углерод sp^2/sp^3 MXene, при 284,3 эВ (C-OH, гидроксильные группы) и при 286,0 эВ (C=O/COOH). В случае БЦ/ГАП/MXene (рис. 23, Г) наблюдаются те же компоненты, но с незначительными сдвигами интенсивности, что указывает на сохранение углеродных состояний MXene при изменённой электронной среде вследствие взаимодействия с ГА.

Спектры O 1s БЦ/MXene (рисунок 23, В) показывают вклады C-OH (529,9 эВ), C=O (528,0 эВ) и O-C-O (530,5 эВ) [226]. В БЦ/ГАП/MXene (рис. 2Д) наблюдается чёткая особенность вблизи 532,0 эВ, характерная фосфатному кислороду (P-O) из ГАП [227], что подтверждает его интеграцию. Изменения интенсивности при 529,2 эВ указывают на усиление гидроксильных взаимодействий.

Развернутые спектры Ti 2p как для БЦ/MXene, так и для БЦ/ГАП/MXene (рис. 2i В, Д) выявляют четыре основных компонента: связь Ti–C основной цепи карбида MXene (453,7 эВ) [228] вместе с видами Ti^{2+} (~454,8 эВ), Ti^{4+} (~456,2 эВ) и Ti-O (~457,2 эВ) [229]. Появление пика Ti-O указывает на образование поверхностных оксидов титана и/или терминальных групп (-OH, -O).

Таблица 5 – Состав поверхности XPS и расположение линий пиков, соответствующих полученным спектрам

Композитный /линейный	БЦ/MXene	Энергия связи [эВ]	БЦ/ГАП/MXene	Энергия связи [эВ]
C 1s	C-O-H	284.3	C-O-H	283.1
	C-C	284.8	C-C	284.9
	C=O/COOH	286.0	C=O/COOH	288.6
O 1s	C-O-H	529.9	C-O-H	531.2
	O-C-O	530.5	O-C-O	532.9
	C(O)O	528.0	C(O)O	529.3
	P-O	-	P-O	532.0
Ti 2p	Ti^{4+}	456.2	Ti^{4+}	459.1
	Ti^{2+}	454.8	Ti^{2+}	458.3
	Ti-C	453.7	Ti-C	456.9
	Ti-O	457.2	Ti-O	460.0

Положительный сдвиг линии Ti 2p на 3,0–3,5 эВ в композите БЦ/ГАП/MXene указывает на системное изменение локальной электростатической среды на поверхности MXene, что согласуется с формированием интерфейсного диполя или изменением работы выхода при взаимодействии с гидроксиапатитом. Эта интерпретация подтверждается небольшим увеличением спин-орбитального расщепления с 5,3 до 5,8 эВ, что свидетельствует об усилении поляризации. Важно отметить, что ГАП, по-видимому, модулирует процесс окисления, а не предотвращает его полностью. Снижение интенсивности сигнала Ti–C указывает на частичное окисление MXene, однако формирование интерфейсных координационных связей Ti–O–P с фосфатными группами гидроксиапатита стабилизирует образующиеся окисленные состояния титана. Этот механизм стабилизации, дополненный доказательством успешной химической интеграции с помощью ИК-Фурье спектроскопии (Рисунок 22), позволяет композиту сохранять функциональные окислительно-восстановительные активные участки, что, как ожидается, будет способствовать устойчивой антибиопленочной активности материала.

Рентгеновская дифрактограмма чистой БЦ (красная кривая) демонстрирует типичные для целлюлозы I отражения при 2θ = 14,3° ($(\bar{1}10)$), 16,6° ((110)) и 22,5° ((200)), это согласуется литературными данными [230]. Наличие этих пиков указывает на выраженную степень кристалличности БЦ и хорошо упорядоченную структуру микрофибрилл. Наиболее выраженный пик при ~22,5° ((200)) соответствует межцепочечным расстояниям в упорядоченных слоях целлюлозы и отражает степень её кристалличности. Дифрактограмма композита БЦ/MXene (синяя) демонстрирует сохранение кристаллической структуры БЦ. Однако пики БЦ демонстрируют небольшое

расширение и сдвиг в сторону больших углов (например, пик (200)), это указывает на уменьшение размера кристаллитов и сжатие элементарной ячейки БЦ из-за межфазного напряжения, вызванного включенным MXene.
На присутствие MXene указывают малоинтенсивные, широкие пики при ~10,4° (002) и ~35,7° (111), что соответствует низкой массовой доле (~5 мас.%) и частично неупорядоченной или расслоенной структуре.

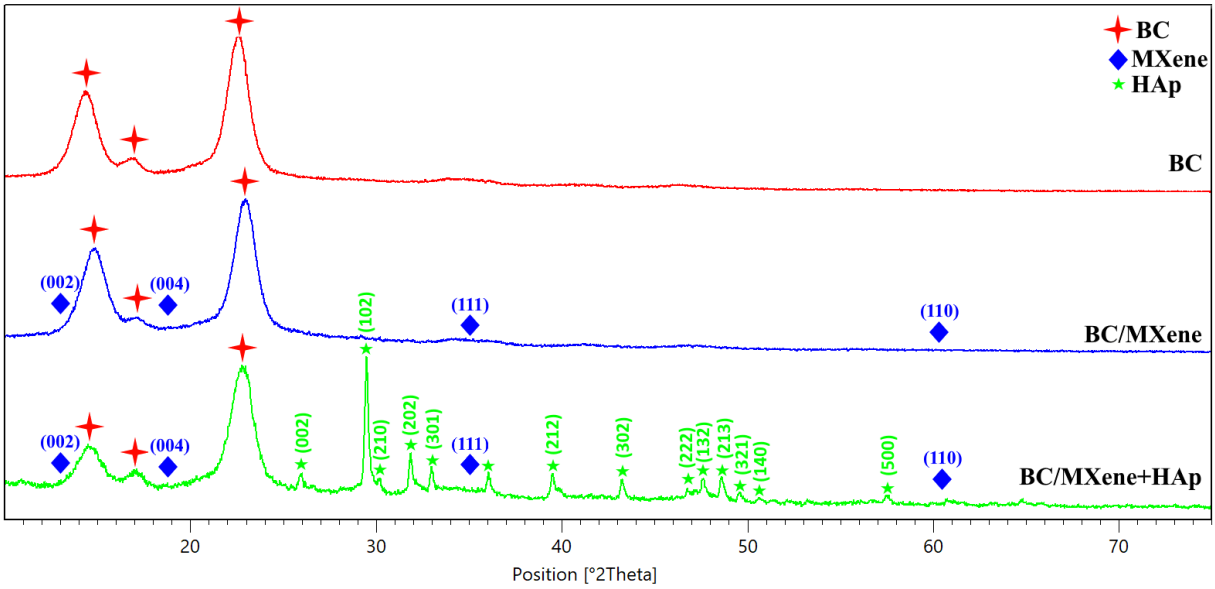


Рисунок 24 – Рентгеновские дифракционные картины (XRD) чистой бактериальной целлюлозы (БЦ), БЦ/MXene и композитов БЦ/ГА/MXene

Дифракционная картина тройного композита БЦ/ГА/MXene (зелёный) характеризуется многочисленными острыми, хорошо выраженными дифракционными пиками, относящимися исключительно к высококристаллической фазе ГАП. Ключевые отражения ГАП (JCPDS #09-0432) наблюдаются при 2θ = 25,9° (002), 31,8° (211), 32,9° (300) и 34,0° (202). При этом характерные пики БЦ остаются различимыми, хотя их интенсивность частично перекрываются дифракционными сигналами ГАП, что может свидетельствовать о равномерном распределении неорганической фазы в органической матрице.

3.2.2 Морфология и микроструктура композитных материалов

Структурно-морфологические характеристки исследуемых образцов БЦ/MXene и БЦ/ГАП/Mxene была исследована методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с ЭДС-анализом и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с применением картирования распределения элементного состава по исследуемой поверхности.

Микрофотография БЦ/Mxene с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) представлена на рисунке 25.

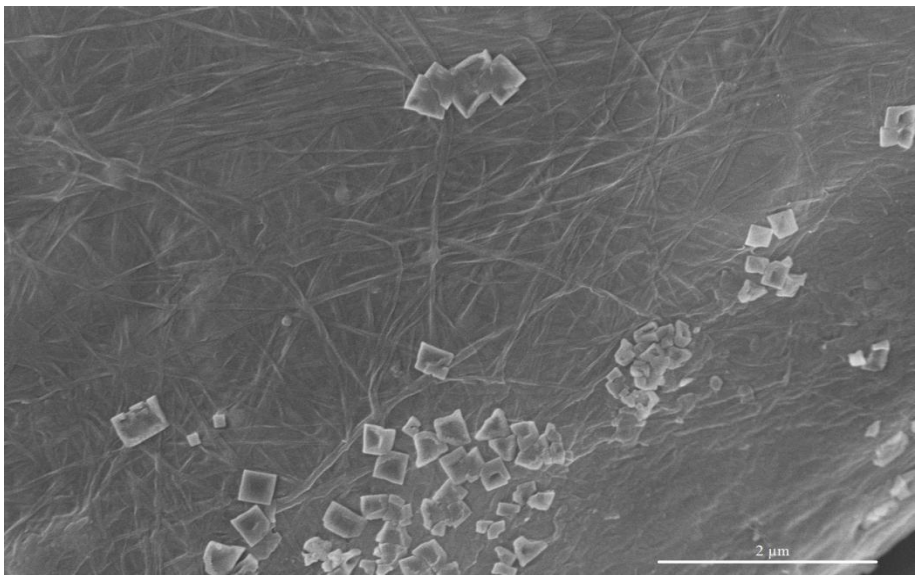


Рисунок 25 – СЭМ-изображения поверхности композита БЦ/MXene

СЭМ-изображение поверхности композита БЦ/MXene демонстрирует сохранённую нанофибриллярную структуру БЦ. На поверхности матрицы отчётливо видны пластинчатые фрагменты $Ti_3C_2T_x$-MXene размером около 85–290 нм, распределённые кластерами вдоль нановолокон БЦ. Ранее аналогичная пространственная организация в гибридных плёнках БЦ/MXene описана в работе Мао и соавт., где подобная морфология обеспечивала усиление электропроводящих и адсорбционных свойств [108].

Фотография СЭМ микроструктуры композита БЦ/ГАП/Mxene представлена на рисунке X в разделе 3.2. Согласно этим данным, композит БЦ/ГАП/MXene характеризуется развитой нанофибриллярной структурой с включениями ГАП и нанопластинами MXene размером 80–285 нм. Оба компонента равномерно внедрены в матрицу БЦ без формирования крупных агрегатов.

Для подтверждения состава и распределения элементов в материалах была проведена энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДС) (таблица 6).

Таблица 6 – Результаты анализа ЭДС

Элемент	C	O	F	Na	P	Ca	Ti	Fe
БЦ/MXene (мас. %)	43.5	54.7	0.0	0.2	0.0	0.0	1.4	0.2
БЦ/ MXene+ГА (wt. %)	41.8	54.2	0.0	0.4	0.6	1.2	1.4	0.4
Чистые кластеры ГАП (мас. %)	0.5	41.0	0.0	0.5	18.5	39.5	0.0	0.0

Анализ ЭДС подтверждает фазу ГАП по высоким сигналам Ca, P и O (атомное соотношение Ca/P ≈ 1,65) и идентифицирует богатую титаном фазу MXene (Ti_3C_2Tx) по высокому содержанию Ti и связанному с ним F [231]. ЭДС подтверждает отсутствие Ca и P, в то время как карты элементов и точечный анализ показывают однородную совместную локализацию титана (MXene) в матрице. Этот анализ подтверждает целевые различия в составе: тройной композит сочетает в себе различные частицы ГАП с MXene в матрице БЦ, в то время как двойной композит образует однородную структуру MXene/БЦ.

Структурная организация и особенности взаимодействия фаз в композите БЦ/ГАП/MXene были изучены с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Полученные данные ПЭМ подтверждают наличие связей между компонентами композита и раскрывают его иерархическую структуру. На композитном FIB срезе визуализируется ламеллярная структура БЦ/MXene с внедренными частицами ГАП (размер агрегатов 200 – 500 нм) (Рисунок 26, А). Прилагаемая карта EDS демонстрирует пространственное распределение кальция (зеленый), локализованного в областях ГАП, и углерода (красный), доминирующего в матрице БЦ/MXene.

Изображения, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (HRTEM) (рис. 26, Б, В), позволяют различить кристаллические границы решетки наночастиц ГАП (диаметром 50–200 нм), состоящих из более мелких нанокристаллов (10–20 нм). Результаты электронной дифракции (SAED), проиндексированные вдоль оси зоны [1100] гексагонального ГАП (ICSD 98-026-1063), свидетельствуют о высокой фазовой чистоте материала и наличии предпочтительной кристаллографической ориентации кристаллитов. Общая архитектура композита: наночастицы ГАП, закреплённые на границе раздела БЦ/MXene. Результаты элементного картирования (EDS) демонстрируют успешное сочетание фаз при их чётком пространственном разделении: области, обогащённые Ca, соответствуют фазе ГАП, тогда как зоны с повышенным содержанием C — матрице MXene, что подтверждается инверсным характером распределения сигналов Ca и C.

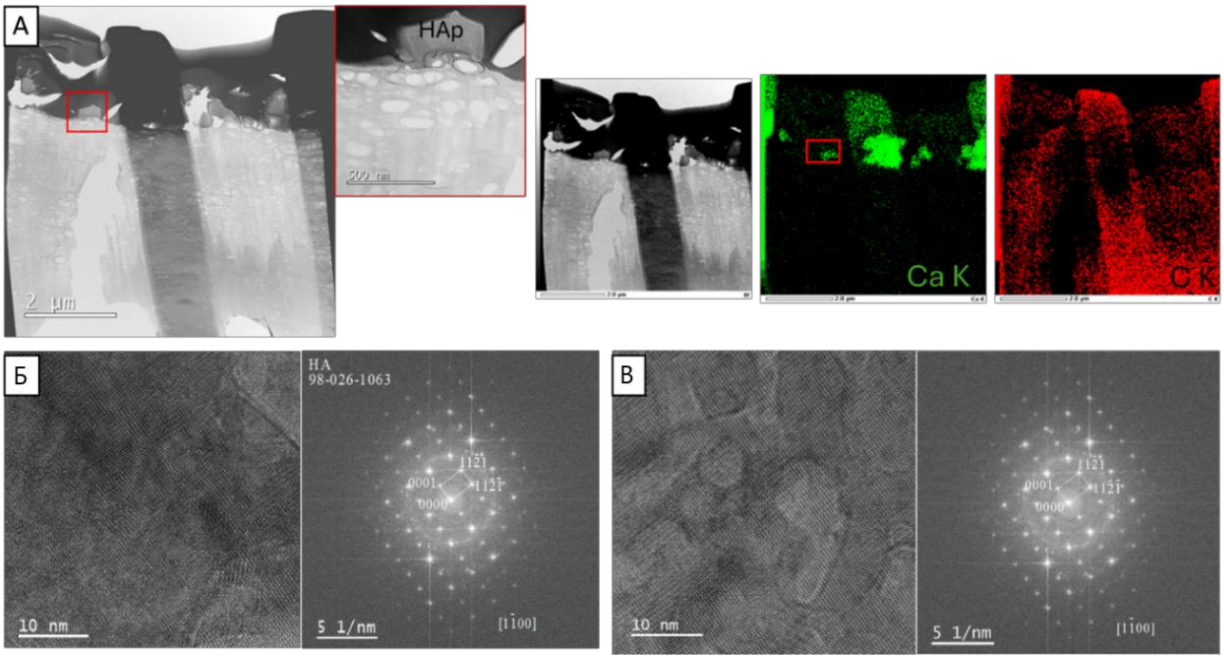


Рисунок 26 – Анализ композита БЦ/ГАП/MXene с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). А – Поперечное сечение композита БЦ/ГАП/MXene, полученное методом FIB, демонстрирующее его интерфейс и внутреннюю ламеллярную структуру, сопровождаемое картой EDS. Б – Подробные ПЭМ-изображения наночастиц ГАП и композитной матрицы с соответствующими картинами дифракции электронов в выбранной области (SAED) (В).

В дополнение к данным HRTEM и SAED выполнено исследование микроструктуры композита методом высокоразрешающей просвечивающей электронной микроскопии в светлом поле BF-TEM в сочетании с элементным картированием EDS (рисунок 27). Изображения, полученные с помощью (BF-TEM в сочетании с элементным картированием EDS нанокомпозита БЦ/ГАП/MXene, свидетельствуют о внедрении ГАП в слоистую структуру $Ti_3C_2T_x$MXene.

MXene имеет характерную пластинчатую морфологию с видимыми зазорами расслоения. В пустоте между слоями расположена овальная наночастица гидроксиапатита длиной приблизительно 45–55 нм.

Соответствующие карты EDS (рисунок 5) отображают пространственное распределение ключевых элементов: Титан (Ti K, желтый) равномерно распределен по всей матрице, богатой MXene, но отсутствует в области частиц ГАП; Сигналы углерода (C K, красный) и кислорода (O K, голубой) широко распространены и исходят как от БЦ, так и от MXene; Сигнал фтора (F K, зелёный) обнаружен исключительно в MXene, что подтверждает наличие - F концевых групп, характерных для MXene, протравленного комплексом HCl-LiF.

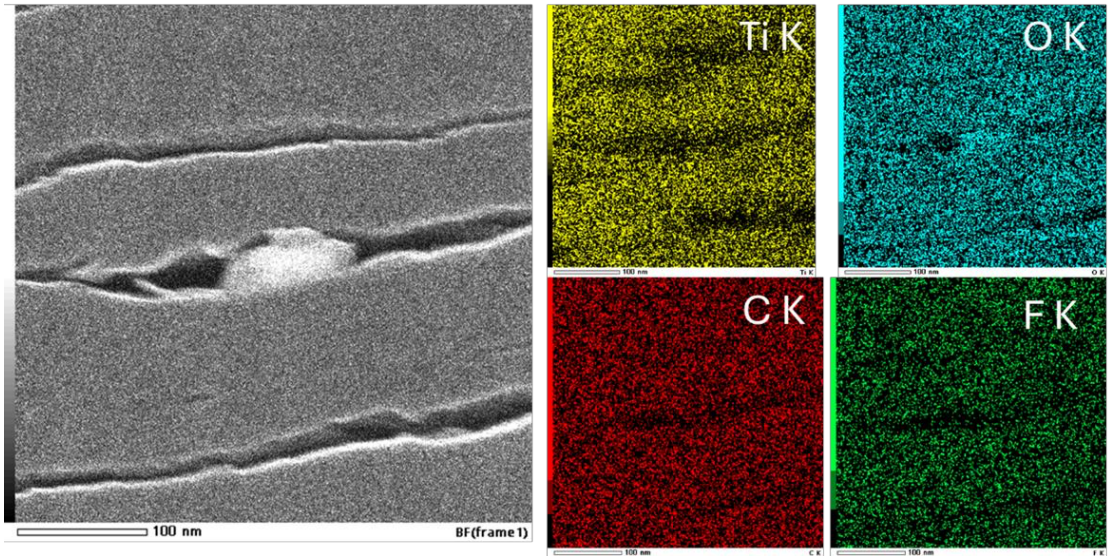


Рисунок 27 – Изображение композита БЦ/ГА/MXene, полученное методом электронно-лучевой электронной микроскопии (BF-TEM), демонстрирующее распределение наночастиц гидроксиапатита в матрице. Соответствующая карта элементного состава, полученная методом EDS

Таким образом, совокупность данных СЭМ, ПЭМ в режиме BF-TEM и EDS-картирования свидетельствует об успешной интеграции обоих неорганических компонентов в матрицу БЦ. ГАП локализован в межслоистых интервалах и сохраняет характерный элементный состав, тогда как MXene образует непрерывные пластинчатые домены с сохранёнными терминальными –F-группами. Такая трёхкомпонентная наноархитектура свидетельствует о формировании стабильного композита с равномерным распределением фаз и чётким структурным разграничением между ними. Эти особенности структуры служат важным подтверждением успешности выбранной стратегии синтеза композитного материала.

3.2.3 Исследование механических свойств композиционных материалов

Физико-механические характеристики являются ключевым параметром при разработке материалов для раневых повязок. Повязка должна быть прочной и эластичной, обеспечивать комфорт пациенту и сохранять свои функции без повреждений или деформаций. Кроме того, механические характеристики способствуют равномерному распределению давления на поверхность раны, обеспечивая эффективное взаимодействие с кожей и тканями, а также поддерживая барьерные функции материала. Поэтому оценка прочности является необходимым этапом при исследовании композитов, предназначенных для применения в медицине.

Механическую прочность пленок определяли на универсальной разрывной машине «Instron» при одноосном режиме по показателям прочности на разрыв (МПа), удлинение (%) при растяжении. Для этого

готовили образцы БЦ в виде полосок 3 мм в ширину. Испытания проводили при температуре (25±2) оС и относительной влажности (55±5) %, при скорости деформирования образца 100 мм/мин (Рисунок 28).

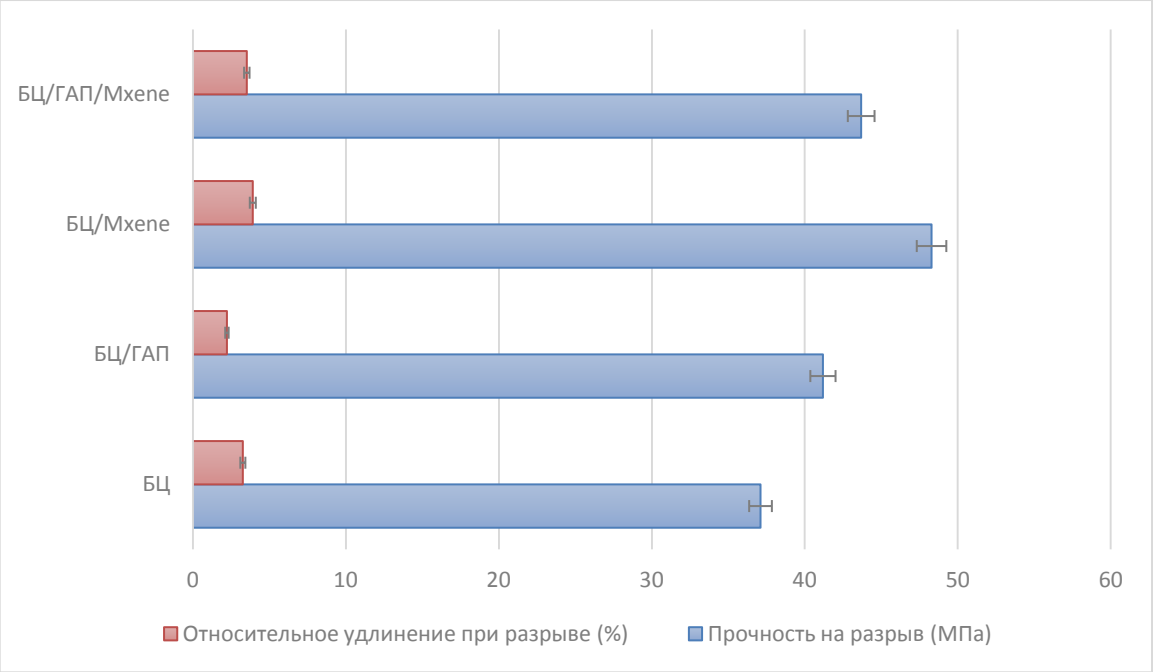


Рисунок 28 – Механические свойства гель-пленок БЦ и композитов

Бактериальная целлюлоза благодаря своей нанофибрилярной структуре сочетает высокую механическую прочность и эластичность, что делает её перспективным материалом для модификации. По результатам механических испытаний, чистая бактериальная целлюлоза демонстрирует относительно высокую прочность на разрыв (37,12 МПа) и умеренное относительное удлинение при растяжении (4%), что согласуется с известными данными о нативной БЦ [232]. Включение ГАП приводит к увеличению прочности композита до 41,2 МПа, однако сопровождается заметным снижением удлинения. В работе Sknepnek и соавт. сообщается, что включение минеральных частиц, таких как ГАП может ослаблять межфибриллярные водородные связи БЦ. Они играют ключевую роль в обеспечении эластичности БЦ, что и приводит к снижению ее удлинения [233]. Напротив, MXene оказывает более выраженный эффект. Прочность композита БЦ/MXene увеличивается до 48 МПа, что значительно превосходит показатели чистой БЦ. Подобный рост прочности объясняется сильными межфазными взаимодействиями между функциональными группами MXene (–O, –OH, –F) и гидроксильными группами целлюлозы. Ma и др. [234] экспериментально продемонстрировали существование сильной химической адсорбции и взаимодействия водородных связей между БЦ и $Ti_3C_3T_x$MXene, обеспечивающих высокую стабилизацию композитных плёнок. Авторы также разработали носибельную ультратонкую плёнку БЦ/MXene со структурой Януса, для которой была получена рекордно высокая прочность

на разрыв до 532,87 МПа. Этот результат согласуется с предыдущими исследованиями MXene-основанных нанокомпозитов, показывающих, что MXene обладает выраженным армирующим эффектом и способен существенно повышать механическую прочность полимерных матриц [235]. В трёхкомпонентном гибриде БЦ/ГАП/MXene наблюдается повышение прочности на разрыв до 43 МПа при одновременном увеличении относительного удлинения до 8 %, что можно объяснить комбинированным армирующим действием ГАП и MXene. Это согласуется с литературными данными о нанокомпозитах на основе БЦ, в которых включение ГАП приводит к усилению несущей способности материала за счёт более эффективного перераспределения напряжений в нановолокнистой матрице БЦ [16]. Более выраженный вклад в упрочнение, вероятно, вносит MXene. Согласно данным Мао и соавт., MXene способен усиливать механические свойства ультратонких плёнок БЦ за счёт сильной химической адсорбции и развитой системы водородных связей между функциональными группами MXene и гидроксильными группами БЦ [108]. В обзорных данных по MXene-полимерным нанокомпозитам, $Ti_3C_2T_x$MXene рассматривается как высокоэффективный армирующий наполнитель, существенно повышающий прочность и модуль упругости за счёт своей ламеллярной морфологии и развитых межфазных взаимодействий [48]. Однако, высокая концентрация MXene (>2%) может вызвать некоторую перестройку цепей, что в конечном итоге приводит к снижению механической прочности [108].

