

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Локова Анастасия Юрьевна**

**Катионные полимеры и поликомплексы для создания биоцидных  
покрытий: физико-химический аспект**

1.4.7. Высокомолекулярные соединения

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук, профессор,  
член-корреспондент РАН  
Ярославов Александр Анатольевич

Москва – 2025

## СОДЕРЖАНИЕ

<i>Введение</i> .....	5
<b>1. Обзор литературы</b> .....	12
<b>1.1 Полимеры с ионными группами (полиэлектролиты)</b> .....	12
1.1.1 Общие представления о полиэлектролитах .....	12
1.1.2 Некоторые разновидности полиэлектролитов .....	13
<b>1.2 Интерполиэлектролитные комплексы</b> .....	14
1.2.1 Определение интерполиэлектролитных комплексов .....	14
1.2.2 Свойства интерполиэлектролитных комплексов .....	15
1.2.3 Формирование интерполиэлектролитных комплексов.....	16
1.2.4 Стехиометричные и нестехиометричные интерполиэлектролитные комплексы.....	17
<b>1.3 Интерполиэлектролитные реакции</b> .....	19
1.3.1 Общие представления об интерполиэлектролитных реакциях.....	19
1.3.2 Интерполиэлектролитные реакции обмена и замещения.....	20
<b>1.4 Полиэлектролит-коллоидные комплексы</b> .....	21
1.4.1 Определение полиэлектролит-коллоидных комплексов .....	21
1.4.2 Формирование полиэлектролит-коллоидных комплексов .....	21
<b>1.5 Биоцидные свойства поликатионов в водном растворе</b> .....	23
1.5.1 Применение катионных полимеров в качестве биоцидных соединений ...	23
1.5.2 Механизм антимикробного действия поликатиона .....	24
<b>1.6 Полимерные пленки и покрытия</b> .....	26
1.6.1 Определение полимерной плёнки и полимерного покрытия.....	26
1.6.2 Методы формирования полимерных плёнок .....	26
<b>1.7 Биоцидные свойства полимерных пленок и покрытий</b> .....	30
1.7.1 Разновидности полимеров с биоцидной активностью.....	30
1.7.2 Полимеры с собственной антимикробной активностью .....	31
1.7.3 Модифицированные полимеры с антимикробной активностью .....	35
1.7.4 Полимеры, содержащие антимикробные органические соединения ..	37
1.7.5 Полимеры, включающие противомикробные неорганические соединения .	39
<b>1.8 Механизм действия антимикробных полимеров</b> .....	40
1.8.1 Принцип антимикробного действия катионных полимеров.....	40

<b>2</b>	<b>Экспериментальная часть</b> .....	42
<b>2.1</b>	<b>Материалы</b> .....	42
2.1.1	Линейные полимеры.....	42
2.1.2	Фосфолипиды.....	43
2.1.3	Низкомолекулярные реагенты.....	44
2.1.4	Другие использованные материалы.....	44
<b>2.2</b>	<b>Объекты исследования</b> .....	45
2.2.1	Катионные нестехиометричные интерполиэлектродитные комплексы....	45
2.2.2	Малые моноламеллярные липосомы.....	46
<b>2.3</b>	<b>Методы исследования</b> .....	47
2.3.1	Динамическое светорассеяние.....	47
2.3.2	Электрофоретическая подвижность.....	48
2.3.3	Флуориметрия.....	48
2.3.5	Кондуктометрия.....	48
2.3.6	Гравиметрия.....	49
2.3.7	Атомно-силовая микроскопия (АСМ).....	50
2.3.8	Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).....	50
2.3.9	Исследование биоцидной активности полимерных рецептур, нанесенных на поверхность покровного стекла.....	51
<b>3</b>	<b>Результаты и их обсуждение</b> .....	52
<b>3.1</b>	<b>Формирование агрегативно стабильных интерполиэлектродитных комплексов</b> .....	52
<b>3.2</b>	<b>Взаимодействие катионных НИПЭК с анионными липосомами. Оценка антимикробной активности катионных НИПЭК</b> .....	57
3.2.1	Физико-химические исследования взаимодействия НИПЭК с липосомами.....	57
3.2.2	Биологическое тестирование ПДАДМАХ и НИПЭК.....	61
<b>3.3</b>	<b>Взаимодействие катионного полимера с анионными липосомами со встроенным в липидную мембрану порообразователем</b> .....	65
3.3.1	Механизм действия липида-переключателя.....	65
3.3.2	Влияние катионного полилизина на анионные липосомы, содержащие липид-переключатель.....	67

<b>3.4</b>	<b>Формирование бактерицидных покрытий из катионных полимеров и НИПЭК .....</b>	<b>70</b>
3.4.1	Сравнение устойчивости полимерных покрытий на основе индивидуального поликатиона и НИПЭК к смыванию водой.....	71
3.4.2	Морфология полимерных покрытий до и после обработки водой.....	74
3.4.3	Антимикробная активность полимерных покрытий после их обработки водой .....	77
<b>3.5</b>	<b>Замечания по поводу механизма антимикробного действия поликатионных покрытий .....</b>	<b>80</b>
<b>4</b>	<b>Заключение.....</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>Итоги выполненного исследования .....</b>	<b>87</b>
<b>4.2</b>	<b>Выводы.....</b>	<b>88</b>
<b>4.3</b>	<b>Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы .....</b>	<b>89</b>
	<b>Список используемых сокращений.....</b>	<b>91</b>
	<b>Список литературы.....</b>	<b>93</b>

### ***Введение***

**Актуальность темы.** Окружающий нас мир населяют различные микроорганизмы. Полезные микроорганизмы лежат в основе пищевых цепочек, разлагают органические вещества и помогают сохранять здоровье нашей планеты и нашего организма. Другие микроорганизмы относятся к разряду болезнетворных (патогенных) и подлежат уничтожению. Для борьбы с патогенными микроорганизмами применяют широкий круг веществ, которые получили название биоцидов. Классические низкомолекулярные биоциды (НМБ) зарекомендовали себя как эффективные средства для уничтожения бактерий и грибов. Однако, зачастую НМБ не обладают длительным действием, вызывают развитие устойчивости (резистентности) у микроорганизмов, показывают слабую адгезию к обрабатываемым поверхностям, формируют хрупкие покрытия, демонстрируют высокую токсичность по отношению к животным и человеку. Это заставляет обратиться к поиску биоцидов, лишённых указанных недостатков. Решение этой актуальной задачи позволит расширить спектр биоцидных рецептур, способных уничтожать микроорганизмы в водном растворе и на поверхности.

**Степень разработанности темы.** Один из активно обсуждаемых подходов к созданию эффективных антимикробных препаратов заключается в использовании биологически инертных полимеров, которые могут выступать в роли матрицы для иммобилизации (концентрирования) НМБ, или полимеров, обладающих собственной биоцидной активностью. К числу последних относятся полимеры линейного строения с катионными группами. Поскольку большинство известных микроорганизмов несет отрицательный поверхностный заряд, они способны сорбировать на своей поверхности катионные полимеры (поликатионы). Такое взаимодействие сопровождается диффузией полимера через клеточную стенку, связыванием полимера с цитоплазматической мембраной и ее разрушением, что в конечном итоге приводит к гибели клетки.

Катионные полимеры способны связываться с противоположно заряженными линейными полимерами (полианионами), в результате чего происходит формирование интерполиэлектrolитных комплексов (ИПЭК), стабилизированных множественными солевыми связями между ионными группами обоих полимеров. Нестехиометричные ИПЭК (НИПЭК) с избытком катионного полимера («катионные ИПЭК») представляют собой сополимеры с гидрофобными блоками, сформированными из взаимно нейтрализованных участков поликатиона и полианиона, и гидрофильными блоками, представленными последовательностями свободных, не связанных в ИПЭК, катионных групп. Катионные ИПЭК сохраняют биоцидные свойства, присущие исходным поликатионам. При этом гидрофобные блоки повышают эффективность связывания ИПЭК с поверхностью клеток, выполняя роль «якоря», проникающего вглубь цитоплазматической мембраны, и могут быть использованы для иммобилизации гидрофобных биологически активных веществ. Варьируя состав ИПЭК (соотношение катионного и анионного компонентов), можно в широких пределах изменять гидрофильно-гидрофобный баланс поликомплексных частиц, их размер, растворимость в воде и ряд других параметров, которые определяют их биоцидное действие.

Поведение биоцидных рецептур тестируют на культивируемых клеточных линиях, смесях клеток и разнообразных модельных системах. Последние используются в том случае, если основной целью исследования является изучение физико-химических аспектов взаимодействия «полимер-клетка»: миграции полимера по клеточной поверхности и между клетками, влияния полимера на распределение липидов в цитоплазматической мембране, встраивания полимера в липидный бислой, агрегации, слияния и разрушения клеток. В качестве моделей хорошо себя зарекомендовали полимерные микросферы и бислойные липидные везикулы – липосомы.

**Цель настоящей работы** заключалась в установлении корреляции между молекулярно-массовыми характеристиками поликатиона/НИПЭК и целостностью

биологической мембраны в контакте с поликатионом/НИПЭК, а также в проведении количественной оценки токсичности поликатиона/НИПЭК по отношению к культивируемым бактериальным клеткам.

Для достижения поставленной цели требовалось выполнить следующие задачи:

1. Получить НИПЭК из линейного катионного полимера с фиксированной молекулярной массой и линейного анионного полимера с варьируемой молекулярной массой.

2. Сформировать покрытия из НИПЭК на твердой поверхности и количественно оценить их устойчивость к обработке водой, провести сравнительное исследование морфологии покрытия до и после такой обработки.

3. Установить взаимосвязь между строением и макромолекулярными характеристиками катионных ИПЭК и протеканием конкурентных реакций в системе «НИПЭК + липосома».

4. Сравнить проницаемость традиционных анионных липосом и анионных липосом со встроенным функциональным элементом (порообразователем) после формирования их комплексов с катионным полимером.

5. Провести сравнительное исследование биологической активности катионного полимера и НИПЭК разного состава в растворе и в покрытии.

**Объекты исследования** включали коммерческие полимеры линейного строения: катионный полидиаллилдиметиламмоний хлорид (ПДАДМАХ) со степенью полимеризации (СП) = 2900, катионный полилизин с СП = 90 и СП = 1350 и анионный полиакрилат натрия (ПАНа) с СП = 85, анионная полиакриловая кислота (ПАК) с СП = 1060 и 2660. В качестве модельных объектов, имитирующих клетки, использовали липосомы двух типов: а) сформированные из смеси электронейтрального диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ) и анионного пальмитоилолеилфосфатидилсерина (ПОФС<sup>1-</sup>), взятых в мольном соотношении 2:8, и б) анионные ДОФХ-ПОФС<sup>1-</sup> липосомы со встроенным липидом-переключателем, реагирующим на изменение рН внешнего раствора. Встроенный

липид-переключатель имитировал действие порообразователей в клеточной мембране. Использовали покрытия из поликатиона и НИПЭК, нанесенные на поверхность стеклянной пластинки.

**Предмет исследования.** Формирование агрегативно стабильных ИПЭК, комплексы поликатиона/НИПЭК с анионными липосомами, целостность липосомальной мембраны со встроенным липидом-переключателем в комплексе с поликатионом, антимикробная активность поликатиона и НИПЭК в растворе и на поверхности, механизм антимикробного действия поликатионных покрытий.

**Научная новизна.** Впервые показано, что взаимодействие катионного ИПЭК с анионными липосомами определяется степенью полимеризации (молекулярной массой) полианиона в составе поликомплекса. Впервые установлено, что катионный полимер ускоряет высвобождение водорастворимой соли из липосом, в мембрану которых встроен липид-переключатель при изменении pH. Этот результат демонстрирует способность поликатиона оказывать влияние на функциональный элемент биологической мембраны. Впервые показано, что полимерное покрытие из катионного ИПЭК сохраняет антимикробные свойства после удаления большей части полимеров в ходе их многократного смывания водой. Предложен механизм антимикробного действия катионных полимерных покрытий, заключающийся в: (1) частичном растворении верхнего слоя покрытия и связывании поликатиона на поверхности клеток, (2) адсорбции клеток на поверхности покрытия и (3) миграции поликатиона между стеклянной подложкой и поверхностью клетки.

**Теоретическая значимость работы** обоснована тем, что выявлены новые закономерности взаимодействия поликатионов и катионных ИПЭК с биологическими мембранами, состоящими из смеси анионного и электронеутрального липидов, и мембранами со встроенным функциональным элементом – липидом-переключателем (порообразователем), продемонстрированы антимикробные свойства покрытия толщиной 5-18 нм и предложен механизм действия антимикробных катионных полимерных покрытий.

**Практическая значимость работы** заключается в разработке подходов к получению антимикробных полимерных рецептур в виде водных растворов и покрытий. Результаты работы представляют интерес для решения широкого круга прикладных задач, включая создание рецептур с антимикробными свойствами для медицины, фармацевтики, сельского хозяйства, биологии.

**Методология и методы исследования** основаны на применении комплексного подхода к решению поставленных в диссертации задач. Поликомплексы получали сливанием водно-солевых растворов катионного и анионного полимеров при тщательном перемешивании получаемой смеси, липосомы – ультразвуковой обработкой водной суспензии липидов или смеси липидов и липида-переключателя, покрытия – посредством нанесения водно-солевого раствора поликатиона или НИПЭК на стеклянную пластинку с последующим высушиванием до постоянного веса. В работе использованы современные методы исследования свойств полимеров, поликомплексов и продуктов их взаимодействия с липосомами, а также антимикробной активности полимерных рецептур: лазерный микроэлектрофорез, динамическое светорассеяние, спектрофотометрия, флуоресцентная спектроскопия, электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия и методы контроля выживаемости клеток, основанные на оценке минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и подсчете количества колониеобразующих единиц (КОЕ).

**На защиту выносятся следующие положения.**

1. Молекулярная масса полианиона определяет результат взаимодействия НИПЭК с анионными липосомами: диссоциацию НИПЭК с «коротким» полианионом и связывание высвободившегося поликатиона с липосомами или связывание НИПЭК с «длинным» полианионом без его диссоциации.

2. Поликатион адсорбируется на поверхности анионных липосом с липидом-переключателем и ускоряет высвобождение водорастворимой соли из липосом в окружающий раствор при понижении pH.

3. Полимерное покрытие из поликатиона или НИПЭК при 8-10-минутной обработке водой теряет до 99% полимера, при этом оставшийся на поверхности катионный полимер обеспечивает гибель не менее 95% нанесенных клеток.

4. Антимикробное действие полимерных покрытий, полученных высушиванием водного раствора поликатиона или НИПЭК, включает связывание растворенного полимера с клетками в растворе, адсорбцию клеток на поверхности покрытия и миграцию поликатиона с подложки на поверхность клетки.

**Личное участие автора.** Личное участие соискателя ученой степени в получении результатов, изложенных в диссертации, являлось основополагающим и заключалось в непосредственном участии на всех этапах работы: от постановки задачи, планирования и выполнения экспериментов до обсуждения и оформления полученных результатов; в подготовке публикаций по теме выполненного исследования и в участии в тематических научных конференциях. Во всех опубликованных в соавторстве работах вклад автора является основополагающим, и заключался в сборе и анализе литературы, получении анионных липосом, интерполиэлектролитных комплексов, изучении взаимодействия липосом с интерполиэлектролитными комплексами и катионными полимерами, получении полимерных покрытий и изучении их морфологии и устойчивости к обработке водой.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Степень достоверности проведенных соискателем ученой степени исследований подтверждена тем, что работа выполнена на высоком экспериментальном уровне с использованием современного оборудования и методов исследования, а также непротиворечивостью полученных данных. Динамическое светорассеяние проводили на приборе Brookhaven 90 Plus, Brookhaven Instruments Company при фиксированном угле ( $90^\circ$ ); лазерный микроэлектрофорез проводили на приборе Brookhaven 90 Plus, Brookhaven Instruments Company в термостатируемой ячейке. Флуоресцентную спектроскопию проводили на спектрофлуориметре F-4000, Hitachi при  $\lambda_{em} = 571$  нм,  $\lambda_{ex} = 557$  нм; УФ-спектроскопию – на приборах UV-Mini-

1240, Shimadzu и ПЭ-5400УФ, ЭКРОС. Сканирующую электронную микроскопию проводили на сканирующем электронном микроскопе JSM-6380LA, JEOL, атомно-силовую микроскопию – на микроскопе Solver PRO-M. Кондуктометрию проводили при помощи кондуктометра CDM 83, Radiometer. Для гравиметрического анализа использовали аналитически весы ВЛА–120М, Госметр, характеризующиеся I (специальным) классом точности. Эксперименты проводили в трёхкратной повторности и рассчитывали среднее значение и доверительный интервал полученной величины с помощью статистической обработки в программе Microsoft Excel.

Результаты данной диссертационной работы были представлены на 10 научных конференциях: Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016», «Ломоносов-2017», «Ломоносов-2018» и «Ломоносов-2024», Москва, Россия; III и IV Зезинской школе-конференции для молодых ученых «Химия и физика полимеров», 2023 г. и 2024 г., Москва, Россия; XXVII Всероссийской конференции молодых ученых-химиков, 2024 г., Нижний Новгород, Россия; VII Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2017», Москва, Россия; VIII Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2020», Москва, Россия; IX Всероссийской Каргинской конференция «Полимеры-2024», Москва, Россия.

**Публикации.** Основные материалы диссертации изложены в 5 печатных публикациях, в том числе в 5 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра РИНЦ «eLibrary Science Index» и в международных базах данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.7. Высокомолекулярные соединения (химические науки).

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (186 наименований). Работа изложена на 117 страницах, содержит 42 рисунка, 4 таблицы, 6 формул.

## 1. Обзор литературы

На сегодняшний день существует широкий выбор сильнодействующих антибиотиков, а также и другие антибактериальные и фунгицидные средства. Однако инфекции, вызываемые патогенными бактериями и грибами, остаются серьезной проблемой для медицины, пищевой промышленности, сельского хозяйства, морского транспорта и других областей научной и практической деятельности. На данный момент особое внимание обращено на борьбу с микробиологическим загрязнением поверхностей. Чтобы придать поверхности биоцидное (антимикробное) свойство, применяются методы, различающиеся технологией нанесения покрытия и эффективностью его биоцидного действия. Существует большое число исследований, которые показали, что обработка поверхности низкомолекулярными биоцидами недостаточно эффективна. Покрытия на основе низкомолекулярных биоцидов представляют собой хрупкие пленки со слабой адгезией к обрабатываемой поверхности, а также могут быть легко удалены с поверхности при обработке водой, что потребует многократного повторного нанесения биоцидного состава. Поэтому применение полимерных составов является перспективным и эффективным методом для получения прочных и долговременных покрытий с биоцидными свойствами.

Далее более подробно будут рассмотрены некоторые полиэлектролиты и интерполиэлектролитные комплексы на их основе, а также способы придания им биоцидных свойств с формированием полимерного покрытия.

### 1.1 Полимеры с ионными группами (полиэлектролиты)

#### 1.1.1 Общие представления о полиэлектролитах

*Полиэлектролиты (ПЭ)* – это полимеры с ионными группами, которые способны к электролитической диссоциации в водных растворах [1]. В более узком смысле ПЭ – полимеры, в которых мольная доля ионных групп превышает

15%; полимеры с меньшим содержанием ионных групп называются *иономерами*. При растворении в воде макромолекула ПЭ диссоциирует на полиион (поликатион или полианион) и низкомолекулярные противоионы противоположного знака заряда. Полимерная природа ПЭ и высокий заряд полимерной матрицы определяют свойства ПЭ в водном растворе. Разбавление водного раствора ПЭ сопровождается «разворачиванием» макромолекул и повышением приведенной вязкости полимерного раствора [1]. ПЭ формируют прочные интерполимерные комплексы с ПЭ противоположного знака заряда, стабилизированные множественными солевыми связями между заряженными звеньями обоих полимеров [2]. Поведение ПЭ в водном растворе определяется рН раствора и концентрацией низкомолекулярной соли. Такое поведение характерно для ПЭ и не имеет аналогов среди гидрофильных незаряженных полимеров.

### 1.1.2 Некоторые разновидности полиэлектролитов

Постоянно расширяющиеся синтетические возможности химии полимеров позволили получить ПЭ разного химического состава, распределения звеньев вдоль полимерной цепи и пространственной организации (архитектуры). Наряду с привычными гомополимерами, состоящими из звеньев одного типа, синтезированы блок-сополимеры, чередующиеся и градиентные сополимеры, звездообразные полимеры и сферические полимерные щетки [3-7]. Схематическое строение таких ПЭ приведено на **рисунке 1**.

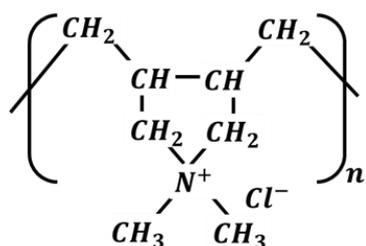


**Рисунок 1.** Примеры ПЭ с разной топологией [3, 5-7].

Наибольшее распространение получили полимеры линейного строения, в которых мономерные звенья выстроены в одну цепочку без ответвлений (боковых цепей). Химические формулы таких ПЭ, полидиаллилдиметиламмоний хлорида (ПДАДМАХ) и полилизина гидробромида (ПЛ) (катионные ПЭ) и анионного полиакрилата натрия (ПАНа), представлены на **рисунке 2**.

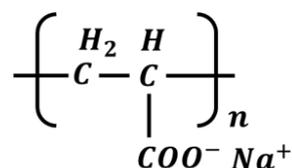
Полидиаллилдиметиламмоний хлорид

(ПДАДМАХ)

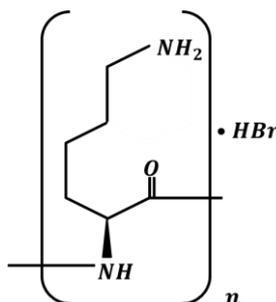


Полиакрилат натрия

(ПАНа)



Полилизин гидробромид (ПЛ)



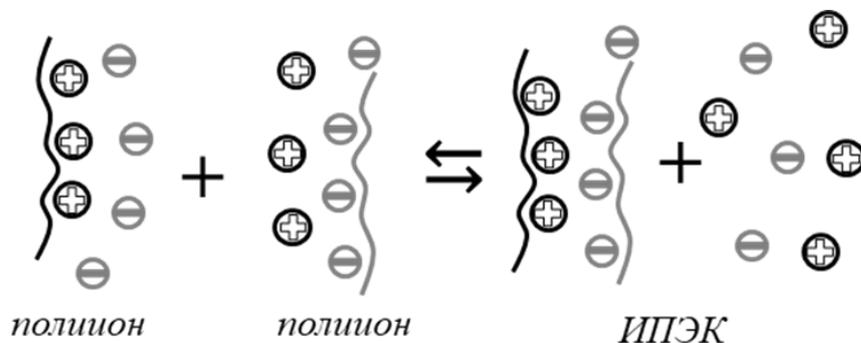
**Рисунок 2.** ПЭ линейного строения: катионный ПДАДМАХ и ПЛ и анионный ПАНа.

## 1.2 Интерполиэлектролитные комплексы

### 1.2.1 Определение интерполиэлектролитных комплексов

Интерполиэлектролитные комплексы (ИПЭК) – продукты кооперативных реакций ионного обмена между противоположно заряженными ПЭ [2]; общая схема реакции образования ИПЭК с участием двух линейных ПЭ приведена на **рисунке 3**. Реакция сопровождается высвобождением в раствор

низкомолекулярных противоионов и объединением двух макроионов с образованием частицы ИПЭК. Реакция протекает в воде и полярных органических растворителях, в которых возможны диссоциация и ионный обмен [8].



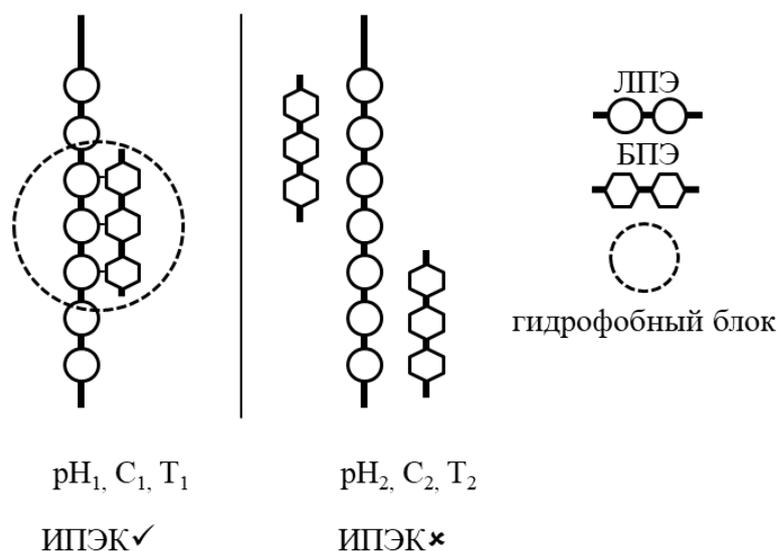
**Рисунок 3.** Общая схема реакции образования ИПЭК с участием катионного и анионного ПЭ [8].

### 1.2.2 Свойства интерполиэлектrolитных комплексов

Движущая сила реакции формирования ИПЭК – повышение энтропии системы за счет перехода в раствор большого количества малых противоионов, которые ранее были электростатически связаны с полимерной матрицей (так называемые «конденсированные ионы») [9-11]. ИПЭК формируется за счет электростатических контактов обоих полимерных компонентов без образования новых ковалентных связей, поэтому полимеры в поликомплексе частично или полностью сохраняют свою «индивидуальность»: молекулярно-массовые характеристики, валовый заряд, способность к взаимодействию с другими компонентами системы и проч. [2].

### 1.2.3 Формирование интерполиэлектролитных комплексов

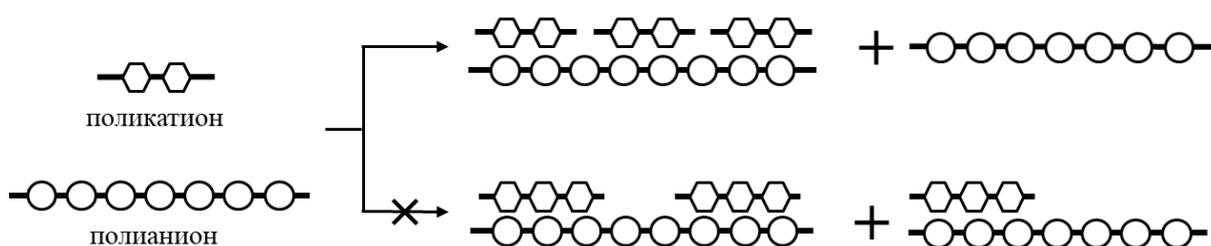
ИПЭК являются кооперативными системами, устойчивость которых определяется протяженной последовательностью физических (электростатических) связей между ними [12]. Такие системы формируются и разрушаются при достижении некоторых критических значений внешних параметров: температуры, рН раствора, концентрации низкомолекулярной соли и др. [2, 8]. Благодаря кооперативности процессы формирования/разрушения развиваются в узком интервале изменения внешних условий (**рис. 4**) [8].



**Рисунок 4.** Образование ИПЭК – процесс кооперативный, поэтому их формирование/разрушение наблюдается в узком диапазоне изменения внешних условий, таких как кислотность раствора ( $\text{pH}_1, \text{pH}_2$ ), концентрация раствора ( $C_1, C_2$ ), температура ( $T_1, T_2$ ) и пр.

Кооперативность реакции формирования ИПЭК означает, что образование протяженной непрерывной последовательности солевых связей в ИПЭК термодинамически выгоднее, чем образование серии точечных связей между

противоположно заряженными цепочками. Минимальная длина блока заряженных звеньев, связывающихся как единое целое по принципу «всё или ничего» (рис. 5) с противоположно заряженной полимерной матрицей, получила название кооперативного участка связывания. Длина такого участка зависит от химической природы взаимодействующих ПЭ, их концентрации, ионной силы раствора и других факторов. Для большинства полиэлектролитов она составляет около 5-8 звеньев [10].



**Рисунок 5.** Схематичное представление механизма образования комплексов по принципу «всё или ничего» [10].

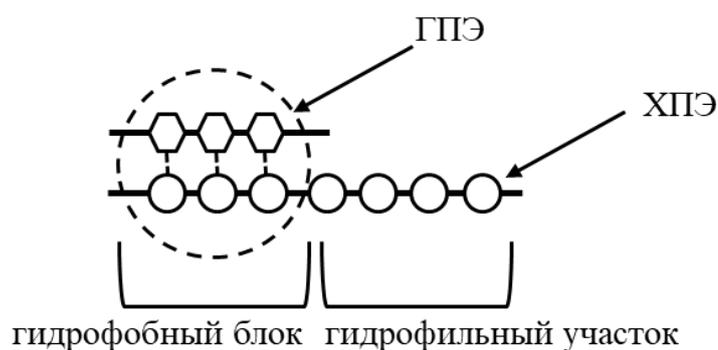
#### 1.2.4 Стехиометричные и нестехиометричные интерполиэлектролитные комплексы

ИПЭК представляют собой макромолекулярные соединения переменного состава, который выражают через мольное соотношение заряженных групп обоих компонентов:  $Z = [+]/[-]$  (или наоборот,  $Z = [-]/[+]$ ) [9]. Стехиометричные ИПЭК с равным соотношением катионных и анионных групп ( $Z = 1$ ) нерастворимы в воде. Нестехиометричные ИПЭК содержат избыток одного из компонентов ( $Z \neq 1$ ); в этом случае ПЭ, взятый в избытке, называется лиофилизующим ПЭ (ЛПЭ), а взятый в недостатке – блокирующим ПЭ (БПЭ). Предельный состав нестехиометричных ИПЭК, который обеспечивает их растворимость в воде, зависит от ряда факторов, зависящих от (1) природы полимера: его химического

строения, длины полимерной цепи, доли ионных групп в макромолекуле, суммарного заряда макромолекулы и др., и (2) внешних условий – pH раствора, концентрации соли и др. [2, 8, 13, 14].

Показано, что молекулярно-массовые характеристики нестехиометричных ИПЭК не зависят от способа их получения – последовательности добавления катионного и анионного компонентов, титрованием смеси полимеров щелочью или кислотой [12]. Это наблюдение указывает на то, что поликомплексы являются равновесными интерполимерными соединениями.