Таким образом, MXene является основным фактором повышения прочности, обеспечивая значительное армирование структуры БЦ, тогда как ГАП вносит вклад в жёсткость, но снижает гибкость пленки. Включение в структуру ГАП/MXene увеличивает прочность на 18% (43 МПА), а удлинение на 8%. Высокий показатель удлинения при разрыве обеспечивает хорошую эластичность БЦ, что очень важно для медицины. Эластичная повязка, хорошо облегающая место раны, является хорошей защитой от внешней инфекции.

3.2.4 Поверхностные и сорбционные свойства композитных материалов

Заживление ран происходит примерно на 50 % быстрее во влажной среде, чем в сухой [236]. Создание благоприятных увлажнённых условий для регенерации тканей способствует более быстрому восстановлению тканей, уменьшению болевых ощущений и снижению затрат пациента на лечение. В этой связи использование гидрофильных материалов, способных поглощать влагу и сохранять влажность в области раневой поверхности, является важным направлением при создании перевязочных средств.

Для оценки гидрофильных свойств исследуемых композитных материалов было проведено измерение угла контакта образцов с водой (Рисунок 29). Контактный угол служит важным параметром для характеристики гидрофильности поверхности материала: чем меньше

значение угла (≤ 90°), тем выше способность материала взаимодействовать с водой. По этой причине в качестве перевязочных материалов предпочтительно использовать покрытия с низким углом смачивания, обеспечивающие оптимальную влажность и ускоренное заживление раневой поверхности.

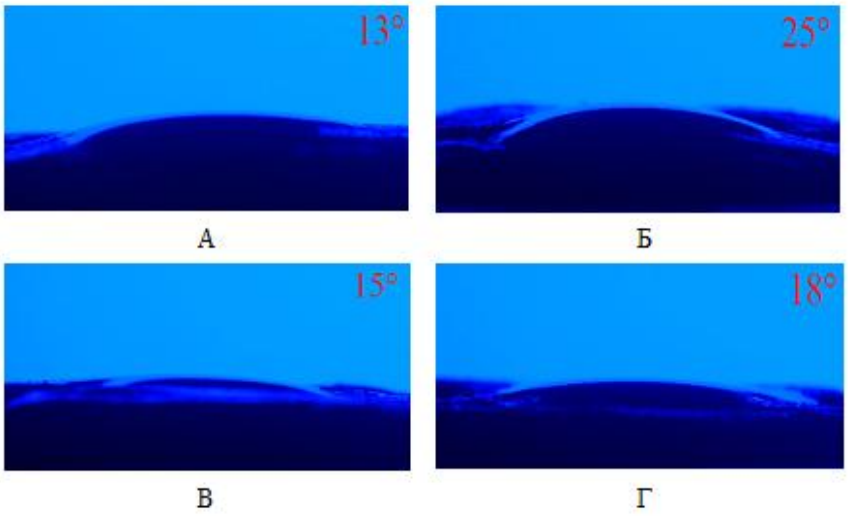


Рис – 29 Угол контакта композитных материалов с водой. А - БЦ; Б – БЦ/ГАП; В - БЦ/Mxene; Г – БЦ/ГАП/Mxene

Согласно результатам измерения угла контакта (рисунок 29А), наименьшее значение было зарегистрировано у нативной БЦ и составило 13°. БЦ является гидрофильным полимером с полярными гидроксильными группами в молекулярной цепи. Добавление ГАП в БЦ увеличивает контактный угол до 25°, что связано с включением кристаллических частиц ГАП, обладающих менее выраженной гидрофильностью по сравнению с БЦ. Включение MXene в матрицу БЦ незначительно увеличивает угол до 15°, что указывает на умеренное влияние MXene на смачиваемость материала. Наконец, тройной композит БЦ/ГАП/MXene демонстрирует контактный угол 18°. Это указывает на то, что композит сохраняет высокую гидрофильность несмотря на усложнённую структуру.

Одной из первоочередных задач на начальном этапе раневого процесса является удаление экссудата, включающего продукты тканевого и микробного распада. Способность материала удерживать максимальное количество токсинов, микроорганизмов, раневого отделяемого и других компонентов определяется его сорбционной ёмкостью, которая является важным критерием при характеристике материала. Сорбционная активность БЦ и её композитов оценивалась по времени, требуемому для полного насыщения адсорбатом (дистиллированная вода и раневой экссудат). Количество адсорбата оценивали по увеличению веса пленки после контакта с водой или раневым экссудатом относительно её исходной массы (Рисунок 30).

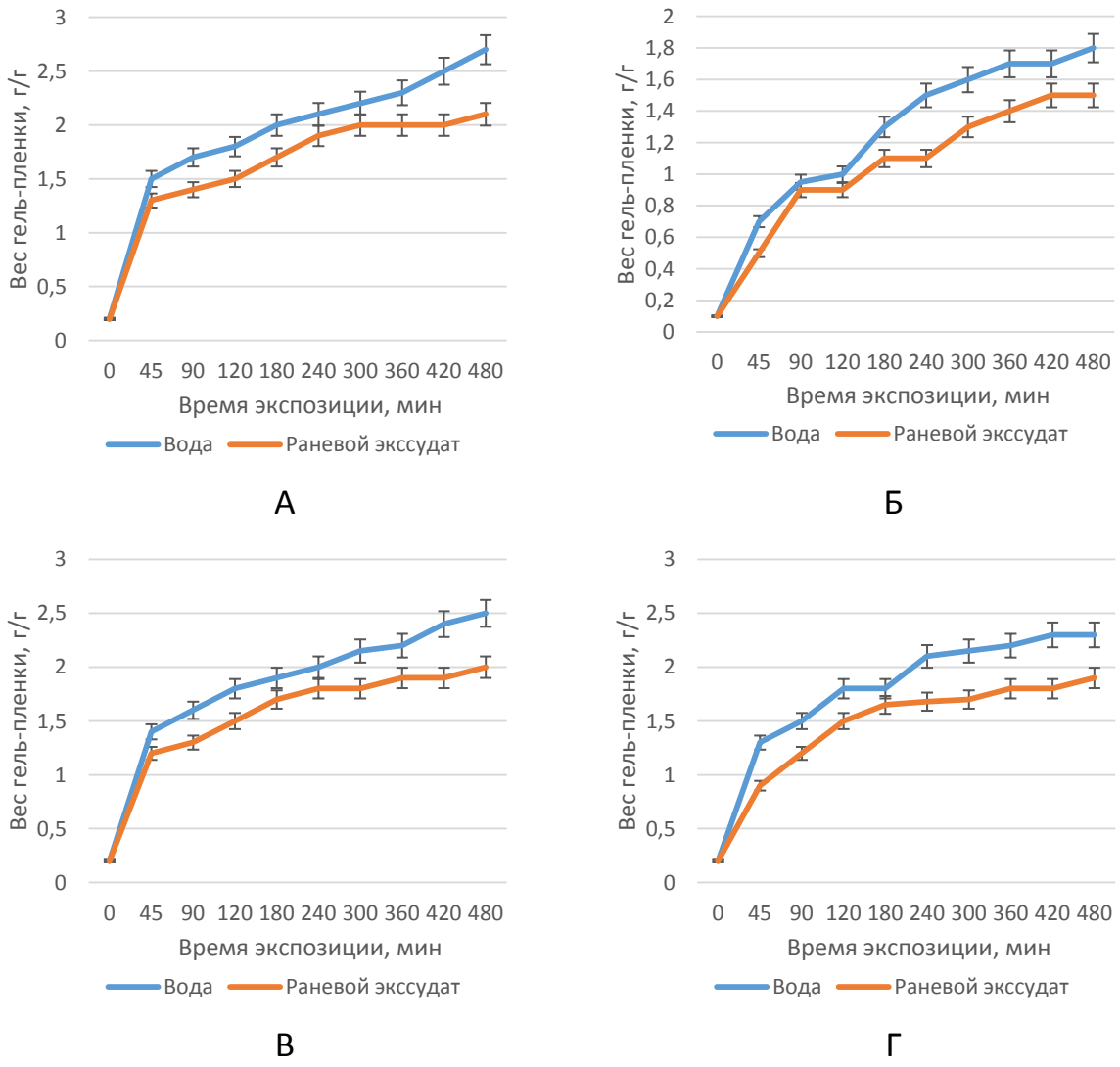


Рисунок 30 – Кинетика сорбции воды и раневого экссудата дегидратированными пленками БЦ (А); БЦ/ГАП (Б); БЦ/Mxene (В) и БЦ/ГАП/Mxene (Г).

Данные эксперимента свидетельствуют о том, что процесс практически завершается в течение 6 часов для обеих жидкостей. Гель-пленки продемонстрировали различную сорбционную активность воды: 2,7±0,4 г для чистой БЦ, 1,8±0,2 г для БЦ/ГАП, 2,5±0,7 г для БЦ/MXene и 2,3±0,5 г для БЦ/ГАП/Mxene. Дальнейшие наблюдения показали, что показатели сорбции всех композитов остаются неизменными. Это свидетельствует о том, что БЦ/ГАП/Mxene обеспечивает максимальное поглощение патологического отделяемого из раны в течение 6 часов, определяя тем самым продолжительность интервалов между перевязками.

Таким образом, сочетание высокой гидрофильности и выраженной адсорбционной способности делает этот композитный материал перспективным для использования в раневых повязках.

3.3 Подбор способа стерилизации для наноструктурированных биоматериалов

Стерилизация медицинских устройств и биоматериалов – ключевой этап обеспечения их безопасности и соответствия требованиям нормативных документов. Для изделий, предназначенных для непосредственного контакта с тканями или раневыми поверхностями, стерильность не просто рекомендована — она является обязательной (например, согласно стандарту ISO 11137 для стерилизации медицинских изделий посредством радиации) [237]. При этом выбор метода стерилизации должен учитывать особенности материала: температура, влажность, радиационное воздействие или химические агенты могут вызывать изменения в структуре, механических и функциональных свойствах биоматериалов, что особенно актуально для полисахаридных матриц [238].

Полисахаридные материалы – такие как бактериальная целлюлоза, хитозан, альгинат и др. – активно внедряются в медицину благодаря высокой биосовместимости, биоразлагаемости и способности стимулировать заживление тканей. Однако их чувствительность к воздействию тепла, влажности, реактивов и ионизирующего излучения требует особого подхода к выбору метода стерилизации [238]. Например, в обзоре Moore и др. отмечено, что ионизирующая радиация, автоклавирование и другие методы могут приводить к разрыву полимерных цепей, снижению молекулярной массы, изменению прозрачности и уменьшению механической прочности полисахаридных изделий [239].

Композит на основе бактериальной целлюлозы, гидроксиапатита и Mxene – представляет собой комбинированную полимерно-наноструктурную матрицу. Такая сложная композиция требует тщательно подобранного метода стерилизации, который обеспечит полную стерильность без ущерба для структуры, морфологии, фототермических и антибактериальных свойств материала. В частности, введение наноматериала MXene ГАП усиливает требования к щадящей стерилизации: термические и агрессивные химические методы могут вызвать деградацию полисахаридной матрицы и окисление наночастиц.

Таким образом, цель данного исследования – обоснование и подбор оптимального метода стерилизации для данного биокомпозита с сохранением его структурных, механических и биофункциональных характеристик.

Для определения эффективности шести способов стерилизации обеспложивание образцов композита БЦ–ГАП–MXene проверяли методом прямого высева на питательные среды. Каждую плёнку (1×1 см) асептически помещали на поверхность мясо-пептонного агара и среды и инкубировали при 37 °C соответственно в течение 48 ч. Наличие микробного роста оценивали визуально. Отсутствие колоний указывало на полную стерильность. Контролем служили необработанные образцы и стерильные чашки без материала. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Эффективность различных методов стерилизации композита БЦ/ГАП/MXene

№	Метод стерилизации	Наблюдения при высеве на агар	Эффективность стерилизации
1	Автоклавирование (121 °C, 20 мин)	Рост отсутствует	100 %
2	Этиленоксид (37 °C, 4 ч + аэрация 12 ч)	Рост отсутствует	100 %
3	УФ-излучение (254 нм, 30 мин × 2 стороны)	Микробная нагрузка уменьшилась наполовину по сравнению с контролем	≈ 50 %
4	Озон (10 г/ч, 30 мин)	Рост отсутствует	100 %
5	Сверхкритический CO_2 (38 МПа, 30 °C, 60 мин)	Незначительный рост (2–3 колонии)	≈ 90 %
6	Холодная плазма (O_2/Ar, 15 мин)	Рост отсутствует	100 %

Различия в стерилизующей эффективности и степени сохранности морфологии композита обусловлены характером физико-химического воздействия, присущим каждому методу. Холодная плазма воздействует преимущественно на поверхность композита: активные формы кислорода и азота эффективно разрушают клеточные структуры без существенной термодеструкции матрицы [240].

УФ-облучение демонстрирует существенно меньшую эффективность (~50 %), что связано с ограниченной глубиной проникновения и частичным экранированием полимерной матрицей. Подобный эффект подтверждается экспериментальными исследованиями фотолиза биополимеров, обладающих естественной устойчивостью к УФ-излучению [241].

Химические агенты (этиленоксид и озон) обеспечивают высокий уровень стерилизации благодаря различным механизмам: алкилированию и окислению, соответственно. При этом озон способен вызывать лёгкое поверхностное окисление сахаров, тогда как обработка EtO требует обязательной аэрации для удаления остаточного токсичного газа [242].

Термические методы (автоклавирование) хотя и обеспечивают надёжную стерилизацию, сопровождаются гидролизом гликозидных связей, снижением кристалличности и общей деградацией полисахаридной матрицы вследствие воздействия высокой температуры [243].

Наиболее щадящим с точки зрения сохранения структуры выступает сверхкритический CO_2: стерильность достигает примерно 90 % за счёт денатурации белков и экстракции липидов бактерий.

Таким образом, оптимальными по сочетанию стерилизующей способности и степени сохранения структуры материала являются холодная

плазма, этиленоксид и озон, в то время как УФ-облучение и термические методы следует рассматривать как вспомогательные.

Для комплексной оценки устойчивости композита БЦ/ГАП/MXene к различным физико-химическим воздействиям была проведена сравнительная характеристика его структурно-функциональных свойств после стерилизации. Поскольку используемые методы существенно различаются по механизму действия (термическое, химическое, плазменное и сверхкритическое воздействие), ожидалось, что степень их влияния на морфологию, механические параметры и функциональные характеристики материала будет неодинаковой.

В рамках исследования оценивалось, сохраняет ли композит исходную трёхмерную структуру бактериальной целлюлозы и распределение наполнителей (ГАП и MXene), а также изменяются ли его эксплуатационные свойства после обработки. Анализ включал моделирование изменений как на уровне надмолекулярной организации (пористость, морфология), так и на уровне макроскопических характеристик (механика, электропроводность), что позволило связать наблюдаемые явления с природой соответствующего стерилизующего воздействия.

В частности, после применения различных способов стерилизации оценивались следующие параметры: Внешний вид и морфология; Механические свойства **(**модуль Юнга (E), прочность на растяжение (σ_u)); Структурные изменения **(**пористость) и функциональные характеристики: электропроводность и фототермическая активность.

Наиболее выраженные морфологические повреждения БЦ/ГА/MXene наблюдались после термической стерилизации и озонирования (уплотнение, растрескивание, изменение цвета), тогда как холодная плазма сохраняли исходную структуру с минимальными визуальными изменениями.

Результаты механических свойств материалов после стерилизации приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Влияние различных методов стерилизации на механические свойства композита БЦ/ГА/MXene

№	Метод стерилизации	Температура / доза / экспозиция	Изменение E-модуля, %	Изменение σ_u, %
I. Термические методы				
1	Автоклав	121 °C, 1 атм, 20 мин	−28 %	−33 %
II. Химические методы				
2	Этиленоксид (EtO)	37 °C, 4 ч + аэрация 12 ч	−5 %	−8 %
3	Озон	10 г/ч, 30 мин	−22 %	−26 %
III. Фотохимические/плазменные				

4	УФ излучение	254 нм, 30 мин × 2	−15 %	−18 %
5	Холодная плазма (O_2/Ar)	50 Вт, 0.2 мбар, 15 мин	−3 %	−4 %
6	Сверхкритический CO_2 ($ScCO_2$)	30 °C, 38 МПа, 60 мин	−7 %	−9 %

Сравнительный анализ показал, что изменение механических свойств композита БЦ/ГАП/MXene существенно зависит от природы стерилизующего воздействия. С позиций сохранности механических свойств и морфологии оптимальными для БЦ/ГАП/MXene являются холодная плазма, EtO и $ScCO_2$; термические методы и озон демонстрируют наибольшую деградацию и должны применяться с осторожностью либо рассматриваться как резервные.

Для более полного понимания устойчивости материала после стерилизации была дополнительно оценена сохранность его структурных характеристик (пористость) (Таблица 9), а также ключевых функциональных свойств, определяющих прикладной потенциал композита, — электропроводности и фототермической активности.

Анализ данных показывает, что методы стерилизации различаются по степени влияния на пористость композита БЦ/ГАП/MXene: наибольшее увеличение пористости зафиксировано при термическом методе (автоклав +8 %), тогда как щадящие процессы (EtO +3 %, $ScCO_2$ +3 %) дают лишь умеренное увеличение, а наименьшее — УФ и холодная плазма (+2 %). Это указывает на то, что агрессивные режимы стерилизации приводят к большей деструкции структуры и образованию вторичных пустот или микротрещин, тогда как щадящие методы лучше сохраняют исходную пористую архитектуру.

Таблица 9 – Пористость БЦ/ГАП/MXene после применения различных методов стерилизации

№	Метод стерилизации	Температура / доза / экспозиция	Изменение пористости, %
1	2	3	4
I. Термические методы			
1	Автоклав	121 °C, 1 атм, 20 мин	+8 %
II. Химические методы			
2	Этиленоксид (EtO)	37 °C, 4 ч + аэрация 12 ч	+3 %

3	Озон	10 г/ч, 30 мин	+6 %
III. Фотохимические/плазменные			
4	УФ излучение	254 нм, 30 мин × 2	+2 %
5	Холодная плазма (O_2/Ar)	50 Вт, 0.2 мбар, 15 мин	+2 %
6	Сверхкритический CO_2 ($ScCO_2$)	30 °C, 38 МПа, 60 мин	+3 %

Изменение пористости после стерилизации хорошо отражает характер воздействия каждого метода на структуру композита. Наибольший прирост пористости наблюдался при термической обработке, что, вероятно, связано с обезвоживанием и усадкой материала, приводящими к коллапсу крупных пор и формированию микротрещин. Подобный механизм описан для биополимеров, структура которых при нагревании становится менее стабильной и подверженной локальному разрушению. В результате формально регистрируется увеличение пористости, хотя фактически оно связано не с формированием полноценной внутренней сети, а с возникновением дефектов [160].

Методы низкотемпературного химического и физико-химического воздействия, такие как обработка этиленоксидом, сверхкритическим CO_2 и холодной плазмой, оказывают минимальное влияние на пористость. Они не нарушают глубинную структуру композита, в основном воздействуя на поверхность, благодаря чему пространственная организация сохраняется почти неизменной.

Таким образом, увеличение пористости не всегда следует рассматривать как благоприятный эффект: значительное её возрастание при термических методах указывает скорее на разрушение матрицы и образование дефектов, тогда как слабые изменения, фиксируемые после щадящих методов, свидетельствуют о лучшей сохранности исходной пористой структуры. В литературе подчёркивается, что важно учитывать не только величину пористости, но и её природу, поскольку дефектные поры и трещины функционально не эквивалентны исходной организованной пористой сети.

Поскольку БЦ/ГАП/MXene разрабатывался как многокомпонентный материал, обладающий электропроводностью и выраженными фототермическими свойствами за счёт присутствия MXene, именно эти параметры являются критически важными для его дальнейшего применения в биомедицине (например, при локальной фототермотерапии и для создания электро-активных имплантатов и биоэлектродов).

Для каждого метода стерилизации были получены значения сохранения электропроводности и фототермической активности (в % от исходного уровня), представленные на Рисунке 31.

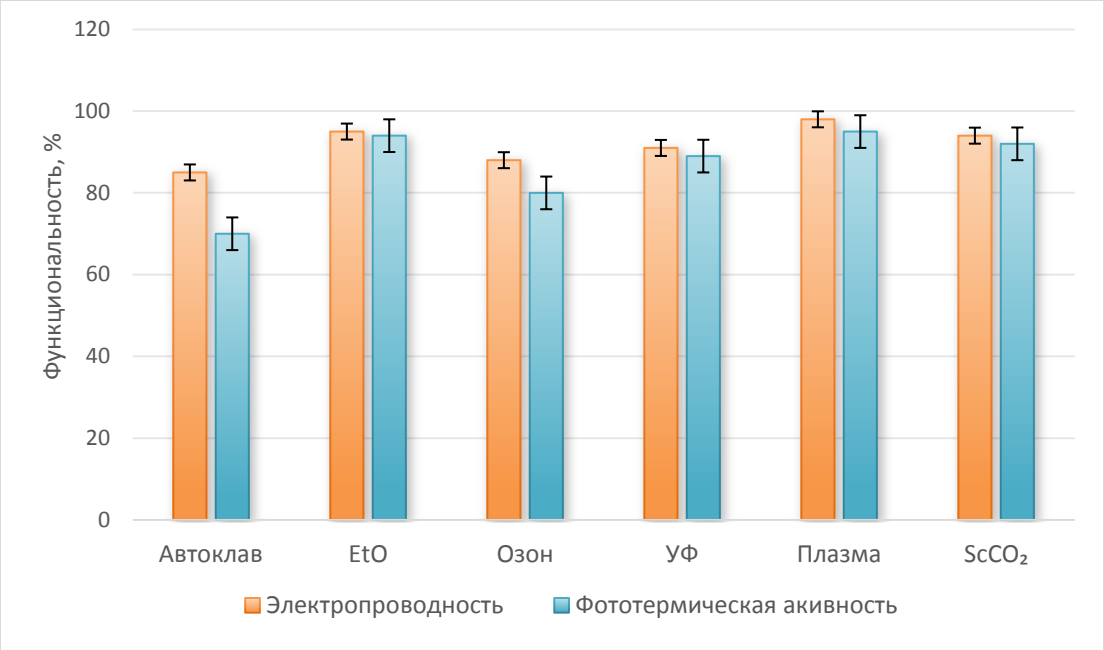


Рисунок 31 – Влияние различных методов стерилизации на функциональные свойства БЦ/ГАП/MXene

Сравнение влияния различных методов стерилизации на функциональные свойства композита БЦ/ГАП/MXene показывает, что характер воздействия определяет степень сохранения его электропроводности и фототермического отклика.

Наибольшее снижение функциональных свойств наблюдается при термических методах: автоклавирование понижает электропроводность (до 85 %) и фототермический отклик (до 70 %). Это согласуется с известными данными о термо-окислительной деструкции MXene, при которой на поверхности $Ti_3C_2T_x$MXene образуются оксиды (TiO_2), уменьшающие его фотопоглощение и электропроводность [244].

Озоновая обработка оказывает умеренное отрицательное воздействие (88 % проводимости, 80 % фототермики), что объясняется быстрым поверхностным окислением $Ti_3C_2T_x$, однако структурная деградация остаётся ограниченной.

Наиболее щадящими оказались низкотемпературные методы — EtO, $ScCO_2$ и холодная плазма. Они обеспечивают почти полное сохранение функциональных свойств – электропроводность 94–98 % и фототермическая активность 92–95 %. Особенно выделяется холодная плазма: она не только минимально снижает функциональность, но и в отдельных случаях даже повышает фототермический отклик, вероятно, за счёт увеличения

гидрофильности поверхности и улучшения дисперсии MXene-частиц в матрице БЦ [245].

В целом, стабильность функциональных свойств композита напрямую связана с отсутствием термического и агрессивного химического воздействия. Методы стерилизации, исключающие нагрев выше ~60 °C, позволяют максимально сохранить электронно-проводящую и фототермическую активность MXene, в то время как высокотемпературные процессы приводят к частичной потере функциональности за счёт оксидирования MXene и возможной деструкции его слоистой структуры.

Ниже приведён сводный сравнительный рейтинг методов стерилизации БЦ/ГАП/MXene, основанный на совокупной оценке: (1) сохранность механических свойств, (2) минимальность структурных изменений (пористость), (3) сохранение функциональных свойств – электропроводности и фототермики (Таблица 10).

Таблица 10 – Интегральная оценка эффективности методов стерилизации БЦ/ГАП/MXene

Ранг	Метод	Итоговая оценка	Краткое обоснование
1	2	3	4
1	Холодная плазма	5	Минимальная деградация механики (−3/−4 %), малая смена пористости (+2 %), почти полная сохранность электропроводности (98 %) и фототермики (95 %).
2	EtO (Этиленоксид)	5	Слабое изменение структуры и механики, высокая сохранность проводимости (95 %) и фототермики (94 %). Требует аэрации.
1	2	3	4
3	$ScCO_2$ (сверхкритический CO_2)	4	Хорошая сохранность структуры и функционала (94/92 %), небольшие изменения пористости (+3 %).
4	УФ-излучение	3	Умеренное снижение параметров, частично поверхностное воздействие, фототермика 89 %, проводимость 91 %.
5	Озон	2	Выраженная деградация матрицы (−22/−26 %); функциональные показатели умеренно снижены (88/80 %).
6	Автоклавирование	1	Сильная деградация механики (−28/−33 %), пористость +8 %, фототермика 70 %, проводимость 85 %.

Наиболее щадящими методами стерилизации БЦ/ГАП/MXene являются холодная плазма, EtO и сверхкритический CO_2, обеспечивающие близкие к исходным уровни структурных, механических и функциональных характеристик. УФ-обработка даёт умеренное ухудшение параметров, однако остаётся менее агрессивной, чем озон и термические методы. Наихудший результат продемонстрировало автоклавирование, вызывая значительную деградацию матрицы БЦ, образование дефектов и выраженную потерю проводящих и фототермических свойств — в первую очередь из-за термо-окислительной трансформации MXene и разрушения структуры БЦ.

В целом, выбор метода стерилизации для БЦ/ГАП/MXene следует осуществлять с учётом баланса между стерилизующей эффективностью и сохранностью функциональных характеристик: оптимальными являются холодная плазма, EtO и $ScCO_2$, тогда как автоклавирование несмотря на то, что обеспечивают 100 % стерильность материала, нежелательны в применении к чувствительным многокомпонентным композитам из-за выраженного ухудшения их свойств.

3.4 Исследование биологической активности композитных материалов

3.4.1 Антибактериальное действие

Открытая рана – благоприятная ниша для микробной колонизации. Как правило, раневые инфекции имеют полимикробный характер: в их составе обнаруживаются как экзогенные патогены, так и эндогенные микроорганизмы, обитающие на поверхности кожи и слизистых оболочек [246]. На ранних стадиях инфицирования ран преобладают грамположительные бактерии (*S.aureu*s, включая MRSA), тогда как на более поздних этапах наблюдается активное распространение грамотрицательных возбудителей, таких как *P.aeruginosa*, способных вызывать глубокие инфекционные поражения тканей [247].

Среди возбудителей раневых инфекций особое значение имеют бактерии, характеризующиеся множественной лекарственной устойчивостью и высокой распространённостью в клинических условиях. В связи с этим одной из первых задач настоящего исследования было установить потенциально опасные микробные ключевые маркеры. Для этого были проанализированы в динамике результаты 60 микробиологических проб с поверхности ожоговых ран у 20 пациентов в возрасте от 15 до 60 лет с ожогами общей площадью от 5 до 20 % поверхности тела и глубиной поражения II-III степени. Во время бактериологического исследования были определены степень микробной обсемененности раны и наличие микробных сообществ - биопленок, проведены идентификация вида возбудителя.

Положительный результат в первом посеве (3–5 сутки), применяемом в качестве первичного индикатора присоединения инфекции в ране, был получен в 76%, причем в 78% результатов от общего числа положительных выявили моно-инфекцию, а в 22% случаев - микст-инфекцию. Среди микробных изолятов превалировали *Pseudomonas aeruginosa* – 39,2% и

Acinetobacter baumannii – 18,2%; в равной степени обнаружены *Klebsiella pneumoniae* – 12,1% и *Staphylococcus aureus* – 12,1%; в меньшей степени распространены *Enterococcus faecalis* – 6,1% и *Staphylococcus saprophyticus* – 6,1% , а также *Staphylococcus epidermidis* – 3,1% и *Proteus vulgaris* – 3,1%. Кроме того, микробные ассоциации регистрировались уже с первого посева (с 3–5 суток госпитализации), и к концу срока наблюдения в 75% случаев микробный пейзаж ожоговых ран был представлен микст-инфекцией.

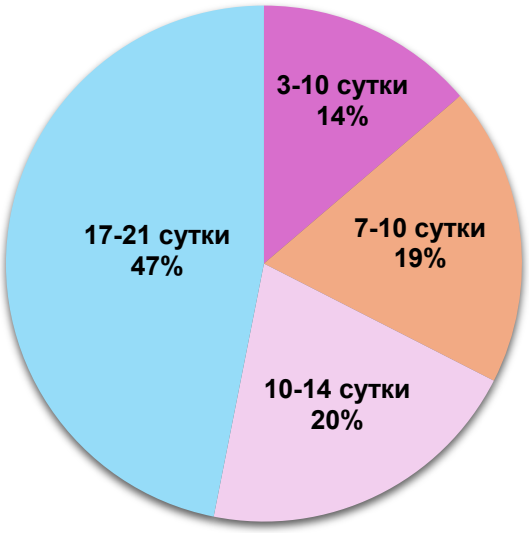


Рисунок 32 – Распространенность микробных ассоциаций в ожоговой ране (% от общего числа положительных результатов бактериологических исследований)

Тревожным фактом явилось то, что из всех положительных результатов в 32% случаях возбудители проявляли устойчивость к 6 и более антибиотикам, что говорит о развитии мультилекарственной устойчивости. Печально то, что феномен панрезистентности ко всем антибиотикам из основного и резервного наборов для антибиотикограммы регистрировался с повышением в 2 раза по сравнению с результатами первой серии посевов. По итогам 4-й серии обследования образцов ОР (т. е. на 24 сутки) из 5 выделенных возбудителей панрезистентность к АБП регистрировалась в 80% на фоне пребывания пациентов в стационаре в течение целого месяца, где они активно получали системную антибактериальную терапию, а также местное лечение в виде раневых повязок с антисептическими растворами и антибактериальными мазями.

Таким образом потенциально опасные ключевые маркеры: неферментирующие грамотрицательные бактерии (*Ps. aeruginosa и A. baumannii*), резистентная флора и микробные ассоциации- биопленки, сформированные чаще всего сформированные *Ps. aeruginosa* и *S. aureus*. Это согласуется с литературными данными о структуре микрофлоры ожоговых ран, в которых была установлена доминирующая роль условно-патогенных

возбудителей, в частности группы «ESKAPE», характеризующейся высокой частотой распространенности в лечебно-профилактических учреждениях (ЛПУ), склонностью к образованию микробных ассоциаций и устойчивостью к антибактериальным препаратам [248]. В связи с этим для дальнейших исследований по определению антибактериальной и антибиопленочной активности исследуемых материалов в качестве микрорганизмов-мишеней использовались: мецитилин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA), и фторхинолон- резистентный *Pseudomonas aeruginosa* (FQRPA). Именно эти УПМ являются индикаторами загрязнения госпитальной среды.

Рост и распространение бактерий эффективно предотвращают антибиотики, однако их многократное применение может способствовать развитию бактериальной резистентности [249]. У более чем 70% возбудителей раневых инфекций отмечен высокий уровень резистентности к одному или нескольким антибиотикам, применяемым в клинической практике [250]. Быстрый рост числа мультирезистентных бактерий, устойчивых к большинству природных и синтетических антибиотиков, подчеркивает острую потребность в разработке новых терапевтических подходов [251]. Одним из них является применение антисептиков, к которым такой резистентности не возникает, но они обладают только антимикробной активностью, не обладая ранозаживляющим действием. В связи с этим, раневое покрытие, в состав которого входит агент, обладающий помимо антимикробного действия, еще и активностью, обеспечивающей регенерацию тканей, может быть перспективным. Таким функциональным агентом может быть и MXene, и ГАП.

Классическим методом для определения чувствительности бактерий к антимикробным веществам является метод совместного культивирования тест-штаммов с экспериментальными образцами. Этот подход позволяет оценить зависимость антимикробного действия от времени экспозиции [252].

Уровень активности определяли по степени подавления роста бактерий в течение соответствующих временных интервалов. Антисептическая активность исследуемых образцов представлена на рисунке 33.

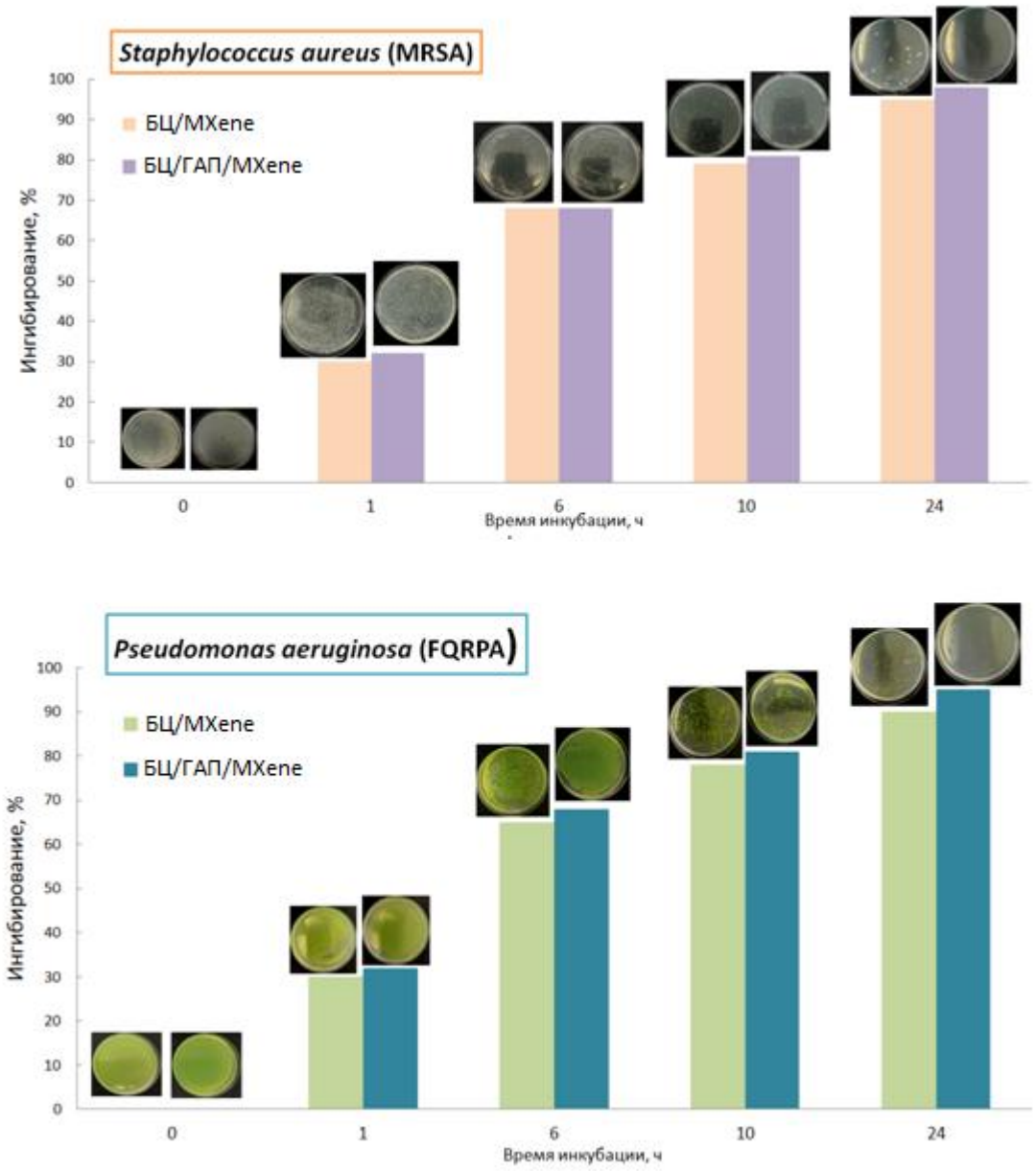


Рисунок 33 – Подавление роста бактерий-мишеней после контакта с нанокомпозитными пленками

Как и ожидалось пленки БЦ и БЦ/ГАП не проявляли антибактериальной активности. Композиты БЦ/MXene и БЦ/ГАП/MXene продемонстрировали высокую антибактериальную эффективность в отношении исследуемых микроорганизмов. Наиболее выраженное бактериостатическое действие наблюдалось при их контакте с нанокомпозитом БЦ/ГАП/MXene, достигая 95% подавления грамотрицательных (*P.aeruginosa*) и до 99% грамположительных (*S.aureus*) бактерий по завершении 24 часов инкубации.

Эти результаты согласуются с литературой, в которой отмечалась более высокая активность этих MXenes в отношении грамположительных бактерий [6, 253]. Rasool и др. указывают, что различия в антибактериальной активности обусловлены особенностями их клеточной стенки. Гр- бактерии

имеют внешнюю защитную липидную мембрану в клеточной стенке, которая может предотвратить прямое повреждение, вызванное частицами MXene. А Гр+ бактерии имеют толстый слой пептидогликана в клеточной стенке, но отсутствие внешней мембраны делает их восприимчивой мишенью для прямого контакта с MXenes [6].

Высокая антимикробная активность данных композитов, вероятно, обусловлена сочетанием механизмов действия, описанных для материалов на основе MXene. Одним из ключевых является генерация АФК, таких как супероксид-анион (O_2^-), гидроксильные радикалы (•OH) и перекись водорода (H_2O_2) на поверхности MXene [254]. Они вызывают окислительное повреждение клеточной мембраны, приводя к утечке внутриклеточных компонентов и инактивации ферментных систем.

Окислительный стресс является общим механизмом антибактериальной активности наноматериалов на основе металлов, оксидов металлов и углерода [255, 256]. Этот процесс связан с генерацией свободных радикалов [257]. АФК вызывают повреждение мембраны бактериальных клеток. Они могут существовать в природе как внутриклеточно, так и внеклеточно [258]. При определенных условиях высокий уровень АФК может усиливать окислительный стресс в клетках. Это может привести не только повреждению клеточной мембраны, но также повреждению белков, ДНК и внутриклеточных систем. В данной работе уровень АФК измеряли с помощью DCFH-DA. Диацетат дихлордигидрофлуоресцеина (DCFH-DA) — один из наиболее широко используемых методов прямого измерения окислительно-восстановительного состояния клетки. DCFH-DA, проницаемый для клеток, нефлуоресцентный предшественник DCF, может быть использован в качестве внутриклеточного зонда для определения окислительного стресса. Он обладает множеством преимуществ по сравнению с другими разработанными методами, поскольку очень прост в использовании, чрезвычайно чувствителен к изменениям окислительно-восстановительного состояния клетки, недорог и может использоваться для отслеживания изменений уровня АФК с течением времени. Для оценки уровня образования АФК клетки (10^5 КОЕ/мл) инкубировали с исследуемыми образцами при 37 °C в течение 0, 1, 6, 10 и 24 часов. После каждого временного промежутка суспензии центрифугировали при 4 °C (600 об/мин, 15 мин), затем полученный супернатант переносили в стерильные пробирки. К нему добавляли раствор DCFH-DA до конечной концентрации 100 мкМ и инкубировали в темноте при комнатной температуре 1 час. После чего регистрировали интенсивность флуоресценции (λ_ex = 485 нм, λ_em = 530 нм). Количество образовавшихся АФК оценивали по увеличению флуоресцентного сигнала относительно контрольных образцов (Рисунок 34).

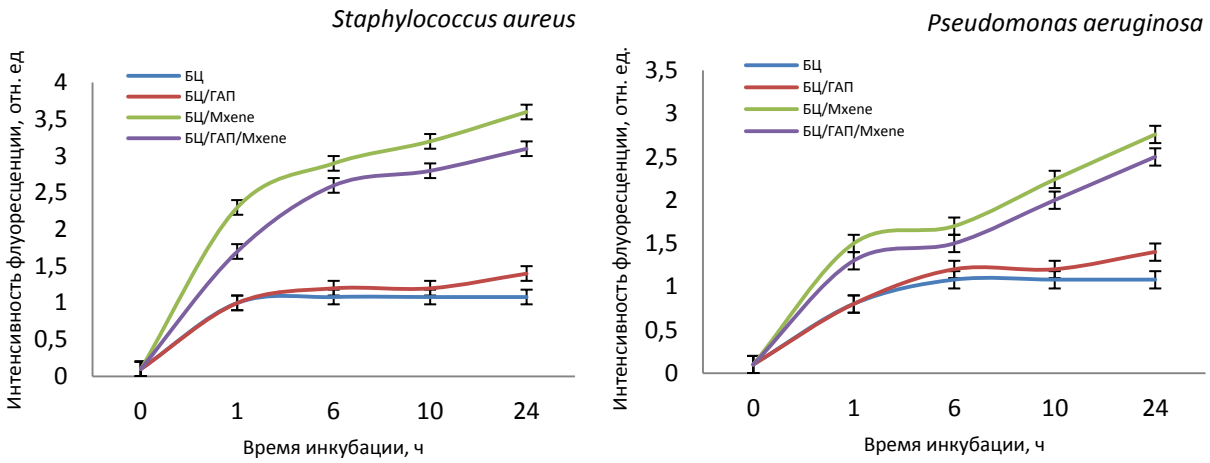


Рисунок 34 – Образование АФК в клетках *S.aureus* и *P.aeruginosa* при воздействии нанокомпозитных материалов

На рисунке 34 представлены результаты определения динамики образования АФК 4 типами материалов: БЦ, БЦ/ГАП, БЦ/MXene и БЦ/ГАП/MXene при воздействии на *S.aureus* и *P.aeruginosa*. Каждый график отражает изменение интенсивности флуоресценции во времени (1–24 ч). При контакте бактерий с БЦ и БЦ/ГАП образования АФК не наблюдалось. А вот включение MXene в матрицу БЦ привело к появлению флуоресценции. Рост интенсивности DCF-сигнала указывает на активную генерацию АФК, что согласуется с известной фотокаталитической и редокс-активной природой MXene [259].

Следует отметить, что в присутствии БЦ/MXene наблюдалось большее количество АФК по сравнению с БЦ/ГАП/MXene. Возможно, включение ГАП стабилизирует MXene, снижая скорость его окисления и, следовательно, интенсивность образования активных форм кислорода. В то же время, присутствие ГАП обеспечивает равномерное распределение нанолистов MXene в матрице и повышает долговременную стабильность композита, что способствует поддержанию умеренной, но устойчивой ROS-активности. При этом уровень образования АФК у Гр+ бактерий был заметно выше, чем у Гр-. Это различие также может быть объяснено особенностями строения клеточной стенки. Грамотрицательные бактерии имеют дополнительную внешнюю мембрану, богатую липополисахаридами, которая действует как барьер, ограничивающий взаимодействие MXene с клеточной стенкой и снижая проникновение АФК внутрь клетки. Кроме того, отрицательный заряд наружной мембраны грамотрицательных бактерий может способствовать электростатическому отталкиванию MXene, что также уменьшает эффективность их контактного действия. В результате наблюдается более низкий уровень генерации АФК и менее выраженный флуоресцентный сигнал.

Напротив, грамположительные бактерии не имеют внешнюю мембрану, а их клеточная стенка представлена толстым, но пористым слоем

пептидогликана, который не препятствует проникновению кислородных радикалов и обеспечивает более прямой контакт материала с клеточной поверхностью [260, 261]. Более того, высокая проницаемость пептидогликанового слоя облегчает диффузию реакционноспособных кислородных частиц внутрь клетки, что усиливает окислительный стресс и объясняет значительно более высокий уровень флуоресценции, наблюдаемый у грамположительных бактерий.

Таким образом, источником генерации АФК в исследуемых композитах является MXene, обладающий собственной редокс-активностью. Более высокий уровень образования АФК при воздействии на грамположительные бактерии связан с их большей восприимчивостью к окислительному стрессу и доступной клеточной поверхностью для MXenes.

Дополнительным подтверждением того, что подавление роста, а может и гибели бактерий происходит за счёт АФК, генерируемых двумерным материалом, являются результаты, полученные в специальной серии экспериментов. В них в реакционную смесь помимо бактерий и композитов вносили еще и антиоксидант. В этом качестве использовали аскорбиновую кислоту (АК), действующую как скэвенджер (улавливатель) активных форм кислорода. Она использовалась для нейтрализации АФК, продуцируемых MXene. Для этого тест-штаммы инкубировали с исследуемыми образцами в присутствии антиоксиданта АК и без него. После проводили посев на чашки Петри и подсчитывали процент выживших клеток. Влияние АК на рост тест-штаммов в присутвии композитов БЦ/ГАП и БЦ/ГАП/MXene представлено на рисунке 35.

В контрольных образцах наблюдался сплошной рост бактерий, что свидетельствует об отсутствии ингибирующего агента. В случае использования БЦ/MXene на питательной среде отмечалось образование единичных колоний, а контакт с композитом БЦ/ГАП/MXene приводил к полному подавлению жизнедеятельности микроорганизмов. Этот феномен исчезал при добавлении АК, т.е. фиксировался рост обоих видов бактерий. Такой эффект объясняется тем, что АК проявляет защитное действие, блокируя реакционноспособные формы кислорода.

Известно, что АК действует как донор электронов, взаимодействуя с супероксидными и гидроксильными радикалами и тем самым прерывая цепные окислительно-восстановительные реакции. По литературным данным, АК эффективно нейтрализует АФК, предотвращая развитие оксидативного стресса и повреждение клеточных мембран [262]. По данным Kora и Arunachalam [263], использование АК в качестве улавливателя активных форм кислорода приводит к 100% выживаемости *P.aeruginosa*.

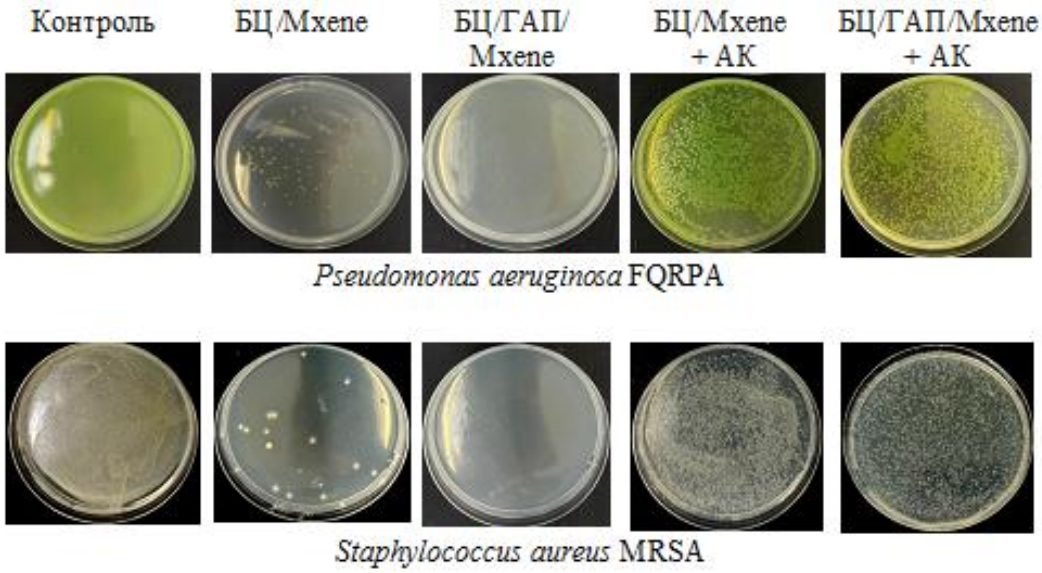


Рисунок 35 – Влияние АК на выживаемость *S.aureus* и *P.aeruginosa*

Тем не менее, даже при наличии антиоксиданта ингибирующая активность MXene сохранялась частично, поскольку плотность клеток оставалась ниже, чем в контроле. Это указывает на присутствие дополнительного, неокислительного механизма действия. Согласно ряду исследований, MXene обладает двумерной ламеллярной структурой с острыми краями, способными механически повреждать клеточные стенки бактерий [6, 264]. Этот эффект известен как механизм “нано-ножей”. При этом острые края MXene способны протыкать клеточную оболочку, нарушать её целостность и вызывать утечку цитоплазматического содержимого. Например, такая контактная деструкция клеточной мембраны была подтверждена микроскопическими исследованиями (SEM и AFM), где наблюдалось деформирование бактериальных клеток и разрушение их морфологии вблизи пластин MXene [6, 264, 265]. В свою очередь, включение ГАП усиливает физическое повреждение бактериальных клеток. Это достигается за счёт стабилизации раскрытой структуры MXene и формирования микрорельефной поверхности с выступающими острыми краями. Такая архитектура обеспечивает более тесный контакт композита с клеточной стенкой и повышает вероятность её механического разрушения. Кроме того, пористая структура и наличие гидроксильных групп ГАП увеличивают адгезию бактерий к поверхности материала, что дополнительно усиливает контактное воздействие и реализует “нано-ножевой” механизм действия.

Дополнительный вклад в антимикробное действие вносит зарядовая природа поверхности MXene. Отрицательно заряженные слои $Ti_3C_2T_x$ взаимодействуют с положительно заряженными участками мембран бактерий, нарушая их структурную целостность и усиливая проницаемость, что облегчает проникновение реакционноспособных частиц и радикалов внутрь клетки [188]. Эта активность усиливается еще и за счёт

«лабиринтного эффекта», создаваемого многослойной структурой MXene. Данный механизм реализуется только при равномерном распределении частиц MXene в матрице БЦ, когда нанолисты образуют упорядоченные барьерные слои [188, 266, 267]. В этом случае создаются пространственные препятствия, ограничивающие подвижность и адгезию бактерий, а также затрудняющие формирование биоплёнок и диффузию питательных веществ.

Усиление антибактерильных свойств при включении ГАП может быть связано с повышением дисперсности и равномерности распределения частиц MXene в матрице БЦ, что обеспечивает больший контакт активных центров с бактериальными клетками. Кроме того, ГАП способствует стабилизации структуры композита и предотвращает агрегацию нанопластин MXene, сохраняя их доступную поверхность и реакционную активность.

Совокупное действие генерируемых АФК, электростатических взаимодействий и физического барьерного эффекта определяет высокую антимикробную эффективность нанокомпозитов БЦ/MXene и БЦ/ГАП/MXene.

Полученные результаты согласуются с литературными сведениями, подчёркивающими значимость MXene-компонента в обеспечении бактерицидных свойств гибридных систем.

На основании проведенных экспериментов представляется, что основным механизмом антибактериального действия MXene является генерация АФК, тогда как механическое повреждение клеточной стенки выступает дополнительным фактором, усиливающим противомикробное действие.