Равновесные водорастворимые ИПЭК представляют собой индивидуальные макромолекулярные соединения, которые можно рассматривать как своеобразные блок-сополимеры, состоящие из гидрофобных блоков, представленных последовательностями межцепных солевых связей, и гидрофильных блоков, состоящих из заряженных звеньев лиофилизующего ПЭ (рис. 6) [9, 15, 16].



**Рисунок 6.** Схематическое строение частиц водорастворимых нестехиометричных ИПЭК с  $R_{ГПЭ} \ll R_{ХПЭ}$ , где  $R_{ГПЭ}$  – степень полимеризации гостя-полиэлектролита (блокирующий ПЭ),  $R_{ХПЭ}$  – степень полимеризации хозяина-полиэлектролита (хозяин ПЭ) [15].

Механизм формирования ИПЭК во многом похож на механизм «самосборки» супрамолекулярных комплексов с участием биополимеров [8, 17]. Поэтому реакции образования ИПЭК отчасти выступают в качестве простых, но

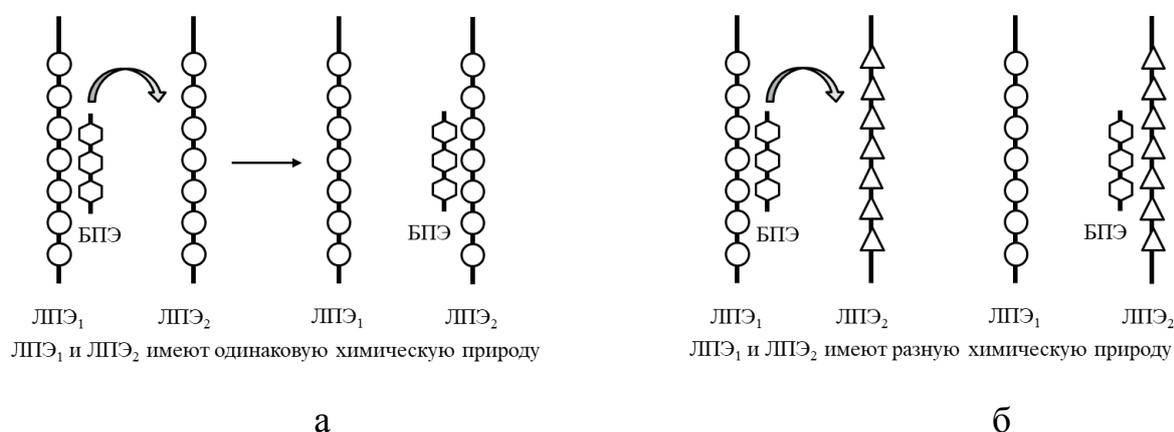
информативных моделей реакций, протекающих между природными полимерами в живых системах.

### 1.3 Интерполиэлектролитные реакции

#### 1.3.1 Общие представления об интерполиэлектролитных реакциях

Интерполиэлектролитные реакции, протекающие в водных растворах разноименно заряженных линейных синтетических ПЭ, схематически представлены на **рисунке 7**. Здесь ЛПЭ<sub>1</sub> и ЛПЭ<sub>2</sub> – лиофилизирующие полиэлектролиты одного знака заряда, конкурирующие за связывание с блокирующим полиэлектролитом БПЭ противоположного знака заряда. Перенос БПЭ на ЛПЭ<sub>2</sub> той же химической природы, что и ЛПЭ<sub>1</sub>, то есть миграцию БПЭ между полимерами одной химической природы называют *интерполиэлектролитной реакцией обмена*. Если ЛПЭ<sub>1</sub> и ЛПЭ<sub>2</sub> имеют различное химическое строение, перенос БПЭ на ЛПЭ<sub>2</sub> называют *интерполиэлектролитной реакцией замещения*.

За протеканием интерполиэлектролитных реакций следили методами седиментации [13, 18-20], вискозиметрии [13], турбидиметрии [20, 21]. Молекулярные характеристики частиц ИПЭК – продуктов интерполиэлектролитного обмена – определяли методом светорассеяния [22-25].

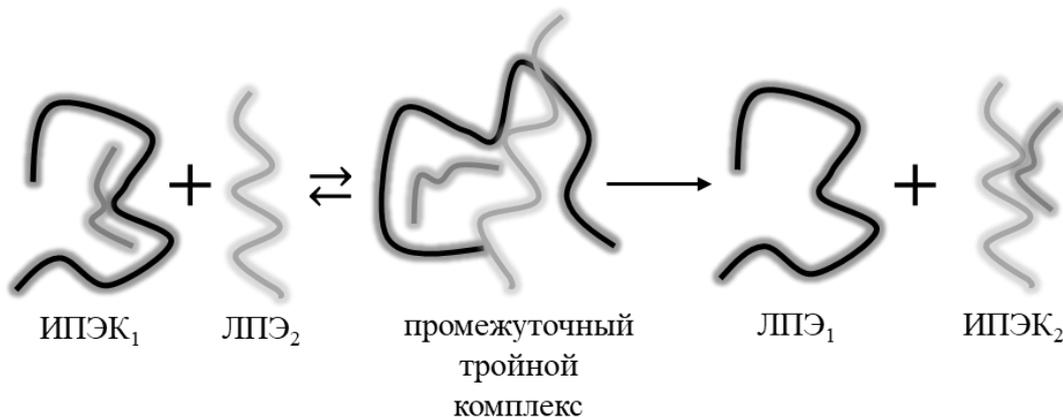


**Рисунок 7.** Интерполиэлектролитные реакции обмена (А) и замещения (Б) (схема) [20].

### 1.3.2 Интерполиэлектролитные реакции обмена и замещения

В ходе реакции интерполиэлектролитного обмена происходит равномерное распределение полимеров по частицам поликомплекса. В этом случае все частицы ИПЭК имеют одинаковый состав, совпадающий с составом исходной полимерной смеси [12]. Интерполиэлектролитное замещение приводит к концентрированию БПЭ на ЛПЭ с максимальным сродством к БПЭ; система при этом становится двухкомпонентной: в ней присутствуют частицы поликомплекса БПЭ-ЛПЭ<sub>1</sub> и свободные макромолекулы ЛПЭ<sub>2</sub> [12].

Описанные выше реакции протекают через взаимное проникновение цепей исходного ИПЭК и свободных макромолекул и формирование промежуточного тройного комплекса (**рис. 8**) [2]. Повышение концентрации соли в растворе ускоряет реакции обмена и замещения в результате ослабления солевых связей в промежуточном комплексе, что облегчает взаимное перераспределение макромолекул. В водных растворах интерполиэлектролитные реакции происходят непрерывно, скорость реакций контролируется ионной силой раствора [2].



**Рисунок 8.** Схема интерполиэлектролитной реакции обмена/замещения с формированием промежуточного тройного комплекса [2].

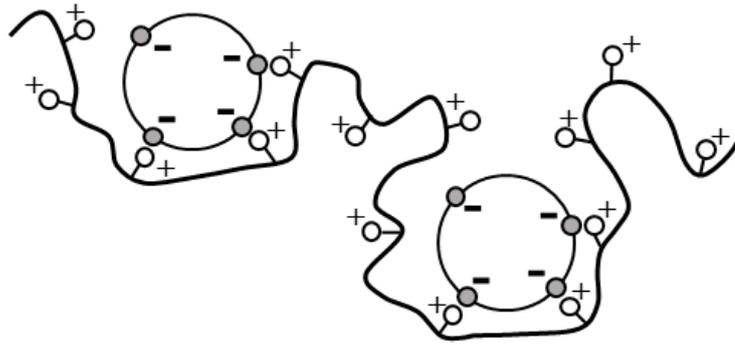
## 1.4 Полиэлектролит-коллоидные комплексы

### 1.4.1 Определение полиэлектролит-коллоидных комплексов

Полиэлектролитные комплексы с участием «жестких», не меняющих форму и размеры коллоидных частиц (полимерных микросфер, неорганических золь, частиц металлов и оксидов металлов) получили название полиэлектролит-коллоидных комплексов (ПКК) [26-31]. Такие частицы в первом приближении можно считать сферами с поверхностными ионными группами, как правило, одного знака заряда – катионными или анионными [27]. Равновесие реакции комплексообразования, структура и свойства ПКК зависят, прежде всего, от соотношения контурной длины цепи ПЭ и среднего диаметра коллоидной частицы, а также от количества и степени ионизации ионных групп в составе обоих компонентов, их зарядовой стехиометрии и ионной силы раствора [8].

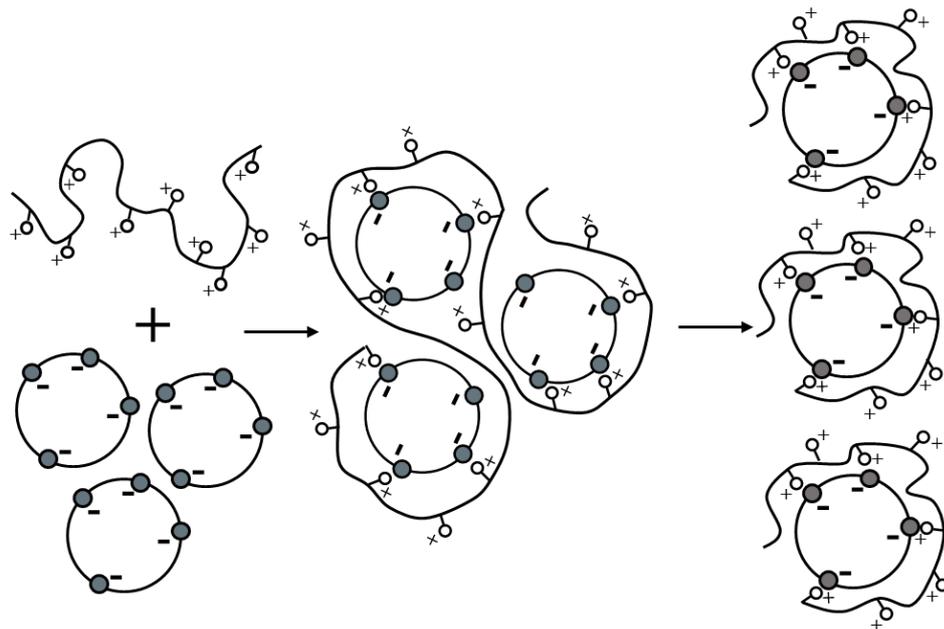
### 1.4.2 Формирование полиэлектролит-коллоидных комплексов

Коллоидные частицы эффективно связывают ПЭ противоположного знака заряда, количественное связывание полимера продолжается до полного заполнения поверхности частиц адсорбированным полимером [28-30]. Комплексообразование имеет электростатическую природу и сопровождается нейтрализацией заряда коллоидных частиц с последующей перезарядкой благодаря связыванию избыточного количества ПЭ (**рис.9**) [28]. Адсорбция ПЭ приводит к утрате коллоидной стабильности частиц, агрегаты наибольшего размера регистрируются при полной нейтрализации поверхностного заряда частиц адсорбированным ПЭ [32]. Добавление низкомолекулярной соли в раствор ПКК инициирует диссоциацию комплекса и «растворение» осадка [33]. Прочность комплекса в присутствии соли уменьшается по мере понижения количества ионных (диссоциирующих) групп на полимерной макромолекуле [34].



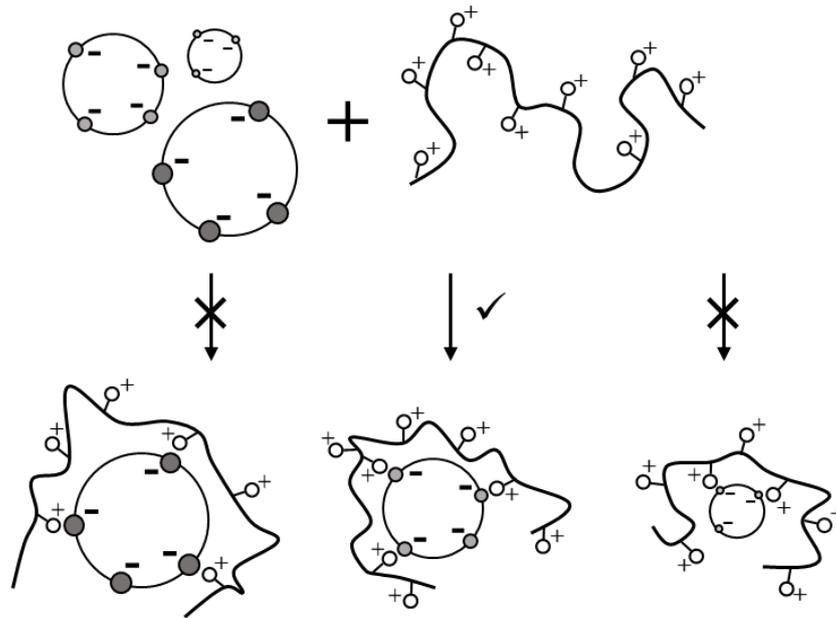
**Рисунок 9.** Схематичное изображение водорастворимого ПКК [8].

Несмотря на высокую эффективность комплексообразования адсорбированный ПЭ способен мигрировать между коллоидными частицами [35]. ПЭ может равномерно распределяться между частицами, если они одинаковы по составу и размеру [27] (**рис. 10**).



**Рисунок 10.** Схема равномерного распределения ПЭ между коллоидными частицами одинакового состава и размера [27].

В смеси частиц разной природы ПЭ предпочтительно связывается с теми, сродство к которым у него выше [12, 36] (**рис. 11**).



**Рисунок 11.** Полиэлектролит связывается с коллоидными частицами, сродство с которыми у него выше.

Таким образом, формирование ИПЭК и ПКК и динамические свойства таких систем (их способность к структурным перестройкам) описываются похожими закономерностями.

## 1.5 Бицидные свойства поликатионов в водном растворе

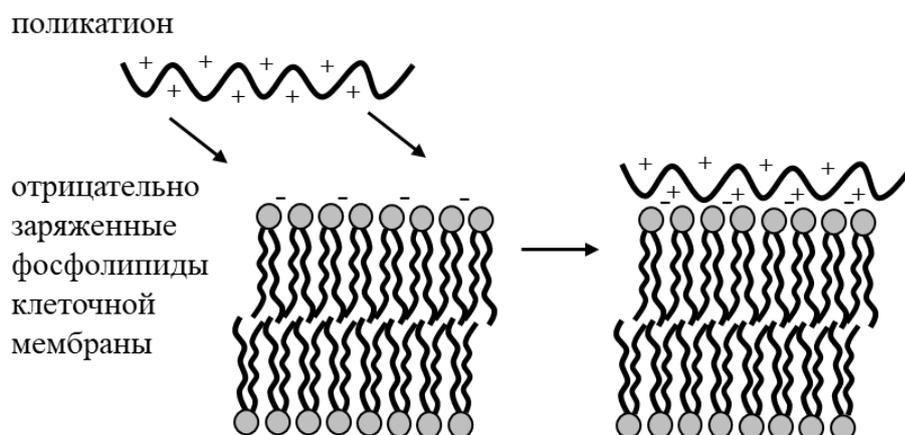
### 1.5.1 Применение катионных полимеров в качестве бицидных соединений

Способность катионных полимеров уничтожать болезнетворные микроорганизмы, то есть проявлять бицидные свойства, хорошо известна и многократно описана в литературе [37, 38]. Поликатионы используют для дезинфекции воды в бассейнах [39], в качестве бицидных флокулянтов для очистки сточных вод [40], при создании материалов биомедицинского назначения, в том числе кремов и мазей [41]. Препараты на основе катионного полисахарида хитозана представляют интерес для создания препаратов,

способствующих подавлению роста условно-патогенных микроорганизмов в кишечнике млекопитающих.

### 1.5.2 Механизм антимикробного действия поликатиона

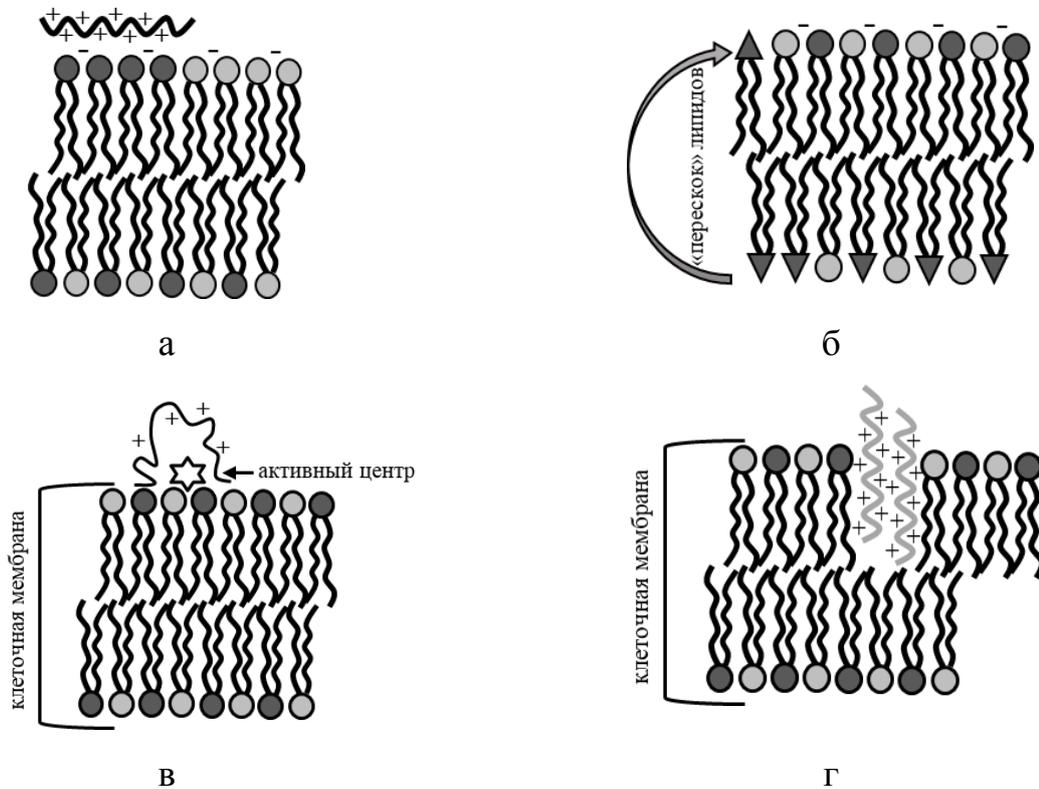
Механизм антимикробного действия катионных ПЭ и катионных поликомплексов был исследован с использованием нативных клеток и модельных объектов: бислойных липидных везикул (липосом), липидных монослоев, плоских липидных бислоев [42, 43]. Взаимодействие антимикробных полимеров/поликомплексов начинается с электростатического связывания катионных групп в составе полимера с анионными группами на клеточной поверхности (**рис.12**) [38, 41, 44, 45].



**Рисунок 12.** Электростатическое связывание катионного полимера с анионными фосфолипидами).

Это приводит к появлению целого ряда вторичных процессов: изменению латерального распределения липидов в клеточной мембране, нарушению трансмембранной асимметрии липидов, блокированию активных центров на поверхности клеток, проникновению полимера внутрь клетки, разрушению клеточных мембран, вытеканию содержимого клеток в окружающий раствор и др.

(рис. 13) [38, 46]. В совокупности эти эффекты приводят к серьезному нарушению функционирования клетки, что в конечном итоге вызывает её гибель [38, 44, 45, 47].



**Рисунок 13.** Связывание поликатиона с клеточной мембраной: а – латеральная сегрегация липидов; б – трансмембранная миграция липидов («флип-флоп»); в – блокирование активных центров на поверхности липидной мембраны клетки; г – проникновение полимера в клеточную мембрану.

Эффективность действия антимикробных полимеров в значительной степени зависит от типа катионной группы, степени ее сольватации, распределения катионных групп вдоль полимерной цепи, суммарного положительного заряда макромолекулы [37, 38]. Гидрофобные блоки в составе ИПЭК могут встраиваться в клеточную мембрану и дополнительно дестабилизировать липидный бислои, что способствует повышению проницаемости мембраны и её разрушению [48].

## 1.6 Полимерные пленки и покрытия

### 1.6.1 Определение полимерной плёнки и полимерного покрытия

Полимерные пленки и покрытия часто рассматриваются как синонимы для обозначения тонкого слоя полимера или полимерного композита. Этот слой может быть нанесен на какой-либо субстрат (поверхность) или существовать самостоятельно без привязки к субстрату. Есть и иное толкование терминов пленка и покрытие – это два типа материалов, различие между ними заключается в толщине, способах получения и областях применения. Пленки характеризуются небольшой толщиной (от нанометров до микрона), они более однородны и используются в высокотехнологичных отраслях – в производстве полупроводников, оптических покрытий и солнечных батарей; покрытия толще пленок (от нескольких микрон до нескольких миллиметров), они менее однородны и часто выполняют роль изолирующих защитных покрытий.

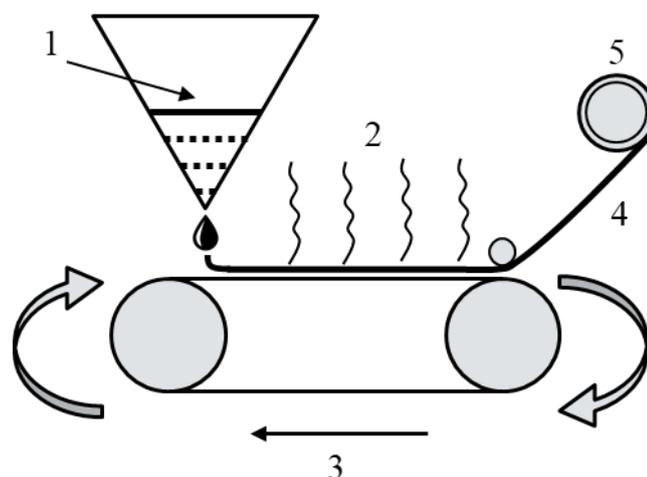
Мы будем придерживаться первого подхода и использовать термины пленка и покрытие как синонимы, которые описывают слой полимера или поликомплекса, нанесенного на твердый субстрат.

### 1.6.2 Методы формирования полимерных плёнок

В литературе описаны различные способы получения полимерных покрытий. Наиболее часто используемые приведены ниже.

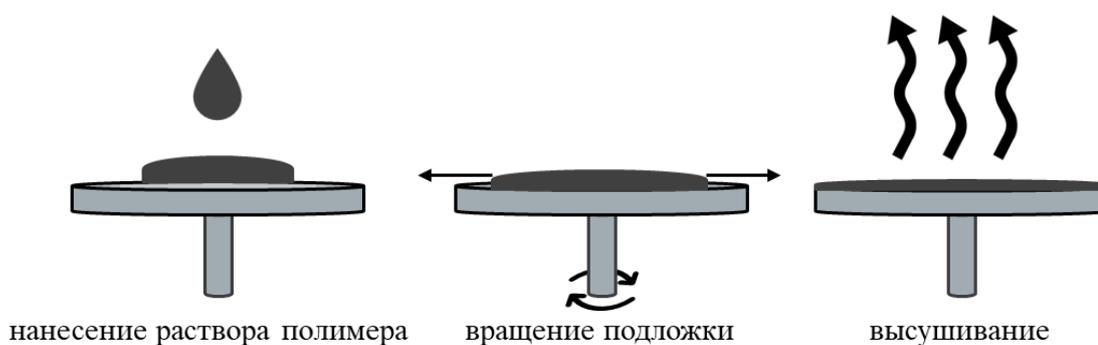
**Метод полива (капельное литье).** Самый простой и быстрый способ получения покрытия/пленки – нанесение раствора полимера в подходящем растворителе на поверхность с последующим отделением (упариванием) растворителя (**рис. 14**). Нанесение полимерного раствора на поверхность «бесконечной» движущейся плоской ленты или вращающегося барабана позволяет организовать формования пленок в непрерывном режиме [49]. Возможно получение пленок из широкого набора полимеров, включая целлюлозу

и ее производные, полиимид, поликарбонат, поливиниловый спирт. Процесс требует очень высокого расхода растворителей, что требует принятия специальных противопожарных мер в помещении при работе с горючими растворителями. Проблема снимается при использовании водных растворов полимеров.



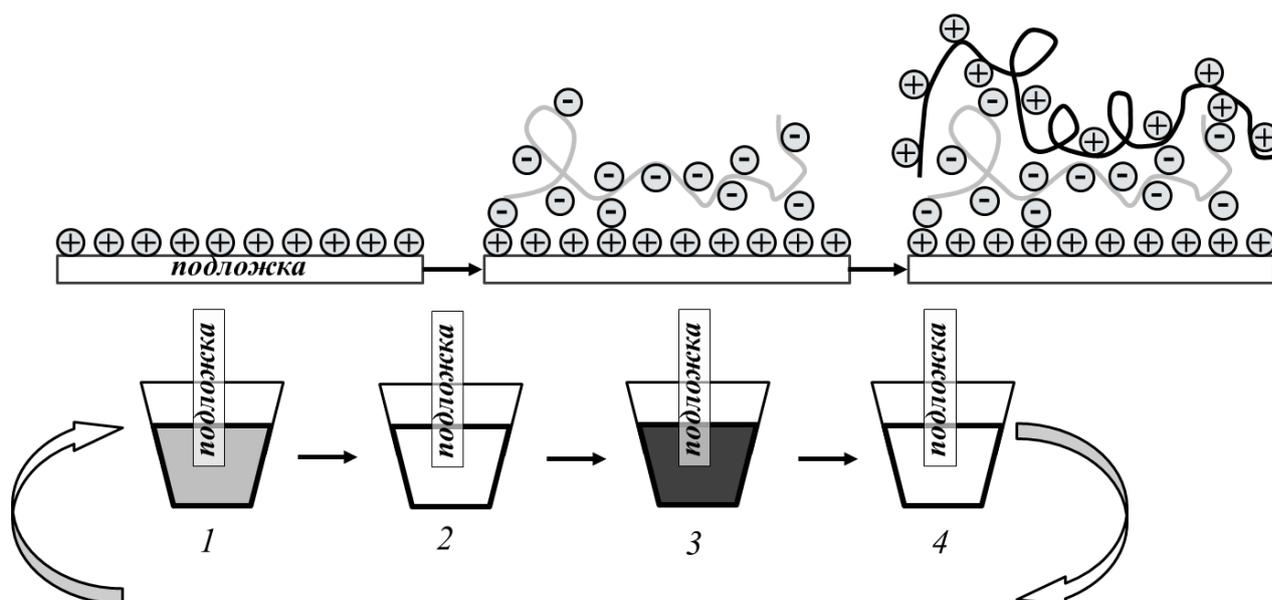
**Рисунок 14.** Формирование плёнок методом полива. 1 – раствор полимера; 2 – упаривание растворителя; 3 – вращающийся барабан/движущаяся лента; 4 – непрерывная полимерная плёнка; 5 – сматывающая катушка [49].

**Метод центрифугирования (*spin coating technique*)** состоит в нанесении полимерного раствора на поверхность субстрата (подложки) с последующим его раскручиванием до некоторой постоянной скорости, которая обеспечивает равномерное распределение раствора по поверхности и испарение растворителя (**рис. 15**). Метод обеспечивает получение сплошных пленок/покрытий, но не позволяет контролировать их толщину и молекулярную ориентацию полимеров/добавок в слое [50].



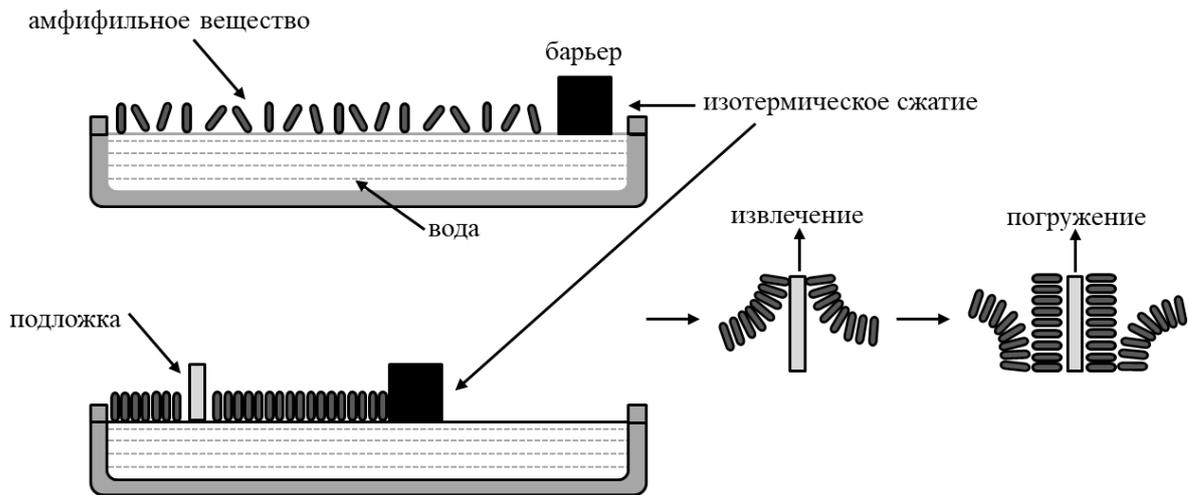
**Рисунок 15.** Формирование плёнок методом центрифугирования [50].

*Метод послойного нанесения (LbL – layer by layer technique)* противоположно заряженных ПЭ [51, 52]. Формирование пленок происходит за счет электростатического взаимодействия монослоев ПЭ, последовательно наносимых на подложку (**рис. 16**). Помимо электростатических сил сформированная пленка может дополнительно быть стабилизирована межцепными водородными связями и гидрофобными взаимодействиями [53]. Метод позволяет получать тонкие плёнки контролируемой толщины (обычно в диапазоне от 5 до 500 нм) и заданного состава из большого количества разнообразных систем (синтетических линейных полимеров, белков, неорганических наночастиц, полимерных микросфер и проч.), причем субстратом может служить любая заряженная поверхность. Несомненное достоинство метода – простота получения покрытий: процедура не требует сложной аппаратуры и может проводиться на воздухе и при комнатной температуре.



**Рисунок 16.** Формирование плёнок методом послойного нанесения. 1 – нанесение на подложку с поликатионом полианиона; 2 – промывка; 3 – нанесение на подложку поликатиона; 4 – промывка. Процесс проводится до достижения необходимо числа полимерных слоёв [53].

*Метод Ленгмюра-Блоджетт* состоит из двух этапов. На первом на водную поверхность наносят раствор амфифильного вещества, им может и быть и образец полимера в органическом растворителе. После испарения растворителя на поверхности образуется мономолекулярный слой амфифила, который сжимают до получения плотного слоя и на втором этапе переносят на твердую подложку [50]. Все операции проводят в специальной ванне Ленгмюра (**рис. 17**). Метод позволяет получать плёнки контролируемой толщины и молекулярной ориентации, при этом могут быть получены не только монослойные пленки, но и сложные многослойные ансамбли из амфифильных молекул с минимальной погрешностью по толщине.



**Рисунок 17.** Формирование плёнок методом *Ленгмюра-Блоджетт* [50].

Описанные выше методы предлагают широкий ассортимент технических решений, который позволяет выбрать технологию, наиболее подходящую для решения конкретной задачи. Для получения покрытий с биоцидными свойствами наиболее подходящим является метод полива. Этот простой в техническом отношении метод позволяет получать биоцидные покрытия из различных полимеров, их конъюгатов с низкомолекулярными биоцидами и поликомплексами. Существенно, что для получения исходных полимерных рецептур в качестве растворителя может быть использована вода. Такая возможность делает процедуру получения/нанесения покрытий экологически приемлемой и снимает многие вопросы к процедуре, касающиеся токсичности, пожароопасности и экономической привлекательности.

## **1.7 Биоцидные свойства полимерных пленок и покрытий**

### **1.7.1 Разновидности полимеров с биоцидной активностью**

Полимеры с антимикробными свойствами, которые используют для получения биоцидных пленок/покрытий, могут быть разделены на следующие категории [38, 54]:

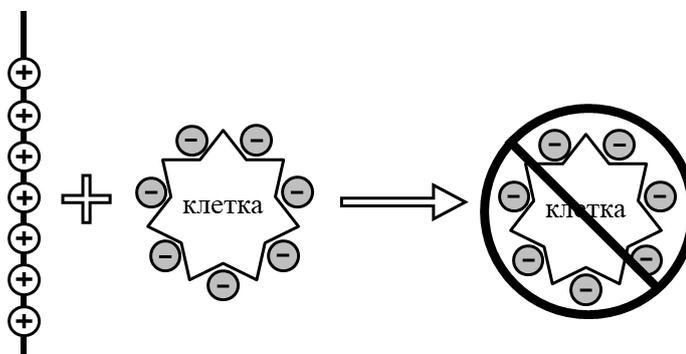
- а) полимеры с собственной антимикробной активностью;
- б) модифицированные полимеры с антимикробной активностью;
- в) полимеры с добавленными антимикробными органическими соединениями;
- г) полимеры с добавленными антимикробными неорганическими соединениями.

Такая классификация достаточно условна; в литературе встречаются комбинации вышеупомянутых полимеров, каждый из которых вносит свой вклад в общую антимикробную активность рецептуры.

### 1.7.2 Полимеры с собственной антимикробной активностью

*Полимеры с собственной антимикробной активностью.* К ним относятся полимеры с четвертичными атомами азота, гуанидинсодержащие полимеры, синтетические пептиды, производные полинорборнена, галогенсодержащие полимеры, полимерные производные фенола и бензойной кислоты, металлоорганические полимеры и другие.

Один из наиболее распространенных подходов к получению биоцидных пленок/покрытий заключается в использовании полимеров с катионными группами (рис. 18) [37]. После нанесения водного раствора полимера на поверхность и последующего высыхания образуется покрытие с выраженными бактерицидными свойствами [55].



**Рисунок 18.** Принцип биоцидного действия катионных полимеров. Катионные полимеры обладают биоцидной активностью за счёт входящих в их состав положительно заряженных групп (схема).

Например, катионные полимерные сферы были получены кватернизацией пиридиновых групп поли(4-винилпиридина) алкилбромидами с 4–10 метиленовыми группами [56]. Полученное соединение показало антибактериальную и противогрибковую активность по отношению к клеткам *E. coli* и *A. niger*.

Прививка 4-винилпиридина на полимерную пленку и последующая кватернизация пиридиновых групп гексилбромидом привела к получению покрытия с антибактериальной активностью по отношению к *E. coli* [57].

Силиконовый каучук с покрытием из ковалентно связанного 3-(триметоксисилил) пропилдиметилоктадециламмоний хлорида проявил антибактериальную активность по отношению к грамположительным бактериям *S. aureus* и *S. epidermidis*, а сформированное из него покрытие снижало жизнеспособность адгезивных грамположительных бактерий *S. aureus* и *S. epidermidis* до 0% и грамотрицательных бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa* до 25% [58].

Противомикробные покрытия были получены из сополимеров [3-(метакрилоиламино) пропил]-триметиламмоний хлорида и 3-триметилсилилпропилметакрилата с катионными группами [59].

Антимикробные свойства показал желатин, модифицированный эпоксидной кремнийорганической солью, содержащей четвертичный аммоний [60].

На основе катионного поли-N, N-диаллил-N, N-диметиламмоний хлорида (ПДАДМАХ) было разработано и зарегистрировано дезинфицирующее средство “Септопол” [61], которое эффективно по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям и грибам.

Получение сополимеров диметилдиаллиламмоний хлорида (ДАДМАХ) с другими мономерами позволило улучшить адгезивные свойства полимерного покрытия при сохранении его биоцидной активности [62-68].

Сополимер ДАДМАХ + виниловый эфир моноэтаноламина демонстрировал бактерицидные свойства по отношению к грамположительным (*S. aureus*) и грамотрицательным (*E. coli*) бактериям [69].

Противомикробная активность свободного ПДАДМАХ оказалась выше активности ПДАДМАХ, иммобилизованного в наночастицах полиметилметакрилата [69].

Модификация различных поверхностей кватернизованным полиэтиленимином сделала их токсичными по отношению к бактериям и вирусам [70-72] и не сказалась на их активности по отношению к клеткам млекопитающих, при этом структура и механические свойства обрабатываемых материалов не претерпели изменений.

В обзоре [73] описаны антимикробные полимеры на основе кватернизованого пиридина, фосфохолина и четвертичных производных метакриловой кислоты и приведены многочисленные примеры их использования для получения биоцидных полимерных композитов.

Синтез и биоцидные свойства полимеров с кватернизованным атомом азота в основной цепи (ионенов) описаны в работе в обзоре [74]. Ионены показали активность в отношении болезнетворных микроорганизмов (*E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans*). Топологическая изомерия и гибкость полимеров определяли суммарную активность полимеров.

Антимикробные свойства были обнаружены у дендримеров – древообразных макромолекул с регулярными ветвлениями. Дендримеры полипропиленimina, функционализированные четвертичным аммонием повышали свою активность с ростом молекулярной массы; дендримеры с бромид-анионами были активнее дендримеров с хлорид-анионами [75].

Кватернизация сополимера поли(диэтиламиноэтилметакрилата-винилбензилхлорида) придавала полученным из него пленкам антимикробные свойства, при этом адгезия и долговечность пленок были выше, чем у пленок,

сформированных из кватернизованного гомополимера поли(диэтиламиноэтилметакрилата) [76].

Пленка из сополимера N-винилпирролидона и соли четвертичного аммония незначительно уменьшала долю выживших бактерий (до 40%) [77].

Антимикробный эффект демонстрируют полимеры, содержащие звенья с имидазольными группами [78, 79]. Рост молекулярной массы полимера приводит к уменьшению антимикробной активности в отношении клеток *E. coli* и *S. aureus* [80].

Катионный полигексаметиленбигуанид (ПГМГ) в виде гидрохлорида или фосфата используется в качестве дезинфицирующего и антисептического средства в пищевой промышленности и для дезинфекции бассейнов [81]. Полимеры с гуанидиновыми группами могут проникать в микробные клетки и взаимодействовать с цитозольными компонентами [82], что повышает эффективность антимикробного действия таких полимеров.

Антимикробная активность катионных полимеров зависит от типа малого противоиона. Это вывод был сделан по результатам тестирования антимикробной активности ряда полимеров с цепью из катионных 4-винилгидроксиэтилпиридиниевых групп и серией противоионов:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{SH}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{BF}_4^-$  или  $\text{CF}_3\text{COO}^-$  в отношении клеток *A. niger*, *M. circenelliods* и *B. Coagulans* [78]. Наибольшую активность показал полимер с  $\text{OH}^-$  проивоионами.

Выраженным биоцидным эффектом обладают полимеры с четвертичными солями фосфония [83]. Механизм биоцидного действия этих полимеров близок к механизму действия полимеров с кватернизованными аминогруппами.

Линейный катионный полисахарид хитозан – пример антимикробного природного полимера. При этом хитозан не демонстрирует токсических свойств по отношению к млекопитающим [83-88]. Такое сочетание делает хитозан перспективным объектом для получения антимикробных препаратов целевого назначения.

Собственной антимикробной активностью обладают полипептиды с катионными группами [89]. Многозарядные полипептиды эффективно связываются с клеточной поверхностью и инициируют вторичные процессы, приводящие к гибели клетки. Помимо того, катионные полипептиды способны проникать через биологические мембраны [90], что усиливает антимикробное действие полимеров.

### 1.7.3 Модифицированные полимеры с антимикробной активностью

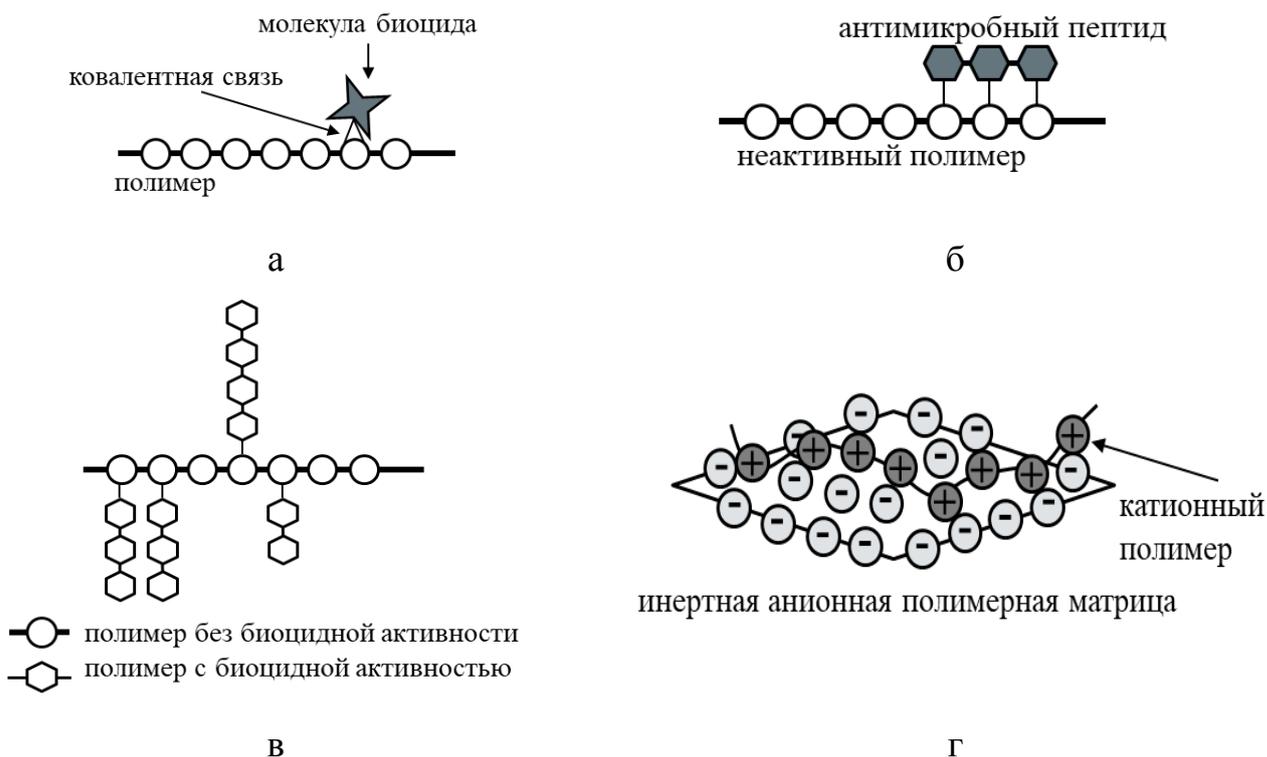
#### ***Модифицированные полимеры с антимикробной активностью.***

Существуют разные подходы для придания полимерам антимикробной активности [37]. Это может быть, например, ковалентное связывание небольших биоцидных молекул с полимером [58, 91, 92]; фиксация антимикробных пептидов на неактивных полимерах [37], прививка противомикробных полимеров к обычным полимерам [93, 94], электростатическое связывание катионного полимера на неактивной анионной полимерной матрице (**рис. 19**) [95].

Ниже приведены примеры полимерных структур, полученных путем модификации полимерной матрицы биоцидными веществами различной химической природы. Биоциды необратимо связываются с полимерной матрицей и проявляют свои антимикробные свойства в составе многокомпонентного композиционного материала.

Сополимеры стирол/акрилат с добавлением антибактериального и противогрибкового агента триклозана ингибировали рост *E. faecalis*. Полученные рецептуры были рекомендованы для создания антимикробных слоев на упаковочных материалах [96].

Наночастицы из кватернизованного полиэтиленimina [97], внедренные в медицинские материалы, показали антибактериальную активность в отношении стрептококковой культуры.



**Рисунок 19.** Различные способы придания биоцидных свойств полимерам; а – ковалентное связывание молекул биоцида с полимером; б – фиксация биоцидных пептидов на неактивном полимере; в – прививка биоцидных полимеров к обычным; г – электростатическое связывание катионного полимера с инертной анионной полимерной матрицей.

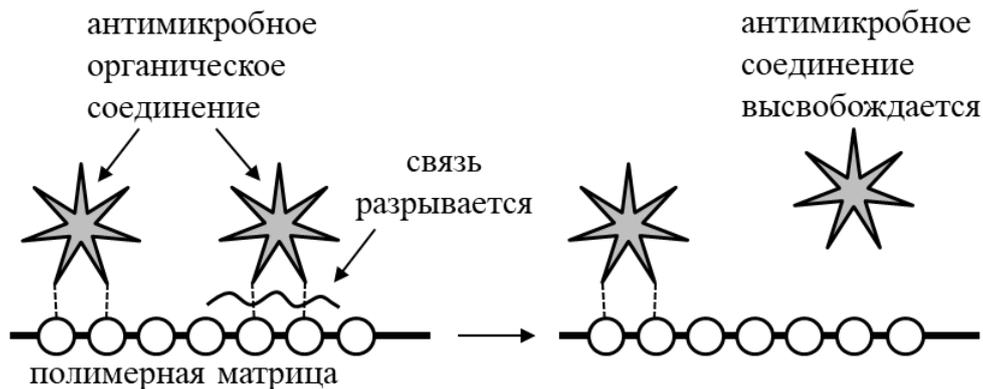
Интересный пример нековалентной модификации инертного полимера биоцидным полимером – связывание полианиона, например, полиакриловой кислоты, в нестехиометричный ИПЭК с катионным полимером, например ПДАДМАХ [98]. Такие ИПЭК сохраняют стабильность (не диссоциируют на исходные компоненты) в концентрированных растворах солей, в том числе в 0,15 М растворе NaCl (физиологическом растворе) [98] и демонстрируют высокую антимикробную активность по отношению к бактериям и грибам в растворе и на поверхности [99]. Другие примеры антимикробных ИПЭК – поликомплекс

катионного полигуанидина с анионной карбоксиметилцеллюлозой [100] и поликомплекс катионного хитозана с полиакриловой кислотой [101].

Биоцидный катионный полимер может быть включен в полимерное покрытие по методу послойного нанесения противоположно заряженных ПЭ [38, 102, 103]. Прочный контакт соседних ПЭ слоев и всей многослойной ПЭ пленки обеспечивается множественными солевыми связями катионного и анионного полимеров. Мультислои демонстрируют бактериостатическое действие, ингибируя рост адсорбированных микроорганизмов, и/или биоцидное действие, вызывая их гибель [104].

#### 1.7.4 Полимеры, содержащие антимикробные органические соединения

*Полимеры, содержащие антимикробные органические соединения.* В этом случае антимикробная активность обусловлена нековалентными связями или лабильными (легко разрушаемыми) связями между антимикробными агентами органической природы и полимерами с постепенным высвобождением активных агентов (рис. 20).



**Рисунок 20.** Принцип действия полимеров, содержащих антимикробные органические соединения (схема).

Такие системы, в которых полимерная матрица играет роль «донора биоцидов», описаны в многочисленных обзорах и статьях (см. обзор [105] и оригинальные работы [106-109]). В качестве доноров были использованы антибиотики, альдегиды, анилиды, диамидины, хлоргексидин, триклозан, N-галамины. Полученные композиции были использованы для формирования покрытий с биоцидными свойствами.

Смесь синтетического полимера с первичными аминогруппами и эфирного масла (карвакрола или эвгенола) эффективно уничтожала биопленки *Pseudomonas* [110].

N-бромгидантоин и N-бром-5,5'-диметилгидантоин, химически связанные с полистирольной матрицей, постепенно выделяли сильный окислитель в окружающий водный раствор, демонстрируя антимикробную активность в отношении клеток *E. coli* и бактериофагов MS2 [111]. Антимикробную активность показали полимеры, содержавшие 5-хлор-8-хинолинилакрилат, в ходе гидролитического высвобождения 5-хлор-8-гидроксихинолина [112]. Пленки из сополимеров, содержавших антибиотик ампициллин [113], были активны в отношении *S. aureus*.

Большая группа полимерных рецептур представлена композициями, содержащими полимер и катионное поверхностно-активное вещество (ПАВ). Комплексы полистиролсульфоната натрия и сополимеров стиролсульфонат натрия-стирол с серией катионных ПАВ [114] подавляли рост плесневых грибов. Комплексы альгината натрия и полиакрилата натрия с цетилпиридиний бромидом были активны в отношении бактериальных клеток *E. coli* и *P. aeruginosa* [115]. Комплексы поли(мет)акриловой кислоты с бензалконий хлоридом проявили активность по отношению к грамположительным бактериям *E. coli*, грамотрицательным бактериям *S. aureus* и грибам *C. albicans* [116].

Механизм действия четвертичных аммонийных соединений обсуждается в обзоре [117]. Основной путь проявления антимикробной активности этих

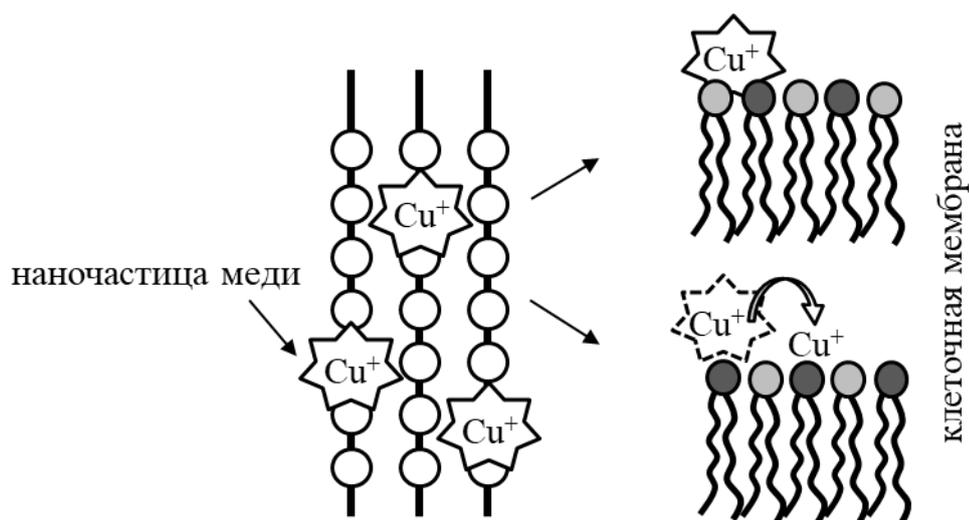
соединений – встраивание в клеточную мембрану, повышение ее проницаемости и лизис клеток [118].

#### 1.7.5 Полимеры, включающие противомикробные неорганические соединения

##### ***Полимеры, включающие противомикробные неорганические соединения.***

Из неорганических веществ сильным антимикробным действием обладают соли тяжелых металлов (серебра, меди); окислители (хлор, озон, йод, пероксид водорода, хлорная известь, перманганат калия); щелочи и кислоты (едкий натр, сернистая, фтористоводородная, борная кислоты); некоторые газы (сероводород, оксид углерода, сернистый, углекислый газ).

Соединения серебра и меди остаются самыми востребованными неорганическими биоцидами. Их токсический эффект обусловлен эффективной инактивацией ферментов [119-121] и способностью генерировать активные формы кислорода [119, 121-123]. Замена ионов металлов на металлические или оксидные наночастицы привела к заметному повышению эффективности антимикробного действия за счет по крайней мере двух эффектов: постепенному высвобождению ионов из наночастиц и прямому связыванию наночастиц с клеточными мембранами (**рис. 21**) [121, 122, 124-128]. Наночастицы могут проникать внутрь бактерий [122, 127, 129], повышая тем самым суммарный токсический эффект.



**Рисунок 21.** Взаимодействие полимерного нанокомпозита с клеточной мембраной. Наночастица меди может как напрямую связываться с мембраной, так и высвобождать ионы меди.

Синтез наночастиц можно проводить в растворе полимера [130-132] с последующим нанесением нанокомпозита на поверхность [124, 133-138] или же непосредственно в полимерной пленке/покрытии [102, 103, 139-144]. Возможно включать в полимерную матрицу два типа неорганических биоцидов – сульфида меди или хлорида серебра [145].

Биоцидным действием обладают частицы алюмосиликата, которые были внедрены в матрицу гидроксиэтилцеллюлозы [146]. Композит был использован для получения пленок с фунгистатическим действием по отношению к грибам рода *Candida*.

## 1.8 Механизм действия антимикробных полимеров

### 1.8.1 Принцип антимикробного действия катионных полимеров

Механизм антимикробного действия катионных полимеров может быть представлен следующим образом [89]. На первом этапе поликатион адсорбируется на поверхности клетки за счет электростатического

взаимодействия катионных групп полимера с анионными группами клеточной стенки, представленными липидами, сиаловыми и тейхоевыми кислотами. Это связывание может быть дополнительно усилено за счет гидрофобных и координационных взаимодействий полимер-клетка. Нейтрализация заряда клеток приводит к утрате ими коллоидной стабильности и агрегации.

Следующий этап – диффузия полимера через клеточную стенку и его связывание с отрицательно заряженной цитоплазматической белково-липидной мембраной. В модельных экспериментах с использованием бислойных липидных мембран было показано, что адсорбция поликатиона на отрицательно заряженной липидной мембране приводит к кластеризации (латеральной сегрегации) липидов [147, 148], нарушению трансмембранного распределения липидов [32], блокированию активных центров на поверхности мембраны [149, 150], встраиванию полимера в мембрану и его транспорту через липидный бислой [79, 151-153] (см. **рис. 13**). Конечный результат зависит от ряда факторов: химического состава поликатиона, его молекулярной массы, плотности катионных групп в макромолекуле, наличия гидрофобных фрагментов, кривизны липидной мембраны, доли анионных липидов в ней, фазового состояния липидного бислоя, pH раствора, концентраций низкомолекулярной соли и др.

Эти процессы приводят к существенному изменению упаковки липидов и белков в цитоплазматической мембране, формированию дефектов в мембране, повышению ее проницаемости [154, 155]. Одновременно с выходом из клеток компонентов цитоплазмы наблюдается и увеличение поглощения клетками веществ, находящихся в окружающей среде. В итоге мембрана клеток утрачивает свою целостность, что приводит к гибели клетки.

Добавление низкомолекулярного биоцида в поликатионную рецептуру приводит к усилению антимикробного эффекта за счет неспецифического действия в случае катионных ПАВ или специфического в случае антибиотиков.

## 2 Экспериментальная часть

### 2.1 Материалы

#### 2.1.1 Линейные полимеры

В работе использовали катионные полимеры: полидиаллилдиметиламмоний хлорид (ПДАДМАХ) со степенью полимеризации СП = 2900, CPS Chem. Com. Inc., США, влажность 10%. Влажность определяли при помощи анализатора влажности Shimadzu МОС63ц, Филиппины; и полилизин гидробромид (ПЛ) с СП = 90 и 1350, Sigma-Aldrich, Германия; анионные полимеры: полиакрилат натрия ПАНа<sub>1</sub> с СП = 85 (Sigma-Aldrich, Германия, раствор в воде, 45% масс.) и полиакриловая кислота (ПАК) с СП = 2660 (Sigma-Aldrich, Германия, раствор в воде, 35% масс.), дополнительно ПАК с СП = 1060 (Sigma-Aldrich, Германия, раствор в воде, 35% масс.). Раствор ПАНа<sub>2</sub> готовили смешением эквимольных растворов ПАК с СП = 2660 или 1060 и водного раствора гидроксида натрия (рис. 22). Все полимеры, использованные в работе, являлись коммерческими образцами и использовались без дополнительной очистки. Полистирольный латекс L621 с поверхностными карбоксильными группами был синтезирован по ранее описанной методике [156].

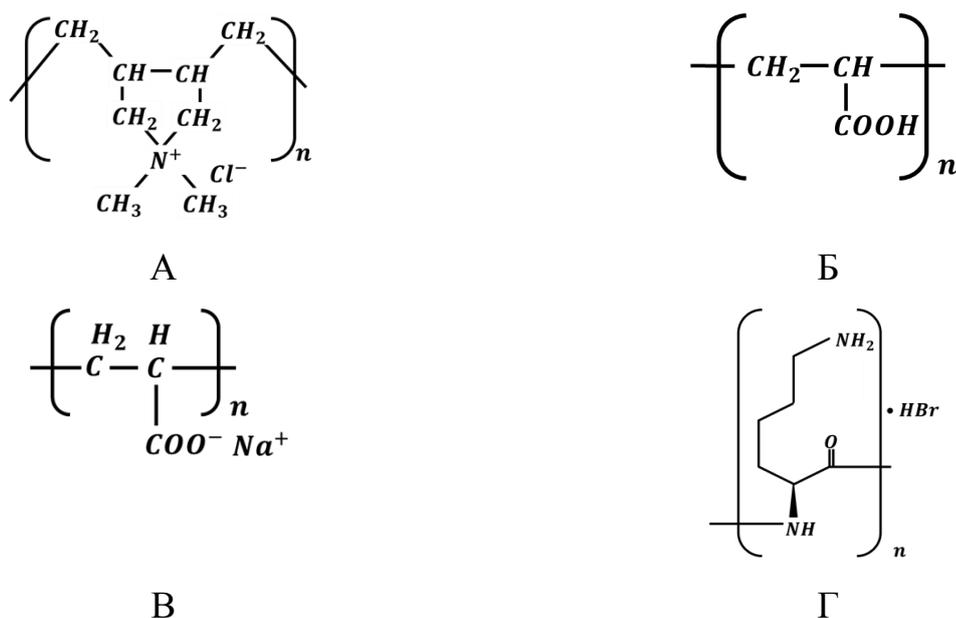


Рисунок 22. Формулы полимеров. А – ПДАДМАХ, Б – ПАК, В – ПАНа, Г – ПЛ.

В работе используется осново-мольная концентрация полимера, т.е. в молях мономерных звеньев в литре раствора.

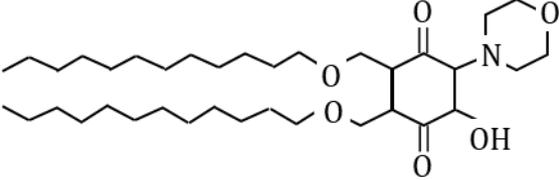
### 2.1.2 Фосфолипиды

Цвиттер-ионный, отрицательно заряженный фосфолипиды и флуоресцентно меченый липид, все производства Avanti Polar Lipids, США, использовали без дополнительной очистки. Фосфолипиды растворяли в смеси метилового спирта  $\text{CH}_3\text{OH}$  и хлороформа, Х.Ч., «Компонент-реактив», СТП ТУ СОРМ 2-028-06, Россия,  $\text{CHCl}_3$ , в соотношении 1:1. Метилловый спирт был дополнительно очищен методом дистилляции. Липид-переключатель транс-4,5-дидодецилаксикарбонил-2-морфолино-циклогексанол (ДЦГ) был синтезирован В. А. Мигулиным в Институте органической химии имени Н. Д. Зелинского РАН по ранее описанной методике (см. детали в работах [157-159]). Названия и структурные формулы фосфолипидов представлены в таблице 1.

**Таблица 1** – Названия и структурные формулы фосфолипидов

Название	Структурная формула
1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ)	
1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфо-L-серин (натриевая соль) (ПОФС <sup>1-</sup> )	
1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиссамин родамин В-сульфонил) (аммонийная соль) (ДОФЭ*)	

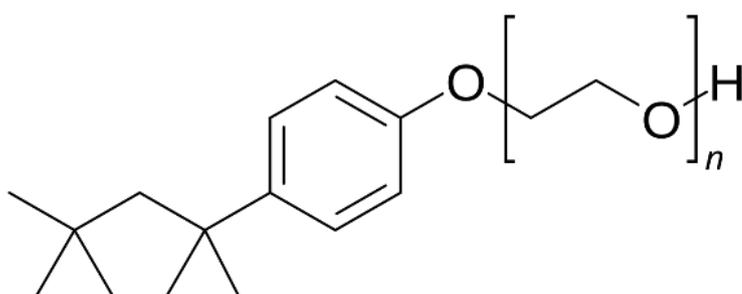
### Продолжение таблицы 1

транс-4,5- дидодецилоксикарбонил-2- морфолиноциклогексанол (ДЦГ)	
---	--

### 2.1.3 Низкомолекулярные реагенты

В работе для приготовления буферных растворов использовали трис(гидроксиметил)аминометан (ТРИС) TRIS Ultrapure, Invitrogen, США,  $C_4H_{11}NO_3$ . Буферные растворы с концентрацией  $10^{-3}$  М готовили по навеске. Хлорид натрия, Х.Ч., «Компонент-реактив», СТП ТУ КОМП 3-245-10, Россия, NaCl и гидроксид натрия, Ч.Д.А., «Компонент-реактив», ГОСТ 4328-77, Россия, использовали без дополнительной очистки.

Для оценки заполняемости липосом, нагруженных 1 М раствором хлорида натрия, применяли неионогенный ПАВ Triton X-100, Ferak Berlin, Германия (рис. 23).