3.4.2 Оценка антибиопленочной активности композитных материалов

Серьезной и актуальной проблемой для всех хирургических, в том числе ожоговых, стационаров являются инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, вызываемые условно-патогенными мультирезистентными микроорганизмами, зачастую образующими биопленки. Она служит безопасным убежищем для входящих в нее клеток. Их физическую защиту осуществляет полисахаридный матрикс биопленки, в который погружены клетки. Физиологическая защита обеспечивается подавлением клеточной активности и даже трансформацией их в «персистеры» [268-270] . Еще один способ, который может повысить резистентность биопленочных бактерий заключается в распространении генов устойчивости среди членов такого сообщества. По сути назревает катастрофическая ситуация, вызванная ростом биопленок и появлением микробов, устойчивых к лекарствам. Поэтому ключом к решению этих проблем является предложение новых эффективных методов лечения, которые не приводят к фармацевтической резистентности. Инновационным подходом в данном контексте является создание раневых покрытий с антимикробными и антибиопленочными компонентами, не имеющими

отношения к антибиотикам.

Методы диагностики и тестирования антимикробной активности на биопленках, к сожалению, не всегда эффективны. Например, стандартные тесты на антимикробную чувствительность, которые включают инъекцию антибактериального агента в планктонные клетки (суспендированные), не могут точно предсказать эффективность этих агентов против патогенов, находящихся в биопленке. В связи с этим только на первом этапе исследований использовался метод образования биопленки в микротитровальных планшетах, который был частично модифицирован. Создание биопленок происходило на дисках, вырезанных из опытных материалов, которые затем тестировались с использованием стандартной 24-луночной планшетной установки. Экспериментально показано, что образование биопленки на дисках БЦ является воспроизводимым и простым в использовании. Для окрашивания и количественного определения адгезивных биопленок использовался кристаллический фиолетовый. Судя по полученным данным, по прошествии 24 часов на поверхности БЦ присутствует развитая как одно-, так и двухвидовая биопленка. Что касается исследуемых композитов, то на их поверхности биопленка или слабо образуется, или вообще отсутствует в некоторых вариантах (рисунок 36). Причем армирующие агенты, включенные в БЦ, по-разному действуют на способность образовывать биопленки бактериями-мишенями. На матрице БЦ/MXene обнаружена слабая биопленка *S.aureus*, а на БЦ/ГАП и БЦ/MXene/ГАП она практически не наблюдается. *P.aeruginosa* менее чувствительна к активным компонентам комбинированных мембран: на диске с ГАП уровень окрашивания сопоставим с тем, что отмечен на диске только БЦ. На скаффолдах БЦ/MXene и БЦ/ГАП/MXene отмечен антибиопленочный эффект, однако меньше, нежели в случае со стафилококком.

К настоящему времени расшифрованы основные биоцидные механизмы MXenes: 1) Генераторы активных форм кислорода (АФК) - вызывают окислительный стресс у микроорганизмов; 2) Нано-нож – способны разрезать клеточную стенку бактерий; 3) Нанотермические агенты - инактивация бактерий за счет генерации тепла при воздействии света [92]. Обнаружена антимикробная активность в отношении таких стандартных моделей патогенов как *E. coli*, *S.aureus*, *B.subtilis*, *P.aeruginosa*, *K.pneumonia* и др. [89-91]. В целом уже несколько раз отмечалась более высокая активность MXenes в отношении грамположительных бактерий [6].

Как уже упоминалось в предыдущем разделе, большинство исследователей считают, что такие различия обусловлены особенностями клеточной стенки грамотрицательных и грамположительных бактерий. Гр- бактерии, как *P.aeruginosa* имеют внешнюю защитную липидную мембрану в клеточной стенке, которая может предотвратить прямое повреждение, вызванное частицами MXene. Отсутствие внешней мембраны у Гр+ бактерий (в данном исследовании *S.aureus*) делает их более восприимчивой мишенью

для прямого контакта с MXenes, несмотря на толстый слой пептидогликана [6].

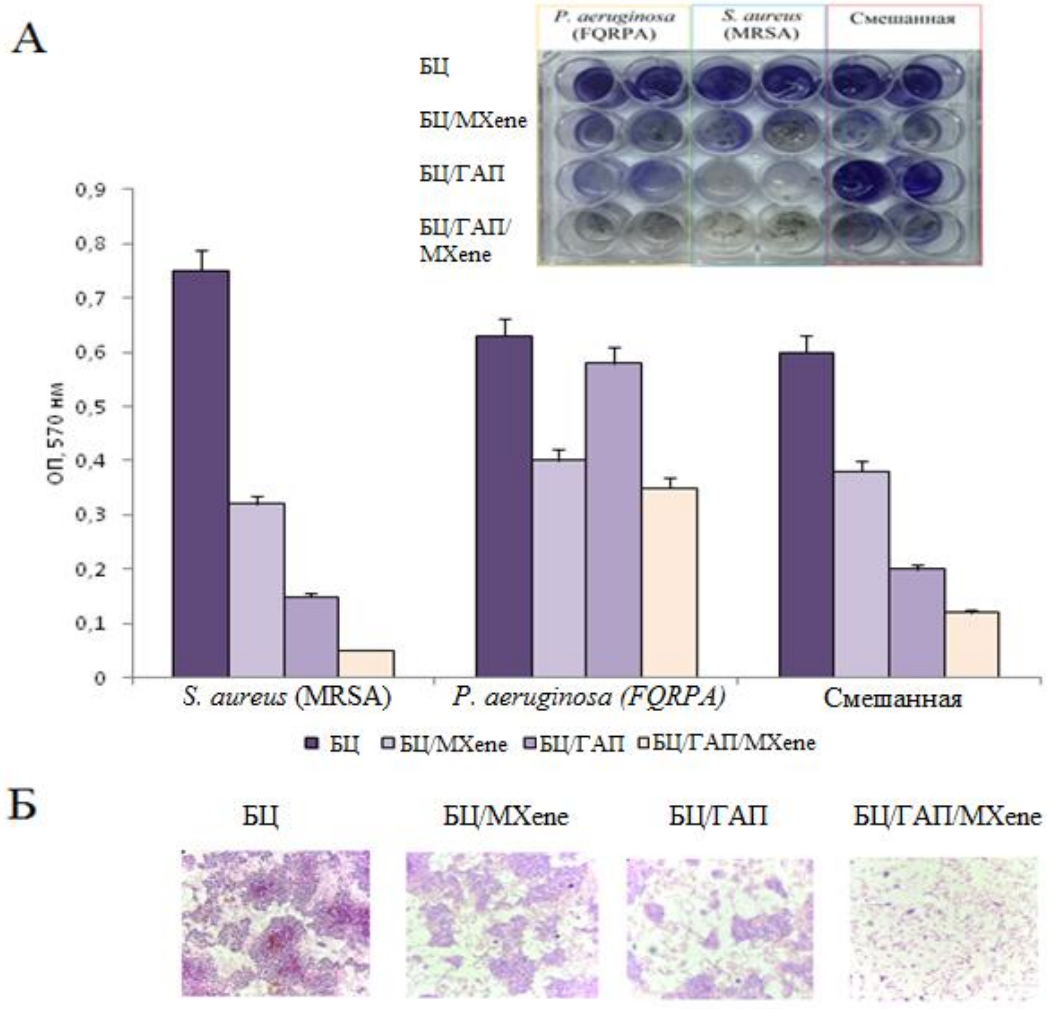


Рисунок 36 – Анализ биопленки. А – Визуализация образования биопленок на поверхности исследуемых материалов размещенных в луночном планшете; В – Оптическая плотность биопленок при длине волны 570 нм; С – Морфология биопленок

Еще одним фактором, который влияет на антимикробную активность композитов является поверхностный заряд материала и клеток тест-мишеней. Противоположные заряды композита и бактерий способствуют притяжению и адсорбции наночастиц на мембране. В результате взаимодействия с материалом, содержащим Mxene, нарушается ее целостность, а за этим следует утечка клеточных компонентов. Через сделанные Mxene-ом «дырки», он проникает в клетку, а там он может образовывать активные формы кислорода, такие как супероксидные анионы (O_2^-), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксильные радикалы (-OH). Во многих исследованиях постулируется, что окислительный стресс является общим механизмом антибактериальной активности наноматериалов на основе металлов, оксидов металлов и углерода [255-257].

Похожий феномен наблюдается и для двухвидовой биопленки: статистически значимое ($p < 0,05$) снижение интенсивности окрашивания по сравнению с контрольным вариантом (только БЦ) обнаружено на дисках, в которых присутствует MXene. Максимальная редукция развития биопленки (на 80%) по сравнению с первым вариантом – БЦ продемонстрировано на дисках БЦ/MXene/ГАП. Это свидетельствует об усилении ГАП антибактериального действия Mxene. Имеется в виду предотвращение их окисления, которое происходит в воде и биологических жидкостях. Во-первых, за счет связывания свободной OH^- группы ГАП с концевой группой T_xMXene, на его поверхности образуется защитный слой. Во-вторых, присутствие OH^- группы ГАП на концевых участках MXene снижает скорость перемещения катионов Ti в системе MXene, что уменьшает вероятность его объединения с молекулами O^{2-} [153].

Также ГАП может оказывать положительное влияние на гидрофильность поверхности $Ti_3C_2T_x$MXene, что в свою очередь может снизить возможность бактерий прилипать к их поверхности. Способность материала предупреждать адгезию бактерий к его поверхности является одним из важных аспектов антимикробной активности. Это особенно важно для применения в медицине, поскольку предотвращение бактериальной колонизации и биопленкообразования критично для уменьшения развития инфекции.

В отличие от Гр- бактерий, клеточная стенка Гр+ бактерий более гидрофобна, из за толстого слоя пептидогликана, поэтому им сложнее адсорбироваться на гидрофильных поверхностях [271]. Этим можно объяснить меньший объем биопленки *S.aureus* на BC/Mxene/HA и преобладание палочковидных клеток *P.aeruginosa* в смешанном микробном сообществе, выделенных из этого материала. Следует отдельно обсудить факт отсутствия биопленки *S.aureus* на дисках с ГАП. У большинства стафилокков, в том числе у *S.aureus* имеется *Bap* белок (белок, ассоциированный с биопленкой). Этот белок способствует прикреплению, а также межклеточной адгезии *S.aureus,* но активность его зависит от степени насыщения Ca^{+2}. Связывание с этим двухвалентным катионом делает *Bap* белок некомпетентным для адгезии и формирования биопленки [272]. Вероятно Ca^{+2} диффундирует из БЦ/ГАП диска в питательную среду, инокулированную бактериями, связывается с этим белком, блокируя его активность. Т.е. *Bap* действует как положительный регулятор клеточной адгезии, тогда как для *Bap*-Ca^{+2} действует как ингибитор. В результате бактерии не способны адгезироваться на БЦ матрице и биопленка не образуется.

Биопленки обычно формируются на поверхности ран. Однако, в некоторых случаях, такие биопленки, как у *P.aeruginosa*, могут глубоко проникать в слои кожи, что затрудняет их обнаружение с помощью обычных методов исследования, таких как мазки из раны. Как уже указывалось выше, для разработки противомикробной и антибиопленочной терапии важно иметь

соответствующие микробиологические модели. Большинство методологий, используемых для этих целей, используют планктонные микробные культуры. Выбор экспериментальной платформы для опытов с биопленкой с одной стороны должен имитировать условия организма, или тканей, где она присутствует. С другой стороны, все больше исследователей стараются избежать «живых моделей» из этических и гуманных соображений. Примером такого подхода является модель хронической раны Лаббока LCWB. Эта модель *in vitro* оказалась реалистичной, число исследований с ней быстро растет и совершенствуется, она является экономически эффективной и простой в настройке [273]. Модель LCWB обеспечивает функциональную систему для тестирования антимикробных и антибиопленочных методов лечения, имитируя условия *in vivo*.

Эта модель состоит из плазмы крови, эритроцитов и смешанной культуры *S.aureus* и *P.aeruginosa*, которые образуют коагулированную систему из двух видов биопленки в фибриновой сети, типичной для среды раны *in vivo* и характеризуется быстрым созреванием многовидовой биопленки. Исследование было выполнено в соответствии с экспериментальными этапами, представленными на рисунке 37.

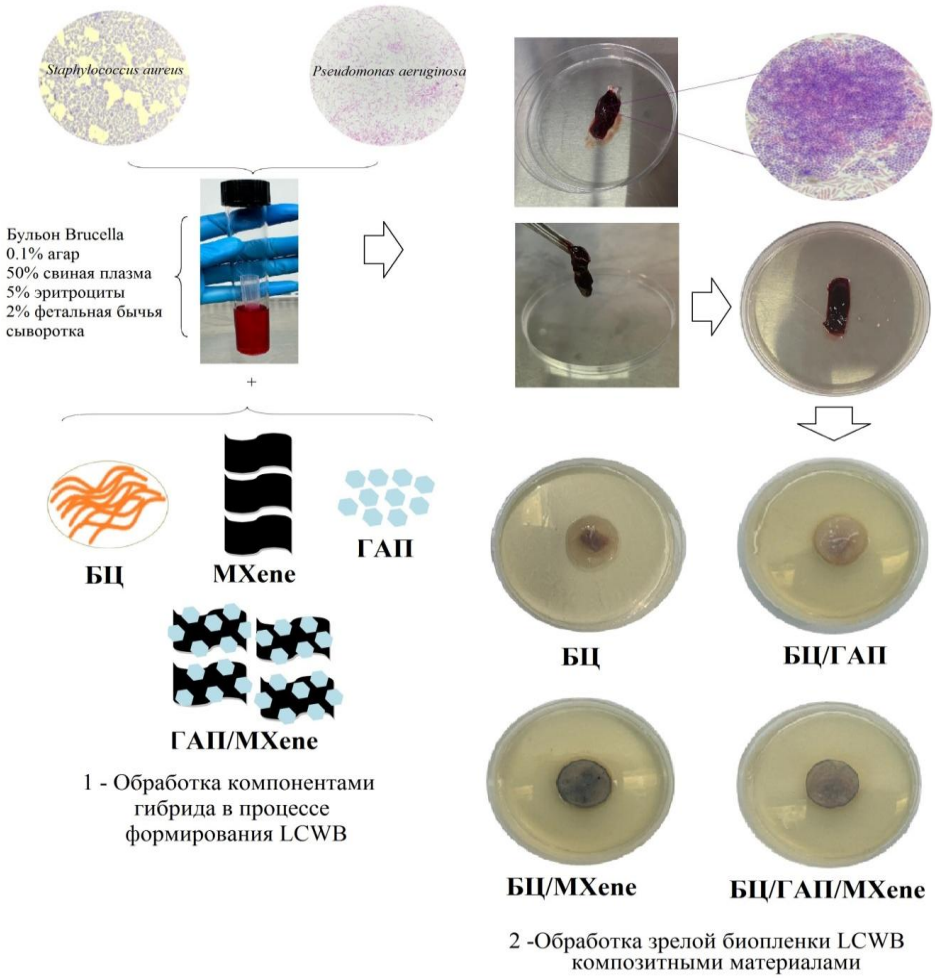


Рисунок 37 – Модель биопленки хронической раны Лаббока

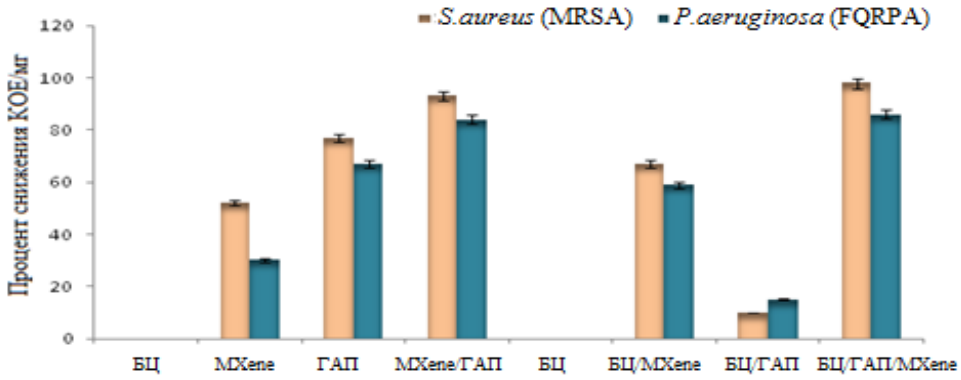
S.aureus синтезирует коагулазу, которая создает нерастворимую фибриновую сеть, формируя каркас раневой биопленки, к которому могут прилипать бактерии. Полагаем, что это один из ключевых факторов, объясняющих частое инфицирование ран стафилококками, т.е. они создают биогенную опору, на которой фиксируются не только клетки этого вида, но следом и другие бактерии, формируя полимикробные биопленки.

Микробное сообщество в биопленке формируется поэтапно. На первом происходит адгезия клеток к субстрату, затем следует его колонизация и созревание биопленки. Адгезия способствует развитию трехмерной структуры, которая связывает бактерии друг с другом и точно воспроизводит пространственную микробную колонизацию хронической раны. В связи с этим ключевая задача проводимого исследования – оценить антибиопленочную активность полученных материалов как на стадии формирования, так и в зрелой биопленке *S.aureus* и *P.aeruginosa.* В первом случае в среду, инокулированную смешанной культурой бактерий вносили отдельные компоненты материалов: БЦ, ГАП, MXene, MXene/ГАП, а затем определяли количество клеток каждого вида в образовавшихся биопленках (рис. 38, Б).

Оказалось, что в присутствии Mxene рост стафилококков снижается на 52%, синегнойной палочки на 30%. А в присутствии только ГАП из смешанной биопленки высевается еще меньше клеток *S.aureus* и *P.aeruginosa* - только 25% и 37% от того количества, которое было зафиксировано в ничем не обработанных суспензиях. ГАП, содержащий Ca^{2+} способен препятствовать полимеризации фибрина, снижая способность *S.aureus* коагулировать плазму, создавая эффективную и сложную сеть волокон. Фибрин образует сложную матрицу в процессах заживления ран, поскольку он служит субстратом для прикрепления клеток, пролиферации и формирования внеклеточного материала. Получается, что Ca^{2+}-связывание с γ-цепью фибриногена имеет основополагающее значение для модуляции полимеризации фибрина. Это благоприятствует более поздней агрегации протофибрилл фибрина для формирования толстых волокон [274-276].

В соответствии с этими данными, результаты, полученные в настоящей работе свидетельствуют о том, что ГАП вызывает отсоединение бактерий путем разрушения фибринового каркаса, удерживающего вместе зрелые биопленки. Эти результаты подтверждаются данными о массе биопленок, формирующихся в среде с ГАП, которая в среднем в четверо меньше, чем в контрольных вариантах (рис.38, В). При внесении в среду культивирования комплекса MXene/ГАП происходит снижение роста биопленки на 93% и 84% для *S.aureus* и *P.aeruginosa* соответственно.

А



Б

Типы LCWB	Действующий агент	Микробная нагрузка отдельного компонента биопленки (КОЕ*10^3/LCWB)		Вес LCWB, мг
		S.aureus	*P.aeruginosa*	
Биопленка в процессе формирования	Без обработки	8.42 ± 0.42	405 ± 32.2	1400.11 ± 71.65
	БЦ	8.49 ± 0.55	408 ± 22.11	1200.05 ± 60.99
	MXene	4.04 ± 0.20*	284 ± 21.14*	720.52 ± 36.7*
	ГАП	3.12 ± 0.41*	203 ± 31.7*	330.37 ± 16.6*
	MXene/ГАП	0.59 ± 0.03*	61 ± 3.63*	150.12 ± 7.81*
Зрелая биопленка	Без обработки	454 ± 22.9	278 ± 13.14	650.74 ± 32.88
	БЦ	461 ± 23.17	282 ± 14.19	595.56 ± 32.01
	БЦ/MXene	136 ± 7.07*	111 ± 6.06*	320.58 ± 16.45*
	БЦ/ГАП	409 ± 20.5*	236 ± 12.12*	250.17 ± 13.78*
	БЦ/ГАП/MXene	60 ± 3.15*	22 ± 1.01*	250.15 ± 12.85*

Примечание: *Во всех отмеченных случаях различия между экспериментальными и контрольными группами были статистически значимыми ($p < 0,01$).

В

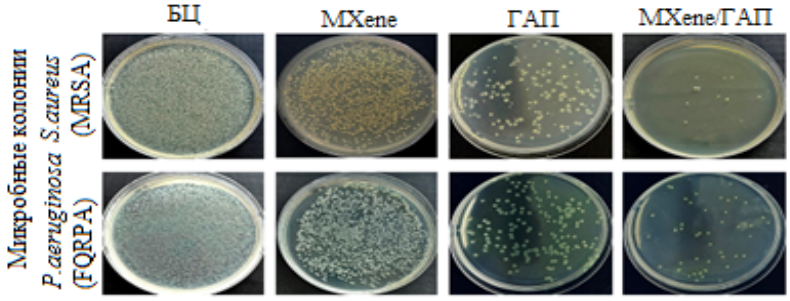


Рисунок 38 – Антибиопленочная активность мембран. А - Процент снижения КОЕ/мг *Staphylococcus aureus*(MRSA) и *Pseudomonas aeruginosa* (FQRPA) в формирующихся и зрелых LCWB в присутствии БЦ, MXene, ГАП и композита MXene/ГАП; В – Вес LCWB (мг) ± SD и бактериальная нагрузка (КОЕ/LCWB мг); С - Фотографические изображения колоний (В) *Staphylococcus aureus*(MRSA) и *Pseudomonas aeruginosa* (FQRPA)

Собранная зрелая биопленка имела твердо-слизистую консистенцию и макроскопический вид, характеризующийся «центральной полостью», образованной кончиком пипетки, «поверхностной областью биопленки» на границе раздела среда/воздух и «нижней областью» на кончике насадки. В целом в процессе формирования биопленки до перевода на искусственное раневое ложе серьезных изменений микроскопической морфологии не наблюдалось. После наложения на зрелую биопленку патчей с БЦ/MXene продемонстрировано хорошее микробное ингибирование, подтверждая основной эффект против *S.aureus* (67%). Антибиопленочное действие Mxene обнаружено также и против *P.aeruginosa* (59%) в биопленке двойного вида по сравнению с контрольными образцами (чистая БЦ). Наибольший эффект отмечен в вариантах с комбинированным покрытием БЦ/MXene/ГАП. В этом экспериментальном образце проценты снижения КОЕ/мг составляют 98% и 86% для *S.aureus* и *P.aeruginosa* соответственно.

Как уже отмечено, основной механизм подавления роста и даже гибели бактерий заключается в физическом взаимодействии MXene с клеточной поверхностью, что приводит к окислительному стрессу внутри клеток [188]. Известно также, что в водной с среде и в присутствии кислорода отдельные слои MXenes могут агрегировать между собой, что снижает их повреждающее действие. Фиксация Mxene в фибриллах БЦ будет препятствовать их расслоению, подобным образом действует на MXene и ГАП. Кроме того, в указанных условиях Mxenes могут окисляться, а ГАП предохраняет их от окисления. Это происходит во-первых, из-того, что OH− из гидроксиапатита может предотвратить окисление MXene, создавая защитный слой, который реагирует с терминальной группой Tx. Во-вторых, гидроксид-ион из ГАП на концевых участках MXene может ослабить внутреннее электрическое поле и уменьшить вероятность образования Ti^{4+} и O^{2-} комбинации. Эти два механизма могут способствовать снижению окисления системы и уменьшению синтеза TiO_2 [127].

Следует заметить также, что микроорганизмы могут секретировать внеклеточные полимерные вещества- экзополисахариды (EPS) на поверхности клеток, которые играют важную роль в бионано-интерфейсных взаимодействиях. Экзополисахариды составляют матрицу биопленки, в которую погружены клетки бактерий. Она в основном состоит из белков и полисахаридов, имеет высокое сродство к наноматериалам. Это может способствовать гетероагломерации между MXenes и бактериальными клетками. Предполагается, что физическое бионано-интерфейсное взаимодействие также способствует токсичности $Ti_3C_2T_x$MXene [277].

Судя по полученным результатам, исследуемые материалы по их антибиопленочной активности можно расположить в следующем порядке: БЦ/ГАП/MXene → БЦ/MXene → БЦ/ГАП. В модели LCWB они способны вмешиваться в кластеризацию бактерий в образовании двухвидовой биопленки, а также способны дезагрегировать и рассеивать микробные сидячие клетки в зрелой биопленке. Таким образом, на первой фазе

микробной колонизации наиболее активный гидрогель БЦ/ГАП/MXene может задерживать процесс инфекции, тогда как в зрелой биопленке он способствует разрушению кластерных бактерий, встроенных во внеклеточные полимерные вещества, что ведет высвобождению и гибели планктонных клеток. Таким образом, БЦ/ГАП/MXene можно считать действенным неантибиотическим соединением, эффективным против резистентных микроорганизмов, выделенных из хронических ран.

3.4.3 Исследование биосовместимости и цитотоксичности материалов в условиях *in vitro*

Оценка биосовместимости является обязательным этапом разработки и внедрения новых биоматериалов, поскольку позволяет определить характер их взаимодействия с клетками и выявить потенциальные цитотоксические эффекты. Биосовместимость характеризует способность материала поддерживать жизнеспособность клеток без индукции повреждения клеточных мембран, нарушения метаболических процессов или запуска программированной клеточной гибели.

Поскольку любые материалы, контактирующие с клетками in vitro, способны изменять их морфологию, кинетику роста и функциональное состояние, определение биосовместимости имеет ключевое значение для оценки перспектив применения композитов на основе бактериальной целлюлозы (БЦ), гидроксиапатита (ГАП) и MXene. Эти материалы представляют особый интерес благодаря их перспективам в регенеративной медицине, тканевой инженерии и разработке покрытий для имплантов.