**Рисунок 23.** Формула Triton X-100 (Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether).

### 2.1.4 Другие использованные материалы

В работе были использованы предметные стекла Thermo Scientific, Gerhard Menzel, Венгрия, с площадью поверхности  $19,76 \text{ см}^2$  для гравиметрического

анализа и покровные стёкла того же производителя с площадью поверхности 3,24 см<sup>2</sup> для микробиологических исследований.

## 2.2 Объекты исследования

### 2.2.1 Катионные нестехиометричные интерполиэлектролитные комплексы

Катионные нестехиометричные интерполиэлектролитные комплексы (НИПЭК) с избытком катионного полимера получали смешением водно-солевых растворов катионного ПДАДМАХ и анионного ПАНа.

Для получения НИПЭК готовили исходные растворы полимеров по навеске. В случае НИПЭК на основе ПДАДМАХ и ПАНа полимеры растворяли в буфере ТРИС с концентрацией 0,01 М, рН 7 – 7,2 и с добавлением хлорида натрия до концентрации 0,005 М. ПДАДМАХ концентрация 0,01 осново-моль/л и ПАНа 0,015 осново-моль/л. Далее раствор анионного полимера (блокирующего) покапельно (каждые 200 мкл из объёма раствора, необходимого для получения того или иного НИПЭК) добавляли к раствору катионного полимера (лиофилизирующего) при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке. Между каждым добавлением анионного полимера к катионному выдерживался интервал в течение двух минут. Концентрация ПДАДМАХ в каждом полученном интерполиэлектролитном комплексе оставалась постоянной – 0,0075 осново-моль/л. Всего было получено восемь образцов интерполиэлектролитных комплексов состава  $Z = 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5$  по 9 образцов в каждой серии для различных молекулярных масс полианиона ( $M_w$  (ПАНа) = 8 и 250 кДа соответственно). Состав поликомплексов отражает соотношение мольных концентраций катионных и анионных групп (соотношение зарядов обоих полимеров)  $Z = [+]/[-]$ . Поликомплексные дисперсии демонстрируют стабильность к агрегации по крайней мере в течение двух недель после приготовления.

### 2.2.2 Малые моноламеллярные липосомы

Липосомы для данной работы получали разных видов, методика получения каждого из них описана ниже.

*Малые моноламеллярные липосомы состава ПОФС<sup>1-</sup>/ДОФХ* с мольным соотношением ПОФС<sup>1-</sup> : ДОФХ = 8:2 получали по стандартной схеме методом озвучивания. Для этого смешивали необходимое количество растворов ПОФС<sup>1-</sup>, ДОФХ в смеси метанол–хлороформ и удаляли органический растворитель на вакуумном роторном испарителе при 30°C, 90 об/мин. в течение 3-5 минут в зависимости от объёма смеси. Образовавшуюся тонкую липидную плёнку диспергировали в буфере ТРИС с концентрацией 10<sup>-3</sup>, рН 7 – 7,2. После этого полученную суспензию подвергали ультразвуковой обработке частотой 22 кГц в течение 180 с в непрерывном режиме при постоянном охлаждении водой. Использовали ультразвуковой диспергатор JY92-IIN (“Ningbo”). Полученные липосомы отделяли от титановой пыли на центрифуге J-11 (“Beckman”) в течение 5 мин при скорости 13 тыс. об/мин.

*Липосомы со встроенной в бислой флуоресцентной меткой ПОФС<sup>1-</sup>/ДОФХ/ДОФЭ\** получали добавлением к смеси растворов липидов 15 мкл 10 мг/мл раствора ДОФЭ\* (0,5масс.% от общего количества липидов). Далее, как описано выше.

*Липосомы со встроенным липидом-переключателем ПОФС<sup>1-</sup>/ДОФХ/ДЦГ* с мольным соотношением компонентов ПОФС<sup>1-</sup>:ДОФХ:ДЦГ = 1:6:3 готовили также, как и липосомы со встроенной в бислой флуоресцентной меткой. К смеси липидов перед упариванием предварительно добавляли раствор липида-переключателя (до достижения требуемого мольного соотношения компонентов).

*Липосомы с включенным во внутренний объём хлоридом натрия* готовили по схожей вышеописанной схеме. Полученную липидную плёнку диспергировали в буфере ТРИС с концентрацией 10<sup>-3</sup>, рН 7 – 7,2, который дополнительно содержал 1 М NaCl. Полученную суспензию подвергали диализу против 10<sup>-3</sup> М

ТРИС буфера, который меняли каждые 30 минут до достижения постоянного значения электропроводности. Проводимость полученной суспензии липосом составляла  $86,0 \pm 0,6$  мкСм/см. После добавления к суспензии липосом 10-кратного избытка неионогенного ПАВ Triton X-100 по отношению к суммарному количеству липидов липосомы разрушаются и высвобождают в окружающий раствор включённую в них соль [160]. Значение электропроводности возрастает до  $180 \pm 0,6$  мкСм/см.

Суммарная концентрация липидов в полученных образцах составляла 1 мг/мл. Разбавление при диализе не учитывалось в виду его малых значений. Размеры липосом, определенные методом квазиупругого светорассеяния, варьировались в пределах 80 –100 нм.

## **2.3 Методы исследования**

### **2.3.1 Динамическое светорассеяние**

Для оценки среднего гидродинамического диаметра (размера) получаемых липосом и их комплексов с полиэлектролитами и катионными интерполиэлектролитными комплексами, а также для оценки размеров полученных в ходе работы НИПЭК использовали прибор Brookhaven 90 Plus, Brookhaven Instruments Company (США) при фиксированном угле ( $90^\circ$ ). Флуктуации интенсивности света регистрировали с помощью коррелятора Brookhaven 90 Plus, Brookhaven Instruments Company, США. Использовали усредненное значение трёх измерений средних гидродинамических диаметров образцов, полученных путём обработки корреляционной функции по методу кумулянтов программным обеспечением Brookhaven.

### 2.3.2 Электрофоретическая подвижность

Электрофоретическая подвижность («заряд») липосом и их комплексов с полиэлектролитами и катионными интерполиэлектролитными комплексами, а также заряды полученных в ходе работы НИПЭК, были измерены с использованием лазерного микроэлектрофореза на приборе Brookhaven 90 Plus, Brookhaven Instruments Company (США), в термостатируемой ячейке. Усредняли данные десяти измерений ЭФП образцов, полученные обработкой значений доплеровского сдвига частоты света лазера, проходящего сквозь ячейку с образцом.

### 2.3.3 Флуориметрия

Измерение интенсивности флуоресценции растворов липосом, меченых флуоресцентной меткой, проводили на спектрофлуориметре F-4000, Hitachi (Япония) при  $\lambda_{em} = 571$  нм,  $\lambda_{ex} = 557$  нм. Использовали полистирольные кюветы шириной 1 см. Измерения проводились в термостатируемой ячейке.

### 2.3.4 УФ-спектроскопия

Измерение оптической плотности растворов ИПЭК, растворов липосом проводили на спектрофотометрах UV-Mini-1240, Shimadzu (Япония) и ПЭ-5400УФ, ЭКРОС (Россия).

### 2.3.5 Кондуктометрия

Измерение электропроводности растворов и высвобождение NaCl из липосом проводили на кондуктометре CDM 83, Radiometer (Дания). Для

измерений использовали полистирольную пробирку, объём пробы составлял 1,5 мл.

### 2.3.6 Гравиметрия

Для оценки стабильности полимерных покрытий на стеклянной поверхности в водном окружении применяли метод гравиметрического анализа. Для этого на предварительно взвешенное предметное стекло наносили 1,5 мл полимерной композиции в расчёте 76 мкл на 1 см<sup>2</sup> поверхности стекла. Такой объём наносимого образца был определён экспериментально и обеспечивал полное покрытие стеклянной подложки без пустот. Далее стёкла сушили при температуре  $25,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  и относительной влажности  $33 \pm 2\%$  до образования стабильной плёнки в течение 1-1,5 суток. Температуру и относительную влажность контролировали при помощи регистратора температуры и влажности СЕМ DT-172. После полного высыхания стекло с плёнкой взвешивали. Гравиметрическим методом с использованием аналитических весов Госметр, ВЛА–120М (Россия), характеризующихся I (специальным) классом точности, было показано, что изменения в весе стекол с полимерным покрытием перестают регистрироваться уже после 4 промываний. Остаток полимерной композиции на стекле рассчитывали по формуле:

$$([(m_n - m_0) * 100\%]) / (m_p - m_0), \quad (1)$$

где  $m_n$  – масса стекла после смывки;

$m_0$  – масса чистого стекла;

$m_p$  – масса стекла с плёнкой.

### 2.3.7 Атомно-силовая микроскопия (АСМ)

Оценку толщины адсорбционного слоя ПДАДМАХ и НИПЭК на стеклянной поверхности проводили методом АСМ. Образцы получали 6-кратным промыванием стёкол, как описано в пункте 2.3.5. Изображения были получены в полуконтактном режиме сканирования с использованием микроскопа Solver PRO-M, ЗАО «Нанотехнология МДТ» (Россия). В случае образца с индивидуальным поликатионом, плёнку «сдирали» деревянным остриём, проводя узкую полосу, ширина которой сопоставима с диаметром кончика деревянного острия. Для образцов НИПЭК адсорбированный слой процарапывали зондом АСМ при сканировании в контактном режиме. Изображения были обработаны с использованием программного обеспечения Image Analysis, ЗАО «Нанотехнология МДТ», Россия и Femtoscan Online, ЗАО «Центр передовых технологий»<sup>1</sup>.

### 2.3.8 Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Для изучения морфологии полимерных покрытий на поверхности стекла до и после промывания водой применяли метод сканирующей электронной микроскопии. Изображения получали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA, JEOL (Япония)<sup>2</sup>. Для удаления с поверхности исходных покрытий кристаллов низкомолекулярных солей, источником которых были компоненты буферного раствора и NaCl, образовавшийся в результате ионного обмена между полиэлектролитами, однократно промывали покрытие бидистиллированной водой по описанной выше методике, что приводило к практически полному удалению солей.

---

<sup>1</sup> Автор выражает благодарность за получение изображений и оценку толщины адсорбционного слоя полимера в.н.с., к.ф.-м.н. Багрову Д.В. МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоинженерии.

<sup>2</sup>Автор выражает благодарность за получение изображений полимерных покрытий ведущему специалисту Богданову А.Г. МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, общефакультетская лаборатория электронной микроскопии.

### 2.3.9 Исследование биоцидной активности полимерных рецептур, нанесенных на поверхность покровного стекла

Для оценки биоцидной способности полимерных композиций, полученных в ходе работы, было предложено взять в качестве тест-микроорганизмов грамотрицательные бактерии *P. aeruginosa* 4.8.1; грамположительные бактерии *S. aureus* и дрожжи *Y. lipolytica* 367-2, которые выращивали на среде LB, Broth, Miller. Затем клеточные суспензии разводили стерильной дистиллированной водой до концентрации  $2 \times 10^3 - 8 \times 10^3$  клеток/мл и наносили на покровные стекла в количестве 100 мкл, распределяя жидкость по поверхности. Через 15 (30) мин., используя 300 мкл стерильной дистиллированной воды, производили смыв клеточной суспензии с поверхности стекол на чашки Петри с агаризованной средой LB (в три этапа по 100 мкл). Шпателем растирали жидкость по поверхности, добиваясь полного впитывания. Чашки инкубировали в течение 2-3 суток при температуре 28°C, а затем производили подсчет выросших колоний (соответствующих количеству клеток). В контрольном эксперименте 100 мкл подготовленной клеточной суспензии наносили сразу на чашку Петри с агаризованной средой. Подсчитывали процент выживших клеток после адгезии на полимерных покрытиях.<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> Автор выражает благодарность за проведение экспериментов по оценке биоцидной активности полимерных покрытий к.б.н. Лойко Н.Г. Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» и к.б.н. Панкратову Т.А. Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

### 3 Результаты и их обсуждение

#### 3.1 Формирование агрегативно стабильных интерполиэлектродитных комплексов <sup>4</sup>

В данной работе были получены два типа нестехиометричных интерполиэлектродитных комплексов (НИПЭК) с избытком катионных звеньев (катионные НИПЭК - НИПЭК) (рис. 24). В качестве катионного полимера использовали ПДАДМАХ с фиксированной СП = 2900 и анионный полимер ПАНа с СП = 85 («короткий» ПАНа<sub>1</sub>) и 2660 («длинный» ПАНа<sub>1</sub>). СП короткого ПАНа<sub>1</sub> была много меньше СП катионного ПДАДМАХ; СП длинного ПАНа<sub>2</sub> была сопоставима с СП катионного полимера.



ПДАДМАХ-ПАНа<sub>1</sub>

ПДАДМАХ-ПАНа<sub>2</sub>

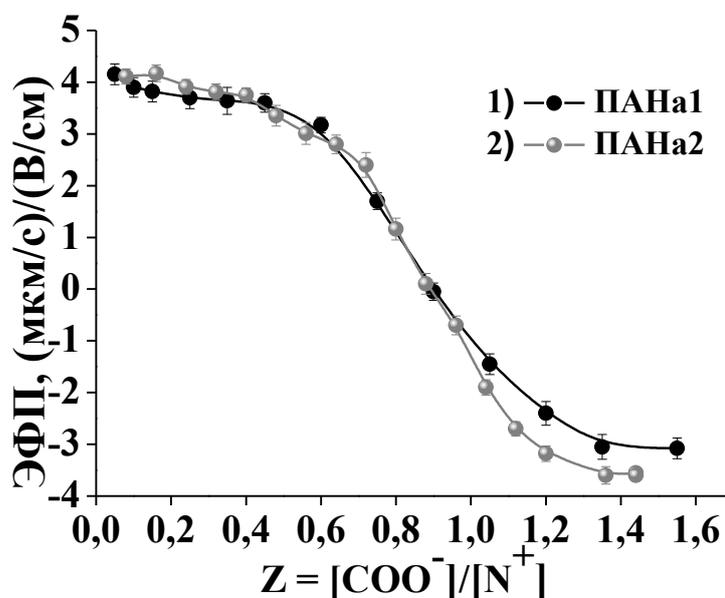
**Рисунок 24.** Фото сформированных НИПЭК.

За процессом формирования ИПЭК следили с помощью метода лазерного микроэлектрофореза, который позволяет регистрировать изменение электрофоретической подвижности частиц в растворе катионного интерполиэлектродитного комплекса, получаемого при добавлении водных растворов ПАНа<sub>1</sub> и ПАНа<sub>2</sub> к водному раствору ПДАДМАХ. Добавление раствора анионного полиэлектролита к катионному сопровождалось нейтрализацией заряда

<sup>4</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

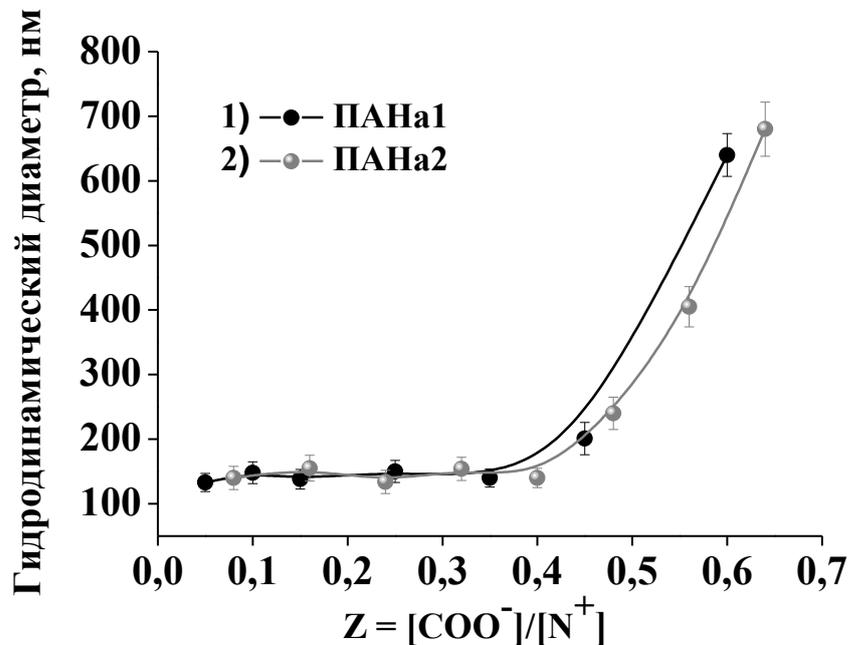
[98] – **Lokova A.Yu.**, Rosova A.Yu., Panova I.G., Loiko N.G., Nikolaev Yu.A., Yaroslavov A.A. / Molecular weight of polyanion affects the biological activity of interpolycomplexes // *Mendelev Communication*. – 2024. – V. 34, № 1. – P. 97-99.

цепей ПДАДМАХ, что и регистрировалось по изменению электрофоретической подвижности (ЭФП) частиц в растворе (рис. 25). Полученная зависимость электрофоретической подвижности от соотношения  $Z = [\text{COO}^-] / [\text{N}^+]$  свидетельствует об электростатической природе взаимодействия полиэлектролитов и формировании ИПЭК, стабилизированных множественными солевыми связями между противоположно заряженными группами обоих полимеров. На представленном графике видно, что зависимости для ПАНа<sub>1</sub> и ПАНа<sub>2</sub> совпадают. Это указывает на то, что оба полианиона количественно связываются с катионным полимером. Исходя из ранее опубликованных работ [161, 162] противоположно заряженные полианион и поликатион количественно связываются друг с другом до образования стехиометричных поликомплексов. Очевидно, что это утверждение верно и для комплексообразования ПДАДМАХ с ПАНа. Таким образом можно сделать вывод, что величина  $Z$  отражает не только состав полимерной смеси, но и состав образующегося ИПЭК. Избыточный положительный заряд ИПЭК гарантирует их агрегативную стабильность в водно-солевых средах.

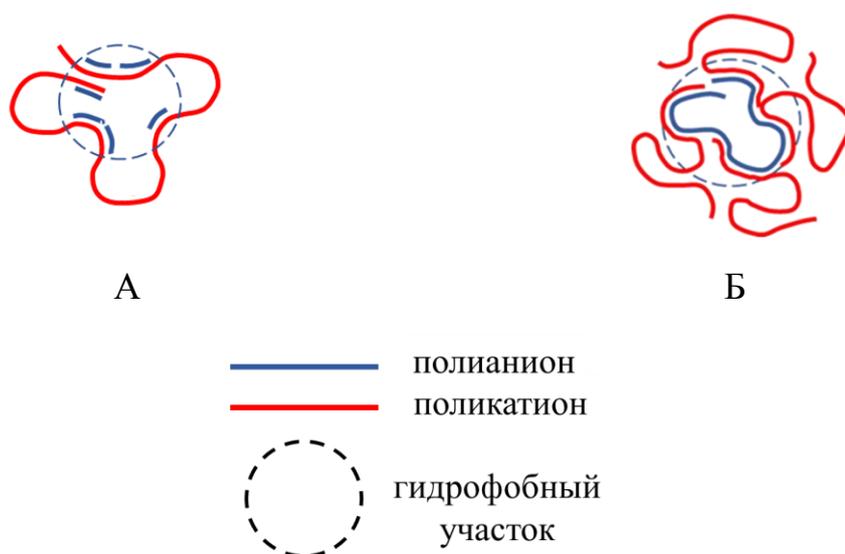


**Рисунок 25.** Зависимость электрофоретической подвижности ИПЭК от соотношения  $Z = [\text{COO}^-] / [\text{N}^+]$  ПАНа<sub>1</sub> (1) и ПАНа<sub>2</sub> (2).  $[\text{N}^+] = 5,0 \times 10^{-3}$  основомоль/л,  $10^{-3}$  моль/л ТРИС буферный раствор с pH 7,  $T = 25$  °C.

Параллельно был измерен размер частиц поликомплекса методом динамического светорассеяния (рис.26). В обоих случаях – как при связывании поликатиона с коротким, так и с длинным полианионом – размер получаемых поликомплексов практически не изменялся до соотношения  $Z = [\text{COO}^-] / [\text{N}^+] = 0,4$ . В этой области значений  $Z$  в растворе присутствовали положительно заряженные индивидуальные (неагрегированные) частицы поликомплекса, строение которых можно представить следующим образом (рис. 27). Такая структура поликомплекса была предложена ранее в работах, в которых описывается образование ИПЭК из двух противоположно заряженных полиэлектролитов [161-164].



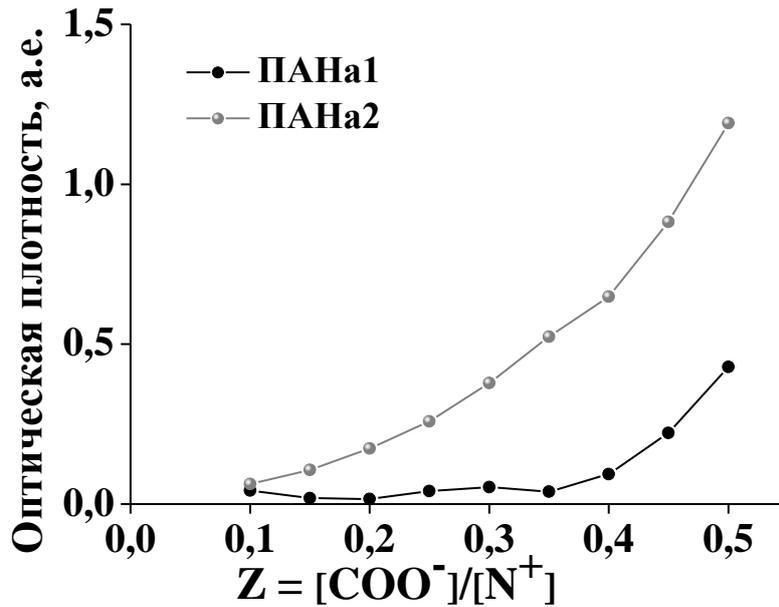
**Рисунок 26.** Зависимость гидродинамического диаметра ИПЭК от соотношения  $Z = [\text{COO}^-] / [\text{N}^+]$  ПАНа<sub>1</sub> (1) и ПАНа<sub>2</sub> (2).  $[\text{N}^+] = 5,0 \times 10^{-3}$  осново-моль/л,  $10^{-3}$  моль/л ТРИС буферный раствор с pH 7,  $T = 25$  °С.



**Рисунок 27.** Схематическое представление строения катионных НИПЭК с «коротким» ПАНа<sub>1</sub> (А) и «длинным» ПАНа<sub>2</sub> (Б).

Короткоцепной ПАНа<sub>1</sub> формировал поликомплекс путем связывания нескольких цепей ПАНа<sub>1</sub> на одной цепи ПДАДМАХ; и наоборот, одна цепь «длинного» ПАНа<sub>2</sub> связывала несколько цепей ПДАДМАХ. Повышение соотношения  $Z$  сверх значения 0,4 сопровождалось потерей агрегативной устойчивости частиц, что отражалось на росте их размера (см. рис. 26). Агрегацию можно было наблюдать и визуальюно: формирование ИПЭК приводило к образованию осадка. Увеличение размеров частиц НИПЭК по мере нейтрализации заряда катионного полимера анионным полимером описано в ранее опубликованных работах [165-167]; агрегаты наибольшего размера регистрировались при взаимной нейтрализации зарядов обоих полимеров.

Помимо динамического светорассеяния за формированием ИПЭК следили, контролируя мутность раствора методом турбидиметрии при длине волны  $\lambda = 400$  нм (рис. 28). В обоих случаях добавление полианиона к раствору ПДАДМАХ приводило к возрастанию мутности системы, что указывало на взаимодействие противоположно заряженных полимеров с образованием ИПЭК.



**Рисунок 28.** Зависимость оптической плотности НИПЭК ПДАДМАХ–ПАНа<sub>1</sub> и ПДАДМАХ–ПАНа<sub>1</sub> от соотношения.  $Z = [\text{COO}^-] / [\text{N}^+]$ ,  $[\text{N}^+] = 7,5 \times 10^{-3}$  основомоль/л,  $10^{-3}$  моль/л ТРИС буферный раствор с рН 7,  $T = 25$  °С.

Кривая, описывающая изменение оптической плотности от  $Z$  для ИПЭК с участием длинного полианиона ПАНа<sub>2</sub>, лежит выше кривой для ИПЭК с коротким полимером ПАНа<sub>1</sub>, что отражает бóльший размер агрегатов, в составе которых присутствует ПАНа<sub>2</sub>.

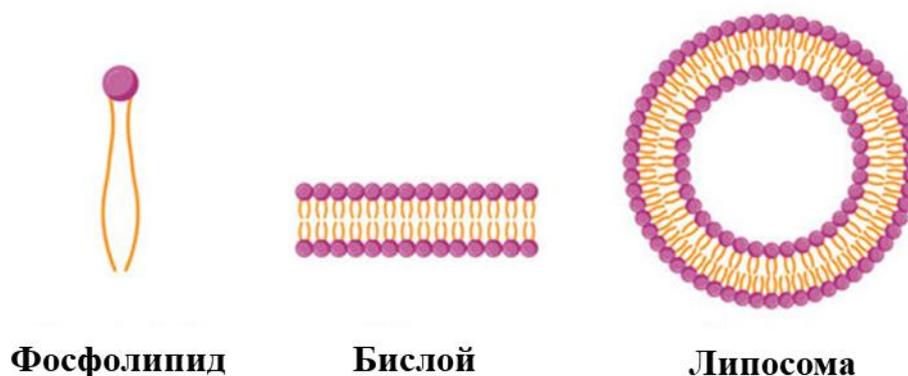
Таким образом, критерий  $Z \leq 0,4$  определяет диапазон составов нестехиометричных ИПЭК с избыточным положительным зарядом, которые были использованы в описанных ниже экспериментах.

### 3.2 Взаимодействие катионных НИПЭК с анионными липосомами.

#### Оценка антимикробной активности катионных НИПЭК

##### 3.2.1 Физико-химические исследования взаимодействия НИПЭК с липосомами<sup>5</sup>

Перед экспериментированием с клеточными линиями были проведены эксперименты с модельными частицами – бислойнными липидными везикулами (липосомами), мембрана которых имитирует поверхность животной клетки (рис. 29).



**Рисунок 29.** Строение липосомы. Гидрофобные цепи липидов, из которых состоит липосома, обращены друг к другу и формируют внутри неполярную область, а их полярные части расположены на поверхности бислоя и защищают гидрофобные цепи от контакта с водой.

Мольная доля отрицательно заряженного липида в липидной смеси составляла

$$Q = \frac{[\text{ПОФС}^{1-}]}{[\text{ПОФС}^{1-}] + [\text{ДОФХ}]} = 0.2, \quad (2)$$

<sup>5</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

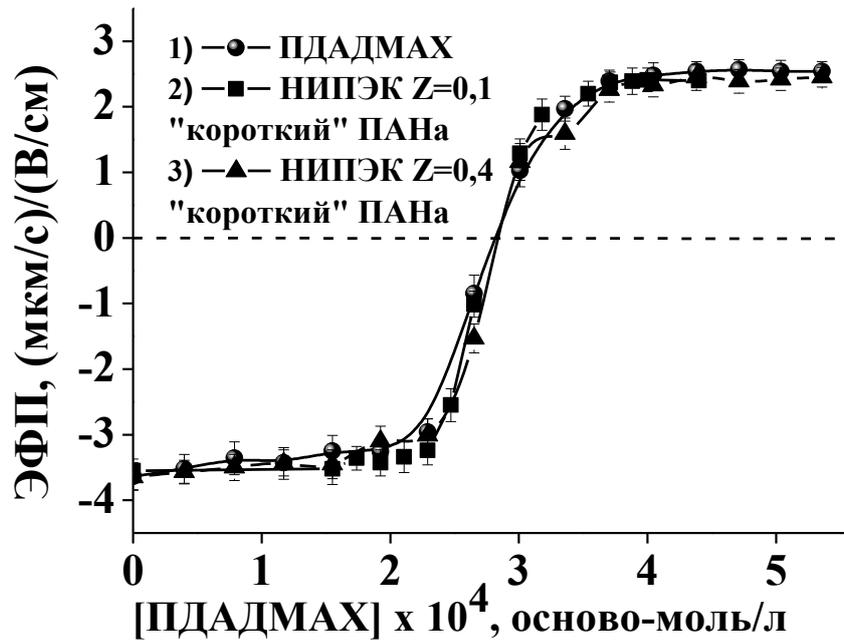
[98] – **Lokova A.Yu.**, Rosova A.Yu., Panova I.G., Loiko N.G., Nikolaev Yu.A., Yaroslavov A.A. / Molecular weight of polyanion affects the biological activity of interpolycomplexes // *Mendelev Communication*. – 2024. – V. 34, № 1. – P. 97-99.

где  $[\text{ПОФС}^{1-}]$  – мольная концентрация анионного липида;

$[\text{ДОФХ}]$  – мольная концентрация цвиттер-ионного липида.

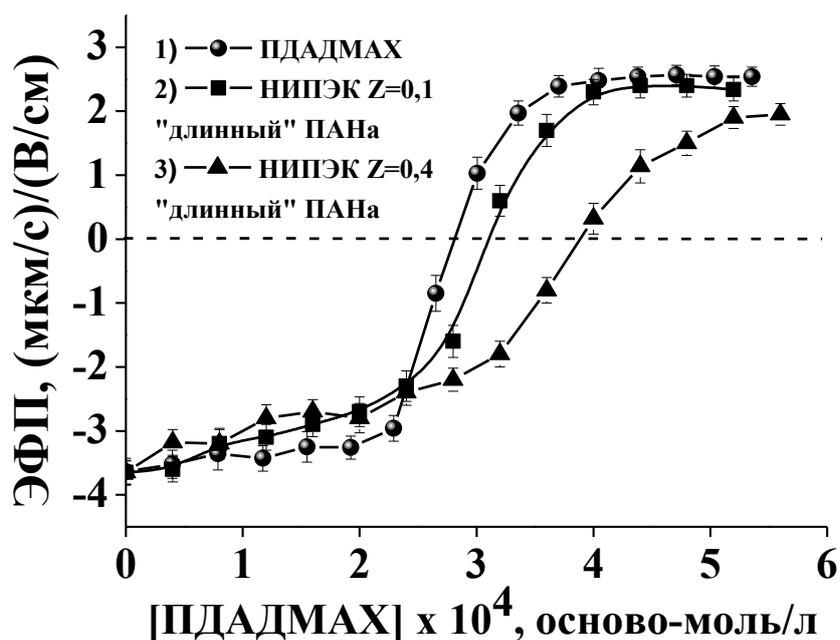
что соответствовало составу липосом из работы [168]. Размер (средний гидродинамический диаметр) липосом был равен  $85 \pm 5$  нм, их ЭФП  $-3,75 \pm 0,1$  (мкМ/с)/(В/см).

К суспензии анионных липосом добавляли катонный ПДАДМАХ и два НИПЭК с «коротким» ПАНа<sub>1</sub> и  $Z = 0,1$  и  $0,4$ . За взаимодействием НИПЭК с анионными липосомами следили по изменению ЭФП частиц методом лазерного микроэлектрофореза. Для удобства обсуждения полученных результатов на **рисунках 30 и 31** по оси X отложена концентрация ПДАДМАХ: свободного, если он единственный добавленный полимер, или привнесённого в составе НИПЭК. Из данных **рисунка 30** следует, что индивидуальный поликатион и оба НИПЭК нейтрализуют заряд липосом при одной и той же концентрации ПДАДМАХ равной  $(2,8 \pm 0,02) \times 10^{-4}$  осново-моль/л. Иными словами, для нейтрализации заряда липосом требуется одинаковое количество поликатиона независимо от того был ли он добавлен в виде индивидуального полимера или в виде комплекса с ПДАДМАХ. Это могло произойти, только если добавление обоих НИПЭК инициировало конкурентную реакцию, в которой поликатион, изначально вовлечённый в комплекс с ПАНа<sub>1</sub>, терял полианион и формировал электростатический комплекс с анионными липосомами. Таким образом, анионные липосомы были более сильным конкурентом для связывания с ПДАДМАХ по сравнению с «коротким» ПАНа<sub>1</sub>.



**Рисунок 30.** Зависимости ЭФП комплекса липосома-поликатион и липосома-НИПЭК от концентрации ПДАДМАХ. ПДАДМАХ, НИПЭК с ПАНа<sub>1</sub> Z = 0,1 и НИПЭК с ПАНа<sub>1</sub> Z = 0,4. Общая концентрация липидов 1 мг/мл, 10<sup>-3</sup> М ТРИС буферный раствор с рН 7, [N<sup>+</sup>] = 5×10<sup>-3</sup> осново-моль/л, T = 25 °С.

После этого к липосомам добавляли два НИПЭК с «длинным» ПАНа<sub>2</sub> и Z = 0,1 и 0,4. В этом случае концентрация, необходимая для нейтрализации заряда липосом, повышалась в ряду ПДАДМАХ <НИПЭК (Z = 0,1) <НИПЭК (Z = 0,4) (рис. 31), то есть повышение Z требовало бóльшего количества НИПЭК для нейтрализации заряда липосом.



**Рисунок 31.** Зависимости ЭФП комплекса липосома-поликатион и липосома-НИПЭК от концентрации ПДАДМАХ. ПДАДМАХ, НИПЭК с ПАН<sub>а2</sub> Z=0,2 и НИПЭК с ПАН<sub>а2</sub> Z=0,4. Общая концентрация липидов 1 мг/мл, 10<sup>-3</sup> М ТРИС буферный раствор с рН 7, [N<sup>+</sup>] = 5×10<sup>-3</sup> осново-моль/л, T = 25 °С.

Такая картина указывала на то, что НИПЭК с длинным ПАН<sub>а2</sub> не диссоциировал при связывании с липосомами. Бóльшее значение Z означало, что бóльшее количество катионных групп ПДАДМАХ был электростатически связано с анионными группами ПАН<sub>а2</sub> и потому не участвовало в комплексообразовании с липосомами. Это выразалось в сдвиге нейтрализующих концентраций ПДАДМАХ в сторону более высоких значений.

Из вышеописанных результатов можно сделать следующий вывод. Поведение катионных НИПЭК при их взаимодействии с анионными липосомами существенно различается в зависимости от того, какой полианион входит в состав комплекса с ПДАДМАХ. Если с липосомами взаимодействует НИПЭК с «коротким» полианионом, то липосомы вытесняют ПАН<sub>а1</sub> из поликомплекса в раствор и формируют бинарный комплекс с высвобожденным поликатионом. При

взаимодействии липосом с НИПЭК на основе «длинного» полианиона такие поликомплексы не диссоциируют, а связываются с липосомами как целое, давая в итоге тройной комплекс липосома/ПДАДМАХ/ПАНа<sub>2</sub>. Взаимодействие липосом с ИПЭК разного состава схематично представлено на **рисунке 32**.



**Рисунок 32.** Схематичное изображение комплексов липосома-НИПЭК. ПДАДМАХ-ПАНа<sub>1</sub> диссоциирует на исходные составляющие при взаимодействии с липосомой, ПДАДМАХ-ПАНа<sub>2</sub> не диссоциирует.

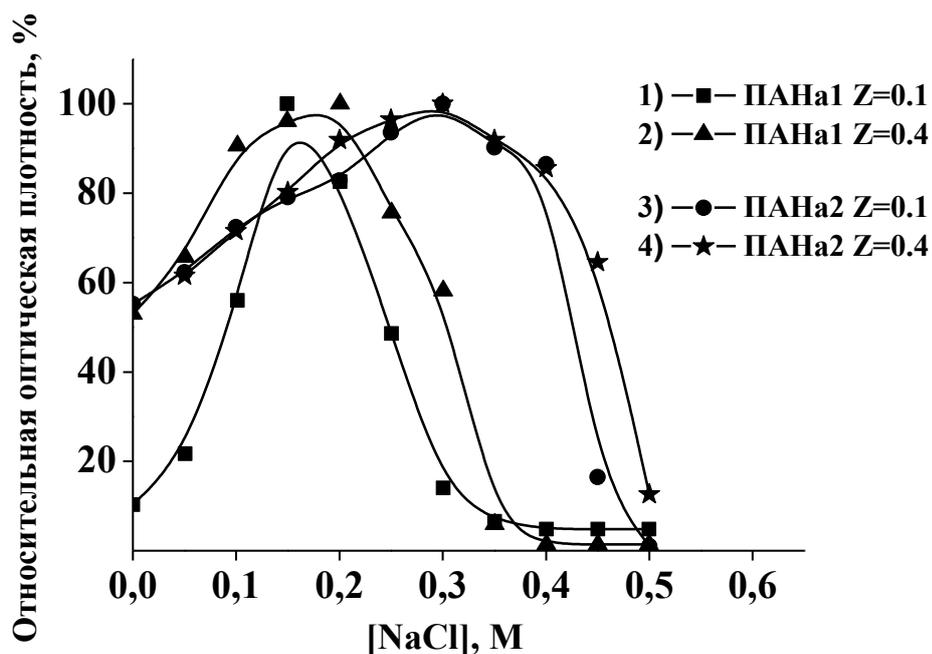
### 3.2.2 Биологическое тестирование ПДАДМАХ и НИПЭК

Для количественной оценки антимикробных свойств растворов ПДАДМАХ и поликомплексов определяли их минимальную ингибирующую концентрацию (МИК). Величина МИК – это наименьшая концентрация химического вещества (в этой роли обычно выступает лекарство), которая подавляет видимый *in vitro* рост бактерий или грибов [169, 170]. Стоит отметить, что тестирование антимикробной активности проводили в специальной питательной среде М9, необходимой для выращивания бактерий. В состав этой среды входят различные соли с суммарной концентрацией 0,08 моль/л. Из литературы известно, что инетрполиэлектролитные комплексы чувствительны к концентрации соли в растворе [33, 171]. При увеличении концентрации соли в водном растворе сначала происходит экранирование заряда частиц поликомплекса зарядами малых

противоионов и агрегация частиц, а затем диссоциация поликомплекса на исходные составляющие – поликатион и полианион. Критическая концентрация соли, приводящая к количественной диссоциации ИПЭК зависит от ряда факторов, включая химическую природу полимеров, образующих ИПЭК. Поэтому перед тестированием НИПЭК на предмет антимикробных свойств была исследована их стабильность в водно-солевых средах. Количественно этот показатель определяли, измеряя оптическую плотность суспензии НИПЭК в режиме титрования раствором хлорида натрия.

Для этих экспериментов концентрация поликомплексов была увеличена до 0,05 осново-моль/л, то есть в 10 раз по сравнению с той, которая была использована в электрофоретических экспериментах (см. **рис. 30** и **рис. 31**). Причина этого заключалась в том, что при концентрации 0,005 осново-моль/л растворы были практически прозрачны и не позволяли зафиксировать уменьшение оптической плотности при диссоциации поликомплексов.

Как и ожидалось, первоначальное увеличение концентрации соли сопровождалось повышением мутности системы, что свидетельствовало о росте размера частиц в системе, т.е. их агрегации (**рис. 33**). При большей концентрации соли мутность уменьшалась из-за диссоциации поликомплекса на исходные компоненты. «Диссоциирующая» концентрация соли была ниже для поликомплекса с коротким полианионом, чем с длинным: 0,35 М для ПАНа<sub>1</sub> против 0,5 М для ПАНа<sub>2</sub>. Таким образом, питательная среда М9 с общей концентрацией низкомолекулярных солей 0,08 М, использованная в микробиологических тестах, не влияла на стабильность обоих типов поликомплексов.



**Рисунок 33.** Зависимость относительной оптической плотности суспензий НИПЭК от концентрации NaCl: НИПЭК с ПАНа<sub>1</sub> Z=0,1 (1) и Z=0,4 (2), НИПЭК с ПАНа<sub>2</sub> Z=0,1 (3) и Z=0,4 (4).  $[N^+] = 5 \times 10^{-2}$  М,  $10^{-3}$  М ТРИС буферный раствор с pH 7, T = 25 °С.

Антимикробные эксперименты проводились с катионным ПДАДМАХ и двумя катионными поликомплексами: с ПАНа<sub>1</sub> и ПАНа<sub>2</sub> с одинаковой степенью нейтрализации зарядов ПДАДМАХ полианионом ( $Z = 0,4$ ). Такой состав поликомплексов был максимальным, который все еще обеспечивал их агрегативную стабильность (см. рис. 26). Антимикробную активность определяли по отношению к грамотрицательным бактериям *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка). *P. aeruginosa* представляет собой вид грамотрицательных аэробных бактерий, обнаруживается в воде, почве. Для человека условно патогенна, является возбудителем внутрибольничных инфекций, устойчива к антибиотикам [172, 173]. Результаты антимикробных тестов представлены в таблице 2.

**Таблица 2** – Антимикробная активность ПДАДМАХ и НИПЭК в растворе МИК, масс. %; Z – соотношение  $[\text{COO}^-]/[\text{N}^+]$

Полимерная композиция	Z	МИК, масс. %
ПДАДМАХ	0	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-3}$
НИПЭК–ПАНа <sub>1</sub>	0,4	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-3}$
НИПЭК–ПАНа <sub>2</sub>	0,4	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-3}$

Как следует из данных Таблицы 2, значение минимальной ингибирующей концентрации для индивидуального поликатиона ПДАДМАХ сравнимо с таковым для НИПЭК на основе короткого ПАНа<sub>1</sub>. Иными словами, ПДАДМАХ и его комплекс с коротким ПАНа<sub>1</sub> обладают практически одинаковой антимикробной активностью. Этот вывод хорошо согласуется с ранее полученными данными по взаимодействию анионных липосом – моделей клеточной поверхности и НИПЭК с участием ПАНа<sub>1</sub>, в ходе которого происходит переход поликатиона из поликомплекса на липосомы. Этот механизм объясняет одинаковую антимикробную активность ПДАДМАХ и его комплекса с коротким ПАНа<sub>1</sub>.

Что касается значения минимальной ингибирующей концентрации НИПЭК с участием длинного ПАНа<sub>2</sub>, то оно оказалось почти в два раза выше значений МИК для НИПЭК с ПАНа<sub>1</sub>. Это означает, что антимикробная активность поликомплекса с ПАНа<sub>2</sub> в два раза меньше, чем поликомплекса с ПАНа<sub>1</sub>. Эти результаты коррелируют с тем фактом, что НИПЭК с ПАНа<sub>2</sub> сохраняет свою целостность при взаимодействии с анионными липосомами.

Из приведённых данных можно сделать вывод о влиянии молекулярной массы анионного полимера на взаимодействие поликомплекса с биологической мембраной и функционирование клетки. При взаимодействии с липосомами НИПЭК могут диссоциировать или связываться целиком; механизм этой ключевой стадии будет определять всю цепочку событий, начиная со связывания НИПЭК с клеткой и заканчивая влиянием НИПЭК на целостность биологической мембраны.

### 3.3 Взаимодействие катионного полимера с анионными липосомами со встроенным в липидную мембрану порообразователем<sup>6</sup>

Клеточная мембрана (или плазматическая/цитоплазматическая мембрана, плазмолемма) представляет собой сложную молекулярную структуру, которая отделяет и защищает внутреннюю часть клетки от внешней среды (внеклеточного пространства) [174]. Клеточная мембрана состоит из липидного бислоя, в состав которого входит холестерин, обеспечивающий необходимую текучесть мембраны при различных температурах. Помимо этого, мембрана содержит различные белки: интегральные, которые пронизывают бислой, и периферические, прикрепленные к внешней стороне клеточной мембраны [175]. При взаимодействии липидного бислоя с катионными полимерами и катионными поликомплексами в процесс должны вовлекаться и мембранные белки, что будет отражаться на их функциональной активности.

#### 3.3.1 Механизм действия липида-переключателя

Для моделирования этих процессов были использованы анионные липосомы со встроенным липидом-переключателем (ЛП) ДЦГ. Этот липид способен изменять свою конформацию при изменении pH внешнего раствора. На **рисунке 34** слева представлена структура ЛП в водном растворе с pH 7. Ацильные радикалы липида-переключателя в этом случае расположены параллельно друг другу. При понижении pH (закислении раствора) происходит протонирование аминогруппы, входящей в состав ЛП, и он приобретает положительный заряд с последующим образованием внутримолекулярной

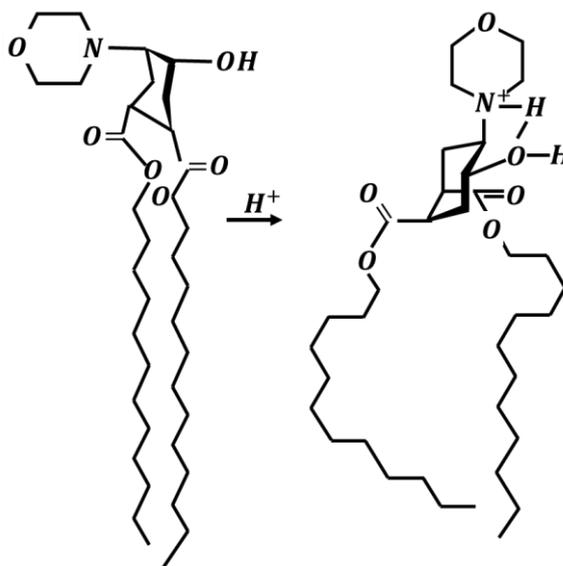
<sup>6</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

[168] Sybachin A.V., **Lokova A.Yu.**, Spiridonov V.V., Novoskol'tseva O.A., Shtykova E.V., Samoshin V.V., Migulin V.A., Yaroslavov A.A. / The effect of cationic polylysine on the release of an encapsulated substance from pH-sensitive anionic liposomes // Polymer Science, Series A – 2019. – V. 61, № 3. – P. 308-316.

[181] Zaborova O.V., **Lokova A.Yu.** / Modification of liposomes with a polycation can enhance the control of pH-induced release // International Journal of Nanomedicine. – 2019. – V. 2019, № 14. – P. 1039-1049.

водородной связи. В результате происходит изменение конформации циклогексанового кольца, что влечёт за собой смену пространственной ориентации ацильных радикалов (см. рис. 34 справа).

Если внедрить такой ЛП в мембрану липосом, он сохранит способность менять конформацию при понижении pH внешнего раствора. Конформационный переход, индуцированный понижением pH, нарушает упаковку липидов в мембране липосом, что ведёт к нарушению целостности мембраны и высвобождению внутреннего содержимого липосом в окружающий раствор. Этот процесс перестройки можно сравнить с открыванием/закрыванием пор в клеточной мембране при изменении кислотности окружающей среды.



**Рисунок 34.** Структурная перестройка в ЛП при протонировании аминогруппы морфолинового кольца.

В работе были использованы липосомы с мольной долей анионного липида

$$Q_1 = \frac{[\text{ПОФС}^-]}{\{[\text{ПОФС}^-] + [\text{ДОФХ}] + [\text{ЛП}]\}} = 0.1 \quad (3)$$

и мольной долей ЛП

$$Q_2 = [ЛП] / \{[ПОФС^-] + [ДОФХ] + [ЛП]\} = 0.3, \quad (4)$$

где [ПОФС<sup>-</sup>] – мольная концентрация анионного липида;

[ДОФХ] – мольная концентрация цвиттер-ионного липида;

[ЛП] – мольная концентрация липида-переключателя.

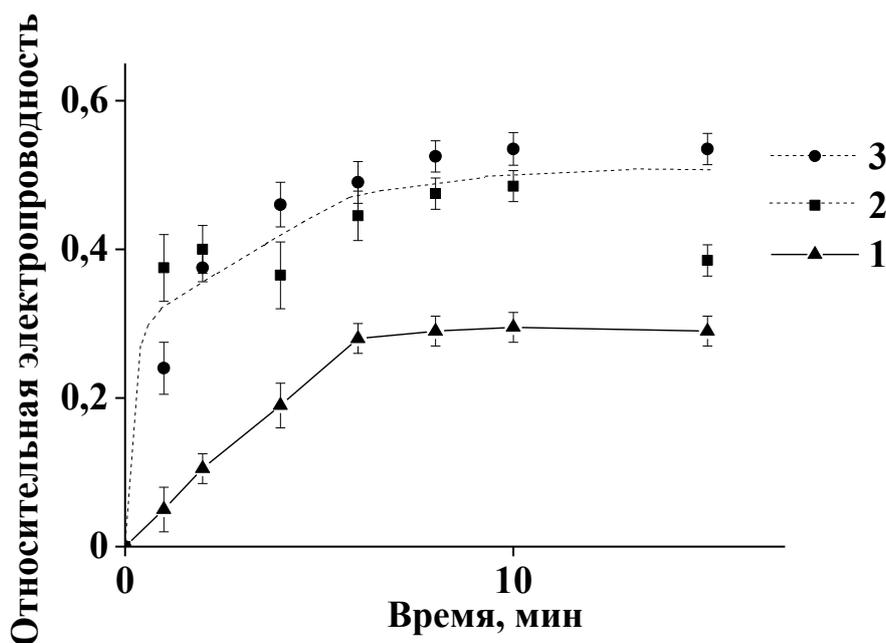
Липосомы заполняли 1 моль/л раствором NaCl. За высвобождением соли из липосом следили по изменению электропроводности внешнего раствора методом кондуктометрии. Максимальное значение электропроводности, которое соответствовало высвобождению максимального количества соли из липосом, получали, разрушая липосомы добавлением избытка детергента Тритон X-100.

В качестве катионного полимера использовали полипептид полилизин: короткий с СП = 90 и длинный с СП = 1350. Полилизин электростатически адсорбировали на поверхности анионных липосом, используя описанную выше процедуру для приготовления комплексов анионных липосом с ПДАДМАХ.

### 3.3.2 Влияние катионного полилизина на анионные липосомы, содержащие липид-переключатель

Мы начали с анализа поведения трех контрольных растворов в буфере с pH 7: 1) липосом со встроенным ЛП; 2) липосом с ЛП и коротким ПЛ; 3) липосом с ЛП и длинным ПЛ. Во всех трёх случаях электропроводность растворов не менялась в течение 1 часа, что указывало на сохранение целостности липосом при этих условиях. Далее pH раствора понижали до 5. Снижение pH привело к увеличению электропроводности как суспензии липосом (**рис. 35**, кривая 1), так и комплексов липосом с полилизином (**рис. 35**, кривые 2 и 3). Сравнение профилей полученных кривых позволяет сделать следующие выводы. Во-первых, комплексообразование с полилизином значительно ускоряет высвобождение соли из липосом. Во-вторых, выход соли из комплексов с коротким и длинным

полилизинном описывается одной и той же кинетической кривой. В-третьих, максимальное высвобождение составляет 30% для свободных липосом и 50% для липосом в комплексе с полилизинном. Таким образом, связывание липосом с ПЛ оказывает заметное влияние на порообразующую способность ЛП.



**Рисунок 35.** Зависимость относительной электропроводности флипосом (1) и флипосом в комплексе с полилизинном СП = 90 (2) и 1350 (3) от времени. Общая концентрация липидов 1 мг/мл; концентрация полилизина =  $1,5 \times 10^{-4}$  М;  $10^{-3}$  М ТРИС буферный раствор с рН 5,  $T = 25$  °С.

Обнаруженный нами эффект нетривиален. Дело в том, что катионный полилизин не связывается электростатически с молекулами липида-переключателя. Молекулы ЛП либо электронейтральны в растворе с рН 7, либо заряжены положительно в растворе с рН 5 (см. рис. 34). Поэтому наблюдаемый эффект ускорения вытекания соли нельзя объяснить прямым взаимодействием полилизина с молекулами липида-переключателя.

Из литературы известно [176-179], что адсорбция полилизина на поверхности смешанных липосом, сформированных из нейтрального и анионного

липидов, сопровождается формированием двух типов кластеров: первый обогащен анионными липидными молекулами, которые удерживаются вместе благодаря их взаимодействию с адсорбированным поликатионом, второй представлен нейтральными липидными молекулами. Граница между двумя типами несмешивающихся липидных кластеров рассматривается в литературе как область с неупорядоченной организацией алкильных цепей липидных молекул [150, 151, 180]. Очевидно, аналогичный процесс развивается при адсорбции полилизина на поверхности ПОФС<sup>1-</sup>-ДОФХ липосом со встроенным липидом-переключателем: полилизин собирает в кластеры молекулы ПОФС<sup>1-</sup> и вытесняет в отдельные домены молекулы ДОФХ и ЛП.

В отдельном эксперименте было показано, что повышение содержания ЛП в мембране анионных липосом сопровождается ускорением рН-индуцированного высвобождения водорастворимого инкапсулированного веществ во внешний раствор [181]. Причина этого заключается в росте количества дефектов в липосомальной мембране, которые ответственны за ее проницаемость. Этот результат позволяет предложить следующий механизм ускорения рН-индуцированного высвобождения соли из липосом со встроенным ЛП после добавления полилизина (или другого катионного полимера). Поликатион «собирает» под себя (концентрирует в кластеры) анионные липиды на липосомальной мембране, и вытесняет в свободные от полимера области другие липиды – нейтральный ДОФХ и ЛП. В этих областях концентрация ЛП повышается, что приводит к локальному концентрированию дефектов в мембране и ускорению вытекания соли.

Полученные результаты указывают на то, что влияние поликатиона на вытекание соли может заключаться не в прямом его воздействии на функциональные элементы биологической мембраны, а опосредованно – через изменение распределения структурообразующих липидов в мембране.

### 3.4 Формирование бактерицидных покрытий из катионных полимеров и НИПЭК<sup>7</sup>

Катионные полимеры применяются для защиты от воздействия вредоносных микроорганизмов [37, 182], которыми загрязнены окружающие нас предметы. Для формирования защитных покрытий могут применяться водные растворы индивидуальных катионных полимеров и водные растворы/суспензии положительно заряженных нестехиометричных ИПЭК, рецептуры которых описаны в данной работе. Поликатион, расположенный на внешней (обращенной в окружающий раствор) стороне покрытия связывается с клетками и индуцирует необратимые изменения в клеточной мембране, которые в конечном итоге могут привести к ее разрушению и гибели клетки.

Такие покрытия формируются через нанесение рецептуры на поверхность с последующей сушкой. Данная процедура проста и экологична – для получения покрытий используют водные растворы, которые можно наносить на большие по площади поверхности при помощи различных технических средств (ранцевых распылители, аэрозольных баллонов, пульверизаторов и проч.). В лабораторных условиях за образованием покрытия можно следить с помощью метода гравиметрии, контролируя потерю веса нанесенного образца.

При этом нужно иметь в виду, что покрытия часто используют во влажной среде или эксплуатируют в помещениях, в которых периодически проводится влажная уборка, что может негативно сказаться на качестве полимерного покрытия. Ионные полимеры легко растворяются в воде, поэтому они могут быть удалены (вымыты) из покрытия при обработке водой, что приведёт к потере его антимикробных свойств.

---

<sup>7</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

[99] Panova I.G., **Lokova A.Yu.**, Bagrov D.V., Loiko N.G., Nikolaev Yu.A., Yaroslavov A.A. / Do cationic polymer coatings retain their biocidal activity after washing with water? // Mendeleev Communications. – 2023. – V. 33, № 4. – P. 562-564.

Один из возможных путей повышения стабильности покрытия в водном окружении – модификация катионного полимера гидрофобными фрагментами. Такая модификация приведет к формированию гидрофобных областей в сформированном покрытии, которые сделают его менее чувствительным к воде.

Мы провели гидрофобизацию катионного ПДАДМАХ через формирование ИПЭК с анионным ПАНа. В полученных ИПЭК доля нейтрализованных катионных групп ПДАДМАХ анионными группами ПАНа не превышала 0,4. Такой ИПЭК можно формально представить сополимером, в котором часть катионных групп (не более 40%) после их нейтрализации превращена в «гидрофобные» блоки, а оставшиеся свободными катионные группы представляют собой «гидрофильные» блоки, которые обеспечивают сополимеру совместимость с водой.

Предлагаемый способ гидрофобизации поликатиона выглядит весьма логично. Но при этом остаются вопросы, связанные с устойчивостью и биоцидными свойствами покрытия. С одной стороны, гидрофобизация (доля нейтрализованных катионных групп) не может превышать некоторую критическую величину, которая все еще обеспечивает растворимость полученного ИПЭК в воде. В случае пары ПДАДМАХ-ПАНа эта «критическая» доля равна 40% (см. **рис. 26**). С другой стороны, гидрофобизация не должна привести к потере антимикробных свойств полимера и покрытия, за которые ответственны свободные катионные группы ИПЭК. Эти вопросы обсуждаются в следующем разделе работы.

#### 3.4.1 Сравнение устойчивости полимерных покрытий на основе индивидуального поликатиона и НИПЭК к смыванию водой

Для получения покрытий использовали водные растворы катионного ПДАДМАХ и катионных НИПЭК состава ПДАДМАХ–ПАНа<sub>2</sub> с  $Z = 0,2$  и  $0,4$ . Полимерные растворы наносили на предметное стекло известного веса и

оставляли до полного высыхания. Объём полимерного раствора выбирали с тем расчетом, чтобы он полностью покрывал одну сторону предметного стекла. Вес полимерного покрытия после высыхания определяли как

$$W_{\text{пл}} = W_{\text{ст+пл}} - W_{\text{ст}}, \quad (5)$$

где  $W_{\text{ст+пл}}$  – вес стекла с покрытием (пленкой), г;

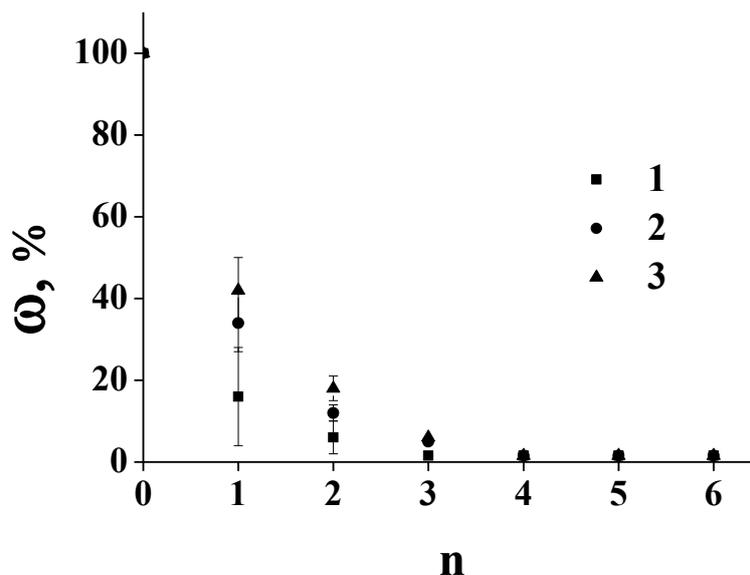
$W_{\text{ст}}$  – вес исходного предметного стекла, г.

На стекло с покрытием наносили бидистиллированную воду в том же объёме, что и полимерный раствор для формирования покрытия. Через 2 минуты воду удаляли при помощи дозатора таким образом, чтобы не задевать наконечником покрытие во избежание его деформации, образец снова сушили до постоянного веса, после чего определяли вес полимерной плёнки. Для каждого полимерного покрытия было выполнено шесть последовательных циклов смывания/сушки. Результаты показаны на **рисунке 36** в виде доли полимера, оставшегося на стекле, в зависимости от количества циклов смывания/сушки  $n$ . Долю оставшегося полимерного покрытия определяли по формуле:

$$\omega = W_{\text{см.пл.}} / W_{\text{пл}} * 100\%, \quad (6)$$

где  $W_{\text{см.пл.}}$  – вес плёнки после смывки, г;

$W_{\text{пл}}$  – исходный вес плёнки, г.



**Рисунок 36.** Доля полимерного покрытия ( $\omega$ ), оставшегося на стеклянной подложке, в зависимости от числа циклов промывки/сушки ( $n$ ). ПДАДМАХ (1), НИПЭК  $Z = 0,2$  (2) и НИПЭК  $Z = 0,4$  (3).

Все полимерные покрытия, сформированные из ПДАДМАХ и обоих поликомплексов, смывались со стеклянной поверхности после обработки водой. Потеря текущей массы была немного меньше для поликомплексов, однако после 4 циклов смывания-сушки на подложках оставалось менее 1 вес. % изначально нанесённого полимерного покрытия, ПДАДМАХ и ИПЭК.