Для выявления цитотоксических эффектов и изучения особенностей клеточного ответа применяли комплекс взаимодополняющих методов:

- морфологический анализ клеток, позволяющий оценить изменения формы, структурной организации и характера роста фибробластов;
- количественное определение живых и мёртвых клеток методом исключения трипанового синего, обеспечивающее объективную оценку жизнеспособности клеточной популяции;
- флуоресцентную микроскопию, применяемую для визуализации клеток, анализа их адгезивных свойств и пролиферативной активности;
- МТТ-тест, позволяющий определить метаболическую активность клеток как интегральный показатель их функционального состояния.

Совокупное применение этих методик позволило комплексно оценить влияние исследуемых материалов на жизнеспособность и пролиферацию фибробластов, а также определить их потенциальную безопасность и пригодность для дальнейшего биомедицинского применения.

Цитотоксичность материалов БЦ, БЦ/ГАП и БЦ/ГАП/MXene оценивали на клеточной линии фибробластов мыши NIH-3T3. Все полученные данные нормировали относительно показателей контрольной клеточной культуры.

На третьи сутки эксперимента значимых морфологических отличий между контрольными культурами и культурами, инкубированными с

материалами БЦ, БЦ/ГАП и БЦ/ГАП/MXene, не выявлено. Фибробласты формировали рыхлый монослой на поверхности лунок 12-луночного планшета. Наблюдалось большое количество делящихся клеток. Клетки имели преимущественно многоугольную форму, включая вытянутую, веретенообразную и звёздчатую. Цитоплазма была снабжена мелкими отростками, в ядрах большинства клеток визуализировались 2–3 ядрышка. Морфологические критерии указывали на их принадлежность к молодым пролиферирующим фибробластам.

В группе БЦ/MXene наблюдалась частичная фрагментация клеток, свидетельствующая о снижении адгезии и возможном повреждении клеточной мембраны.

Таким образом, морфология NIH-3T3 на 3-и сутки отражала их сохранённую функциональную активность, включая способность к пролиферации и взаимодействию с субстратом. Фибробласты, как ключевые клетки репаративного процесса, необходимы для регенерации тканей через миграцию и пролиферацию.

Локально как в контрольных, так и в экспериментальных группах встречались клетки с пикнотичными ядрами и вакуолизированной цитоплазмой, что возможно связано с естественными процессами апоптоза.

Для верификации наблюдений было проведено количественное определение общего числа клеток и числа погибших клеток методом исключения трипанового синего (Таблица 11).

Таблица 11 – Количество клеток фибробластов NIH-3T3 на 3-й и 5-й дни культивирования в присутствии материалов ($n = 7$; $p \leq 0,05$)

Экспериментальные группы	3 день		5 день	
	Общее количество клеток	Мертвые клетки	Общее количество клеток	Мертвые клетки
Контрольная культура фибробластов	$1.98x10^4$	$1,88\times10^{3a}$ 9.5%	$3.21x10^4$	$4,84\times10^{3b}$ 15.1%
БЦ	$1.53x10^4$	$1,5\times10^{3a}$ 9.8%	$1.92x10^4$	$2,84\times10^{3a}$ 14.8%
БЦ/MXene	$2.8x10^4$	$4,78x10^{3c}$ 17.1%	$3.05x10^4$	$5.97x10^{3c}$ 19.6%
БЦ/ГАП	$2.05x10^4$	$2,11\times10^{3ab}$ 10.3%	$2.03x10^4$	$2,94x10^{3a}$ 14.5%
БЦ/ГАП/MXene	$3.68x10^4$	$4,49x10^{3c}$ 12.2%	$4.01x10^4$	$6.77x10^{3d}$ 16.9%
Примечание: буквенные обозначения показывают статистически значимые различия ($p<0,05$) между группами внутри каждого временного интервала (3 день и 5 день)				

На 3-й день процент мёртвых клеток в группах БЦ, БЦ/ГАП и БЦ/ГАП/MXene составил 9,8%, 10,3% и 12,2% соответственно, что сопоставимо с контролем (9,5%). Полученные значения находятся в пределах

нормы для первичных культур. Наибольшее количество нежизнеспособных клеток обнаружено в группе БЦ/MXene – 17,1%, что на 7,6% выше, чем в контроле.

Добавление гидроксиапатита в композит БЦ/ГАП/MXene снижало цитотоксичность MXene на 4,9%, вероятно, за счёт уменьшения интенсивности генерации активных форм кислорода (АФК).

Известно, что токсичность двумерных листов Ti_3C_2Tx MXene обусловлена образованием ROS (O_2•−, H_2O_2) при контакте с водой, воздухом и биологическими жидкостями [278]. Hassan и соавт. показали, что включение ГАП в композит формирует защитный барьер, связывающий концевые –OH-группы MXene, и снижает внутреннее электрическое поле, замедляя миграцию катионов Ti и их взаимодействие с O_2− [153].

На 5-е сутки наблюдалось увеличение плотности клеток во всех экспериментальных и контрольных группах. Цитологические характеристики клеток в группах БЦ, БЦ/ГАП и БЦ/ГАП/MXene оставались сопоставимыми с контролем. Клетки представляли собой зрелые фибробласты с характерной веретенообразной формой и компактными ядрами. Процент мёртвых клеток не превышал 19,6%, что соответствует нормальным значениям для первичных культур.

Максимальная плотность клеток отмечалась в центральных областях лунок, где встречались участки многослойного роста. Количество митозов уменьшалось, а число клеток с пикнотичными ядрами и признаками цитоплазматической деградации увеличивалось, что соответствует более поздней фазе роста культуры.

Число погибших клеток в контрольной группе составило 15,1%, тогда как для композитов значения находились в диапазоне 14,5–19,6%. Таким образом, все исследуемые материалы не оказывали выраженного цитотоксического действия.

В совокупности данные свидетельствуют о стабильном росте клеток, сохранении их морфофункциональной активности и отсутствии нарушений структурной организации клеток при контакте с исследуемыми композитами в течение 5 суток.

Морфологический анализ показал более выраженную адгезию клеток к поверхностям БЦ, БЦ/ГАП и БЦ/ГАП/MXene по сравнению с БЦ/MXene. Это может быть связано с особенностями пористой архитектуры БЦ-содержащих материалов, обеспечивающих увеличенную площадь контакта и развитие фокальных адгезивных взаимодействий. Нанопористая структура БЦ формирует благоприятный матрикс для адгезии и пролиферации клеток [279].

Гидроксиапатит, интегрированный в композит, усиливает адгезию за счёт взаимодействия ионов Ca^{2+} с интегрин-опосредованными рецепторами, активируя сигнальные пути адгезии и клеточного роста [18; 280]. Таким образом, ГАП не только снижает цитотоксичность MXene, но и улучшает его биосовместимость на молекулярном уровне.

Метод флуоресцентной микроскопии был использован для оценки

степени адгезии, плотности распределения и морфологических особенностей фибробластов NIH-3T3 при культивировании в присутствии исследуемых материалов (Рисунок 39).

Как видно из представленных изображений, композиты на основе БЦ и БЦ/ГАП создают благоприятную микросреду для адгезии и пролиферации фибробластов NIH-3T3, обеспечивая плотность и равномерность распределения клеток, сопоставимые с контрольной культурой. В группе БЦ/MXene отмечается несколько менее выраженная клеточная адгезия, что может быть связано с частичным цитотоксическим воздействием MXene. В то же время включение гидроксиапатита в состав композита нивелирует это влияние и способствует улучшению клеточного ответа, что подтверждается увеличением плотности клеток и их равномерного распределения на поверхности материала.

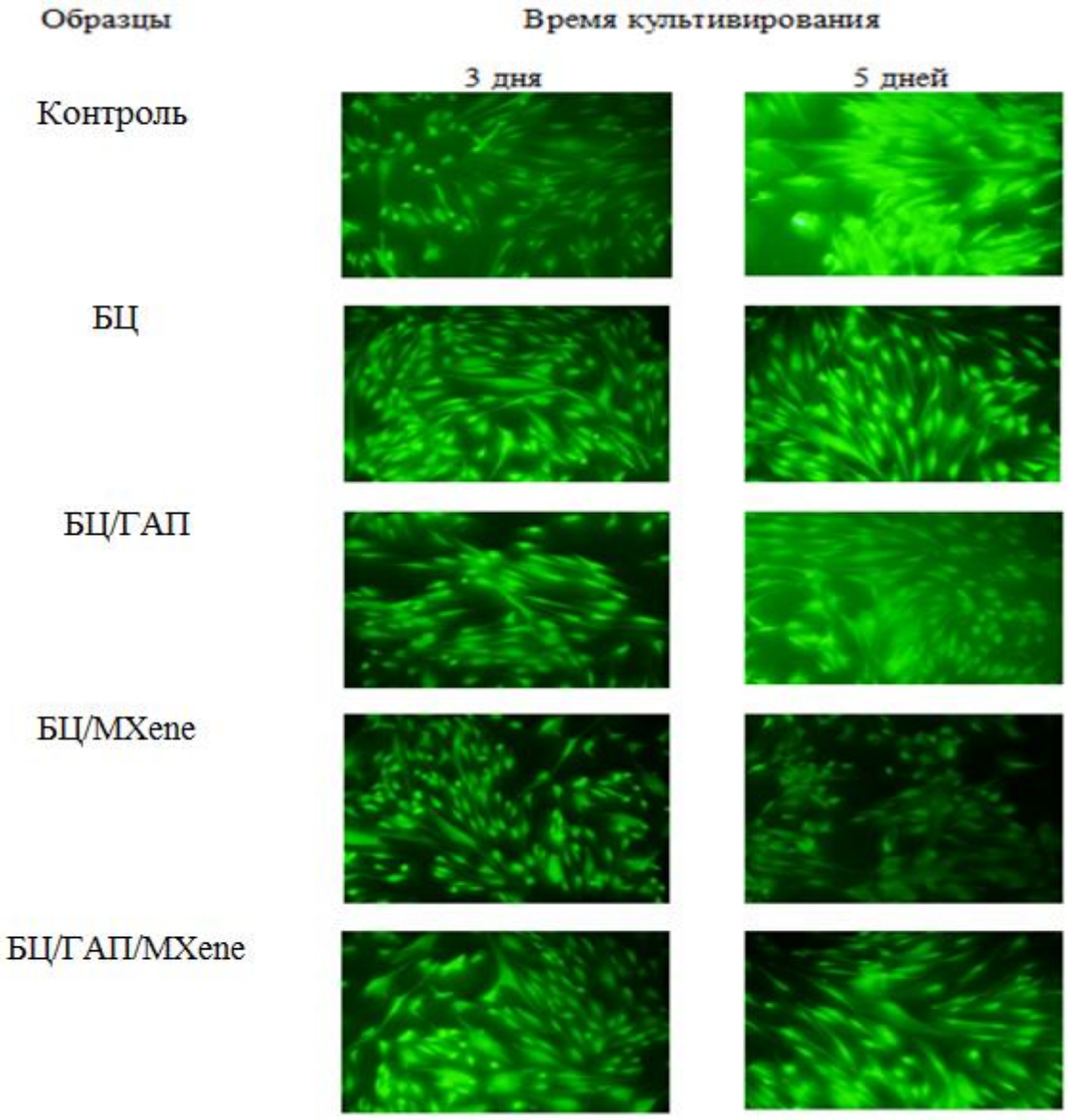


Рисунок 39 – Флуоресцентные изображения клеток NIH-3T3, культивированных собразцами БЦ, БЦ/MXene, БЦ/ГАП и БЦ/ГАП/MXene

Метаболическая активность клеток оценивалась методом MTT (Рисунок 40). Восстановление тетразолиевого красителя опосредовано NADPH-зависимыми оксидоредуктазами цитозоля [281] и отражает функциональное состояние клеток. Высокие значения MTT свидетельствуют о сохранённой метаболической активности и пролиферации.

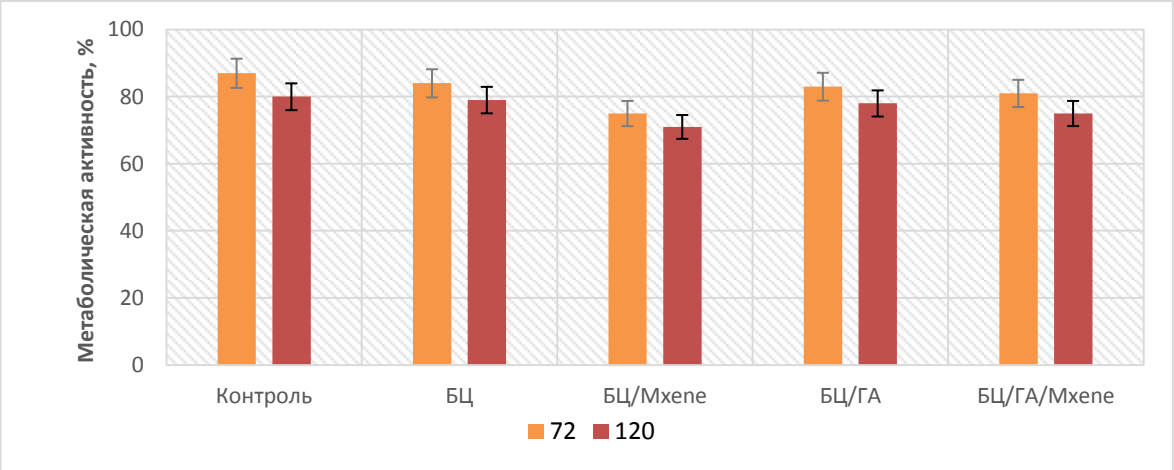


Рисунок 40 – Метаболическая активность клеток мышиных фибробластов NIH-3T3, культивированных с образцами материалов

Результаты показали, что в контрольной группе, а также в культурах с БЦ и БЦ/ГАП наблюдался рост метаболической активности на протяжении 72 и 120 часов. В группе БЦ/ГАП/MXene зафиксировано умеренное снижение активности на 3-и и 5-е сутки (≤19% и ≤25%, соответственно), однако значения оставались в пределах физиологической нормы, что подтверждает низкую цитотоксичность материала.

Значения MTT-анализа коррелировали с данными по выживаемости клеток, что дополнительно подтверждает отсутствие токсического влияния композитов и сохранение функциональной активности клеток.

Таким образом, результаты комплексного анализа показывают, что композиты на основе БЦ, БЦ/ГАП и БЦ/ГАП/MXene являются биосовместимыми и не оказывают выраженного цитотоксического действия на клетки NIH-3T3 в течение 5 суток культивирования. Интеграция гидроксиапатита снижает цитотоксичность MXene и способствует усилению адгезивных и пролиферативных свойств за счёт оптимизации микроструктуры композитов и активации молекулярных механизмов клеточного взаимодействия. Полученные результаты подтверждают перспективность этих композитов для дальнейших исследований и потенциального использования в регенеративной медицине.

Оценка антиоксидантного потенциала является важнейшим аспектом исследования функциональных биоматериалов, поскольку избыточное образование активных форм кислорода (ROS) играет ключевую роль в патогенезе воспалительных и дегенеративных состояний,

сопровождающихся оксидативным стрессом. К числу наиболее валидированных инструментов количественной характеристики свободнорадикальной нейтрализующей активности относится спектрофотометрический тест с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH), включённым в стандартные аналитические протоколы при оценке редокс-активных систем.

Метод основан на способности стабильного радикального катиона DPPH, обладающего характерным поглощением при 517 нм, подвергаться восстановлению при взаимодействии с антиоксидантами. Снижение оптической плотности реакционной смеси отражает антирадикальную активность исследуемого материала и позволяет строить дозозависимые кривые для последующего определения величины IC_{50} — концентрации, обеспечивающей 50 % ингибирования радикала и служащей количественным показателем эффективности улавливания свободных радикалов.

В рамках настоящего исследования метод DPPH был применён для объективной количественной оценки радикал-подавляющей способности композита БЦ/ГАП/MXene, содержащего двумерные нанолисты $Ti_3C_2T_x$, известные выраженными редокс-активными свойствами и способностью к улавливанию ROS. Дополнительно проведён сравнительный анализ с референсным антиоксидантом АК (аскорбиновая кислота), что позволило сопоставить функциональные характеристики исследуемого композита с установленным биохимическим эталоном.

С учётом установленной радикал-подавляющей активности MXene особое внимание было уделено количественной оценке вклада MXene в составе композита. Антиоксидантный потенциал системы БЦ/ГАП/MXene (массовое соотношение 95/3/2%) определяли по способности экстрактов композита нейтрализовать стабильный свободный радикал DPPH. Поскольку массовая доля MXene в композите составляет 2 %, экстрагирование 0,10 г плёнки в 10 мл 50 % этанола обеспечивало концентрацию MXene в супернатанте порядка ≈200 мкг/мл. Последующее смешение экстракта с раствором DPPH в соотношении 1:1 приводило к рабочей концентрации MXene в реакционной системе около ≈100 мкг/мл.

При данной концентрации композит БЦ/ГАП/MXene демонстрировал высокую эффективность радикал-подавления ≈87 %, что сопоставимо с активностью референсного антиоксиданта Trolox, который при той же концентрации обеспечивал ≈93 % ингибирования DPPH. При более низких концентрациях (≈3.12–25 мкг/мл) эффективность MXene возрастала дозозависимо от 50 % до 82 %, при этом оставалась близкой к активности АК, который в этих условиях обеспечивал ≈48–84 % ингибирования. Таким образом, композит проявляет антиоксидантную способность того же порядка, что и АК, демонстрируя выраженную эффективность уже в низкоконцентрационном диапазоне (Рисунок 41).

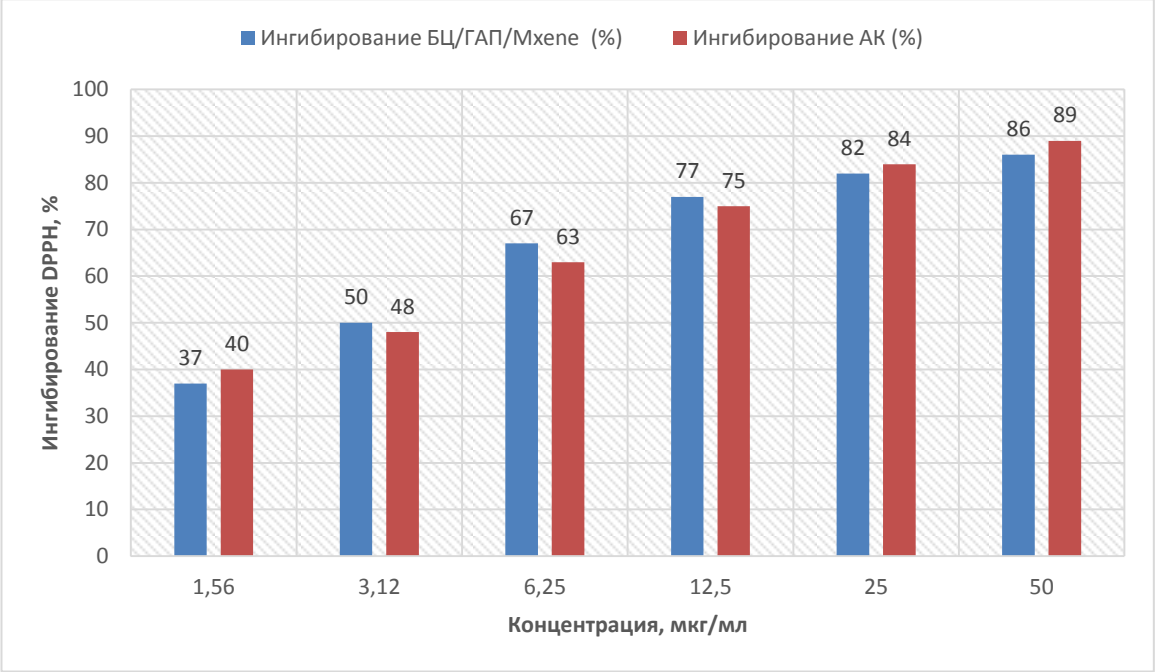


Рисунок 41 – Улавливание DPPH композитом БЦ/ГАП/MXene

Высокая эффективность DPPH-скэвенджинга свидетельствует о сохранении функциональной активности MXene внутри гибридной матрицы БЦ/ГАП. Вероятно, гидроксильные и оксо-терминальные группы MXene обеспечивают эффективный электронный обмен с радикальными формами, что приводит к их восстановлению и инактивации.

Полученные дозозависимые кривые позволили определить параметр IC_{50}, характеризующий концентрацию, необходимую для подавления 50 % свободных радикалов DPPH. Для композита величина IC_{50} составила ≈3,12 мкг/мл, что соответствует диапазону ≈4–6 мкг/мл, ранее описанному для металлоорганических каркасов [282], подтверждая высокую антиоксидантную активность материала, обусловленную развитой поверхностью и наличием функциональных терминалов (–O, –OH, –F), способствующих эффективному переносу электрона/водорода.

Для сравнения референсный антиоксидант АК проявил сопоставимую способность к улавливанию радикалов, демонстрируя IC_{50} ≈3,54 мкг/мл. Незначительно более высокая концентрация, требуемая для достижения 50 % подавления, позволяет заключить, что MXene по уровню радикал-подавления практически не уступает АК, традиционно рассматриваемому как высокоэффективный стандарт. Это свидетельствует о том, что даже при низкой массовой доле (2 %) MXene в составе композита БЦ/ГАП/MXene вносит существенный вклад в антиоксидантный потенциал системы.

Таким образом, MXene демонстрирует эффективность улавливания свободных радикалов, сопоставимую с АК, что подчёркивает перспективность его использования не только в качестве структурного компонента композита, но и как функционального элемента, обеспечивающего антиоксидантную защиту. Это особенно важно в контексте потенциального применения таких материалов для биомедицинских задач,

связанных с контролем оксидативного стресса и предотвращением ROS-индуцированных повреждений тканей.

Полученные результаты подтверждают, что композит БЦ/ГАП/MXene обладает значительным антиоксидантным потенциалом, сопоставимым с АК, в отношении свободных радикалов (DPPH). Радикал-подавляющие свойства MXene обусловлены несколькими факторами: 1) Поверхностные функциональные группы. Терминалные концы –O, –OH и –F, присутствующие на $Ti_3C_2T_x$, служат активными центрами электронного обмена и редуцирования радикалов и пероксидов; 2) Высокая удельная поверхность нанолистов. Плоская 2D-морфология MXene обеспечивает большое количество доступных реакционно-способных сайтов, что повышает эффективность взаимодействия с ROS; 3) Электронная плотность Ti-центров. Титановые центры участвуют в восстановлении активных форм кислорода, проявляя псевдокаталитические (наноэнзим-подобные) свойства, способствующие снижению уровня ROS; 4) Структурная поддержка со стороны ГАП и БЦ. Гидроксиапатит стабилизирует MXene, снижая его агрегацию и повышая доступность функциональных терминалов. Бактериальная целлюлоза формирует трёхмерную, постоянно гидратированную матрицу, обеспечивающую эффективную диффузию ROS к активным центрам композита.

MXene ($Ti_3C_2T_x$) обладает редокс-амбивалентной наноэнзим-активностью [283]. Этот 2-D материал в нормальных условиях может проявлять каталазоподобное H_2O_2-scavenging-действие, снижая оксидативный стресс тканей, тогда как при воспалении и наличии повышенных концентраций H_2O_2/металл-кофакторов реализует пероксидазоподобную активность с генерированием –OH [284, 285], обеспечивая выраженный антибактериальный эффект.

Таким образом, композит БЦ/ГАП/MXene является бифункциональным редокс-модулятором, способным адаптивно переключаться между антиоксидантным и про-оксидантным режимами в зависимости от микроокружения раны.

Благодаря этой присущей ему «умной» редокс-регуляции материал потенциально особенно полезен при лечении инфицированных ран. На ранней стадии, когда концентрация H_2O_2 и других воспалительных медиаторов повышена, MXene катализирует образование бактерицидных ROS (-OH), способствуя быстрому подавлению микробной нагрузки и разрушению биоплёнок, что снижает риск развития хронического воспаления и резистентности к антибиотикам. По мере санации раны и снижения уровня H_2O_2 поведение материала переключается преимущественно в антиоксидантный режим: композит начинает утилизировать избыточные ROS, уменьшая оксидативное повреждение здоровых тканей, подавляя воспаление, поддерживая миграцию фибробластов, пролиферацию кератиноцитов и формирование новой внеклеточной матрицы.

Дополнительный вклад БЦ и ГАП усиливает регенеративный потенциал покрытия. БЦ обеспечивает влажную среду, газообмен, адгезию клеток и механическую защиту. В свою очередь, ГАП может высвобождать ионы Ca^{2+}/PO_4^{3-}, стимулировать ангиогенез и ремоделирование тканей. Таким образом, БЦ/ГАП/MXene функционирует как интеллектуальное раневое покрытие двойного действия: на этапе инфекции – как локальный катализатор бактерицидных ROS, а на этапе репарации – как антиоксидантная платформа, способствующая заживлению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены комплексные исследования, посвященные разработке, изготовлению и всесторонней оценке новой трехкомпонентной раневой повязки на основе бактериальной целлюлозы (БЦ), MXene и гидроксиапатита (ГАП). Тройной композит БЦ/ГАП/MXene представляет собой многофункциональную неантибиотическую платформу, которая уникальным образом сочетает в себе структурную стабильность, мощную антибиопленочную активность и низкую цитотоксичность. Полученные результаты позволяют сделать следующие **выводы:**

1. Механически прочная (37,12+0,2 МПа) и эластичная (удлинение на 3,28+0,2 %) наноструктурированная БЦ, состоящая из нановолокон диаметром 15–35 нм и фибриллярными пучками размером 50–150 нм формируется на модифицированной среде с мелассой (2%). Культивирование штамма Komagataeibacter xylinus C-3 на этой среде в течение 7 суток обеспечивает повышение продуктивности образования плёнки до 12,8 г/л и снижение себестоимости синтезируемого биополимера в 5 раз.

2. Получен наноструктурированный композитный материал БЦ/ГАП/MXene путем интеграции предварительно сформированного комплекса ГАП/MXene в матрицу БЦ методом ex situ, обеспечивающим равномерное распределение наночастиц ГАП и листов MXene в структуре БЦ.