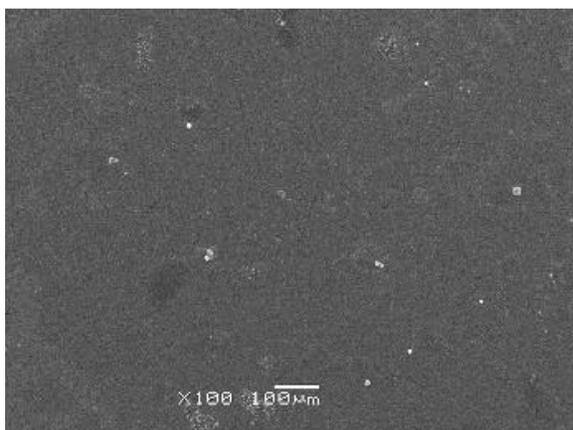
Таким образом, модификация катионного ПДАДМАХ анионным ПАНа не привела к повышению устойчивости покрытия к обработке водой. Покрытие из ПДАДМАХ прогрессивно смывалось со стеклянной пластинки при ее обработке водой. После 4 циклов смывания-сушки на подложке оставалось менее 1 вес. % покрытия. Гидрофобизация ПДАДМАХ путем перевода его в поликомплекс с ПАНа не оказала влияния на стабильность покрытия: четырех циклов смывания-сушки практически полностью удаляли поликомплексное покрытие со стеклянной поверхности. Примечательно, что на стабильность ИПЭК покрытия не повлияло двукратное увеличение длины доли гидрофобного блока. По-видимому,

«рыхлые» гидрофобные блоки, представленные взаимно нейтрализованными последовательностями ПДАДМАХ и ПАНа, не могут обеспечить плотного и прочного контакта частиц ИПЭК в покрытии и, как следствие, не дают ожидаемого повышения стабильности покрытия в водном окружении.

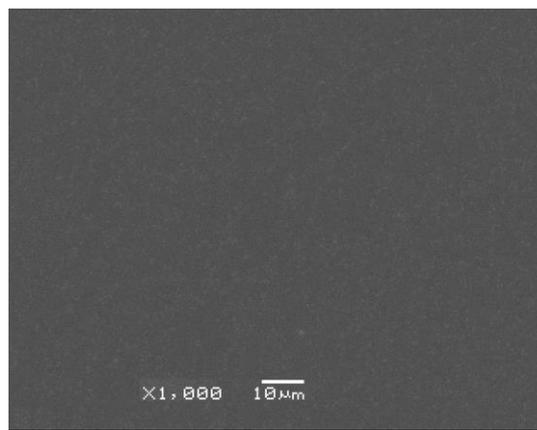
### 3.4.2 Морфология полимерных покрытий до и после обработки водой

Из литературы известно, что электростатическое связывание катионного полимера с анионными полимерными микросферами, биокolloидами, минеральными частицами приводит к образованию на границе раздела полимерных слоёв, которые удерживаются на поверхности в концентрированных солевых растворах [183]. Поэтому логично предположить наличие остаточного полимерного слоя с катионными группами на стеклянной подложке даже после шести циклов смывания-сушки, который будет проявлять антимикробные свойства.

Морфологию полимерного покрытия до и после обработки водой оценивали методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ). На поверхности исходного «толстого» покрытия из ПДАДМАХ, которое не подвергалось обработке водой, можно увидеть кристаллы низкомолекулярных солей, поступивших из буферного раствора (**рис. 37А**). Для покрытия из поликомплекса ПДАДМАХ–ПАНа<sub>2</sub> число кристаллов низкомолекулярных солей выше (**рис. 38А**) в связи с высвобождением малых противоионов, изначально связанных с цепями анионного и катионного полимеров. Двух последовательных циклов смывания-сушки было достаточно для полного удаления кристаллов низкомолекулярных солей с поверхности покрытия (**рис. 37Б и 38Б**). Двукратно обработанное водой полимерное покрытие характеризовалось гладкой поверхностью без микроструктурных дефектов.

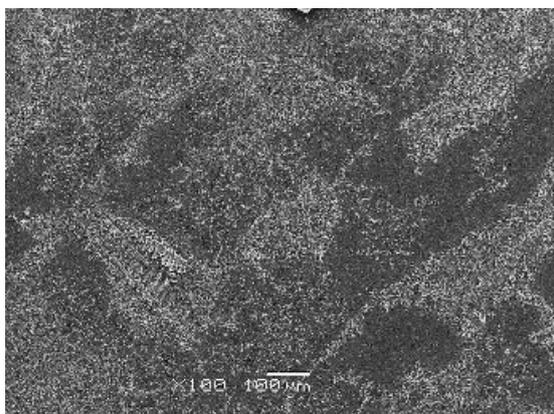


А

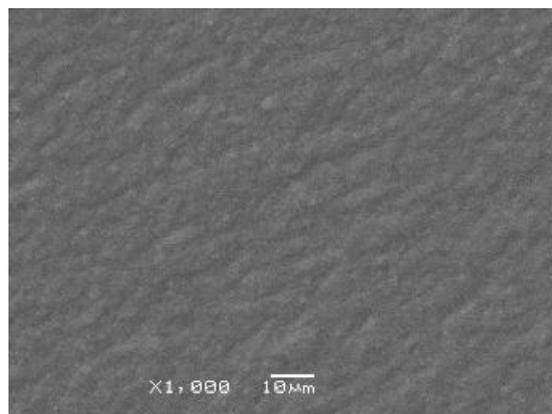


Б

**Рисунок 37.** СЭМ – изображения полимерных покрытий. А – не обработанное водой исходное покрытие из ПДАДМАХ; Б – двукратно обработанное водой покрытие.  $[N^+] = 5 \times 10^{-2} \text{ М}$ ,  $10^{-3} \text{ М}$  ТРИС буферный раствор с рН 7.



А

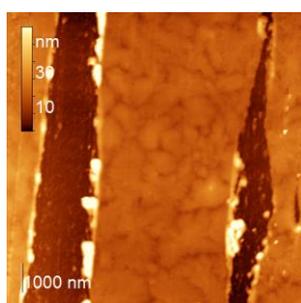


Б

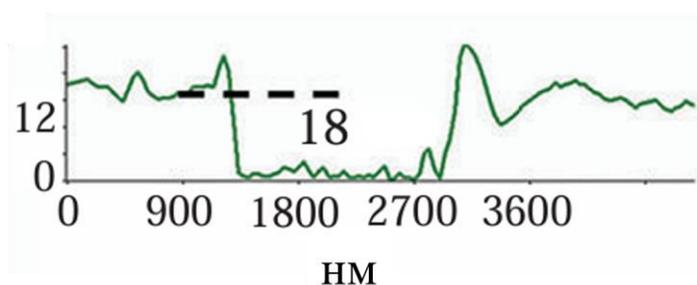
**Рисунок 38.** СЭМ – изображения полимерных покрытий. А – не обработанное водой исходное покрытие из ПДАДМАХ–ПАНа<sub>2</sub>; Б – двукратно обработанное водой покрытие.  $[N^+] = 5 \times 10^{-2} \text{ М}$ ,  $10^{-3} \text{ М}$  ТРИС буферный раствор с рН 7.

Толщину шестикратно отмытого полимерного покрытия определили с помощью метода АСМ, изображения были получены в полуконтактном режиме. Покрытие из ПДАДМАХ было процарапано острой деревянной палочкой (рис.

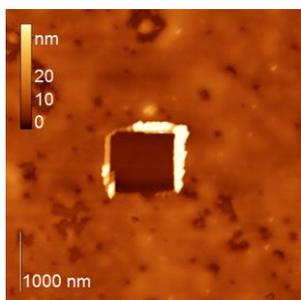
**39А)**, покрытие из поликомплекса ПДАДМАХ–ПАНа<sub>2</sub> с  $Z = 0,4$  кантилевером – микромеханическим зондом, применяемый в методе АСМ (**рис. 39Б**). Толщина покрытия для ПДАДМАХ составила  $18,0 \pm 2,0$  нм (**рис. 39А'**), толщина покрытия поликомплекса  $5,5 \pm 1,5$  нм (**рис. 39Б'**). В обоих случаях толщина шестикратно отмытого покрытия составляла не более 20 нм, что соответствует толщине монослоя или нескольких слоев адсорбированного полимера/поликомплекса [100].



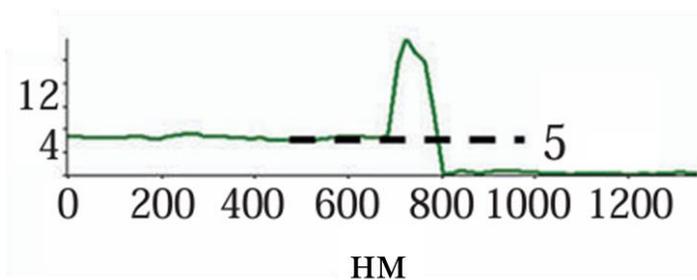
А



А'



Б



Б'

**Рисунок 39.** АСМ – изображения шестикратно отмытых полимерных покрытий на стекле (А и Б) и гистограммы распределения толщины покрытий (А' и Б'). Покрытия сформированы из ПДАДМАХ (А – А') и ПДАДМАХ–ПАНа<sub>2</sub>  $Z = 0,4$  (Б – Б').

Покрытие из поликомплекса имеет в своей структуре поры (**рис. 39Б**), глубина которых совпадает с толщиной покрытия (**рис. 39Б'**). Это означает, что поры пронизывают покрытие на всю его толщину. Логично предположить, что

высушивание раствора НИПЭЖ приводит к появлению низкомолекулярных солей не только на поверхности покрытия, но и внутри его. Вода растворяет соли на поверхности покрытия и вымывает их с бóльшей части полимерного покрытия, что приводит к образованию непрерывных пор (**рис. 39Б**). Покрытие из индивидуального ПДАДМАХ содержит меньшее количество солей, что приводит к формированию меньшего количества пор после обработки покрытия водой.

### 3.4.3 Антимикробная активность полимерных покрытий после их обработки водой

Антимикробная активность шестикратно отмытых полимерных покрытий была протестирована на грамотрицательных бактериях *P. aeruginosa* и грамположительных бактериях *S. aureus*. *P. aeruginosa* – она же синегнойная палочка, вид грамотрицательных аэробных подвижных палочковидных бактерий. Обитает в воде, почве, условно патогенна для человека, возбудитель внутрибольничных инфекций у человека. Лечение затруднительно ввиду высокой устойчивости к антибиотикам [172, 173].

*S. aureus* – золотистый стафилококк. Вид шаровидных грамположительных бактерий из рода стафилококков. Приблизительно 25-40 % населения являются постоянными носителями этой бактерии, которая может сохраняться на кожных покровах и слизистых оболочках верхних дыхательных путей [184]. Золотистый стафилококк может вызывать широкий диапазон заболеваний, начиная с лёгких кожных инфекций и абсцесс — до смертельно опасных заболеваний.

На стеклянную пластинку наносили водную полимерную рецептуру и сушили до постоянного веса. Полученное полимерное покрытие 6 раз промывали водой как описано выше, после чего на оставшийся тонкий слой полимера наносили бактерии в количестве от 200 до 800 клеток. Спустя 15 минут клетки смывали стерильной водой на питательную среду (агаровый субстрат). Через 2 дня проводили подсчёт колониеобразующих единиц (КОЕ), этот показатель

отражает количество жизнеспособными и/или способных к размножению клеток в тестируемом образце. В Таблице 3 показан процент выживших клеток после 15-минутного контакта с отмытыми полимерными покрытиями.

**Таблица 3** – Доля выживших клеток *P. aeruginosa* и *S. aureus* после связывания с полимерным покрытием  $\omega$ , %

Процент выживших клеток						
Полимерная рецептура (покрытие)	Синегнойная палочка			Золотистый стафилококк		
	Число нанесенных клеток, шт.					
	200	600	800	200	600	800
ПДАДМАХ	19,0	34,4	67,1	1,0	4,9	7,4
ПДАДМАХ-ПАНа <sub>2</sub> , $Z = 0,2$	6,2	26,0	46,4	0	1,2	1,6
ПДАДМАХ-ПАНа <sub>2</sub> , $Z = 0,4$	25,9	58,9	75,9	4,4	15,2	20,6

Как следует из данных таблицы, антимикробная активность отмытых полимерных покрытий зависит от количества бактериальных клеток в нанесённой аликвоте ( $\gamma$ ) или, говоря другими словами, от плотности клеток на полимерном покрытии, а также от состава полимерной рецептуры. Для всех протестированных рецептур – ПДАДМАХ и обоих поликомплексов – наблюдалась следующая закономерность: при увеличении параметра  $\gamma$  увеличивалась и доля выживших клеток, т.е. биоцидность покрытия уменьшалась. Покрытие из ПДАДМАХ-ПАНа<sub>2</sub> с  $Z = 0,2$  показало самый высокий биоцидный эффект по отношению к синегнойной палочке: доля выживших клеток составляла 6,2% при  $\gamma = 200$ , 26,0% при  $\gamma = 600$  и 46,4% при  $\gamma = 800$ . На биоцидные свойства покрытий влияет также и вид микроорганизма. Золотистый стафилококк оказался чувствителен ко всем катионным полимерным покрытиям, при  $\gamma = 200$  процент выживших клеток не превышал 5%.

На антибактериальные свойства покрытий влияло и время экспозиции: чем дольше клетки находились в контакте с полимерным покрытием, тем меньше был процент выживших клеток. В таблице 4 показано как падает выживаемость клеток на отмытом катионном покрытии при увеличении времени инкубации с 15 до 30 минут. Для покрытия из ПДАДМАХ она уменьшается с 34,4 до 3,7%, для самого активного ПДАДМАХ–ПАНа<sub>2</sub> с  $Z = 0,2$  покрытия с 26,0 до 3,1%.

**Таблица 4** – Доля выживших клеток *P. aeruginosa* после 15 и 30–минутной инкубации на полимерном покрытии  $\omega$ , % ( $\gamma = 600$  клеток)

Процент выживших клеток		
Полимерная рецептура (покрытие)	Инкубация 15 минут	Инкубация 30 минут
ПДАДМАХ	34,4	3,7
ПДАДМАХ–ПАНа <sub>2</sub> , $Z=0,2$	26,0	3,1
ПДАДМАХ–ПАНа <sub>2</sub> , $Z=0,4$	58,9	40,2

Биоцидные свойства НИПЭК обеспечиваются их катионными группами и взаимно нейтрализованными гидрофобными блоками. Оба фактора обеспечивают связывание бактерий с покрытиями из НИПЭК, что вызывает перестройку в структуре бактериальной стенки и цитоплазматической мембраны и последующее разрушение и гибель клетки [54]. НИПЭК ПДАДМАХ-ПАНа<sub>2</sub> с  $Z = 0,2$  показал самую высокую антимицробную активность при экспозиции в 15 и 30 минут. Этот результат может указывать на то, что в структуре НИПЭК ПДАДМАХ-ПАНа<sub>2</sub> с  $Z = 0,2$  содержится оптимальное соотношение катионных и гидрофобных фрагментов. Это предположение, основанный на ограниченных экспериментальных данных, требует дальнейшего подтверждения.

Таким образом, подводя итоги данного раздела, можно сделать следующие выводы. Полимерные покрытия, полученные нанесением и последующим высушиванием водных растворов поликатиона/НИПЭК, могут быть удалены с

поверхности при обработке водой. Четырёх циклов смывания/сушки достаточно, чтобы удалить большую часть полимерной композиции со стеклянной подложки. Связывание поликатиона с полианионом и формирование гидрофобных блоков в НИПЭК не повлияло на устойчивость такого покрытия к смыванию. Остающиеся на поверхности стеклянной подложки тонкие полимерные слои демонстрируют высокую антимикробную активность; эти слои при 30-минутной экспозиции дезактивируют более 95% нанесенных клеток.

### 3.5 Замечания по поводу механизма антимикробного действия поликатионных покрытий<sup>8</sup>

Для более детального представления о механизме воздействия биоцидных катионных покрытий на бактериальную клетку были проведены дополнительные исследования. Напомним стандартную процедуру оценки антимикробного действия полимерного покрытия. Водную рецептуру с катионным полимером или катионным поликомплексом наносят на модифицируемую поверхность (в нашем случае поверхность стекла) и высушивают до постоянного веса. Поверх высушенного покрытия наносят бактериальную культуру и выдерживают (инкубируют) в течение заданного времени. Выше были описаны эксперименты с 15- и 30-минутной инкубацией клеток. В дополнительных экспериментах были использованы помимо уже упоминавшихся *P. aeruginosa*, грамположительные бактерии *S. aureus* и дрожжевые грибы *Y. lipolytica* [185]; время инкубации клеток составило 1 час.

После инкубации бактериальные и дрожжевые клетки смывались с поверхности в ходе 2-3-минутной обработки стерильной водой. Таким образом удавалось смыть от 30 до 80% клеток [185]. Этот факт вызывает удивление. Дело

---

<sup>8</sup> При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

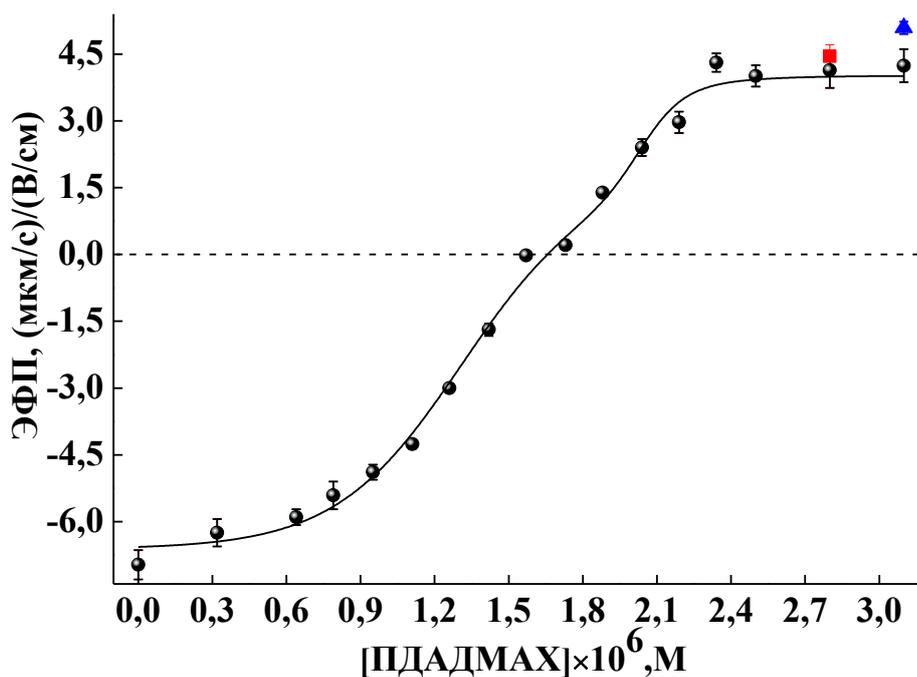
[185] Panova I.G., Lokova A.Yu., Pankratov T.A., Nikolaev Yu.A., Yaroslavov A.A. / On the quantification of biocidal activity of protective coatings // Mendeleev Communication. – 2024. – V. 34, № 2. – P. 185-187.

в том, что поверхность клеток несет суммарный отрицательный заряд, который должен обеспечивать их прочное связывание с положительной заряженной поверхностью катионного полимерного покрытия. Ранее было показано, что анионные коллоиды – полимерные и стеклянные микросферы, липидные везикулы и проч. – демонстрируют чрезвычайно высокое сродство к катионным полимерам [183]. В результате полимер-коллоидные комплексы сохраняют свою целостность (не диссоциируют на исходные компоненты) даже в концентрированных солевых растворах [183, 186]. Это связано с кооперативным характером взаимодействиями между противоположно заряженными звеньями (группами) обоих компонентов. По аналогии с этим можно было ожидать и высокой стабильности электростатических комплексов между клетками и катионным покрытием; однако эксперимент показывает обратное.

Причина этого противоречия может быть в следующем. Выше мы показали, что катионные полимерные покрытия почти количественно удаляются со стеклянной поверхности в ходе нескольких двухминутных циклов обработки водой. В ходе смывания клеток с поверхности покрытия (одна из стадий стандартной процедуры оценки его антимикробного действия) вместе с уходящим полимером в раствор могут переходить и адсорбированные на покрытии клетки. Логично полагать, что уходящие клетки будут связаны в комплекс с поликатионом, и их поверхностный заряд будет отличаться от заряда клеток, изначально адсорбированных на полимерном покрытии. Такой механизм объясняет быструю десорбцию всех типов клеток с катионной поверхности.

Для проверки такой интерпретации антимикробного действия полимерных покрытий был проведён дополнительный эксперимент. На исходное (неотмытое) покрытие из ПДАДМАХ на стеклянной подложке были адсорбированы полимерные микросферы из сополимера бутадиена и метилстирола (7/3) с карбоксильными группами на поверхности. Гидродинамический диаметр микросфер, определенный методом динамического светорассеяния, составлял 400 нм. Карбоксильные группы придавали частицам отрицательный заряд, что

позволяло рассматривать их как грубую модель клетки (клеточной поверхности). Спустя 10 минут микросферы удаляли с поверхности дистиллированной водой и измеряли их ЭФП – параметр, напрямую связанный с поверхностным зарядом частиц. Результат сравнивали с зависимостью ЭФП от концентрации ПДАДМАХ, которую получали в отдельном эксперименте (рис. 40).



**Рисунок 40.** Зависимость ЭФП полимерных микросфер от концентрации ПДАДМАХ. Концентрация микросфер  $1,42 \times 10^{12}$  л<sup>-1</sup>;  $10^{-3}$  М ТРИС буферный раствор,  $5 \times 10^{-3}$  М NaCl с рН 7,  $T = 25$  °С. Красная точка – для случая не обработанного водой полимерного покрытия. Синяя точка – обработанное водой полимерное покрытие.

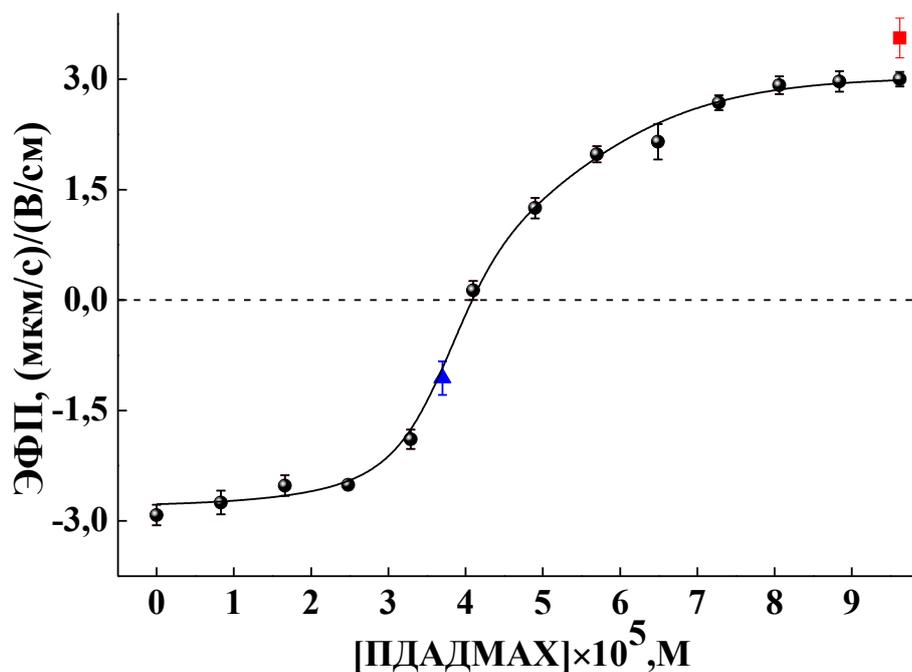
Из данных рисунка 40 следует, что ЭФП исходных микросфер (в отсутствие поликатиона) была равна  $-6,97 \pm 0,33$  (мкм/с)/(В/см). Связывание ПДАДМАХ привело к нейтрализации заряда микросфер и смене знака заряда на положительный в избытке поликатиона. Красная точка на графике соответствует ЭФП частиц, которые были смыты с покрытия из ПДАДМАХ в ходе

антимикробного эксперимента. Положительное значение ЭФП смывых частиц ( $+4,45 \pm 0.26$  (мкм/с)/(В/см) ) однозначно указывает на то, что смывые частицы были покрыты катионным полимером, который поступил в раствор при растворении покрытия.

Аналогичный эксперимент был проведен с «модельными» клетками, которые были получены обработкой нативных клеток K562 фиксирующими растворами.<sup>9</sup> В ходе такой обработки в клеточной мембране образовывались поры, через которые содержимое клетки вытекало наружу, во внешний раствор. Фиксированные клетки сохраняли форму и большую часть внешнего белково-липидного бислоя, который сохранял отрицательный заряд, как и у цитоплазматической мембраны нативных клеток. Благодаря этому фиксированные клетки эффективно адсорбировали катионный полимер. Связывание ПДАДМАХ с клетками в водном растворе протекало по вышеописанной схеме: на первом этапе поликатион нейтрализовал заряд клеточной поверхности, а на втором, в избытке поликатиона, поверхность приобретала положительный заряд (**рис. 41**).

---

<sup>9</sup> Автор выражает благодарность за обработку клеток фиксирующими растворами с.н.с., к.б.н. Марковой А.А. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.



**Рисунок 41.** Зависимость ЭФП модельных клеток от концентрации ПДАДМАХ. Концентрация клеток  $7,2 \times 10^8 \text{ л}^{-1}$ ;  $10^{-3} \text{ М}$  ТРИС буферный раствор +  $5 \times 10^{-3} \text{ М}$  NaCl с pH 7,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Красная точка – для случая не обработанного водой полимерного покрытия. Синяя точка – обработанное водой полимерное покрытие.

Затем фиксированные клетки наносили на полимерное покрытие, сформированное из ПДАДМАХ на стеклянной подложке. Через 10 минут клетки удаляли с поверхности покрытия дистиллированной водой и измеряли их ЭФП. На рисунке 40 красная точка соответствует ЭФП смытых клеток  $3,56 \pm 0,24$  (мкм/с)/(В/см). Сравнение полученного значения ЭФП с ЭФП фиксированных клеток  $-2,92 \pm 0,14$  (мкм/с)/(В/см) говорило о том, что на поверхности смытых клеток был адсорбирован ПДАДМАХ.

После этого полимерные покрытия были получены заново и отмыты с использованием шести последовательных циклов смывания/сушки. В результате на поверхности стекла оставался «монослой» полимера толщиной не более 20 нм (см. выше). Этот слой удерживался на поверхности стекла за счет формирования

множественных ионных контактов положительных зарядов ПДАДМАХ и отрицательных зарядов на поверхности стекла. Далее на полимерные «монослои» адсорбировали микросферы и фиксированные клетки, которые спустя 10 минут удаляли с поверхности дистиллированной водой. ЭФП смытых микросфер и клеток представлены синими точками на рисунке 40 и рисунке 41, соответственно. ЭФП смытых микросфер была равна  $+5,09 \pm 0,14$  (мкм/с)/(В/см), а смытых клеток ЭФП =  $-1,06 \pm 0,23$  (мкм/с)/(В/см). Полученные значения ЭФП заметно отличались от ЭФП исходных микросфер и клеток, что говорило о переходе ПДАДМАХ как на микросферы, так и на клетки при их связывании с шестикратно отмытыми покрытиями. Количество перешедшего поликатиона было больше для микросфер, чем для клеток.

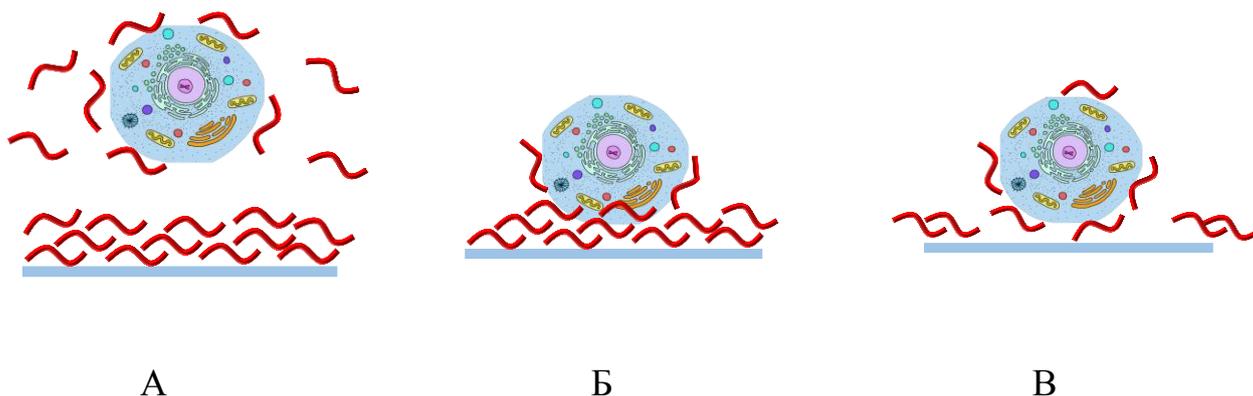
Описанные выше результаты экспериментов с нативными и модельными клетками и полимерными микросферами подтверждают справедливость предложенной интерпретации антимикробного действия многослойных полимерных покрытий, которые формируются в ходе стандартной процедуры нанесения и последующего высушивания водного раствора катионного полимера.

Смытые с покрытия клетки переходят в раствор в виде комплекса с катионным полимером. В таком виде их переносят на агар и выращивают для подсчета КОЕ. Таким образом, в бактериологических тестах ведётся наблюдение за развитием не нативных клеток, а клеток, модифицированных полимером. Судя по данным рисунка 40, количество связанного с клетками полимера может быть значительным, что может сказаться на жизнеспособности клеток и должно быть принято во внимание при постановке антимикробных экспериментов и интерпретации полученных результатов.

Катионное покрытие сохраняет свои биоцидные свойства даже после того, как поверхность была многократно промыта водой и на поверхности остался только «монослой» катионного полимера (Таблица 3). Этот монослой способен связывать клетки из внешнего раствора, что приводит к эффективной дезактивации клеток. Проведенный нами эксперимент показал, что клетки,

адсорбированные на катионный монослой, также смываются с него в виде комплекса с катионным полимером. В этом случае мы видим пример конкурентной реакции с участием адсорбированного поликатиона, когда он перераспределяется между поверхностью стеклянной пластинки и поверхностью клетки.

Таким образом, в системе «клетка + поликатионное покрытие» развивается несколько процессов (**рис. 42**): растворение поликатиона и его связывание с клетками (А), адсорбция комплекса поликатион-клетка на покрытие (Б), и миграция поликатиона с подложки (в нашем случае стеклянной) на поверхность клетки (В). Вместе эти процессы обеспечивают высокую эффективность биоцидного действия покрытий с участием катионного полимера.