3. Комплексный структурный анализ композита БЦ/ГАП/MXene подтвердил успешную интеграцию всех компонентов в наномасштабе. СЭМ и ЭДС выявили отдельные микроагломераты ГАП (1–5 мкм), встроенные в матрицу БЦ/MXene, с элементным картированием, подтверждающим колокализацию Ca и P из ГАП и Ti из MXene. Визуализация поперечного сечения с помощью TEM и FIB предоставила прямые доказательства наличия наночастиц ГАП (50–200 нм), закрепленных на границе раздела между слоями БЦ и MXene, подтверждая иерархическую архитектуру с разделением фаз. Анализ XPS продемонстрировал значительный сдвиг энергии связи Ti 2p ($\Delta \approx$ 2,5 эВ) в композите БЦ/ГАП/Mxene по сравнению с БЦ/MXene, что указывает на сильные интерфейсные электронные взаимодействия между MXene и ГАП. Добавление MXene/ГАП повышало прочность на разрыв до 43 МПа и увеличивало относительное удлинение при растяжении на 8 %

4. Способы стерилизации нанокомпозита БЦ/ГАП/MXene холодной плазмой или этиленоксидом являются предпочтительными, поскольку обеспечивают минимальные изменения структуры и функциональных свойств материала с сохранением электропроводности и фототермического отклика на уровне 94–98 % от исходного.

5. Включение нанокомплекса ГАП/MXene в БЦ придает композиту БЦ/ГАП/MXene высокую антибактериальную и антибиоплёночную активность в отношении клинически значимых патогенов с множественной лекарственной устойчивостью. Степень бактериостатического ингибирования роста 95% (P. aeruginosa) и 99% (S. aureus). В физиологически релевантной

модели хронической раневой биоплёнки (LCWB) наблюдалось снижение жизнеспособности MRSA до 98% и FQRPA до 86%.

6. Наноструктурированная архитектура композита БЦ/ГАП/MXene способствует высокой адгезии фибробластов NIH-3T3 к поверхности материала и их активной пролиферации. Клетки, культивируемые на среде с материалом, характеризовались высоким уровнем метаболической активности в МТТ-тесте (>81%), что указывает на отсутствие выраженной цитотоксичности и приемлемый уровень биосовместимости композита.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Goshisht M. K. Emerging Nanomaterial Strategies for Antibacterial and Antibiofilm Applications: Innovations in Bacterial Detection, Mechanistic Understanding, and Therapeutic Interventions to Address Antibiotic Resistance // APMIS. – 2025. – Vol. 133, № 7. – P. 70050.
2. Moradi F., Ghaedi A., Fooladfar Z., Bazrgar A. Recent advance on nanoparticles or nanomaterials with anti-multidrug resistant bacteria and anti-bacterial biofilm properties: A systematic review // Heliyon. – 2023. – Vol. 9, № 11. – P. 22105.
3. Nandhini J., Karthikeyan E., Rajeshkumar S. Nanomaterials for wound healing: Current status and futuristic frontier // Biomedical Technology. – 2024. – Vol. 6. – P. 26–45.
4. Portela R., Leal C. R., Almeida P. L., Sobral R. G. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications // Microbial Biotechnology. – 2019. – Vol. 12, № 4. – P. 586–610.
5. Choi S. M., Rao K. M., Zo S. M., Shin E. J., Han S. S. Bacterial Cellulose and Its Applications // Polymers. – 2022. – Vol. 14, № 6. – P. 1080.
6. Rasool K., Helal M., Ali A., Ren C. E., Gogotsi Y., Mahmoud K. A. Antibacterial Activity of Ti_3C_2Tx MXene // ACS Nano. – 2016. – Vol. 10, № 3. – P. 3674–3684.
7. Yang C., Luo Y., Lin H., Ge M., Shi J., Zhang X. Niobium Carbide MXene Augmented Medical Implant Elicits Bacterial Infection Elimination and Tissue Regeneration // ACS Nano. – 2021. – Vol. 15, № 1. – P. 1086–1099.
8. Zheng K., Li S., Jing L., Chen P.-Y., Xie J. Synergistic antimicrobial titanium carbide (MXene) conjugated with gold nanoclusters // Advanced Healthcare Materials. – 2020. – Vol. 9, № 19. – P. 2001007.
9. Lim G. P., Soon C. F., Ma N. L., Morsin M., Nayan N., Ahmad M. K., Tee K. S. Cytotoxicity of MXene-based nanomaterials for biomedical applications: A mini review // Environmental Research. – 2021. – Vol. 201. – P. 111592.
10. Okabayashi R., Nakamura M., Okabayashi T., Tanaka Y., Nagai A., Yamashita K. Efficacy of polarized hydroxyapatite and silk fibroin composite dressing gel on epidermal recovery from full-thickness skin wounds // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2009. – Vol. 90, № 2. – P. 641–646.
11. Ribeiro N., Sousa A., Cunha-Reis C., Oliveira A. L., Granja P. L., Monteiro F. J., Sousa S. R. New prospects in skin regeneration and repair using nanophased hydroxyapatite embedded in collagen nanofibers // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. – 2021. – Vol. 33. – P. 102353.
12. Jadali A., Ghazizadeh S. Protein kinase D is implicated in the reversible commitment to differentiation in primary cultures of mouse keratinocytes // Journal of Biological Chemistry. – 2010. – Vol. 285, № 30. – P. 23387–23397.

13. Bikle D. D., Ng D., Tu C. L., Oda Y., Xie Z. Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2001. – Vol. 177, № 1-2. – P. 161–171.

14. Guziewicz W., Srivatsa S., Zambrzycki M., Dziadek M., Szatkowski P., Szymczak P., Berent K., Marciszko-Wiąckowska M., Radecka M., Kołodziejczyk A., Uhl T. MXene/Bacterial Cellulose Hybrid Materials for Sustainable Soft Electronics // Materials. – 2024. – Vol. 17, № 22. – P. 5513.

15. İlhan S. N., Yilmaz B. A., Ciftci F. Functional bacterial cellulose-based MXene ($Ti_3C_2T_x$) electronic-skin patch for accelerated healing and monitoring // BME Frontiers. – 2025. – Vol. 6, № 1. – P. 0109.

16. Grande C. J., Torres F. G., Gomez C. M., Bañó M. C. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications // Acta Biomaterialia. – 2009. – Vol. 5, № 5. – P. 1605–1615.

17. Saska S., Barud H. S., Gaspar A. M. M., Marchetto R., Ribeiro S. J. L., Messaddeq Y. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration // International Journal of Biomaterials. – 2011. – P. 175362.

18. Fu Y., Zhang J.-B., Lin H., Mo A. C. 2D titanium carbide (MXene) nanosheets and 1D hydroxyapatite nanowires into free-standing nanocomposite membrane: in vitro and in vivo evaluations for bone regeneration // Materials Science and Engineering: C. – 2021. – Vol. 118. – P. 111367.

19. Bhong M., Khan T. K. H., Devade K., Krishna B. V., Sura S., Eftikhaar H. K., Thethi H. P., Gupta N. Review of composite materials and applications // Materials Today: Proceedings. – 2023. – Vol. 22. – P. 1–15.

20. Davlet M., Smyrnova K., Pogrebnjak A. Advanced biomaterials in tissue engineering: A critical review of nanocomposites based on bacterial cellulose, MXenes, hydroxyapatite, and metal particles for regenerative medicine // Advances in Colloid and Interface Science. – 2025. – Vol. 345. – P. 103634.

21. Sultana N., Cole A., Strachan F. Biocomposite Scaffolds for Tissue Engineering: Materials, Fabrication Techniques and Future Directions // Materials. – 2024. – Vol. 17, № 22. – P. 5577.

22. Sultana N. Mechanical and biological properties of scaffold materials // Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds. – 2018. – Chap. 1. – P. 1–21.

23. Vaiani L., Boccaccio A., Uva A. E., Palumbo G., Piccininni A., Guglielmi P., Cantore S., Santacroce L., Charitos I. A., & Ballini A. Ceramic materials for biomedical applications: An overview on properties and fabrication processes // Journal of Functional Biomaterials. – 2023. – Vol. 14, № 3. – P. 146.

24. Abouelkheir S. S., Kamara M. S., Atia S. M., Amer S. A., Youssef M. I., Abdelkawy R. S., Khattab S. N., Sabry S. A. Novel research on nanocellulose production by a marine Bacillus velezensis strain SMR: a comparative study // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 14202.

25. Rahman M. M., Netravali A. N. Aligned bacterial cellulose arrays as “green” nanofibers for composite materials // ACS Macro Letters. – 2016. – Vol. 5, № 9. – P. 1070–1074.

26. Commission Recommendation of 10 June 2022 on the definition of nanomaterial 2022/C 229/01.

27. Ibrahim A. A., Dellinger A. L., Coscarelly J., Pathiraja G., Obare S. O., LaJeunesse D. Enhanced thermal and structural properties of bacterial cellulose with $MgAl_2O_4$ nanoparticles integration // Materials Advances. – 2025. – Vol. 6. – P. 3063–3072.

28. Martirani-VonAbercron S.-M., Pacheco-Sánchez D. Bacterial cellulose: A highly versatile nanomaterial // Microbial Biotechnology. – 2023. – Vol. 16, № 6. – P. 1174–1178.

29. Zhao J., Wu Q., Liu Y., Liu H., Xie Y., Hu C., Zhang X., Wang Y. Antibacterial activity of silver-doped zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli and Staphylococcus aureus // Nanomaterials. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 58.

30. Fatima A., Ortiz-Albo P., Neves L. A., Nascimento F. X., Crespo J. G. Biosynthesis and characterization of bacterial cellulose membranes presenting relevant characteristics for air/gas filtration // Journal of Membrane Science. – 2023. – Vol. 674. – P. 121509.

31. Poddar M. K., Dikshit P. K. Recent development in bacterial cellulose production and synthesis of cellulose-based conductive polymer nanocomposites // Nano Select. – 2021. – Vol. 2, № 9. – P. 1605–1628.

32. Barja F. Bacterial nanocellulose production and biomedical applications // Journal of Biomedical Research. – 2021. – Vol. 35, № 4. – P. 310–317.

33. Zhou Y., Reshmy R., Philip E., Thomas D., Sindhu R., Bhargava P. C., Tiwari A., Ruiz H. A., Madhavan A., Pandey A., Awasthi M. K. Bacterial nanocellulose: Optimized synthesis and biomedical applications // Industrial Crops and Products. – 2023. – Vol. 205. – P. 117589.

34. Singh S., Bhardwaj S., Tiwari P., Dev K., Ghosh K., Maji P. K. Recent advances in cellulose nanocrystals-based sensors: a review // Materials Advances. – 2024. – Vol. 5, № 7. – P. 2622–2654.

35. Ghilan A., Nicu R., Ciolacu D. E., Ciolacu F. Insight into the Latest Medical Applications of Nanocellulose // Materials. – 2023. – Vol. 16, № 12. – P. 4447.

36. Bao Y., He J., Song K., Guo J., Zhou X., Liu S. Functionalization and Antibacterial Applications of Cellulose-Based Composite Hydrogels // Polymers. – 2022. – Vol. 14, № 4. – P. 769.

37. Li X., Wang Y., Chen Z., Liu J., Zhang Z., Li H., Gao C. Enhanced mechanical and antibacterial properties of nanocellulose-silver composite films // Nanomaterials. – 2020. – Vol. 10, № 3. – P. 406.

38. Sahin F., Kayra N., Aytekin A. O. Optimizing the production of bacterial cellulose nanofibers and nanocrystals through strategic fiber pretreatment // Biopolymers. – 2025. – Vol. 116, № 1. – P. 23634.

39. Cruz M. A., Flor-Unda O., Avila A., Garcia M. D., Cerda-Mejía L. Advances in bacterial cellulose production: A scoping review // Coatings. – 2024. – Vol. 14, № 11. – P. 1401.

40. Popa L., Ghica M. V., Tudoroiu E.-E., Ionescu D.-G., Dinu-Pîrvu C.-E. Bacterial cellulose — a remarkable polymer as a source for biomaterials tailoring // Materials. – 2022. – Vol. 15, № 3. – P. 1054.

41. Torres F. G., Commeaux S., Troncoso O. P. Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials // Journal of Functional Biomaterials. – 2012. – Vol. 3, № 4. – P. 864–878.

42. Kim S.-H., Lee J., Park J.-H., Choi Y.-J., Kim Y.-G., Kim K. Enhanced properties of bacterial cellulose-based nanocomposites for biomedical applications // Polymers. – 2024. – Vol. 14, № 21. – P. 4670.

43. Girard V.-D., Chaussé J., Vermette P. Bacterial cellulose: a comprehensive review // Journal of Applied Polymer Science. – 2024. – Vol. 141, № 15. – P. 55163.

44. Assis S. C. de, Morgado D. L., Scheidt D. T., Souza S. S. de, Cavallari M. R., Ando Junior O. H., Carrilho E. Review of bacterial nanocellulose-based electrochemical biosensors: functionalization, challenges, and future perspectives // Biosensors. – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 142.

45. Gomes N. O., Carrilho E., Machado S. A. S., Sgobbi L. F. Bacterial cellulose-based electrochemical sensing platform: a smart material for miniaturized biosensors // Electrochimica Acta. – 2020. – Vol. 349. – P. 136341.

46. Liu Y., Zhang H., Liu X., Wang Q., Li S., Song Y., Zhao X. Advanced functional cellulose-based biopolymers: synthesis, properties and biomedical applications // Polymers. – 2025. – Vol. 15, № 16. – P. 3466.

47. Buldum G., Mantalaris A. Systematic understanding of recent developments in bacterial cellulose biosynthesis at genetic, bioprocess and product levels // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, № 13. – P. 7192.

48. Talipova A. B., Buranych V. V., Savitskaya I. S., Bondar O. V., Turlybekuly A., Pogrebnjak A. D. Synthesis, properties, and applications of nanocomposite materials based on bacterial cellulose and MXene // Polymers. – 2023. – Vol. 15, № 20. – P. 4067.

49. Lahiri D., Nag M., Dutta B., Dey A., Sarkar T., Pati S., Edinur H. A., Abdul Kari Z., Mohd Noor N. H., Ray R. R. Bacterial cellulose: production, characterization, and application as antimicrobial agent // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, № 23. – P. 12984.

50. Koehler J., Brandl F. P., Goepferich A. Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds // European Polymer Journal. – 2018. – Vol. 100. – P. 1–11.

51. Dutta S. D., Patel D. K., Lim K.-T. Functional cellulose-based hydrogels as extracellular matrices for tissue engineering // Journal of Biological Engineering. – 2019. – Vol. 13. – P. 55.

52. Sawada M., Sridhar K., Kanda Y., Yamanaka S. Pure hydroxyapatite synthesis originating from amorphous calcium carbonate // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 11546.

53. Singh A., Mishra A. K., Yadav R., Gautam S., Verma R. K., Choudhary R., Singh R. K. Electrospun nanofibers for biomedical applications: a comprehensive review // Nanomaterials. – 2021. – Vol. 11, № 10. – P. 2569.

54. Sultana S., Hossain M. S., Mahmud M., Mobarak M. B., Kabir M. H., Sharmin N., Ahmed S. UV-assisted synthesis of hydroxyapatite from eggshells at ambient temperature: cytotoxicity, drug delivery and bioactivity // RSC Advances. – 2021. – Vol. 11, № 6. – P. 3686–3694.

55. Mohd Pu'ad N. A. S., Koshy P., Abdullah H. Z., Idris M. I., Lee T. C. Syntheses of hydroxyapatite from natural sources // Heliyon. – 2019. – Vol. 5, № 5. – P. 01588.

56. Nambiar M., Yeow J. T. W. A comprehensive review of hydroxyapatite composites in biomedical applications // RSC Advances. – 2017. – Vol. 7, № 22. – P. 13372–13393.

57. Chen H., Wang Q., Li Y., Wang X., Zhang Y., Jiang Y., Zhang X. Novel bioactive glass–ceramic coatings on titanium surfaces for improved osteogenic activity // Journal of Functional Biomaterials. – 2025. – Vol. 16, № 4. – P. 127.

58. Salama A., Khattab S. N., El-Shafei A., El-Sadek M. M. Injectable bacterial cellulose-based hydrogels reinforced with nanohydroxyapatite for bone tissue engineering // Materials Science and Engineering: C. – 2020. – Vol. 108. – P. 109965.

59. Kong B., Gao X., Shi R., Leong W. L., Cui L., Yang M., Wang J., Zhou X. Bacterial nanocellulose-based nanocomposites: synthesis, properties and biomedical applications // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2021. – Vol. 8. – P. 627015.

60. Sun Y., Wang Y., Ji C., Ma J., He B. The impact of hydroxyapatite crystal structures and protein interactions on bone's mechanical properties // Scientific Reports. – 2024. – Vol. 14, № 1. – P. 9786.

61. Kareem Z., Eyiler E. Synthesis of hydroxyapatite from eggshells via wet chemical precipitation: a review // RSC Advances. – 2024. – Vol. 14, № 30. – P. 21439–21452.

62. Ha S. W., Jang H. L., Nam K. T., Beck G. R. Jr. Nano-hydroxyapatite modulates osteoblast lineage commitment by stimulation of DNA methylation and regulation of gene expression // Biomaterials. – 2015. – Vol. 65. – P. 32–42.

63. Zhang X., Feng Y., Li H., Liu J., Wang Y., Shi X., Yang L., Chen Y. Enhanced osteogenic and antibacterial performance of MXene–hydroxyapatite composite coatings on titanium implants // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2023. – Vol. 15, № 4. – P. 5332–5344.

64. Osuchukwu O. A., Salihi A., Abdullahi I., Abdulkareem B., Nwannenna C. S. Synthesis techniques, characterization and mechanical properties of natural derived hydroxyapatite scaffolds for bone implants: a review // SN Applied Sciences. – 2021. – Vol. 3. – P. 822.

65. Sultana S., Hossain M. S., Nayak S. K., Kabir M. H., Sharmin N., Ahmed S. Facile synthesis and characterization of hydroxyapatite from waste eggshell and

its antibacterial assessment // RSC Advances. – 2020. – Vol. 10, № 56. – P. 33964–33974.

66. Tarafdar A., Gaur V. K., Rawat N., Wankhade P. R., Gaur G. K., Awasthi M. K., Sagar N. A., Sirohi R. Advances in biomaterial production from animal derived waste // Bioengineered. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 8247–8258.

67. Tommila M., Jokinen J., Wilson T., Forsback A.-P., Saukko P., Penttinen R., Ekholm E. Bioactive glass-derived hydroxyapatite-coating promotes granulation tissue growth in subcutaneous cellulose implants in rats // Acta Biomaterialia. – 2008. – Vol. 4, № 2. – P. 354–361.

68. Ragab H. S., Ibrahim F. A., Abdallah F., Al-Ghamdi A. A., El-Tantawy F., Yakuphanoglu F. Synthesis and in vitro antibacterial properties of hydroxyapatite nanoparticles // IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 77–85.

69. Protyai M. I. H., Rashid A. B. A comprehensive overview of recent progress in MXene-based polymer composites: their fabrication processes, advanced applications, and prospects // Heliyon. – 2024. – Vol. 10, № 17. – P. 37030.

70. Jussambayev M., Shakenov K., Sultakhan S., Zhantikeyev U., Askaruly K., Toshtay K., Azat S. MXenes for sustainable energy: a comprehensive review on conservation and storage applications // Carbon Trends. – 2025. – Vol. 19. – P. 100471.

71. Pogorielov V. M., Smyrnova K., Kyrylenko S., Zahorodna V., Pogrebnjak A. MXenes — a new class of two-dimensional materials: Structure, properties and potential applications // Nanomaterials. – 2021. – Vol. 11, № 12. – P. 3412.

72. Said Z., Sohail M. A., Tabassum H., Sajid I. H., Ali H. M., Jamil F., Mishra Y. K., Pandey A. K. MXenes at the forefront: advances in energy storage and nanofluidic applications // Advanced Composites and Hybrid Materials. – 2025. – Vol. 8, № 4. – P. 320.

73. Khan I. A., Yogarathinam L. T., Younas H., Mushtaq A., Aljundi I. H., Baig N. The rise of MXenes: synthesis, properties and fabrication of advanced membranes // Desalination. – 2026. – Vol. 620. – P. 119598.

74. Sun Z. M. Progress in research and development on MAX phases: a family of layered ternary compounds // International Materials Reviews. – 2011. – Vol. 56, № 3. – P. 143–166.

75. Ahmed E. M. Exploring the potential of MXenes in advanced energy storage systems: a review // RSC Advances. – 2025. – Vol. 15. – P. 44812–44863.

76. Brette F., Kourati D., Paris M., Loupias L., Célérier S., Cabioch T., Deschamps M., Boucher F., Mauchamp V. Assessing the surface chemistry of 2D transition metal carbides (MXenes): a combined experimental/theoretical ^{13}C solid state NMR approach // Journal of the American Chemical Society. – 2023. – Vol. 145. – P. 4003–4014.

77. Seredych M., Shuck C. E., Pinto D., Alhabeb M., Precetti E., Deysher G., Anasori B., Kurra N., Gogotsi Y. High-Temperature Behavior and Surface

Chemistry of Carbide MXenes Studied by Thermal Analysis // Chemistry of Materials. – 2019. – Vol. 31, № 9. – P. 3324–3332.

78. Long Y., Tao Y., Shang T., Yang H., Sun Z., Chen W., Yang Q.-H. Roles of metal ions in MXene synthesis, processing and applications: a perspective // Advanced Science. – 2022. – Vol. 9, № 12. – P. 2200296.

79. Siwal S. S., Kaur H., Chauhan G., Thakur V. K. MXene-Based Nanomaterials for Biomedical Applications: Healthier Substitute Materials for the Future // Advanced NanoBiomed Research. – 2023. – Vol. 3, № 1. – P. 2200123.

80. Dadashi Firouzjaei M., Nemani S. K., Sadrzadeh M., Wujcik E. K., Elliott M., Anasori B. Life-Cycle Assessment of $Ti_3C_2T_x$ MXene Synthesis // Advanced Materials. – 2023. – Vol. 35, № 31. – P. 2300422.

81. Zhang H. Ultrathin Two-Dimensional Nanomaterials // ACS Nano. – 2015. – Vol. 9, № 10. – P. 9451–9469.

82. Alhabeb M., Maleski K., Anasori B., Lelyukh P., Clark L., Sin S., Gogotsi Y. Guidelines for Synthesis and Processing of Two-Dimensional Titanium Carbide ($Ti_3C_2T_x$) MXene // Chemistry of Materials. – 2017. – Vol. 29, № 18. – P. 7633–7644.

83. Dinesh R. P. R., Dinesh S., Siti N. A. Z. The effect of fluoride-based salt etching in the synthesis of Ti_3C_2 MXene // Materials Research Proceedings. – 2023. – Vol. 29. – P. 59–65.

84. Ahmed B., Hossain M. J., Islam T., Jalil A. M., Rakibuzzaman S. M., Surid S. M., Zabed M. R. I. Recent advancements of MXene/nanocellulose-based hydrogel and aerogel: a review // Advanced Energy & Sustainability Research. – 2024. – Vol. 5, № 3.

85. Abid M. Z., Rafiq K., Aslam A., Jin R., Hussain E. Scope, evaluation and current perspectives of MXene synthesis strategies for state-of-the-art applications // Journal of Materials Chemistry A. – 2024. – Vol. 12. – P. 7351–7395.

86. Mozafari M., Soroush M. Surface functionalization of MXenes // Materials Advances. – 2021. – Vol. 2, № 22. – P. 7277–7307.

87. Yu R., Zhang H., Guo B. Conductive biomaterials as bioactive wound dressing for wound healing and skin tissue engineering // Nano-Micro Letters. – 2022. – Vol. 14, № 1.

88. Li Y., Hu Y., Wei H., Cao W., Qi Y., Zhou S., Zhang P., Li H., Li G. L., Chai R. Two-dimensional $Ti_3C_2T_x$MXene promotes electrophysiological maturation of neural circuits // Journal of Nanobiotechnology. – 2022. – Vol. 20, № 1. – P. 1–16.

89. Mayerberger E. A., Street R. M., McDaniel R. M., Barsoum M. W., Schauer C. L. Antibacterial properties of electrospun $Ti_3C_2T_x$ (MXene)/chitosan nanofibers // RSC Advances. – 2018. – Vol. 8. – P. 35386–35394.

90. Pandey R. P., Abdul Rasheed P., Gomez T., Rasool K., Ponraj J., Prenger K., Naguib M., Mahmoud K. A. Effect of sheet size and atomic structure on the antibacterial activity of niobium MXene nanosheets // ACS Applied Nano Materials. – 2020. – Vol. 3, № 11. – P. 11372–11382.

91. Wang W., Feng H., Liu J., Zhang M., Liu S., Feng C., Chen S., Chen H., Hu X., Tian S. A photocatalyst of cuprous oxide anchored on MXene nanosheets with dramatic enhancement of synergistic antibacterial ability // Chemical Engineering Journal. – 2020. – Vol. 386. – P. 124116.

92. Li H., Mu M., Chen B., Zhou L., Han B., Guo G. MXene-based nanomaterials for antibacterial and wound healing // Materials Research Letters. – 2024. – Vol. 12, № 2. – P. 67–87.

93. Gayathri V. G., Richard B., Chacko J. T., Bayry J., Rasheed P. A. Non-Ti MXenes: new biocompatible and biodegradable candidates for biomedical applications // Journal of Materials Chemistry B. – 2025. – Vol. 13. – P. 1212–1228.

94. Shamsabadi A. A., Sharifian Gh. M., Anasori B., Soroush M. Antimicrobial mode-of-action of colloidal $Ti_3C_2T_x$ MXene nanosheets // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. – 2018. – Vol. 6, № 12. – P. 16586–16596.

95. Wang L., Li Y., Zhao L., Qi Z., Gou J., Zhang S., Zhang J. Z. Recent advances in ultrathin two-dimensional materials and biomedical applications for reactive oxygen species generation and scavenging // Nanoscale. – 2020. – Vol. 12, № 38. – P. 19516–19535.

96. Seidi F., Arabi Shamsabadi A., Dadashi Firouzjaei M., Elliott M., Saeb M. R., Huang Y., Li C., Xiao H., Anasori B. MXenes Antibacterial Properties and Applications: A Review and Perspective // Small. – 2023. – Vol. 19, № 14. – P. 2206716.

97. Khazaei M., Ranjbar A., Arai M., Sasaki T., Yunoki S. Electronic properties and applications of MXenes: a theoretical review // Journal of Materials Chemistry C. – 2017. – Vol. 5, № 10. – P. 2488–2503.

98. Joze-Majidi H., Zabihi E., Arab-Bafrani Z., Mir S. M., Reiter R. J. Comparative radiosensitization efficiency assessment of graphene oxide and Ti_3C_2 MXene as 2D carbon-based nanoparticles against breast cancer cells: characterization, toxicity and mechanisms // 2D Materials. – 2023. – Vol. 10, № 2. – P. 025021.

99. Chen J., Liu L., Wang W., Gao H., Li Z., Cheng G. Tailored hydrogel delivering niobium carbide boosts ROS-scavenging and antimicrobial activities for diabetic wound healing // Small. – 2022. – Vol. 18, № 27. – P. 2201300.

100. Xin H., Liu Y., Xiao Y., Wen M., Sheng L., Jia Z. Design and nanoengineering of photoactive antimicrobials // Advanced Functional Materials. – 2024. – Vol. 34, № 38. – 2402607.

101. Lin H., Wang X., Yu L., Chen Y., Shi J. Two-Dimensional Ultrathin MXene Ceramic Nanosheets for Photothermal Conversion // Nano Letters. – 2017. – Vol. 17, № 1. – P. 384–391.

102. Schön A., Freire E. Reversibility and irreversibility in the temperature denaturation of monoclonal antibodies // Analytical Biochemistry. – 2021. – Vol. 626. – P. 114240.

103. Wang X., Yao M., Ma L., Yu P., Lu T., Lu Z., Yin J., Tang C., Tang H., Zhao S., Li Z., Wang H., Liu H., Zhang S. NIR-Responsive Ti_3C_2 MXene

Colloidal Solution for Purulent Subcutaneous Infection Treatment // Advanced Healthcare Materials. – 2021. – Vol. 10, № 14. – P. 2100392.

104. Tian Y., Li Y., Liu J., Lin Y., Jiao J., Chen B., Wang W., Wu S., Li C. Photothermal therapy with regulated Nrf2/NF-κB signaling pathway for treating bacteria-induced periodontitis // Bioactive Materials. – 2021. – Vol. 9. – P. 428–445.

105. Yang X., Huang J., Chen C., Zhou L., Ren H., Sun D. Biomimetic Design of Double-Sided Functionalized Silver Nanoparticle/Bacterial Cellulose/Hydroxyapatite Hydrogel Mesh for Temporary Cranioplasty // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2023. – Vol. 15, № 8. – P. 10506–10519.

106. Zhang G., Lu Y., Song J., Huang D., An M., Chen W., Han P., Yao X., Zhang X. A multifunctional nano-hydroxyapatite/MXene scaffold for the photothermal/dynamic treatment of bone tumours and simultaneous tissue regeneration // Journal of Colloid and Interface Science. – 2023. – Vol. 652, Pt B. – P. 1673–1684.

107. Sun S., Yuan R., Ling S., Zhou T., Wu Z., Fu M., He H., Li X., Zhang C. Self-healable, self-adhesive and degradable MXene-based multifunctional hydrogel for flexible epidermal sensors // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2024. – Vol. 16, № 6. – P. 7826–7837.

108. Mao L., Chen Z., Wang Y., Zhang Y., Chen C., (и др.) Biodegradable and electroactive regenerated bacterial cellulose/MXene ($Ti_3C_2T_x$) composite hydrogel as wound dressing for accelerating skin wound healing under electrical stimulation // Advanced Healthcare Materials. – 2020. – Vol. 9, № 19. – P. 2000872.

109. Wang X., Yang X., Xiao X., Li X., Chen C., Sun D. Biomimetic design of platelet-rich plasma controlled release bacterial cellulose/hydroxyapatite composite hydrogel for bone tissue engineering // International Journal of Biological Macromolecules. – 2024. – Vol. 269, Pt 2. – P. 132124.

110. Thanachotkullapat P., Sukyai P., Li Y.-C. E., Morakul S., Torgbo S. Fabrication, physicochemical characterization and in vitro evaluation of pre-osteoblast cells on bacterial cellulose/hydroxyapatite reinforced with chitosan composite scaffold for bone tissue engineering // International Journal of Biological Macromolecules. – 2025. – Vol. 334, – P. 148779.

111. Liu H., Gao S., Li A., Zhang L., Zhao X., Zhang H., Wu J., Zhang P. Mussel-inspired conductive hydrogel with MXene for enhanced osteogenic and antibacterial performance // Materials Today Bio. – 2023. – Vol. 18. – P. 100740.

112. Liang Y., Qiao L., Qiao B., Guo B. Conductive hydrogels for tissue repair // Chemical Science. – 2023. – Vol. 14, № 12. – P. 3091–3116.

113. Wang Y., Wu T., Mo X., Wang Y. Recent advances and biomedical applications of conductive hydrogels for wound repair // Journal of Materials Chemistry B. – 2025. – Vol. 13. – P. 11148–11165.

114. Nie L., Wei Q., Li J., Deng Y., He X., Gao X., Ma X., Liu S., Sun Y., Jiang G., Okoro O. V., Shavandi A., Jing S. Fabrication and desired properties of conductive hydrogel dressings for wound healing // RSC Advances. – 2023. – Vol. 13, № 25. – P. 8502–8522.

115. Ren D., Zhang Y., Du B., Wang L., Gong M., Zhu W. An antibacterial, conductive nanocomposite hydrogel coupled with electrical stimulation for accelerated wound healing // International Journal of Nanomedicine. – 2024. – Vol. 19. – P. 4495–4513.

116. Zheng L., Li S., Luo J., Wang X. Latest advances on bacterial cellulose-based antibacterial materials as wound dressings // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – Vol. 8, P. 593768.

117. Paramshetti S., Angolkar M., Al Fatease A., Alshahrani S. M., Hani U., Garg A., Ravi G., Osmani R. A. M. Revolutionizing drug delivery and therapeutics: the biomedical applications of conductive polymers and composites-based systems // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15, № 4, P. 1204.

118. Abdelhamid H. N., Mathew A. P. Cellulose-based nanomaterials advance biomedicine: a review // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 10, P. 5405.

119. Rajwade J. M., Paknikar K. M., Kumbhar J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2015. – Vol. 99, № 6. – P. 2491–2511.

120. Yang G., Zhang Z., Liu K., Ji X., Fatehi P., Chen J. A cellulose nanofibril-reinforced hydrogel with robust mechanical, self-healing, pH-responsive and antibacterial characteristics for wound dressing applications // Journal of Nanobiotechnology. – 2022. – Vol. 20, № 1, P. 312.

121. Loh E. Y. X., Mohamad N., Fauzi M. B., Ng M. H., Ng S. F., Mohd Amin M. C. I. Development of a bacterial cellulose-based hydrogel cell carrier containing keratinocytes and fibroblasts for full-thickness wound healing // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8, P. 2875.

122. Zhu Y., Hao L., Luo Y., Gao J., Xu F., Li H., Hao C., Lin C., Yu H., Zhu Y., Duan J. A composite dressing combining ultralong hydroxyapatite nanowire bio-paper and a calcium alginate hydrogel accelerates wound healing // Journal of Materials Chemistry B. – 2025. – Vol. 13, № 3. – P. 997–1012.

123. Hao L., Liang S., Han Q., Jing Y., Li J., Li Q., Wang A., Bai S., Yin J. Ultralong hydroxyapatite nanowires-incorporated dipeptide hydrogel with enhanced mechanical strength and superior in vivo osteogenesis activity // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2023. – Vol. 664, P. 131153.

124. Zhou L., Zheng H., Liu Z., Wang S., Liu Z., Chen F., Zhang H., Kong J., Zhou F., Zhang Q. Conductive antibacterial hemostatic multifunctional scaffolds based on $Ti_3C_2T_x$ MXene nanosheets for promoting multidrug-resistant bacteria-infected wound healing // ACS Nano. – 2021. – Vol. 15, № 2. – P. 2468–2480.

125. Liu J., Han X., Zhang T., Wu Y., Chen H., Li Q., Zhao X., Wang L., Zhang C. Reactive oxygen species (ROS) scavenging biomaterials for anti-inflammatory diseases: from mechanism to therapy // Journal of Hematology & Oncology. – 2023. – Vol. 16, № 1, P. 116.

126. Checa J., Aran J. M. Reactive oxygen species: drivers of physiological and pathological processes // Journal of Inflammation Research. – 2020. – Vol. 13. – P. 1057–1073.

127. Liu J., Lu W., Lu X., Zhang L., Dong H., Li Y. Versatile $Ti_3C_2T_x$ MXene for free-radical scavenging // Nano Research. – 2022. – Vol. 15, № 3. – P. 2558–2566.

128. Hou L., Gong F., Liu B., Yang X., Chen L., Li G., Gong Y., Liang C., Yang N., Shen X., Liu Z., Cheng L. Orally administered titanium carbide nanosheets as anti-inflammatory therapy for colitis // Theranostics. – 2022. – Vol. 12, № 8. – P. 3834–3846.

129. Li Y., Fu R., Duan Z., Zhu C., Fan D. Artificial nonenzymatic antioxidant MXene nanosheet-anchored injectable hydrogel as a mild photothermal-controlled oxygen release platform for diabetic wound healing // ACS Nano. – 2022. – Vol. 16, № 5. – P. 7486–7502.

130. Geng H., Ren Y., Qin G., Wen T., Liu Q., Xu H., He W. Ti_3C_2 nanosheets with broad-spectrum antioxidant activity for cytoprotection against oxidative stress // RSC Advances. – 2022. – Vol. 12, № 18. – P. 11128–11138.

131. Ju P. S., Mei H. Z., Jia L. Z., Fu J. J., Ma L. J., Li D. T., Hu X. S., Chen F. A green, ROS-scavenging and anti-bacterial hydrogel loading MnO_2-curcumin nanocomposite for the full-thickness wound healing // Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2024. – Vol. 100, P. 105951.

132. Fernandes I. de A. A., Maciel G. M., Rampazzo Ribeiro V., Rossetto R., Pedro A. C., Haminiuk C. W. I. The role of bacterial cellulose loaded with plant phenolics in prevention of UV-induced skin damage // Carbohydrate Polymer Technologies and Applications. – 2021. – Vol. 2. – P. 100122.

133. Pinmanee P., Sompinit K., Jantimaporn A., Khongkow M., Haltrich D., Nimchua T., Sukyai P. Purification and immobilization of superoxide dismutase obtained from Saccharomyces cerevisiae TBRC657 on bacterial cellulose and its protective effect against oxidative damage in fibroblasts // Biomolecules. – 2023. – Vol. 13, № 7, P. 1156.

134. Wang B., Huang Y., Cai Q., Du Z., Li X. Biomaterials for diabetic bone repair: Influencing mechanisms, multi-aspect progress and future prospects // Composites Part B: Engineering. – 2024. – Vol. 274, P. 111282.

135. Yu Y., Li X., Li J., Li D., Wang Q., Teng W. Dopamine-assisted co-deposition of hydroxyapatite-functionalised nanoparticles of polydopamine on implant surfaces to promote osteogenesis in environments with high ROS levels // Materials Science and Engineering: C – Materials for Biological Applications. – 2021. – Vol. 131, P. 112473.

136. Hosseini M., Shafiee A. Engineering bioactive scaffolds for skin regeneration // Small. – 2021. – Vol. 17, № 41, P. 2101384.

137. Zhang W.-J., Li S., Yan Y.-Z., Park S. S., Mohan A., Chung I., Ahn S.-K., Kim J.-R., Lee J. R., Ha C.-S. Dual (pH- and ROS-) responsive antibacterial MXene-based nanocarrier for drug delivery // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 23, P. 14925.

138. Soleymaniha M., Shahbazi M.-A., Rafieerad A. R., Maleki A., Amiri A. Promoting role of MXene nanosheets in biomedical sciences: therapeutic and biosensing innovations // Advanced Healthcare Materials. – 2019. – Vol. 8, № 1, P. 1801137.

139. Zhang J., Tang S., Ding N., Ma P., Zhang Z. Surface-modified Ti_3C_2 MXene nanosheets for mesenchymal stem cell osteogenic differentiation via photothermal conversion // Nanoscale Advances. – 2023. – Vol. 5, № 12. – P. 2921–2932.

140. Xie Z., Fan T., An J., Choi W., Duo Y., Ge Y., Zhang B., Nie G., Xie N., Zheng T., Chen Y., Zhang H., Kim J. S. Emerging combination strategies with phototherapy in cancer nanomedicine // Chemical Society Reviews. – 2020. – Vol. 49, № 22. – P. 8065–8087.

141. Szuplewska A., Kulpińska D., Dybko A., Jastrzębska A. M., Wojciechowski T., Rozmysłowska A., Chudy M., Grabowska-Jadach I., Ziemkowska W., Brzózka Z., Olszyna A. 2D Ti_2C (MXene) as a novel highly efficient and selective agent for photothermal therapy // Materials Science and Engineering: C – Materials for Biological Applications. – 2019. – Vol. 98. – P. 874–886.

142. Kyrylenko S., Gogotsi O., Baginskiy I., Balitskyi V., Zahorodna V., Husak Y., Yanko I., Pernakov M., Roshchupkin A., Lyndin M., Singer B. B., Buranych V., Pogrebnjak A., Sulaieva O., Solodovnyk O., Gogotsi Y., Pogorielov M. MXene-assisted ablation of cells with a pulsed near-infrared laser // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2022. – Vol. 14, № 25. – P. 28683–28696.

143. Du T., Zhao S., Dong W., Ma W., Zhou X., Wang Y., Zhang M. Surface modification of carbon fiber-reinforced polyetheretherketone with MXene nanosheets for enhanced photothermal antibacterial activity and osteogenicity // ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2022. – Vol. 8, № 6. – P. 2375–2389.

144. Chang L., Huang S., Zhao X., Hu Y., Ren X., Mei X., Chen Z. Preparation of ROS active and photothermal responsive hydroxyapatite nanoplatforms for anticancer therapy // Materials Science and Engineering: C – Materials for Biological Applications. – 2021. – Vol. 125, P. 112098.

145. Jo G., Park Y., Park M. H., Hyun H. Near-Infrared fluorescent hydroxyapatite nanoparticles for targeted photothermal cancer therapy // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15, № 5, P. 1374.

146. Hong H., Kim M., Lee W., Jeon M., Lee C., Kim H., Im H.-J., Piao Y. Injectable biocompatible nanocomposites of Prussian blue nanoparticles and bacterial cellulose as a safe and effective photothermal cancer therapy // Journal of Nanobiotechnology. – 2023. – Vol. 21, № 1, P. 365.

147. Ma J., Zhang L., Lei B. Multifunctional MXene-based bioactive materials for integrated regeneration therapy // ACS Nano. – 2023. – Vol. 17, № 20. – P. 19526–19549.

148. Iravani S., Varma R. S. MXenes and MXene-based materials for tissue engineering and regenerative medicine: recent advances // Materials Advances. – 2021. – Vol. 2, № 9. – P. 2906–2917.

149. Zhantlessova S., Savitskaya I., Kistaubayeva A., Ignatova L., Talipova A., Pogrebnjak A., Digel I. Advanced “Green” Prebiotic Composite of Bacterial Cellulose/Pullulan Based on Synthetic Biology-Powered Microbial Coculture Strategy // Polymers. – 2022. – Vol. 14, № 15, P. 3224.

150. Gromovykh T. I., Tikchonova O. A., Bardakova K. N., Lutsenko S. V., Kiselyova O. I., Feldman N. B., Gavryushina I. A., Pigaleva M. A. Elaboration of bacterial cellulose matrix for the immobilisation of Escherichia coli cells // International Journal of Nanotechnology. – 2018. – Vol. 15, № 4/5. – P. 288–300.

151. Farag S., Asker M. S. M., Mahmoud M. G., Ibrahim H., Amr A. Comparative Study for Bacterial Cellulose Production Using Egyptian Achromobacter sp. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2016. – Vol. 7, № 6. – P. 954–969.

152. Ghidiu M., Lukatskaya M. R., Zhao M.-Q., Gogotsi Y., Barsoum M. W. Conductive two-dimensional titanium carbide ‘clay’ with high volumetric capacitance // Nature. – 2014. – Vol. 516, № 7529. – P. 78–81.

153. Hassan M. U., Lee S., Mehran M. T., Shahzad F., Husnain S. M., Ryu H. J. Post-decontamination treatment of MXene after adsorbing Cs from contaminated water with the enhanced thermal stability to form a stable radioactive waste matrix // Journal of Nuclear Materials. – 2021. – Vol. 543, P. 152566.

154. Daulbayev C., Sultanov F., Aldasheva M., Abdybekova A., Bakbolat B., Shams M., Chekiyeva A., Mansurov Z. Nanofibrous biologically soluble scaffolds as an effective drug delivery system // Comptes Rendus. Chimie. – 2021. – Vol. 24, № 1. – P. 1–9.

155. Ullah H., Santos H. A., Khan T. Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and biomedical fields // Cellulose. – 2016. – Vol. 23. – P. 2291–2314.

156. ISO 17665:2024 Sterilization of health care products — Moist heat — Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices. – 2024.

157. ISO 11135:2014 Sterilization of health-care products — Ethylene oxide — Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices. – 2014.

158. Stoppel W. L., White J. C., Horava S. D., Henry A. C., Roberts S. C., Bhatia S. R. Terminal sterilization of alginate hydrogels: efficacy and impact on mechanical properties // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2014. – Vol. 102, № 4. – P. 877–884.

159. Tyubaeva P., Zykova A., Podmasteriev V., Olkhov A., Popov A., Iordanskii A. The investigation of the structure and properties of ozone-sterilized nonwoven biopolymer materials for medical applications // Polymers. – 2021. – Vol. 13, № 8, P. 1268.

160. Ribeiro N., Soares G. C., Santos-Rosales V., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C., García-González C. A., Oliveira A. L. A new era for sterilization based on supercritical CO_2 technology // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2020. – Vol. 108, № 2. – P. 399–428.

161. Karthik C., Mavelil-Sam R., Thomas S., Thomas V. Cold Plasma Technology Based Eco-Friendly Food Packaging Biomaterials // Polymers. – 2024. – Vol. 16, № 2, P. 230.

162. CLSI M26. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline — Second Edition. – Wayne, PA : CLSI, 2015.

163. Sun Y., Dowd S. E., Smith E., Rhoads D. D., Wolcott R. D. In vitro multispecies Lubbock chronic wound biofilm model // Wound Repair and Regeneration. – 2008. – Vol. 16, № 6. – P. 805–813.

164. Di Lodovico S., Petrini M., Di Fermo P., De Pasquale V., De Martino L., D'Ercole S., Nocera F. P., Di Giulio M. Staphylococcus pseudintermedius and Pseudomonas aeruginosa Lubbock Chronic Wound Biofilm (LCWB): a suitable dual-species model for in vitro studies // Microbes and Infection. – 2024. – Vol. 26, № 8, P. 105384.

165. Kučera J., Sojka M., Pavlik V., Szuszkiewicz K., Velebny V., Klein P. Multispecies biofilm in an artificial wound bed — a novel model for in vitro assessment of solid antimicrobial dressings // Journal of Microbiological Methods. – 2014. – Vol. 103. – P. 18–24.

166. ISO 10993-5:2023 Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. – 2023.

167. Sukumaran V., Senanayake S. Bacterial skin and soft tissue infections // Australian Prescriber. – 2016. – Vol. 39, № 5. – P. 159–163.

168. Anderson J. G., Tosi M. F., Asbell P. A. In vitro antimicrobial efficacy of a preservative-free combination of polyquaternium-1 and myristamidopropyl dimethylamine against microorganisms associated with contact-lens-related adverse events // Journal of Cataract & Refractive Surgery. – 2012. – Vol. 38, № 4. – P. 690–698.

169. Cao L.-L., Zhang Z.-F., Min J., Yuan D., Yu J.-Y., Yu P. Beyond bone regeneration: Hydroxyapatite's emerging potential in advanced wound management // Materials Today Communications. – 2025. – Vol. 48, P. 113426.

170. Hu Y., Catchmark J. M. Formation and characterization of spherelike bacterial cellulose particles produced by Acetobacter xylinum JCM 9730 strain // Biomacromolecules. – 2010. – Vol. 11, № 7. – P. 1727–1734.

171. Гладышева Е. К. Биосинтез бактериальной целлюлозы на ферментативном гидролизате технической целлюлозы из плодовых оболочек овса // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 140–146.

172. Ul-Islam M., Khan T., Park J. K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by different methods of production // Carbohydrate Polymers. – 2012. – Vol. 88, № 2. – P. 596–603.

173. Chen G., Wu G., Chen L., Wang W., Hong Y., Lin X., Chen J., Yang Y. Recent advances in bacterial cellulose production and its biomedical applications // Microbial Biotechnology. – 2022. – Vol. 15, № 6. – P. 1721–1746.

174. Mohammadkazemi F., Doosthoseini K., Azin M. Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus (PTCC 1734) // Cellulose Chemistry and Technology. – 2015. – Vol. 49, № 5–6. – P. 455–462.

175. Montenegro-Silva P., Ellis T., Dourado F., Gama M., Domingues L. Enhanced bacterial cellulose production in Komagataeibacter sucrofermentans: impact of different PQQ-dependent dehydrogenase knockouts and ethanol supplementation // Biotechnology for Biofuels and Bioproducts. – 2024. – Vol. 17, № 1, P. 35.

176. Hong F., Qiu K. An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain Acetobacter aceti subsp. xylinus ATCC 23770 // Carbohydrate Polymers. – 2008. – Vol. 72, № 3. – P. 545–549.

177. Vázquez A., Foresti M. L., Cerrutti P., Galvagno M. A. Bacterial cellulose from simple and low-cost production media by Gluconacetobacter xylinus // Journal of Polymers and the Environment. – 2013. – Vol. 21, № 2. – P. 545–554.

178. Li Z., Wang L., Hua J., Jia S., Zhang J., Liu H. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using Acetobacter xylinum // Carbohydrate Polymers. – 2015. – Vol. 120. – P. 115–119.

179. Huang C., Yang X.-Y., Xiong L., Guo H.-J., Luo J., Wang B., Zhang H.-R., Lin X.-Q., Chen X.-D. Evaluating the possibility of using acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation wastewater for bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus // Letters in Applied Microbiology. – 2015. – Vol. 60, № 5. – P. 491–496.

180. Revin V. V., Dolganov A. V., Liyaskina E. V., Nazarova N. B., Balandina A. V., Devyataeva A. A., Revin V. D. Characterizing bacterial cellulose produced by Komagataeibacter sucrofermentans H-110 on molasses medium and obtaining a biocomposite based on it for the adsorption of fluoride // Polymers. – 2021. – Vol. 13, № 9 – P. 1422.

181. Keshk S. M. A. S., Razek T. M. A., Sameshima K. Bacterial cellulose production from beet molasses // African Journal of Biotechnology. – 2006. – Vol. 5, № 17 – P. 1519–1523.

182. Barshan S., Rezazadeh-Bari M., Almasi H., Amiri S. Optimization and characterization of bacterial cellulose produced by Komagataeibacter xylinus PTCC 1734 using vinasse as a cheap cultivation medium // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 136 – P. 1188–1195.

183. Kumar U. V., Narayanasamy S., Uthandi S. Bacterial cellulose: A comprehensive review on biosynthesis, sustainable production, and multifaceted industrial applications // Food and Bioprocess Technology. – 2025. – Vol. 18, No. 3 – P. 153–174.

184. Shokatayeva D., Ignatova L., Savitskaya I., Kistaubaeva A., Talipova A., et al. Bacterial cellulose and pullulan from simple and low cost production media // Eurasian Chemico-Technological Journal. – 2019. – Vol. 21, No. 3 – P. 247–258.

185. Heydorn R. L., Lammers D., Gottschling M., Dohnt K. Effect of food industry by-products on bacterial cellulose production and its structural properties // Cellulose. – 2023. – Vol. 30 – P. 4159–4179.

186. Sharma A., Thakur M., Bhattacharya M., Mandal T., Goswami S. Commercial application of cellulose nano-composites – a review // Biotechnology Reports. – 2019. – Vol. 21 – P. e00316.

187. Quijano L., Rodrigues R., Fischer D., Tovar-Castro J. D., Payne A., Navone L., Hu Y., Yan H., Pinmanee P., Poon E., Yang J. H., Barro E. Bacterial cellulose cookbook: a systematic review on sustainable and cost-effective substrates // Journal of Bioresources and Bioproducts. – 2024. – Vol. 9, No. 4 – P. 379–409.

188. Ye S., Liu J., Zhang X., Wang H., Li Y., Zhang T. MXene: A wonderful nanomaterial in antibacterial // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2024. – Vol. 12 – P. 1338539.

189. Zarepour A., Rafati N., Khosravi A., Rabiee N., Iravani S., Zarrabi A. MXene-based composites in smart wound healing and dressings // Nanoscale Advances. – 2024. – Vol. 6 – P. 3513–3532.

190. Jia X.-T., Xing H.-W., Cheng X.-W., Zhang Z.-H., Wang Q., Zhou J.-Z., He Y.-Y., Li W.-J. Two-Dimensional Nanostructured $Ti_3C_2T_x$ MXene for Ceramic Materials: Preparation and Applications // Nanomaterials. – 2025. – Vol. 15, № 3. – P. 204.