**Рисунок 42.** Взаимодействие клетки с полимерным покрытием (схематическое представление).

## 4 Заключение

### 4.1 Итоги выполненного исследования

В рамках настоящей работы исследован процесс взаимодействия анионных липосом с катионными интерполиэлектролитными комплексами на основе катионного полимера полидиаллилдиметиламмоний хлорида с фиксированной степенью полимеризации и анионного полимера полиакрилата натрия с варьируемой степенью полимеризации. Установлено влияние молекулярной массы полианиона в составе катионного интерполиэлектролитного комплекса на процесс взаимодействия такого комплекса с анионными липосомами. Добавление поликомплекса, в состав которого входит полианион с молекулярной массой меньше молекулярной массы поликатиона, инициирует конкурентную реакцию, в ходе которой поликатион количественно переходит из поликомплекса на липосомальную мембрану и ПАНа высвобождается в раствор; поликомплекс с ПАНа с молекулярной массой, сопоставимой с молекулярной массой поликатиона при связывании с анионными липосомами на исходные составляющие не диссоциирует. Также исследовано взаимодействие катионного полилизина с липосомами, в мембрану которых встроен липид-переключатель. Показано, что добавление полилизина ускоряет высвобождение водорастворимой соли из липосом, что приводит к большему максимальному количеству перешедшего во внешний раствор раствора соли из липосом. Из полученных катионных интерполиэлектролитных комплексов сформированы полимерные покрытия на поверхности стекла и установлено, что после многократной обработки водой таких покрытий на поверхности стекла остаётся полимерный «монослой» толщиной от 5 до 18 нм, и такой «монослой» обладает высокой антимикробной активностью (за 30 минут дезактивируется до 95% бактериальных клеток, нанесённых на полимерное покрытие). Предложен механизм антимикробного действия полимерного покрытия, состоящий из нескольких взаимосвязанных процессов – первый, частичное растворение поликатиона из сформированного

покрытия и его связывание на поверхности адсорбирующихся клеток; второй - связывание клеток с полимерным покрытием и третий, более характерный для полимерного «монослоя», миграция поликатиона со стеклянной поверхности на поверхность клетки.

#### 4.2 Выводы

На основании проведенного исследования можно сформулировать следующие основные выводы:

1. Впервые установлено влияние молекулярной массы полианиона в составе НИПЭК на характер его взаимодействия с анионными липосомами в растворе. Добавление НИПЭК с участием «короткого» ПАНа (СП = 85) инициирует конкурентную реакцию, в ходе которой ПДАДМАХ количественно переходит из НИПЭК на липосомальную мембрану, а ПАНа высвобождается в раствор. НИПЭК с участием «длинного» ПАНа (СП = 2660) при связывании с липосомами не диссоциирует на исходные составляющие.
2. Сформированы полимерные покрытия на поверхности стекла путем нанесения водных растворов ПДАДМАХ и НИПЭК и последующего их высушивания. Установлено, что после обработки исходных покрытий водой на стеклянной поверхности остается полимерный «монослой» толщиной от 5 до 18 нм. Впервые показано, что остающиеся на поверхности после обработки водой полимерные «монослои» демонстрируют высокую антимикробную активность, которая позволяет им за 30 минут дезактивировать более 95% клеток, нанесенных на полимерное покрытие.
3. Предложен механизм антимикробного действия полимерного покрытия с участием катионного полимера, который включает несколько одновременно развивающихся процессов. Первый – частичное растворение поликатиона из исходно сформированного покрытия и его связывание на поверхности адсорбирующихся клеток, второй – связывание клеток с поверхностью полимерного покрытия и третий, который характерен для предельно отмытого полимерного «монослоя», – миграция поликатиона со стеклянной подложки на

поверхность клетки. Вместе эти процессы обеспечивают высокую эффективность биоцидного действия покрытий с участием катионного полимера.

4. Показано, что связывание катионного полилизина с анионными липосомами, в мембрану которых встроен липид-переключатель, ускоряет высвобождение водорастворимой соли из внутреннего объема липосом в окружающий раствор при понижении внешнего pH. Это приводит к большему предельному количеству перешедшего во внешний раствор содержимого липосом, а именно 50% против 30% для свободных (не связанных с полилизином) липосом. Этот результат моделирует дезактивацию адсорбированным поликатионом функционального элемента биологической мембраны.

### **4.3 Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы**

Как уже упоминалось ранее, окружающие нас предметы населяют различные микроорганизмы, часть из которых являются патогенными. Такие микроорганизмы могут приводить к заражению человека и животных различными тяжёлыми болезнями, трудно поддающихся лечению. Поэтому патогенные микроорганизмы подлежат уничтожению. Для борьбы с ними часто применяются низкомолекулярные биоцидные средства. Они широко распространены и достаточно эффективны, но всё же имеют ряд различных недостатков: обладают краткосрочным действием, вызывают развитие резистентности у патогенных микроорганизмов, имеют слабую адгезию к обрабатываемым поверхностям, формируют хрупкие покрытия, демонстрируют высокую токсичность по отношению к животным и человеку. Поэтому необходимо обратиться к поиску биоцидов, лишённых указанных недостатков. Решение этой задачи позволит расширить спектр биоцидных рецептур, способных уничтожать патогенные микроорганизмы в водном растворе и на поверхности.

Одним из часто обсуждаемых подходов к созданию эффективных антимикробных препаратов заключается в использовании биологически инертных

полимеров, которые могут выступать в роли матрицы для иммобилизации низкомолекулярных биоцидных соединений, или полимеров, обладающих собственной биоцидной активностью. К последним относятся полимеры линейного строения с катионными группами. Также катионные полимеры способны связываться с противоположно заряженными линейными полимерами (полианионами) с формированием интерполиэлектролитных комплексов (ИПЭК), стабилизированных множественными солевыми связями между ионными группами обоих полимеров. Нестехиометричные ИПЭК (НИПЭК) с избытком катионного полимера («катионные НИПЭК») представляют собой сополимеры с гидрофобными блоками, сформированными из взаимно нейтрализованных участков поликатиона и полианиона, и гидрофильными блоками, представленными последовательностями свободных, не связанных в НИПЭК, катионных групп. Катионные НИПЭК сохраняют биоцидные свойства, присущие исходным поликатионам. При этом гидрофобные блоки повышают эффективность связывания НИПЭК с поверхностью клеток, выполняя роль «якоря», проникающего вглубь цитоплазматической мембраны, и могут быть использованы для иммобилизации гидрофобных биологически активных веществ.

Таким образом, изменяя состав НИПЭК (соотношение катионного и анионного компонентов), можно в широких пределах изменять гидрофильно-гидрофобный баланс поликомплексных частиц, их размер, растворимость в воде и ряд других параметров, которые определяют их биоцидное действие. Подобрать необходимое соотношение катионного и анионного компонентов в системе, можно добиться сочетания высокой биоцидной активности и улучшенной адгезии полимерного покрытия к обрабатываемой поверхности.

### Список используемых сокращений

- АСМ - атомно-силовая микроскопия
- БПЭ - блокирующий полиэлектролит
- ГПЭ- «гость»-полиэлектролит
- ДАДМАХ - диаллилдиметиламмоний хлорид
- ДОФХ - диолеилфосфатидилхолин
- ДОФЭ\* - 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиссамин родамин В-сульфонил) (аммонийная соль)
- ДЦГ - транс-4,5-дидодецилаксикарбонил-2-морфолино-циклогексанол
- ИПЭК - интерполиэлектролитный комплекс
- КОЕ - количество колониеобразующих единиц
- НИПЭК - катионные нестехиометричные инетрполиэлектролитные комплексы
- ЛП - липид-переключатель
- ЛПЭ - лиофилизирующий полиэлектролит
- МИК - минимальная ингибирующая концентрация
- НМБ - низкомолекулярный биоцид
- НИПЭК - нестехиометричный интерполиэлектролитный комплекс
- НМБ - низкомолекулярный биоцид
- ПАВ - поверхностно-активное вещество
- ПАК - полиакриловая кислота
- ПАНа - полиакрилат натрия
- ПГМГ - катионный полигексаметиленбигуанид
- ПДАДМАХ - полидиаллилдиметиламмоний хлорид
- ПКК - полиэлектролит-коллоидный комплекс
- ПЛ - полилизина гидробромид
- ПОФС<sup>1-</sup> - пальмитоилолеилфосфатидилсерин
- СП - степень полимеризации
- СЭМ - сканирующая электронная микроскопия
- ТРИС - трис(гидроксиметил)аминометан

ХПЭ - «хозяин»-полиэлектролит

ЭФП - электрофоретическая подвижность

### Список литературы

1. Высокомолекулярные соединения: учебник и практикум для академического бакалавриата / под ред. А.Б. Зезина. – М.: Издательство Юрайт, 2016. – 340 с. – Серия: Бакалавр. Академический курс.
2. Кабанов, В.А. Физико-химические основы и перспективы применения растворимых интерполиэлектrolитных комплексов (обзор) / А.В. Кабанов // Высокомолекулярные соединения, Серия А. – 1994. – Т. 36, № 2. – С. 183-197.
3. Hadjichristidis, N. Synthesis of Block Copolymers / N. Hadjichristidis, M. Pitsikalis, H. Iatrou // *Advances in Polymer Science*. – 2005. – P. 1-124.
4. Аскадский, А.А. Градиентные полимерные материалы / А.А. Аскадский, Л.М. Голенева, К.А. Бычко, В.В. Казанцева, К.В. Константинов, Е.С. Алмаева, А.Ф. Клиньских, О.В. Коврига // *Российский химический журнал*. – 2001. – Т. XLV, №3. – С. 123-128.
5. Черникова, Е.В. Радикальная сополимеризация с обратимой деактивацией цепи: синтез сополимеров с контролируемой последовательностью звеньев / Е.В. Черникова, К.О. Минеева // *Высокомолекулярные соединения, серия С*. – 2022. – Т. 64, №1. – С. 3-29.
6. Блохин, А.Н. Ионная полимеризация с раскрытием цикла в синтезе звездообразных полимеров / А.Н. Блохин, М.М. Дудкина, А.В. Теньковцев // *Высокомолекулярные соединения, серия С*. – 2022. – Т. 64, №2. – С. 176-191.
7. Бирштейн, Т.М. Полимерные щётки / Т.М. Бирштейн, В.М. Амосков // *Высокомолекулярные соединения, серия С*. – 2000. – Т. 42, №12. – С. 2286-2327.
8. Лысенко, Е.А. Поликомплексы с участием мицелл ионогенных блок сополимеров : специальность 02.00.06 «Высокомолекулярные соединения, химические науки» : диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук / Е.А. Лысенко ; Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. – Москва, 2017. – 390 с.

9. Кабанов, В.А. Полиэлектrolитные комплексы в растворе и в конденсированной фазе / В.А. Кабанов // Russian chemical reviews. – 2005. – V. 74, № 1. – P. 3-20.
10. Tsuchida, E. Interactions between macromolecules in solution and intermacromolecular complexes : part of the book series: advances in polymer Science / E. Tsuchida, K. Abe. – Berlin : Springer Berlin, Heidelberg, 1982. – 119 p. – (Advances in Polymer Science, V. 45).
11. Fu, J. Driving forces for oppositely charged polyion association in aqueous solutions: enthalpic, entropic, but not electrostatic / J. Fu, J.B. Schlenoff // Journal of the American Chemical Society. – 2016. – V. 138, № 3. – P. 980-990.
12. Изумрудов, В.А. Равновесие интерполиэлектrolитных реакций и явление молекулярного «узнавания» в растворах интерполиэлектrolитных комплексов / В.А. Изумрудов, А.В. Зезин, В.А. Кабанов // Успехи химии. – 1991. – Т. 60, №7. – С. 1570-1595.
13. Изумрудов, В.А. Реакции замещения в трехкомпонентных макромолекулярных системах / В.А. Изумрудов, Т.К. Бронич, М.Б. Новикова, А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // Высокомолекулярные соединения, Серия А. – 1982. – Т. 24, № 2. – С. 339-348.
14. Изумрудов, В.А. Влияние длины N-алкильного заместителя в поли-4-винилпиридиний катионе на устойчивость полиэлектrolитных комплексов / В.А. Изумрудов, Т.К. Бронич, А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // Высокомолекулярные соединения, Серия Б. – 1989. – Т. 31, № 5. – С. 326-327.
15. Зезин, А.Б. Новый класс комплексных водорастворимых полиэлектrolитов / А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // Успехи химии. – 1982. – Т. 51, № 9. – С. 1447-1478.
16. Харенко, О.А. Строение нестехиометричных водорастворимых полиэлектrolитных комплексов / О.А. Харенко, А.В. Харенко, В.А. Касаикин, А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // Высокомолекулярные соединения, Серия А. – 1979. – Т. 21, № 12. – С. 2726-2733.

17. Изумрудов, В.А. Явления самосборки и молекулярного «узнавания» в растворах (био)полиэлектролитных комплексов / В.А. Изумрудов // Успехи химии. – 2008. – Т. 77, № 4. – С. 401-415.
18. Изумрудов, В.А. Исследование водорастворимых интерполиэлектролитных комплексов неэквивимольного состава / В.А. Изумрудов, В.А. Касаикин, Л.Н. Ермакова, А.Б. Зезин // Высокомолекулярные соединения, Серия А. – 1978. – Т. 20, № 2. – С. 400-406.
19. Изумрудов, В.А. Макромолекулярный обмен в растворах комплексов глобулярных белков с неприродными полиэлектролитами / В.А. Изумрудов, А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // Доклад АН СССР. – 1984. – Т. 275, № 5. – С. 1120-1123.
20. Изумрудов, В.А. Особенности реакции интерполиэлектролитного замещения / В.А. Изумрудов, Т.К. Бронич, А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // Высокомолекулярные соединения, серия А. – 1987. – Т. 29, № 6. – С. 1224-1230.
21. Izumrudov, V.A. A fluorescence quenching study of interpolyelectrolyte reactions / V.A. Izumrudov, A.P. Savitski, K.N. Bakeev, A.B. Zezin, V.A. Kabanov // Macromolecular Rapid Communications. – 1984. – V. 5, №11. – P. 709-714.
22. Харенко, О.А. Нестехиометричные полиэлектролитные комплексы – новые водорастворимые макромолекулярные соединения / О.А. Харенко, А.В., Харенко, Р.И. Калюжная, В.А. Изумрудов, В.А. Касаикин, А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // Высокомолекулярные соединения, Серия А. – 1979. – Т. 21, № 12. – С. 2719-2725.
23. Харенко, О.А. Процессы ассоциации-диссоциации в растворах нестехиометричных полиэлектролитных комплексов / О.А. Харенко, В. А. Изумрудов, А.В. Харенко, В.А. Касаикин, А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // Высокомолекулярные соединения, Серия А. – 1980. – Т. 22, № 1. – С. 218-224.
24. Изумрудов, В.А. Поведение нестехиометричных полиэлектролитных комплексов в водных растворах солей / В.А. Изумрудов, О.А. Харенко, А.В.

- Харенко, Ж.Г. Гуляева, В.А. Касаикин, А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // *Высокомолекулярные соединения, Серия А.* – 1979. – Т. 22, № 3. – С. 692-699.
25. Изумрудов, В.А. Свойства нестехиометричных полиэлектролитных комплексов, содержащих ферменты / В.А. Изумрудов, А.Л. Марголин, С.Ф. Шерстюк и др. // *Доклады АН СССР.* – 1983. – Т. 269, № 3. – С. 631-634.
26. Miyake, M. Recent progress of the characterization of oppositely charged polymer/surfactant complex in dilution deposition system / M. Miyake // *Advances in Colloid and Interface Science.* – 2017. – V. 239. – P. 146-157.
27. Messina, R. Polyelectrolyte adsorption and multilayering on charged colloidal particles / R. Messina, C. Holm, K. Kremer // *Journal of Polymer Science, part B Polymer Physics.* – 2017. – V. 42, № 19. – P. 3557-3570.
28. Sukhishvili, S.A. Adsorption of poly-N-ethyl-4-vinylpyridinium bromide on the surface of carboxylated latex particles: composition and structure of interfacial complex / S.A. Sukhishvili, O.S. Chechik, A.A. Yaroslavov // *Journal of Colloid and Interface Science.* – 1996. – V. 178, № 1. – P. 42-46.
29. Сухишвили, А.С. Об обратимости адсорбции поликатионов на противоположно заряженных латексных частицах / С.А. Сухишвили, А.С. Полинский, А.А. Ярославов, О.С. Чечик, В.А. Кабанов // *Доклады АН СССР.* – 1988. – Т. 302, № 2. – С. 381-384.
30. Sadeghpour, A. Influence of the degree of ionization and molecular mass of weak polyelectrolytes on charging and stability behavior of oppositely charged colloidal particles / A. Sadeghpour, E. Seyrek, I. Szilágyi, J. Hierrezuelo, M. Borkovec // *Langmuir.* – 2011. – V. 27, № 15. – P. 9270-9276.
31. Bolto, B. Organic polyelectrolytes in water treatment / B. Bolto, J. Gregory // *Water Research.* – 2007. – V. 41, № 11. – P. 2301-2324.
32. Ярославов, А.А. Адсорбция поликатиона на поверхности отрицательно заряженных липосом. Влияние фазового состояния липидного бислоя на строение комплекса поликатион-липосома / А.А. Ярославов, А.А.

Ефимова, В.Е. Кульков, В.А. Кабанов // Высокомолекулярные соединения, Серия А. – 1994 – Т. 36, № 2. – Р. 264-270.

33. Пергушов, Д.В. Влияние низкомолекулярных солей на поведение водорастворимых нестехиометричных полиэлектролитных комплексов / Д.В. Пергушев, В.А. Изумрудов, А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // Высокомолекулярные соединения, Серия А. – 1993. – Т. 35, № 7. – С. 844-849.

34. Пергушов, Д.В. Влияние степени полимеризации полиионов на устойчивость интерполиэлектролитных комплексов в водно-солевых растворах / Д.В. Пергушев, В.А. Изумрудов, А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // Высокомолекулярные соединения, Серия А. – 1995. – Т. 37, № 10. – С. 1739-1746.

35. Szilagyı I. Polyelectrolyte adsorption, interparticle forces, and colloidal aggregation / I. Szilagyı, G. Trefalt, A. Tiraferri, P. Maronia, M. Borkovec // *Soft Matter*. – 2014. – V. 10, № 15. – P. 2479-2502.

36. Johal, M.S, Polymer–surfactant complexation in polyelectrolyte multilayer assemblies / M.S. Johal, P.A. Chiarelli // *Soft Matter*. – 2006. – V. 3, № 1. – P. 34-46.

37. Зильберглейт, М.А. Антимикробные свойства катионных полиэлектролитов / М.А. Зильберглейт, М.О. Шевчук, С.В. Нестерова, С.Ф. Якубовский // *Вестник Полоцкого государственного университета, Серия В. Промышленность. Прикладные науки*. – 2019. – № 3, С. 118-124.

38. Мисин, В.М. Биоцидные полимерные рецептуры и покрытия / В.М. Мисин, А.А. Зезин, Д.И. Климов, А.В. Сыбачин, А.А. Ярославов // *Высокомолекулярные соединения, Серия Б*. – 2021. – Т. 63, № 5. – С. 295-306.

39. Farah, S. Quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles for treating bacterial contaminated water / S. Farah, O. Aviv, N. Laout, S. Ratner, A.J. Domb // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2015. – V. 128, P. 614-619.

40. Ульрих, Е.В. Использование флокулянтов для очистки сточных вод / Е.В. Ульрих, А.С. Баркова // Трансформация экосистем. – 2022. – Т. 6, № 3. – С. 168-187.
41. Скуредина, А.А. Структурно-функциональные аспекты взаимодействия полимеров медицинского назначения с липосомами и бактериальными клетками / А.А. Скуредина, Л.Р. Якупова, И.М. Ле-Дейген, Е.В. Кудряшова // Вестник Московского университета, Серия 2. – 2023. – Т. 64, № 5. – С. 441-459.
42. Avery, C.W. Investigations of the interactions between synthetic antimicrobial polymers and substrate-supported lipid bilayers using sum frequency generation vibrational spectroscopy / C.W. Avery, E.F. Palermo, A. McLaughlin, K. Kuroda, Z. Chen // Analytical Chemistry. – 2011. – V. 83, № 4. – P. 1342-1349.
43. Avery, C.W. Dependence of antimicrobial selectivity and potency on oligomer structure investigated using substrate supported lipid bilayers and sum frequency generation vibrational spectroscopy / C.W. Avery, A. Som, Y. Xu, G.N. Tew, Z. Chen // Analytical Chemistry. – 2009. – V. 81, № 20. – P. 8365-8372.
44. Jain, A. Antimicrobial polymers / A. Jain, L.S. Duvvuri, S. Farah, N. Beyth, A.J Domb, W. Khan // Advanced Healthcare Materials. – 2014. – V. 3, № 12. – P. 1969-1985.
45. Qiu, H. The mechanisms and the applications of antibacterial polymers in surface modification on medical devices / H. Qiu, Z. Si, Y. Luo, P. Feng, X. Wu, W. Hou, Y. Zhu, M.B. Chan-Park, L. Xu, D. Huang // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – V. 8. – P. 1-16.
46. Timofeeva, L. Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications / L. Timofeeva, N. Kleshcheva // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2010. – V. 89, № 3. – P. 475-492.
47. Santos, M.R.E. Recent developments in antimicrobial polymers: a review / M.R.E. Santos, A.C. Fonseca, P.V. Mendonça, R. Branco, A.C. Serra, P.V. Morais, J.F.J. Coelho // Materials. – 2016. – V. 9, № 7. – P. 1-33.

48. Valdez-Lara, A.G. Disruption of biological membranes by hydrophobic molecules: a way to inhibit bacterial growth / A.G. Valdez-Lara, Á.M. Jaramillo-Granada, D. Ortega-Zambrano, E. García-Marquez, J.A. García-Fajardo, H. Mercado-Urbe, J.C. Ruiz-Suárez // *Frontiers in Microbiology*. – 2024. – V. 15.– 13 p.
49. Ухарцева, И.Ю. Методы изготовления полимерной упаковки для пищевых продуктов (обзор) / И.Ю. Ухарцева, Е.А. Цветкова, В.А. Гольдаде // *Пластические массы*. – 2020. – № 7-8. – С. 40-48.
50. Бовин Н.В. Модификация поверхности пластиков / А.Ю. Нокель, Н.В. Бовин, Н.В. Шилова // *Российские нанотехнологии* – 2022. Т. 17, № 1. – С. 14-28.
51. Lee, H. Adsorption of ordered zirconium phosphonate multilayer films on silicon and gold / H. Lee, L.J. Kepley, H.-Gi. Hong, S. Akhter, T.E. Mallouk // *Journal of Physical Chemistry*. – 1988. – V. 92, № 9.– P. 2597-2601.
52. Lvov, Y. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine) / Y. Lvov, G. Decher, H. Möhwald. // *Langmuir*. – 1993. – V. 9. – № 2.– P. 481-486.
53. Букреева, Т.В. Полиэлектролитные микрокапсулы: о формировании и возможностях регулировки многослойных структур / Т.В. Букреева, Т.Н. Бородина, Д.Б. Трушина // *Коллоидный журнал*. – 2022. – Т. 84, № 5. – С. 642-656.
54. Тарасевич, В.А. Полимерные биоциды / В.А. Тарасевич, В.А. Добыш, Е.В. Карпинчик, В.Е. Агабеков // *Наука и инновации*. – 2019. – Т. 11, № 201.– P. 23-26.
55. Cárdenas, G. Chitosan composite films. Biomedical applications / G. Cárdenas, P. Anaya, C. von Plessing, C. Rojas, J. Sepúlveda. // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2008. – V. 19, № 6. – P. 2397-2405.

56. Hu, F.X. Antibacterial and antifungal efficacy of surface functionalized polymeric beads in repeated applications / F.X. Hu, K.G. Neoh, L. Cen, E.T. Kang // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2005. – V. 89, № 4. – P. 474-484.
57. Neoh, K.G. Surface functionalization technique for conferring antibacterial properties to polymeric and cellulosic surfaces / K.G. Neoh, L. Cen, E.T. Kang // *Langmuir*. – 2003. – V. 19. – P. 10295-10303.
58. Busscher, H.J. In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber / H.J. Busscher, B. Gottenbos, H.C. van der Mei, F. Klatter, P. Nieuwenhuis // *Biomaterials*. – 2002. – V. 23, № 6. – P. 1417-1423.
59. Li, H.R. High durability and low toxicity antimicrobial coatings fabricated by quaternary ammonium silane copolymers / H.R. Li, H.Q. Bao, K.X. Bok, C.Y. Lee, B.Li, M.T. Zin, L.F. Kang // *Biomaterials Science*. – 2016. – V. 4, № 2. – P. 299-309.
60. Li, J. Preparation and antibacterial properties of gelatin grafted with an epoxy silicone quaternary ammonium salt / J. Li, Z. Sha, W. Zhang, F. Tao, P. Yang // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2016. – V. 27, № 10. – P. 1017-1028.
61. Фёдорова, Л.С. Исследование бактерицидной, туберкулоцидной и фунгицидной активности нового отечественного дезинфектанта «Септопол» / Л.С. Фёдорова, И.М. Цвирова, В.М. Мисин, Г.М. Зайдлин // *Дезинфекционное дело*. – 2000. – № 4. – С. 40-43.
62. Schuller, W.H. Soluble copolymers of diallyl monomers / W.H. Schuller, J.A. Price, S.T. Moore, W.M. Thomas // *Journal of Chemical & Engineering Data*. – 2002. – V. 4, № 3 – P. 273-276.
63. Zhao, K. The chain conformation, relaxation dynamics and thermodynamics of poly(acrylamide-co-diallyldimethylammonium chloride) solution: Dielectric analysis coupled with scaling approach / K. Zhao, Y. Lian, Z.

Li, Z. Liu, J. Xie // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2016. – V. 490. – P. 343-353.

64. Boya, V.K.N. Development of poly (acrylamide-co-diallyldimethylammonium chloride) nanogels and study of their ability as drug delivery devices / V.K.N. Boya, S.S. Sana, S.K. Arla1, V. Badineni // *Discover Applied Sciences*. – 2019. – V. 1, № 12. – P. 1716.

65. Patent № 4617362-A USA Inverse emulsion polymers with improved incorporation of diallyldimethylammonium chloride / Becker L.W., Larson E.H. Pat. Declared 16.05.1985. Published 14.10.1986.

66. Abdiyev, K.Zh. Copolymerization of N, N-dimethyl-N, N-diallylammonium chloride with N, N-dimethylacrylamide / K.Zh. Abdiyev, Zh. Toktarbay, A.Zh. Zhenissova, M.B. Zhursumbaeva, R.N. Kainazarova // *Polymer Science, Series B*. – 2015. – V. 57, № 3. – P. 217-223.

67. Lezov, A.V. Molecular properties of the copolymers of N, N-diallyl-N,N-dimethylammonium chloride and maleic acid / A.V. Lezov, G.E. Polushina, A.A. Lezov, P.S. Vlasov, N.S. Domnina // *Polymer Science, Series A*. – 2011. – V. 53, № 2. – P. 93-101.

68. Lezov, A. Cationic electrolyte copolymers of diallyldimethylammonium chloride with carboxybetaine 2-(diallyl(methyl) ammonio) acetate of various compositions in water solutions of different ionic strengths // A.A. Lezov, A.A. Lezova, P.S. Vlasov, S.A. Samokhvalova, V.B. Rogozhin, G.E. Polushina, N.V. Tsvetkov // *Journal of Polymer Research*. – 2019. – V. 26. – P. 97.

69. Toktarbay, Z. Copolymers of diallyldimethylammonium chloride and vinyl ether of monoethanolamine: synthesis, flocculating, and antimicrobial properties / Y. Dauletov, N. Nuraje, K. Abdiyev, Z. Toktarbay, M. Zhursumbaeva // *Journal of Surfactants and Detergents*. – 2019. – V. 22, № 5. – P. 1129-1137.

70. Larson, A.M. Biocidal packaging for pharmaceuticals, foods, and other perishables / A.M. Larson, A.M. Klivanov // *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. – 2013. – V. 4, № 1. – P. 171-186.

71. Klibanov, A.M. Permanently microbicidal materials coatings / A.M. Klibanov // *Journal of Materials Chemistry*. – 2007. – V. 17, № 24. – P. 2479-2482.
72. Liu, H. Why do some immobilized N-alkylated polyethylenimines far surpass others in inactivating influenza viruses? / H. Liu, I. Elkin, J. Chen, A.M. Klibanov // *Biomacromolecules*. – 2015. – V. 16, № 1. – P. 351-356.
73. Wang, J. Application of antimicrobial polymers in the development of dental resin composite / J. Xue, J. Wang, D. Feng, H. Huang, M. Wang // *Molecules*. – 2020. – V. 25, № 20. – P. 4738.
74. Jańczewski, D. Hydrophilic quaternary ammonium ionenes – is there an influence of backbone flexibility and topology on antibacterial properties? / R.J. Kopiasz, W. Tomaszewski, A. Kuźmińska, K. Chreptowicz, J. Mierzejewska, T. Ciach, D. Jańczewski. // *Macromolecular Bioscience*. – 2020. – V. 20, № 7. – P. 2000063.
75. Chen, C.Z. Quaternary ammonium functionalized poly (propylene imine) dendrimers as effective antimicrobials: structure-activity studies / C.Z. Chen, N.C. Beck-Tan, P. Dhurjati, T.K. van Dyk, R.A. LaRossa, S.L. Cooper. // *Biomacromolecules*. – 2000. – V. 1, № 3. – P. 473-480.
76. Karaman, M. Vapor deposition of quaternary ammonium methacrylate polymers with high antimicrobial activity: synthetic route, toxicity assessment, and durability analysis / E. Çıtak, H. Testici, M. Gürsoy, E.S. Mercan, H.T. Dağı, B. Öztürk, M. Karaman. // *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces and Films*. – 2020. – V. 38, № 4. – P. 043203.
77. Xie, D. Polyurethane surface modified with a hydrophilic polymer containing quaternary ammonium bromide / H. Leah, R. Almousa, D. Xie // *Emergent Materials*. – 2020. – V. 3. – P. 637-648.
78. Chauhan, G.S. Tuning anti-microbial activity of poly (4-vinyl 2-hydroxyethyl pyridinium) chloride by anion exchange reactions / S.K. Sharma, G.S. Chauhan, R. Gupta, J-H. Ahn // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2010. – V. 21, № 2 – P. 717-724.

79. Long, T.E. Imidazole- and imidazolium-containing polymers for biology and material science applications / E.B. Anderson, T.E. Long // *Polymer*. – 2010. – V. 51, № 12 – P. 2447-2454.
80. Timofeeva, L.M. Secondary and tertiary polydiallylammonium salts: novel polymers with high antimicrobial activity / L.M. Timofeeva, N.A Kleshcheva, A.F. Moroz, L.V. Didenko // *Biomacromolecules*. – 2009. – V. 10, № 11. – P. 2976-2986.
81. Лебедь-Шарлевич, Я.И. Проблемы безопасности использования дезинфицирующих средств на основе полигексаметиленгуанидина (обзор литературы) / Я.И. Лебедь-Шарлевич, Р.А. Мамонов // *Hygiene and Sanitation*. – 2019. – Т. 102, № 9. – С. 981-986.
82. Domb, A.J. Quaternary ammonium antimicrobial polymers / A.J. Domb, N. Beyth, F. Shady // *MRS online Proceedings Library*. – 2013. – V. 1569. – P. – 97-107.
83. Xiao, H. Antimicrobial polymeric materials with quaternary ammonium and phosphonium salts / Y. Xue, H. Xiao, Y. Zhang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – V. 16, № 2. – P. 3626-3655.
84. Carvalho, T.S. Combined effect of a fluoride-, stannous- and chitosan-containing toothpaste and stannous-containing rinse on the prevention of initial enamel erosion-abrasion / Carvalho T.S., Lussi A. // *Journal of Dentistry*. – 2014. – V. 42. – P. 450-459.
85. Xia, W. Prenatal and developmental effect of high molecular weight chitosan (HMWCS) to mice / Q. Cheng, J. Zhang, W. Xia // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. – 2013. – V. 65. – P. 294-303.
86. Chiang, M.-T. Effect of dietary chitosans with different viscosity on plasma lipids and lipid peroxidation in rats fed on a diet enriched with cholesterol / M.-T. Chiang, H.-T. Yao, H.-C. Chen // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2000. – V. 64, № 5. – P. 965-971.

87. Yang, C.-Y. Effects of habitual chitosan intake on bone mass, bone-related metabolic markers and duodenum CaBP D9K mRNA in ovariectomized SHRSP rats / C.-Y. Yang, T.-W. Oh, D. Nakajima, A. Maeda, T. Naka, C.-S. Kim, S. Igawa, F. Ohta // *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. – 2002. – V. 48. – № 5, P. 371-378.
88. Gu, X.S. The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo / Y.M. Yang, W. Hu, X.D. Wang, X.S. Gu // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2007. – V. 18, № 11. – P. 2117-2121.
89. Афиногенов, Г.Е. Антимикробные полимеры : монография / Г.Е. Афиногенов, Е.Ф. Панарин. – Санкт-Петербург : Гиппократ, 1993. – 264 с.
90. Lima de Oliveira, E.C. Biological membrane-penetrating peptides: computational prediction and applications / E.C. Lima de Oliveira, K. Santana, P.S.T. Junior, A. Lima, C. de S. de S. Junior // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – V. 12. – 2022. – P. 25-23.
91. Ibach, R.E. Wood preservation based on in situ polymerization of bioactive monomers. Part 1. Synthesis of bioactive monomers, wood treatments and microscopic analysis / R.E. Ibach, R.M. Rowell. // *Holzforschung*. – 2001. – V. 55, № 4. – P. 358-364.
92. Ibach, R.E. Wood preservation based on in situ polymerization of bioactive monomers. Part 2. Fungal resistance and thermal properties of treated wood / R.E. Ibach, R.M. Rowell. // *Holzforschung*. – 2001. – V. 55, № 4. – P. 365-372.
93. Tiller, J.C. Polymer surfaces derivatized with poly(vinyl-N-hexylpyridinium) kill airborne and waterborne bacteria / J.C. Tiller, S.B. Lee, K. Lewis, A.M. Klivanov // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2002. – V. 79, № 4. – P. 465-471.
94. Tiller, J.C. Designing surfaces that kill bacteria on contact / J.C. Tiller, C. J. Liao, K. Lewis, A.M. Klivanov // *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*. – 2001. – V. 98, № 11. – P. 5981-5985.

95. Carmona-Ribeiro, A.M. The antimicrobial activity of free and immobilized poly (diallyldimethylammonium) chloride in nanoparticles of poly (methylmethacrylate) / L.M. Sanches, D.F.S. Petri, L. Dias de Melo Carrasco, A.M. Carmona-Ribeiro // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2015. – V. 13:58, № 1. – 13 p.
96. Yam, K.L. Evaluation of a polymer coating containing triclosan as the antimicrobial layer for packaging materials / D. Chung, S.E. Papadakis, K.L. Yam. // *International Journal of Food Science and Technology*. – 2003. – V. 38, № 2. – P. 165-169.
97. Domb, A.J. Antibacterial effect of composite resins containing quaternary ammonium polyethyleneimine nanoparticles / I. Yudovin-Farber, N. Beyth, E.I. Weiss, A.J. Domb // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2010. – V. 12, № 2. – P. 591-603.
98. **Lokova, A.Yu.** Molecular weight of polyanion affects the biological activity of interpolycomplexes / A.Yu. Lokova, A.Yu. Rosova, I.G. Panova, N.G. Loiko, Yu.A. Nikolaev, A.A. Yaroslavov // *Mendeleev Communications*. – 2024. – V. 34, № 1. – P. 97-99.
99. Panova, I.G. Do cationic polymer coatings retain their biocidal activity after washing with water? / I.G. Panova, **A.Yu. Lokova**, D.V. Bagrov, N.G. Loiko, Yu.A. Nikolaev, A.A. Yaroslavov // *Mendeleev Communications*. – 2023. – V. 33, № 4. – P. 562-564.
100. Huining, X.N. Polyelectrolyte complex containing antimicrobial guanidine-based polymer and its adsorption on cellulose fibers / L. Qian, D. Chao, L. Xiangtao, H. Beihai, X. Huining // *Holzforschung*. – 2014. – V. 68, № 1. – P. 103-111.
101. Ortega-Ortiz, H. Antibacterial activity of chitosan and the interpolyelectrolyte complexes of poly (acrylic acid)-chitosan / H. Ortega-Ortiz, B. Gutierrez-Rodriguez, G. Cadenas-Pliego, L.I. Jimenez // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. – 2010. – V. 53, № 3. – P. 623-628.

102. Demchenko, V. X-ray study of structural formation, thermomechanical and antimicrobial properties of copper-containing polymer nanocomposites obtained by the thermal reduction method / V. Demchenko, S. Riabov, N. Rybalchenko, L. Goncharenko, S. Kobylinskyi, V. Shtompel' // *European Polymer Journal*. – 2017. – V. 96. – P. 326-336.
103. Pergushov, D.V. // *Advanced functional structures based on interpolyelectrolyte complexes* / D.V. Pergushov, A.A. Zezin, A.B. Zezin, A.H. E. Müller. – Berlin, 2014. – V. 255. – P. 173-225.
104. Бегиева, М.Б. Водорастворимые азотсодержащие полиэлектролиты с бактерицидными свойствами / М.Б. Бегиева, Л.З. Блиева, З.Ф. Хараева, А.М. Хараев, Ю.А. Малкандуев // *Фундаментальные исследования*. – 2012. – Т. 9, №3. – С. 542-544.
105. Green, J.-B.D., A review of immobilized antimicrobial agents and methods for testing / J.-B.D. Green, T. Fulghum, M.A. Nordhaus // *Biointerphases*. – 2011. – V. 6, № 4. – P. MR13-MR28.
106. Milstone, A.M. Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention / A.M. Milstone, C.L. Passaretti, T.M. Perl // *Clinical Infectious Diseases*. – 2008. – V. 46, № 2. – P. 274-281.
107. Rai, M. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials / M. Rai, A. Yadav, A. Gade // *Biotechnology Advances*. – 2009. – V. 27, № 1. – P. 76-83.
108. Barbosa, D.B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver / D.R. Monteiro, L.F. Gorup, A.S. Takamiya, A.C. Ruvollo, E.R. Camargo, D.B. Barbosa // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2009. – V. 34, № 2. – P. 103-110.
109. Zilberman, M. Antibiotic-eluting medical devices for various applications / M. Zilberman, J.J. Elsner // *Journal of Controlled Release*. – 2008. – V. 130, № 3. – P. 202-215.

110. Boyer, C. Antibiofilm platform based on the combination of antimicrobial polymers and essential oils / R. Namivandi-Zangeneh, Y. Yang, S. Xu, E.H.H. Wong, C. Boyer // *Biomacromolecules*. – 2020. – V. 21, № 1. – P. 262-272.
111. Domb, A.J. Antimicrobial N-brominated hydantoin and uracil grafted polystyrene beads / S. Farah, O. Aviv, N. Laout, S. Ratner, A.J. Domb // *Journal of Controlled Release*. – 2015. – V. 216. – P. 18-29.
112. Bankova, M. Hydrolysis and antibacterial activity of polymers containing 8-quinolinyl acrylate / M. Bankova, N. Manolova, N. Markova, T. Radoucheva, K. Dilova, I. Rashkov // *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. – 1997. – V. 12, № 4. – P. 294-307.
113. Uhrich, K.E. Polymeric prodrugs of ampicillin as antibacterial coatings / A. Prudencio, N.D. Stebbins, M. Johnson, M.J. Song, B.A. Langowski, K.E. Uhrich // *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. – 2014. – V. 29, № 3. – P. 208-220.
114. Долгова, Е.В. Синтез и свойства ионогенных полимеров и их комплексов с поверхностно-активными веществами в качестве биоцидных материалов : специальность 02.00.06 «Высокомолекулярные соединения» : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Е.В. Долгова ; Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова. – Москва, 2015. – 154 с.
115. Novoskoltseva, O.A. Polycomplexes to modulate bactericidal activity of cetylpyridinium bromide / O.A. Novoskoltseva, D.G. Sinelnikova, N.G. Loiko, Yu.A. Nikolaev, A.A. Yaroslavov // *Mendeleev Communications*. – 2024. – V. 34, № 3. – P. 369-371.
116. Wang, J. Antimicrobial properties of benzalkonium chloride derived polymerizable deep eutectic solvent / J. Wang, J. Xue, X. Dong, Yu. Qingsong, S.N. Baker, M. Wang, H. Huang // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2020. – V. 575. – № 119005.

117. Jennings, M.C. Quaternary ammonium compounds: an antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance / M.C. Jennings, K.P.C. Minbiole, W.M. Wuest // *ACS Infectious Diseases*. – 2015. – V. 1, № 7. – P. 288-303.
118. Xie, X. Synthesis, physiochemical property and antimicrobial activity of novel quaternary ammonium salts / X. Xie, W. Cong, F. Zhao, H. Li, W. Xin, G. Hou, C. Wang // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. – 2018. – V. 33, № 1 – P. 98-105.
119. Matsumura, Y. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate / Y. Matsumura, K. Yoshikata, S. Kunisaki, T. Tsuchido // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2003. – V. 69, № 7. – P. 4278-4281.
120. Liao, S.Y. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions / S.Y. Liao, D.C. Read, W.J. Pugh, J.R. Furr, A.D. Russell // *Letters in Applied Microbiology*. – 1997. – V. 25, № 4. – P. 279-283.
121. Russell, A.D. Antimicrobial activity and action of silver / A.D. Russell, F.R.C. Path, W.B. Hugo // *Progress in Medicinal Chemistry*. – 1994. – V. 31. – P. 351-370.
122. Wang, Z. Mechanisms of nanosilver-induced toxicological effects: more attention should be paid to its sublethal effects / Z. Wang, T. Xia, S. Liu // *Nanoscale*. – 2015. – V. 7, № 17. – P. 7470-7481.
123. Johnston, H.J. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity / H.J. Johnston, G. Hutchison, F.M. Christensen, S. Peters, S. Hankin, V. Stone // *Critical Reviews in Toxicology*. – 2010. – V. 40, № 4. – P. 328-346.

124. Sharma, V.K. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities / V.K. Sharma, R.A. Yngard, Y. Lin // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2009. – V. 145, № 1–2. – P. 83-96.
125. Beer, C. Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion? / C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D.S. Sutherland, H. Autrup // *Toxicology Letters*. – 2012. – V. 208, № 3. – P. 286-292.
126. Waite, D.T. Silver nanoparticle-algae interactions: oxidative dissolution, reactive oxygen species generation and synergistic toxic effects / D. He, J.J. Dorantes-Aranda, T.D. Waite // *Environmental Science & Technology*. – 2012. – V. 46, № 16. – P.8731-8738.
127. Reidy, B. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications / B. Reidy, A. Haase, A. Luch, K.A. Dawson, I. Lynch // *Materials*. – 2013. – V. 6, № 6. – P. 2295-2350.
128. Chen, C. Fate and toxicity of metallic and metal-containing nanoparticles for biomedical applications / Y-F. Li, C. Chen // *Small*. – 2011. – V. 7, № 21. – P. 2965-2980.
129. Morones, J.R. The bactericidal effect of silver nanoparticles / J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez, M.J. Yacaman // *Nanotechnology*. – 2005. – V. 16, № 10. – P. 2346-2353.
130. Zezin, A.A. Synthesis of hybrid materials in polyelectrolyte matrixes: Control over sizes and spatial organization of metallic nanostructures // *Polymer Science, Series C*. – 2016. – V. 58, № 1. – P. 118-130.
131. Belloni, J. Nucleation, growth and properties of nanoclusters studied by radiation chemistry // *Catalysis Today*. – 2006. – V. 113, № 3-4. – P. 141-156.
132. Xia, Y. Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics? / Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, S.E. Skrabalak // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2009. – V. 48, № 1. – P. 60-103.

133. Khaydarov, R.A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobial prophylaxis / I.T. Garipov, R.A. Khaydarov, O.U. Gapurova, Firdaus M. Lutfi, I.L. Efimova, S.Y. Evgrafova // *Journal of Siberian Federal University. Biology.* – 2019. – V. 12, № 3. – P. 266-276.
134. Twu, Y.K. Preparation of silver nanoparticles using chitosan suspensions / Y.K. Twu, Y-W Chen, C.M. Shih // *Powder Technology.* 2008. – V. 185, № 3. – P. 251-257.
135. Yang, X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method / Huang H., Yang X. // *Carbohydrate Research.* – 2004. – V. 339, № 15. – P. 2627-2631.
136. Yoksan, R. Silver nanoparticles dispersing in chitosan solution: preparation by  $\gamma$ -ray irradiation and their antimicrobial activities / Yoksana R., Chirachanchai C. // *Materials Chemistry and Physics.* – 2009. – V. 115, № 1. – P. 296-302.
137. Preethika, R.K. Synthesis and characterization of neomycin functionalized chitosan stabilized silver nanoparticles and study its antimicrobial activity / R.K. Preethika, R. Ramya, M. Ganesan, S. Nagaraj, K. Pandian // *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics.* – 2016. – V. 7, № 4. – P. 759-764.
138. Prozorova, G.F. Green synthesis of water-soluble nontoxic polymeric nanocomposites containing silver nanoparticles / G.F. Prozorova, A.S. Pozdnyakov, N.P. Kuznetsova, S.A. Korzhova, A.I. Emel'yanov, T.G. Ermakova, T.V. Fadeeva, L.M. Sosedova // *International Journal of Nanomedicine.* – 2014. – V. 9, №1 – P. 1883-1889.
139. Demchenko, V.L. Preparation and characterization of Cu/Cu<sub>2</sub>O-containing nanocomposites based on interpolyelectrolyte complexes of pectin–polyethyleneimine / V.L. Demchenko, V.I. Shtompe, S.V. Riabov, L.A. Goncharenko, S. Kobylinskyi, M. Iurzhenko // *Applied Nanoscience (Switzerland).* – 2020. – V. 10, № 12. – P. 5479-5488.

140. Feldman, V.I. Controlled radiation-chemical synthesis of metal polymer nanocomposites in the films of interpolyelectrolyte complexes: principles, prospects and implications / A.A. Zezin, D.I. Klimov, E.A. Zezina, K.V. Mkrtchyan, V.I. Feldman // *Radiation Physics and Chemistry*. – 2020. – V. 169. – 36 p.
141. Zezina, E.A. Radiation-induced synthesis of copper nanostructures in the films of interpolymer complexes / E.A. Zezina, A.I. Emel'yanov, A.S. Pozdnyakov, G.F. Prozorova, S.S. Abramchuk, V.I. Feldman, A.A. Zezin // *Radiation Physics and Chemistry*. – 2019. – V. 158. – P. 115-121.
142. Demchenko, V. Novel approach to synthesis of silver nanoparticles in interpolyelectrolyte complexes based on pectin, chitosan, starch and their derivatives / V. Demchenko, S. Riabov, S. Sinelnikov, O. Radchenko, S. Kobylinskyi, N. Rybalchenko // *Carbohydrate Polymers*. – 2020. – V. 242. – 116431.
143. Demchenko, V. Effect of the type of reducing agents of silver ions in interpolyelectrolyte-metal complexes on the structure, morphology and properties of silver-containing nanocomposites / V. Demchenko, S. Riabov, S. Kobylinskyi, L. Goncharenko, N. Rybalchenko, A. Kruk, O. Moskalenko, M. Shut // *Scientific Reports*. – 2020. – V. 10, № 1. – p. 7126.
144. Klimov, D.I. Radiation-induced preparation of metal nanostructures in coatings of interpolyelectrolyte complexes / D.I. Klimov, E.A. Zezina, V.C. Lipik, S.S. Abramchuk, A.A. Yaroslavov, V.I. Feldman, A.V. Sybachin, V.V. Spiridonov, A.A. Zezin // *Radiation Physics and Chemistry*. – 2019. – V. 162. – P. 23-30.
145. Bordunov, S.V. Physico-chemical modification of the fibrous filter nozzles for purification processes of water and air / S.V. Bordunov, O.V. Galtseva, N.M. Natalinova, A.A. Rogachev, R.Z. Zhang // 12 Int. scientific conference on radiation-thermal effects and processes in inorganic materials : materials of conference (04-12 September 2016, Tomsk). – Tomsk, 2016. V. 168, № 1. – p. 012087.
146. Гарасько, Е.В. Структура и биологическая активность композитов гидроксиэтилцеллюлозы/бентонит / Е.В. Гарасько, А.Н. Родионова, О.В.

Алексеева, Н.А. Багровская, А.В. Агафонов // Успехи современного естествознания. – 2015. – V. 1, № 11. – P. 20-25.

147. Yaroslavov, A.A. Reversibility of structural rearrangements in the negative vesicular membrane upon electrostatic adsorption/desorption of polycation / A.A. Yaroslavov, A.A. Efimova, V.I. Lobyshev, V.A. Kabanov // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. – 2002. – V. 1560, № 1-2. – P. 14-24.

148. Ivashkov, V. Composition and properties of complexes between anionic liposomes and diblock copolymers with cationic and poly (ethylene oxide) blocks / V. Ivashkov, A. Sybachin, A. Efimova, V. Orlov, D. Pergushov, H. Schmalz, A. Yaroslavov // *Polymer International*. – 2017. – V. 66, № 11. – P. 1669-1674.

149. Kabanov, V.A. What happens to negatively charged lipid vesicles upon interacting with polycation species? / V.A. Kabanov, A.A. Yaroslavov // *Journal of Controlled Release*. – 2002. – V. 78, № 1-3. – P. 267-271.

150. Efimova, A.A. Effect of anionic-lipid-molecule geometry on the structure and properties of liposome-polycation complexes / A.A. Efimova, A.V. Sybachin, A.A. Yaroslavov // *Polymer Science, Series C*. – 2011. – V. 53, № 1. – P. 89-96.

151. Yaroslavov, A.A. Effect of polylysine on transformations and permeability of negative vesicular membranes / A.A. Yaroslavov, O.Ye. Kuchenkova, I.B. Okuneva, N.S. Melik-Nubarov, N.O. Kozlova, V.I. Lobyshev, V.A. Kabanov, F.M. Menger // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. – 2003. – V. 1611, № 1-2. – P. 44-54.

152. Menger, F.M. Migration of poly-L-lysine through a lipid bilayer / F.M. Menger, V.A. Seredyuk, M.V. Kitaeva, A.A. Yaroslavov, N.S. Melik-Nubarov // *Journal of the American Chemical Society*. – 2003. – V. 125, № 10. – P. 2846-2847.

153. Yaroslavov, A.A. A polycation causes migration of negatively charged phospholipids from inner to outer leaflet of the liposomal membrane / A.A. Yaroslavov, V.E. Kul'kov, A.S. Polinsky, B.A. Baibakov, V.A. Kabanov // *FEBS Letters*. – 1994. – V. 340, № 1-2. – P. 121-123.

154. Yaroslavov, A.A. Electrostatically driven complexation of liposomes with a star-shaped polyelectrolyte to low-toxicity multi-liposomal assemblies / A. A. Yaroslavov, A.V. Sybachin, O.V. Zaborova, D.V. Pergushov, A.B. Zezin, N.S. Melik-Nubarov, F.A. Plamper, A.H.E. Muller, F.M. Menger // *Macromolecular Bioscience*. – 2013. – V. 14, № 4. – P. 491-495.
155. Sybachin, A.V. Complexes between anionic liposomes and spherical polycationic brushes. An assembly of assemblies / A.V. Sybachin, O.V Zaborova, V.N. Orlov, P.I. Semenyuk, M. Ballauff, E. Kesselman, J. Schmidt, Y. Talmon, F.M. Menger, A.A. Yaroslavov // *Langmuir*. – 2014. – V. 30, № 9. – P. 2441-2447.
156. Menshikova, A.Yu. Surface modified latex particles: synthesis and self-assembling into photonic crystals / A.Yu. Menshikova, B.M. Shabsels, N.N. Shevchenko, A.G. Bazhenova, A.B. Pevtsov, A.V. Sel'kin, A.Yu Bilibin // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2007. – V. 298, №1. – P. 27-33.
157. Samoshin, V.V. Trans-2-Aminocyclohexanol as a pH-sensitive conformational switch in lipid amphiphiles / B. Brazdova, N. Zhang, V.V. Samoshin, X. Guo X. // *Chemical Communications*. – 2008. – №. 39. – P 4774-4776.
158. Samoshin V.V. Trans-2-aminocyclohexanols as pH-triggered molecular switches / V.V. Samoshin, D.E. Gremyachinskiy, V.A. Chertkov, B. Brazdova, E.K. Dobretsova, A.K. Shestakova, L.P. Vatlina, H.-J. Schneider // *ARKIVOC*. – 2005. V. 2005, № 4. – P 129-141.
159. Samoshin, V.V. Trans-2-Aminocyclohexanols as pH-triggers for conformationally controlled crowns and podands / V.V. Samoshin, V.A Chertkov, D.E. Gremyachinskiy, E.K. Dobretsova, A.K. Shestakova, L.P. Vatlina // *Tetrahedron Letters*. – 2004. – V. 45, № 42. – P. 7823-7826.
160. Yaroslavov, A.A. Capacious and programmable multi-liposomal carriers / A.A. Yaroslavov, A.V. Sybachin, O.V. Zaborova, V.A. Migulin, V.V. Samoshin,

M.M. Ballauff, E. Kesselman, J. Schmidt, Y. Talmon, F.M. Menger // *Nanoscale*. – 2015. – V.7, №5. – P. 1635-1641.

161. Izumrudov, V.A. Self-assembly and molecular 'recognition' phenomena in solutions of (bio)polyelectrolyte complexes / *Russian Chemical Reviews*. – 2008. – V. 77, № 4. – P. 381-393.

162. Kabanov, V.A. Polyelectrolyte complexes in solution and in bulk / *Russian Chemical Reviews*. – 2005. – V.74, № 3. – P. 3-20.

163. Izumrudov, V.A. Interpolyelectrolyte complexes: advances and prospects of application / V.A. Izumrudov, B.Kh. Mussabayeva, Z.S. Kassymova, A.N. Klivenko, L.K. Orazzhanova // *Russian Chemical Reviews*. – 2019. – V.88, № 10. – P. 1046-1062.

164. Voron'ko, N.G. The chitosan-gelatin (bio)polyelectrolyte complexes formation in an acidic medium / N.G. Voron'ko, S.R. Derkach, Y.A. Kuchina, N.I. Sokolan // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – V.138. – P. 265-272.

165. Zhang, Y. The influence of ionic strength and mixing ratio on the colloidal stability of PDAC/PSS polyelectrolyte complexes / Y. Zhang, E. Yildirim, H.S. Antila, L.D. Valenzuela, M. Sammalkorpi, J.L. Lutkenhaus // *Soft Matter*. – 2015. – V.11, № 7. – P. 7392-7401.

166. Požar, J. Conditions leading to polyelectrolyte complex overcharging in solution: complexation of poly(acrylate) anion with poly(allylammonium) cation / T. Kremer, D. Kovac'evic', J. Salopek, J. Požar // *Macromolecules*. – 2016. – V.49, № 22. – P. 8672-8685.

167. Kovac'evic', D. Ion-specific and solvent effects on PDADMA-PSS complexation and multilayer formation / J. Jukic', K. Korade, A.-M. Milisav, I. Delac' Marion, D. Kovac'evic' // *Colloids Interfaces*. – 2021. – V.5, № 3. – p. 38.

168. Sybachin, A.V. The effect of cationic polylysine on the release of an encapsulated substance from pH-sensitive anionic liposomes / A.V. Sybachin, **A.Yu. Lokova**, V.V. Spiridonov, O.A. Novoskol'tseva, E.V. Shtykova, V.V.

- Samoshin, V.A. Migulin, A.A. Yaroslavov // *Polymer Science, Series A.* – 2019. – V.61, № 3. – P. 308-316.
169. Zahar, J-R When and how to use MIC in clinical practice / S. Magréault, F. Jauréguay, E. Carbonnelle, J-R. Zahar // *Antibiotics.* – 2022. – V.11, № 12. – 1748.
170. Pfaller, M-A, Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods / M-A. Pfaller, D. Andes, D-J. Diekema, A. Espinel-Ingroff, D. Sheehan // *Drug Resistance Updates.* – 2010. – V.13, № 6. – P. 180-195.
171. Новоскольцева, О.А. Полиэлектролиты и поликомплексы для стабилизации песчаных грунтов / О.А. Новоскольцева, И.Г. Панова, Н.Г. Лойко, Ю.А. Николаев, Е.А. Литманович, А.А. Ярославов // *Высокомолекулярные соединения, Серия Б.* – 2021. – Т. 63, № 5. – С. 317-325.
172. Яковлев, С.В. Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам: уроки исследования MYSTIC / С.В. Яковлев // *Фарматека.* – 2007. – Т. 143, № 8/9. – С. 67-70.
173. Goossens, H. Susceptibility of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: results from the European MYSTIC study group / H. Goossens // *Clinical Microbiology and Infection.* – 2003. – V.9, № 9. – P. 980-983.
174. Singleton, P. Bacteria in biology, biotechnology and medicine : the monograph / P. Singleton. – New York : Wiley, 1999. – p. 510.
175. Токгаев, Н.Т. Строение клеточной мембраны / Токгаев Н.Т. // *Наука и мировоззрение.* – 2025. – Т. 1, № 48. – С. 64-71.
176. Yaroslavov, A.A. Integrity of mixed liposomes contacting a polycation depends on the negatively charged lipid content / A.A. Yaroslavov, E.A. Kiseliova, O.Y. Udalykh, V.A. Kabanov // *Langmuir.* – 1998. – V. 14, № 18. – P. 5160-5163.

177. Sugiyama, M. Possible mechanism of polycation liposome (PCL)-mediated gene transfer / M. Sugiyama, M. Matsuura, Y. Takeuchi, J. Kosaka, M. Nango, N. Oku // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2004. – V. 1660, № 1–2. – P. 24-30.
178. Bordi, F. Time evolution of the formation of different size cationic liposome–polyelectrolyte complexes / F. Bordi, C. Cametti T. Gili, D. Gaudino, S. Sennato // *Bioelectrochemistry*. – 2003.– V. 59, № 1–2. – P. 99-106.
179. Montembault, A. Liposome loaded chitosan physical hydrogel: toward a promising delayed-release biosystem / A. Billard, L. Pourchet, S. Malaise, P. Alcouffe, A. Montembault, C. Ladavière // *Carbohydrate Polymers*. – 2015.– V. 115. – P. 651-657.
180. Pedersen, J.A. Formation of supported lipid bilayers containing phase-segregated domains and their interaction with gold nanoparticles / E.S. Melby, A.C. Mensch, S.E Lohse, D. Hu, G. Orr, C.J. Murphy, R.J. Hamers, J.A. Pedersen // *Environmental Science Nano*. – 2016. – V. 3, № 1. – P. 45-55.
181. Zaborova, O.V. Modification of flipposomes with a polycation can enhance the control of pH-induced release / O.V. Zaborova, **A.Yu. Lokova** // *International Journal of Nanomedicine*. – 2019. – V.2019 – №14. – P. 1039-1049.
182. Moghimi, S.M. Polycation-mediated integrated cell death processes / L. Parhamifar, H. Andersen, L.P. Wu, A. Hall, D. Hudzech, S.M. Moghimi // *Advances in Genetics*. – 2014. – V. 88. P. – 353-398.
183. Малинин, А.С. Адсорбция катионных полимеров на поверхности анионных стеклянных микросфер / А.С. Малинин, И.В. Калашникова, А.А. Рахнянская, А.А. Ярославов // *Высокомолекулярные соединения, Серия А*. – 2015. – Т.7, №5. – С. 1635-1641.
184. Kluytmans, J. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks / J. Kluytmans, A. Belkum, H. Verbrugh // *Clinical Microbiology Reviews*. – 1997. – V. 10, № 3. – P. 505-520.

185. Panova, I.G. On the quantification of biocidal activity of protective coatings / I.G. Panova, **A.Yu. Lokova**, T.A. Pankratov, Yu.A. Nikolaev, A.A. Yaroslavov // *Mendeleev Communications*. – 2024. – V. 34, № 2. – P. 185-187.
186. Изумрудов, В.А. Контролируемая стабильность полимер-коллоидного комплекса в водно-солевых средах / М.В. Жирякова, В.А. Изумрудов // *Высокомолекулярные Соединения, Серия А*. – 2008. – Т.50, №10. – С. 1793-1801.