191. Liew J., Bashir S., Ramesh K., Ramesh S. R. A comprehensive characterisation of titanium carbide (Ti_3C_2) MXene with hydrothermal-assisted in-situ hydrofluoric acid etching // Materials Science and Engineering: B. – 2025. – Vol. 314 – P. 118076.

192. Urbankowski P., Anasori B., Makaryan T., Er D., Kota S., Walsh P. L., Zhao M., Shenoy V. B., Barsoum M. W., Gogotsi Y. Synthesis of two-dimensional titanium nitride Ti_4N_3 (MXene) // Nanoscale. – 2016. – Vol. 8, No. 22 – P. 11385–11391.

193. Wang Z., Zhou W., Yang H., Wang L., Li X., Zhou Z. MXenes: next-generation 2D nanomaterials for effective antimicrobial applications // Chemical Engineering Journal. – 2025. – Vol. 516 – P. 163681.

194. Miao L., Wang C., Hou J., Wang P., Xu Y., et al. Aggregation and removal of copper oxide (CuO) nanoparticles in wastewater environment and their effects on the microbial activities of wastewater biofilms // Bioresource Technology. – 2016. – Vol. 216 – P. 537–544.

195. Masih A., Tripathi S., Raj V. S., Thakur O. P. Optimum ultrasonication duration for effective antimicrobial activity of Ti_3C_2-MXene // Materials Chemistry and Physics. – 2024. – Vol. 328 – P. 129979.

196. Alsafari I. A., Munir S., Zulfiqar S., Saif M. S., Warsi M. F., Shahid M. Synthesis, characterization, photocatalytic and antibacterial properties of copper ferrite/MXene ($CuFe_2O_4/Ti_3C_2$) nanohybrids // Ceramics International. – 2021. – Vol. 47, № 20 – P. 28874–28883.

197. Akhter R., Maktedar S. S. MXenes: A comprehensive review of synthesis, properties, and progress in supercapacitor applications // Journal of Materiomics. – 2023. – Vol. 9, № 6 – P. 1196–1241.

198. Saju D. M., Sapna R., Deka U., Hareesh K. MXene material for supercapacitor applications: A comprehensive review on properties, synthesis and machine learning for supercapacitance performance prediction // Journal of Power Sources. – 2025. – Vol. 647. – P. 237302.

199. Malchik F., Maldybayev K., Kan T., Kokhmetova S., Chae M. S., Kurbatov A., Galeyeva A., Kaupbay O., Nimkar A., Bergman G., Levi N., Zhang H., Jin Q., Lin Z., Shpigel N., Mandler D. Boosting the capacity of MXene electrodes in neutral aqueous electrolytes // Cell Reports Physical Science. – 2023. – Vol. 4, No. 7 – P. 101507.

200. Wu J., Yu Yanyan, Su Gaoxing. Safety Assessment of 2D MXenes: In Vitro and In Vivo // Nanomaterials. – 2022. – Vol. 12, № 5. – Art. 828.

201. Zhang Y., Liu X., Wang J., Chen H., Li Z., Zhao Y. Photothermal-enhanced antibacterial activity of MXene-based nanocomposites for biomedical applications // Nanoscale. – 2024.

202. Li T., Qiang W., Lei B. Bioactive surface-functionalized MXenes for biomedicine // Nanoscale. – 2025. – Vol. 17, № 9 – P. 4854–4891.

203. Yelten-Yilmaz A., Yilmaz S. Wet chemical precipitation synthesis of hydroxyapatite (HA) powders // Ceramics International. – 2018. – Vol. 44, № 8 – P. 9703–9710.

204. Prakasam V. P. A., Rajasree S. R. Extraction and characterization of biogenic nano-calcium derived from Daysciaena albida and Otolithes ruber: potential applications // Food Technology and Biotechnology. – 2025. – Vol. 63, No. 1 – P. 74–82.

205. Etinosa P. O., Osuchukwu O. A., Anisiji E. O., Lawal M. Y., Mohammed S. A., Ibitoye O. I., Oni P. G., Aderibigbe V. D., Aina T., Oyebode D., Nwigbo S. C. In-depth review of synthesis of hydroxyapatite biomaterials from natural resources and chemical reagents for biomedical applications // Arabian Journal of Chemistry. – 2024. – Vol. 17, No. 12 – P. 106010.

206. Perotti G. F., Barud H. S., Messaddeq Y., Ribeiro S. J. L., Constantino V. R. Bacterial cellulose–Laponite clay nanocomposites // Polymer. – 2011. – Vol. 52, № 1 – P. 157–163.

207. Huang-Chan Huang, Li-Chen Chen, Shih-Bin Lin, Chieh-Ping Hsu, Hui-Huang Chen. In situ modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation // Bioresource Technology. – 2010. – Vol. 101, № 15 – P. 6084–6091.

208. Shin Ping Lin, Iris Loira Calvar, Jeffrey M. Catchmark, Je-Ruei Liu, Ali Demirci, Kuan-Chen Cheng. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose // Cellulose. – 2013. – Vol. 20, № 5 – P. 2191–2219.

209. Hu W., Chen S., Yang J., Li Z., Wang H. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites // Carbohydrate Polymers. – 2014. – Vol. 101 – P. 1043–1060.

210. Challa A. A., Saha N., Zhivkova T., Alexandrova R., Saha P. Bacterial cellulose/graphene oxide/hydroxyapatite biocomposite: a scaffold from sustainable sources for bone tissue engineering // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2025. – Vol. 17, № 1. – P. 572–582.

211. Ramani D., Sastry T. P. Bacterial cellulose-reinforced hydroxyapatite functionalized graphene oxide: a potential osteoinductive composite // Cellulose. – 2014. – Vol. 21, № 5. – P. 3585–3595.

212. Wang J., Wan Y., Han J., Lei X., Yan T., Gao C. Nanocomposite prepared by immobilising gelatin and hydroxyapatite on bacterial cellulose nanofibres // Micro & Nano Letters. – 2011. – Vol. 6, № 3. – P. 133–136.

213. Zimmermann K. A., LeBlanc J. M., Sheets K. T., Fox R. W., Gatenholm P. Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications // Materials Science and Engineering: C. – 2011. – Vol. 31, № 1 – P. 43–49.

214. Hutchens S. A., Benson R. S., Evans B. R., Rawn C. J., O'Neill H. A resorbable calcium-deficient hydroxyapatite hydrogel composite for osseous regeneration // Cellulose. – 2009. – Vol. 16, № 5 – P. 887–898.

215. Nicoara A. I., Stoica A. E., Ene D.-I., Vasile B. S., Holban A. M., Neacsu I. A. In Situ and Ex Situ Designed Hydroxyapatite: Bacterial Cellulose Materials with Biomedical Applications // Materials. – 2020. – Vol. 13, № 21 – P. 4793.

216. Orelma H., Morales L. O., Johansson L. S., Hoeger I. C., Filpponen I., Castro C., Rojas O. J., Laine J. Affibody conjugation onto bacterial cellulose tubes and bioseparation of human serum albumin // RSC Advances. – 2014. – Vol. 4, № 93 – P. 51440–51450.

217. Wang J., Wan Y., Huang Y. Immobilisation of heparin on bacterial cellulose-chitosan nano-fibres surfaces via the cross-linking technique // IET Nanobiotechnology. – 2012. – Vol. 6, № 2 – P. 52-57.

218. Talipova A., Kistaubayeva A., Pogrebnjak A., Turlybekuly A., Savitskaya I., Saidildina S. Features of Bacterial Cellulose Hydroxyapatite Nanocomposites Obtained by Two Different Techniques // Nanomaterials in Biomedical Application and Biosensors (NAP-2019). Springer Proceedings in Physics, Springer, Singapore. – 2020. - Vol. 244. - P.161-167.

219. Turlybekuly A., Sagidugumar A., Otarov Y., Magazov N., Pogrebnjak A., Savitskaya I., Akatan K., Kistaubayeva A. , Talipova A. Bacterial Cellulose/Hydroxyapatite Printed Scaffolds for Bone Engineering // Nanomaterials in Biomedical Application and Biosensors (NAP-2019). Springer Proceedings in Physics, Springer, Singapore. – 2020. -Vol. 244. - P. 1-7.

220. Abu Hasan N. S., Mohamad S., Sy Mohamad S. F., Arzmi M. H., Supian N. N. I. Ex-situ development and characterization of composite film based on bacterial cellulose derived from oil palm frond juice and chitosan as food packaging // Pertanika Journal of Science & Technology. – 2023. – Vol. 31, № 3.

221. Casals E., Gusta M. F., Bastus N., Rello J., Puntes V. Silver Nanoparticles and Antibiotics: A Promising Synergistic Approach to Multidrug-Resistant Infections // Microorganisms. – 2025. – Vol. 13, № 4 – P. 952.

222. Sukhodub L. F., Pogrebnjak A. D., Sukhodub L. B., Sagidugumar A., Kistaubayeva A. S., Savitskaya I. S., Talipova A., Sadibekov A., Kantay N., Akatan K., Turlybekuly A. Antibacterial and physical characteristics of silver-loaded hydroxyapatite/alginate composites // Functional Composites and Structures. – 2021. – Vol. 3, № 4 – P. 045010.

223. Wang C., Wang X., Zhang L., Yin L. MXene for high energy and power density: a perspective // JPhys Energy. – 2020. – Vol. 2, № 4 – P. 041002.

224. Pogrebnjak A. D., Smyrnova K. V., Talipova A. B. MXenes for environmental applications // Eurasian Journal of Ecology. – 2022. – № 1(70). – P. 16–23.

225. Chen K., Qiu N., Deng Q., Kang M. H., Yang H., Baek J. U., Koh Y. H., Du S., Huang Q., Kim H. E. Cytocompatibility of Ti_3AlC_2, Ti_3SiC_2, and Ti_2AlN: In Vitro Tests and First-Principles Calculations // ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2017. – Vol. 3, № 10. – P. 2293–2301.

226. Vasil'kov A., Budnikov A., Gromovykh T., Pigaleva M., Sadykova V., Arkharova N., Naumkin A. Effect of bacterial cellulose plasma treatment on the biological activity of Ag nanoparticles deposited using magnetron deposition // Polymers. – 2022. – Vol. 14, № 18 – P. 3907.

227. Gomes G. C., Borghi F. F., Ospina R. O., López E. O., Borges F. O., Mello A. Nd:YAG (532 nm) pulsed laser deposition produces crystalline hydroxyapatite thin coatings at room temperature // Surface and Coatings Technology. – 2017. – Vol. 329 – P. 174–183.

228. Yuan K., Hao P., Hu X., Zhang J., Zhou Y. Experimental and computational studies on S-decorated Ti_3C_2 MXene as anode material in Li-ion batteries // Journal of Materials Science. – 2022. – Vol. 57 – P. 7001–7011.

229. Natu V., Benchakar M., Canaff C., Habrioux A., Célérier S., Barsoum M. W. A critical analysis of the X-ray photoelectron spectra of Ti_3C_2Tz MXenes // Matter. – 2021. – Vol. 4, № 4 – P. 1224–1251.

230. Sonaglia E., Schifano E., Sharbaf M., Uccelletti D., Felici A. C., Santarelli M. L. Bacterial nanocellulose hydrogel for the green cleaning of copper stains from marble // Gels. – 2024. – Vol. 10, № 2 – P. 150.

231. Anasori B., Lukatskaya M. R., Gogotsi Y. 2D metal carbides and nitrides (MXenes) for energy storage // Nature Reviews Materials. – 2017. – Vol. 2 – P. 16098.

232. Шокатаева Д.Х., Савицкая И.С., Кистаубаева А.С., Абдулжанова М.А. Талипова А.Б. Структурные и механические свойства бактериальной целлюлозы, полученной при культивировании продуцента на средах с производственными отходами // Вестник КазНУ экологический. – 2018. – 2(55), 2018. – С. 80-91.

233. Sknepnek A., Filipović S., Pavlović V. B., Mirković N., Miletić D., Gržetić J., Mirković M. Effects of synthesis parameters on structure and antimicrobial properties of bacterial cellulose/hydroxyapatite/TiO_2 polymer–ceramic composite material // Polymers. – 2024. – Vol. 16, № 4 – P. 470.

234. Ma C., Cao W., Zhang W., Ma M.-G., Sun W.-M., Zhang J., Chen F. Wearable, ultrathin and transparent bacterial celluloses/MXene film with Janus structure and excellent mechanical property for electromagnetic interference shielding // Chemical Engineering Journal. – 2021. – Vol. 403 – P. 126438.

235. Zhang H., Wang L., Chen Q., Li P., Zhou A., Cao X., Hu Q. Preparation, mechanical and anti-friction performance of MXene/polymer composites // Materials & Design. – 2016. – Vol. 92 – P. 682–689.

236. Doğan E., Tokcan P., Diken M. E., Yılmaz B., Kızılduman B. K., Sabaz P. Synthesis, Characterization and Some Biological Properties of PVA/PVP/PN Hydrogel Nanocomposites: Antibacterial and Biocompatibility // Advances in Materials Science. – 2019. – Vol. 19, № 3. – P. 32–45.

237. ISO 11137-1:2025 Sterilization of health care products — Radiation — Part 1: Requirements for development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices. – 2025.

238. Munarin F., Bozzini S., Visai L., Tanzi M. C., Petrini P. Sterilization treatments on polysaccharides: Effects and side effects on pectin // Food Hydrocolloids. – 2013. – Vol. 31, № 1. – P. 74–84.

239. Moore E., Cortese Y. J., Colbert D. M. A Review of Sterilization Methods and Their Commercial Impacts on Polysaccharide-Based Biomaterials // Macromol — A Journal of Macromolecular Research. – 2025. – Vol. 5, № 4. – P. 45.

240. Mahmoud Y. A.-G., Elkaliny N. E., Elshikh F. M., Ashraf Y., Metwally K., Yahya G., Sherif S. Cold plasma as a revolutionary antimicrobial modality: a multifaceted weapon against antibiotic resistance // Antibiotics. – 2025. – Vol. 14, № 9. – P. 930.

241. Herczeg C. K., Song J. Sterilization of polymeric implants: challenges and opportunities // ACS Applied Bio Materials. – 2022. – Vol. 5, № 11. – P. 5077–5088.

242. Vink P., Pleijsier K. Aeration of ethylene oxide-sterilized polymers // Biomaterials. – 1986. – Vol. 7, № 3. – P. 225–230.

243. Xue H., Ji L., Zhang K., Wang P., Liao X., Tan J. Preparation, properties, and applications of polysaccharide-based films: a comprehensive overview // Journal of Future Foods. – 2025. – P. 05.011.

244. Kumar S., Park H. M., Nguyen V. H., Kim M., Nasir N., Suleman M., Lee S., Seo Y. Oxidation-driven auto-conversion of $Ti_3C_2T_x$ MXene to TiO_2 nanoparticles for photocatalytic applications // Journal of Alloys and Compounds. – 2024. – Vol. 976. – P. 173399.

245. Chiper A. S., Borcia G. Stable surface modification by cold atmospheric-pressure plasma: comparative study on cellulose-based and synthetic polymers // Polymers. – 2023. – Vol. 15, № 20. – P. 4172.

246. Bowler P. G., Duerden B. I., Armstrong D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management // Clinical Microbiology Reviews. – 2001. – Vol. 14, № 2. – P. 244–269.

247. Natsha S., Lacey H., Belkebir S., Attili A., Atatra A., Daragmeh R., Abu-Safa A., Dheansa B., Khayyat R. Microbial profile of burn wound injuries in the

Northern West Bank — a retrospective cohort study // Burns Open. – 2025. – Vol. 9. – P. 100379.

248. Mulani M. S., Kamble E. E., Kumkar S. N., Tawre M. S., Pardesi K. R. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol. 10, P. 539.

249. Ahmed S. K., Hussein S., Qurbani K., Ibrahim R. H., Fareeq A., Mahmood K. A., Mohamed M. G. Antimicrobial resistance: impacts, challenges, and future prospects // Journal of Medicine, Surgery and Public Health. – 2024. – Vol. 2. – P. 100081.

250. Yousefian F., Hesari R., Jensen T., Obagi S., Rgeai A., Damiani G., Bunick C. G., Grada A. Antimicrobial wound dressings: a concise review for clinicians // Antibiotics. – 2023. – Vol. 12, № 9. – P. 1434.

251. Uddin T. M., Chakraborty A. J., Khusro A., Zidan B. R. M., Mitra S., Emran T. B., Dhama K., Ripon M. K. H., Gajdács M., Sahibzada M. U. K., Hossain M. J., Koirala N. Antibiotic resistance in microbes: history, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects // Journal of Infection and Public Health. – 2021. – Vol. 14, № 12. – P. 1750–1766.

252. Liu Y., He L., Mustapha A., Li H., Hu Z. Q., Lin M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7 // Journal of Applied Microbiology. – 2009. – Vol. 107, № 4. – P. 1193–1201.

253. Сейшанло Ф.С., Талипова А.Б. Антимикробный композитный материал на основе природного полимера // МАТЕРИАЛЫ международной научной конференции студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ӘЛЕМІ» Алматы, Казахстан, 6-8 апреля 2023 года, С. 328.

254. Wu C., Xia L., Feng W., Chen Y. MXene-Mediated Catalytic Redox Reactions for Biomedical Applications // ChemPlusChem. – 2024. – Vol. 89, № 6. – P. e202300777.

255. Li Jinhua, Wang Gang, Zhu Hongqin, Zhang Miao, Zheng Xiaohu, Di Zengfeng, Liu Xuanyong, Wang Xi. Antibacterial activity of large-area monolayer graphene film manipulated by charge transfer // Scientific Reports. – 2014. – Vol. 4. – P. 4359.

256. Liu Shaobin, Zeng Tingying Helen, Hofmann Mario, Burcombe Ehdi, Wei Jun, Jiang Rongrong, Kong Jing, Chen Yuan. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress // ACS Nano. – 2011. – Vol. 5, № 9. – P. 6971–6980.

257. Li Y., Zhang W., Niu J., Chen Y. Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles // ACS Nano. – 2012. – Vol. 6, № 6. – P. 5164–5173.

258. Hong Y., Boiti A., Vallone D., Foulkes N. S. Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution // Antioxidants. – 2024. – Vol. 13, № 3. – P. 312.

259. Ferrara V., et al. Advanced approaches in skin wound healing – a review on MXene-based wound healing devices // Nanoscale. – 2024.

260. Sakalauskienė G. V., Radzevičienė A. Biofilm and Outer Membrane Vesicle Formation in ESKAPE Gram-Negative Bacteria: A Comprehensive Review // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26, № 20, P. 9857.

261. Abolhasani F. S., Vaghefinanekaran N., Yarahmadi A., et al. Outer Membrane Vesicles in Gram-Negative Bacteria and Its Correlation with Pathogenesis // Frontiers in Immunology. – 2025. – P. 1541636.

262. Liu J., Lin Y., Lin H., Lin M., Fan Z. Impacts of exogenous ROS scavenger ascorbic acid on the storability and quality attributes of fresh longan fruit // Food Chemistry: X. – 2021. – Vol. 12. – P. 100167.

263. Kora A. J., Arunachalam J. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on Pseudomonas aeruginosa and its mechanism of action // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Vol. 27, № 5. – P. 1209–1216.

264. Rasool K., Mahmoud K. A., Johnson D. J., Helal M., Berdiyorov G. R., Gogotsi Y. Efficient Antibacterial Membrane based on Two-Dimensional $Ti_3C_2T_x$ (MXene) Nanosheets // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 1598.

265. Iravani S., Varma R. S. MXene-based composites against antibiotic-resistant bacteria: current trends and future perspectives // RSC Advances. – 2023. – Vol. 13, № 14. – P. 9665–9677.

266. AhadiParsa M., Dehghani A., Ramezanzadeh M., Ramezanzadeh B. Rising of MXenes: Novel 2D-functionalized nanomaterials as a new milestone in corrosion science – a critical review // Advances in Colloid and Interface Science. – 2022. – Vol. 307. – P. 102730.

267. Zhang Y., Yin Y., Li J., Yang F., Meng L., Cai Y., Wu J., Guo F., Wang W. MXene-based anti-corrosive coatings: From physical barrier to active corrosion protection // Progress in Organic Coatings. – 2025. – Vol. 204. – P. 109225.

268. Percival S. L., McCarty S. M., Lipsky B. Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence // Advances in Wound Care. – 2015. – Vol. 4, № 7. – P. 373–381.

269. Razdan K., Garcia-Lara J., Sinha V. R., Singh K. K. Pharmaceutical strategies for the treatment of bacterial biofilms in chronic wounds // Drug Discovery Today. – 2022. – Vol. 27, № 8. – P. 2137–2150.

270. Cavallo I., Sivori F., Mastrofrancesco A., Abril E., Pontone M., Di Domenico E. G., Pimpinelli F. Bacterial Biofilm in Chronic Wounds and Possible Therapeutic Approaches // Biology. – 2024. – Vol. 13, № 2. – P. 109.

271. Krasowska A., Sigler K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2014. – Vol. 4. – P. 112.

272. Martí M., Trotonda M. P., Tormo-Más M. A., Vergara-Irigaray M., Cheung A. L., Lasa I., Penadés J. R. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in Staphylococcus aureus // Microbes and Infection. – 2010. – Vol. 12, № 1. – P. 55–64.

273. Diban F., Di Lodovico S., Di Fermo P., D'Ercole S., D'Arcangelo S., Di Giulio M., Cellini L. Biofilms in Chronic Wound Infections: Innovative Antimicrobial Approaches Using the In Vitro Lubbock Chronic Wound Biofilm Model // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, № 2. – P. 1004.

274. Weisel J. W., Litvinov R. I. Fibrin Formation, Structure and Properties // Subcellular Biochemistry, Vol. 82: Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms. – 2017. – P. 405–456.

275. Deepachitra R., Sathish Kumar S., Ramesh R., Manivasakan P., Jayachandran M. Osteo-mineralization of fibrin-decorated graphene oxide // Carbon. – 2013. – Vol. 56. – P. 64–76.

276. Di Crescenzo A., Zara S., Di Nisio C., Ettorre V., Ventrella A., Zavan B., Di Profio P., Cataldi A., Fontana A. Graphene Oxide Foils as an Osteoinductive Stem Cell Substrate // ACS Applied Bio Materials. – 2019. – Vol. 2, № 4. – P. 1643–1651.

277. Krishnamoorthy R., Shen S., Ke T., Lin D. Achieving high bactericidal and antibiofouling activities of 2D titanium carbide ($Ti_3C_2T_x$) by delamination and intercalation // 2D Materials. – 2019. – Vol. 6, № 3. – P. 035040.

278. Jastrzębska A. M., Szuplewska A., Wojciechowski T., Chudy M., Olszyna A. In vitro studies on cytotoxicity of delaminated Ti_3C_2 MXene // Journal of Hazardous Materials. – 2017. – Vol. 339. – P. 1–8.

279. Betlej I., Rybak K., Nowacka M., Antczak A., Borysiak S., Krochmal-Marczak B., Lipska K., Boruszewski P. Structural properties of bacterial cellulose film obtained on a substrate containing sweet potato waste // Crystals. – 2022. – Vol. 12, № 9. – P. 1191.

280. Iwasa F., Hori N., Ueno T., Minamikawa H., Yamada M., Ogawa T. Enhancement of osteoblast adhesion to UV-photofunctionalized titanium via an electrostatic mechanism // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31, № 10. – P. 2717–2727.

281. Berridge M. V., Herst P. M., Tan A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction // Biotechnology Annual Review. – 2005. – Vol. 11. – P. 127–152.

282. Li X., Fu L., Chen F., Lv Y., Zhao S., Karimi-Maleh H. Research on the application of metal-organic framework (MOF)-based nanozymes in colorimetric and electrochemical detection of biomolecules // Inorganic Chemistry Communications. – 2025. – Vol. 179, Part 1. – P. 114752.

283. Yu R., Xue J., Wang Y., Qiu J., Huang X., Chen A., Xue J. Novel $Ti_3C_2T_x$ MXene nanozyme with manageable catalytic activity and application to electrochemical biosensor // Journal of Nanobiotechnology. – 2022. – Vol. 20, № 1. – P. 119.

284. Iravani S., Varma R. S. MXene-Based Composites as Nanozymes in Biomedicine: A Perspective // Nano-Micro Letters. – 2022. – Vol. 14, № 213. – P. 213.

285. Wang W., Yin Y., Gunasekaran S. Oxygen-terminated few-layered $Ti_3C_2T_x$ MXene nanosheets as peroxidase-mimic nanozyme for colorimetric detection of kanamycin // Biosensors and Bioelectronics. – 2022. – Vol. 218. – P. 114774.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Патент на полезную модель

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 11376

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL

(21) 2025/1329.2

(22) 05.09.2025

(45) 07.11.2025

(54) БИОКОМПОЗИТТІК МАТЕРИАЛДЫ АЛУ ТӘСІЛІ
СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОКОМПОЗИТНОГО МАТЕРИАЛА
METHOD OF OBTAINING BIOCOMPOSITE MATERIAL

(73) Шокатаева Дина Хабдулманатовна (KZ)
Shokatayeva Dina Khabdulmanatovna (KZ)

(72) Савицкая Ирина Станиславовна (KZ) Savitskaya Irina Stanislavovna (KZ)
Абашидзе Инара Исрафиловна (KZ) Abashidze Inara Israfilovna (KZ)
Шокатаева Дина Хабдулманатовна (KZ) Shokataeva Dina Khabdulmanatovna (KZ)
Кистаубаева Аида Сериковна (KZ) Kistaubaeva Aida Serikovna (KZ)
Талипова Айжан Бериковна (KZ) Talipova Aizhan Berikovna (KZ)
Мальчик Фёдор Игоревич (KZ) Malchik Fyodor Igorevich (KZ)

ЭЦҚ қол қойылды С. Ахметов
Подписано ЭЦП С. Ахметов
Signed with EDS S. Akhmetov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE