



Совместное действие металлических и ферментных наночастиц, используемых для функционализации защитных самоочищающихся материалов, нейтрализующих фосфорорганические соединения и обладающих бактерицидной активностью

В.В. Завьялов¹, Н.В. Завьялова¹, В.И. Холстов¹, В.А. Ковтун¹,
В.К. Гореленков², Г.А. Фролов³, И.В. Лягин⁴, Н.А. Степанов⁴,
А.Г. Асланлы⁴, Е.Н. Ефременко⁴

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации, 111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19

²ООО «Научно-исследовательский институт эластомерных материалов и изделий», Российская Федерация, 111024, г. Москва, Перовский проезд, д. 2, стр. 1

³НИТУ стали и сплавов, Российская Федерация, 119049, г. Москва, Ленинский проспект, д. 4

⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119234, Российская Федерация, г. Москва, Ленинские Горы, д. 1, стр. 3

Поступила 13.06.2023 г. Принята к публикации 27.06.2023 г.

Комбинирование нескольких модулей, включающих в свой состав наночастицы металлов (тантала или цинка), антимикробные вещества, ферментные наноконплексы, обеспечивающие самоочищение (самодегазацию) и осуществляющие множественную функционализацию, позволяет создать материалы, обеспечивающие защиту от химических и биологических поражающих агентов. *Цель работы* – изучение комбинированного действия наночастиц металлов, других биоцидных соединений и наноразмерных ферментных комплексов гексидинсодержащей органофосфатгидролазы и пенициллинацилазы, нанесенных на тканевые унифицированные платформы, на фосфорорганические соединения и бактерицидную активность. *Материалы и методы исследования.* Защитный самоочищающийся материал создавали на основе принципа построения модульных материалов с заданными свойствами. Наноразмерные металлические комплексы и ферментные нековалентные полиэлектролитные комплексы с полиглутаминовой кислотой или антимикробными пептидами наносили на тканевую унифицированную платформу в определенной последовательности и определенном количестве, и изучали ее антитоксические и антимикробные свойства. *Обсуждение результатов.* При одновременном действии нескольких модулей, при соблюдении определенных требований нанесения количества и последовательности, сохраняются свойства модулей, которые не нейтрализуют и не выводят из рабочего состояния специфические свойства модулей и не мешают другим модулям осуществлять свои функции. Лучшие результаты таких материалов могут быть получены при комбинировании наночастиц биологически инертного Та и стабилизированного фермента в полиэлектролитном комплексе. Для приобретения антимикробных свойств волокнистые материалы могут быть функционализированы не только комбинацией наночастиц металлов с ферментными препаратами, но и комбинацией низкомолекулярных антибиотиков с ферментами. *Выводы.* Проведенные исследования продемонстрировали возможность комбинирования модулей, содержащих карбоксилаты металлов, наночастицы металлов и ферментные наноконплексы для множественной функционализации одних и тех же волокнистых материалов, которые приобретали биоцидные и противохимические защитные свойства. Получены новые самодегазирующиеся материалы, обладающие защитными химико-биологическими свойствами и высокой стабильностью в отношении проявляемой каталитической активности по отношению к основным субстратам введенных ферментов и бактерицидностью. Использование таких подходов позволяет придать защитные свойства практически любой ткани или одежде, изготовленной из нее, на которые будут нанесены изученные модули, которые обеспечат требуемый уровень защиты личного состава, обладающих изнуряющим и сковывающим действием.

Ключевые слова: бактерицидные свойства материала; защитный композиционный материал и ткань; защитные химико-биологические свойства; гексидинсодержащая органофосфатгидролаза; наноразмерный

металлический комплекс; наноразмерные металлы; наноразмерный ферментный комплекс; пенициллинацилаза; специфические свойства модульных материалов.

Библиографическое описание: Завьялов В.В., Завьялова Н.В., Холстов В.И., Ковтун В.А., Гореленков В.К., Фролов Г.А., Лягин И.В., Степанов Н.А., Асланлы А.Г., Ефременко Е.Н. Совместное действие металлических и ферментных наночастиц, используемых для функционализации защитных самоочищающихся материалов, нейтрализующих фосфорорганические соединения и обладающих бактерицидной активностью // *Вестник войск РХБ защиты*. 2023. Т. 7, № 2. С. 107–126. EDN: jzeivh.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2023-7-2-107-126>

Разработанный нами принцип построения модульных защитных материалов с заданными свойствами, изученные механизмы нанесения модулей для нейтрализации фосфорорганических соединений (ФОС) и биоцидного воздействия на клетки микроорганизмов на тканевую унифицированную платформу, были положены в основу процесса функционализации (модификации) волокнистых материалов [1–5].

Модульные материалы с бактерицидными свойствами были созданы благодаря нанодисперсным системам на основе металлов (тантала или цинка), которые обеспечивали биоцидную активность и максимально сохраняли ее в самом волокнистом материале. Бактерицидные свойства также зависели и от выбранного способа нанесения модульных защитных рецептур на волокнистые материалы [6–20]. Используемые в исследованиях металлические нанодисперсные системы были получены электрохимическим методом на основе дугового разряда в жидкой среде (воде или органическом растворителе), который сопровождается коррозией металлического электрода и образованием наночастиц [6, 21].

Ранее в работах [22–32] нами обсуждался состав, свойства, а также механизмы действия самодезинфицирующих материалов, которые представляются прообразом специальных (как химически нейтральных, так и химически активных) модулей. Результаты этих исследований позволили создать модульные защитные материалы с заданными свойствами.

Композиционные материалы и ткани со специальными заданными свойствами самоочистки (самодезинфекции) и самодезинфекции, были созданы при использовании модулей: «Адгезионный», «Дезинфицирующий» «Дезгазирующий» («Биохимический»), которые наносились на тканевую унифицированную платформу путем использования металлических наночастиц, обеспечивающих ее бактерицидные свойства. При этом соблюдались определенные требования нанесения количества и последовательности, которые не позволяли нейтрализовать или вывести из рабочего со-

стояния специфические модули и не мешали другим модулям осуществлять свои функции [2, 3, 21].

В отличие от ранее разработанных самодезгазирующихся материалов, композиционные материалы со специальными заданными свойствами самоочистки (самодезгазации) содержали в своем составе гексидинсодержащую органофосфатгидролазу ($\text{His}_6\text{-OPH}$), стабилизированную в виде наночастиц полиэлектролитного комплекса фермента с полиглутаминовой кислотой ($\text{HCl-His}_6\text{-OPH}$), сформированных при разных значениях pH [22, 23, 26, 31].

Цель работы – изучение комбинированного действия наночастиц металлов, других биоцидных соединений и наноразмерных ферментных комплексов гексидинсодержащей органофосфатгидролазы и пенициллинацилазы, нанесенных на тканевые унифицированные платформы, на фосфорорганические соединения и бактерицидную активность.

Исследование комбинированного и одновременного действия нескольких модулей, включающих в свой состав наночастицы металлов (тантала или цинка) или другие антимикробные вещества, ферментные наноконструкции, обеспечивающие самоочистку (самодезгазацию) и осуществляющих множественную функционализацию, представляет научно-практический интерес, как с точки зрения познания закономерностей процесса функционализации (модификации) свойств самих волокнистых материалов, так и с точки зрения закономерностей взаимодействия отдельных модулей друг с другом при нанесении их на одну тканевую платформу.

Основными задачами работы были:

1. Рассмотрение общих закономерностей при комбинированном нанесении модульных рецептур, содержащих наноразмерные металлы и ферментные наноконструкции, обеспечивающие биоцидные и противохимические защитные свойства.

2. Изучение влияния типа фермента на комбинированное действие наночастиц металлов и ферментативных комплексов при функционализации волокнистых материалов.

3. Установление фактов принципиальной возможности комбинирования металлсодержащих наночастиц, биоцидных веществ и ферментных наноконплексов для множественной функционализации волокнистых материалов.

4. Определение возможности функционализации волокнистых материалов наноразмерными ферментными препаратами в комбинации с антибиотиками.

5. Оценка биотоксических свойств модифицированных волокнистых материалов, обладающих самодезинфицирующими и самоочищающими свойствами за счет комбинированного действия наночастиц металлов и ферментных наноконплексов.

Общие закономерности при комбинированном нанесении модульных рецептур, содержащих наноразмерные металлы и ферментные наноконплексы, обеспечивающие биоцидные и противохимические защитные свойства. В результате комбинированного нанесения модульных рецептур, содержащих наноразмерные металлы и ферментные наноконплексы, обеспечивающие биоцидные и противохимические защитные свойства, изменяются свойства самих волокнистых материалов. Так, ранее нами было показано, что в результате нанесения металлоорганических покрытий на поверхность волокнистого материала возможна агрегация наночастиц. Такая агрегация может привести к неравномерному распределению наночастиц на поверхности материала. Поэтому при разработке модульных рецептур очень важен подбор как металла, так и самого волокнистого материала. Кроме того, для гарантированного бактерицидного действия материала немаловажное значение имеют нормы количества наносимых наночастиц металла. Эти нормы в свою очередь зависят от количества, наносимого на эту же ткань гидролитического фермента, в составе ферментных наноконплексов [4].

Ранее было показано, что при правильном и тщательном подборе наночастиц металлов и фермента для нанесения на тканевую платформу полученные модульные волокнистые материалы проявляют хорошие биокаталитические характеристики в отношении различных фосфорорганических соединений, микотоксинов и обладают бактерицидностью за счет наличия на их поверхности металлических наночастиц [4, 21, 34].

Для проведения исследования по комбинированию модулей в этой работе были использованы следующие модули: «Адгезионный» – карбоксилат Cu, «Бактерицидный» – металлсодержащие наночастицы Ta или Zn; «Дегазирующий» («Биохимический») – ферменты His₆-ОРН или пенициллинацилаза (ПЦА), ста-

билизованные в составе фермент-полиэлектrolитных наноконплексов с полиглутаминовой кислотой (соответственно НЧ- His₆-ОРН или НЧ-ПЦА).

Модульные рецептуры наносились на волокнистые материалы под шифром № 1.1, 2.1, 5.4, 5.5. Первым наносился модуль «Адгезионный» (карбоксилат меди), а далее модуль «Бактерицидный» – наночастицы Ta или Zn в этаноле и модуль «Дегазирующий» («Биохимический») – наночастицы ферментных конплексов.

Полученные в такой последовательности функционализированные волокнистые материалы сравнивали по их эффективности действия с теми, что были модифицированы только карбоксилатом Cu и наночастицами металлов [24, 25].

Было установлено, что с течением времени даже на образцах самих волокнистых материалов (№ 1.1, 2.1, 5.4, 5.5) без нанесения модулей наблюдалась гибель грамотрицательных (*Escherichia coli*) и грамположительных (*Bacillus subtilis*) клеток бактерий. Было отмечено, что нанесение модулей «Адгезионный», «Бактерицидный» и «Дегазирующий» («Биохимический»), в особенности, комбинация всех трех модулей значительно ускоряла гибель клеток микроорганизмов и приводила к деконтаминации разных материалов.

В результате проведенных экспериментов наблюдалась практически полная гибель клеток через 1 сутки, в то время как на контрольных образцах сохранялось от 20 до 50 % от исходных концентраций клеток бактерий. Максимальная степень гибели клеток была выявлена при использовании материалов 2.1, 5.4, 5.5, в качестве тканевой унифицированной платформы, которую функционализировали комбинацией модулей, содержащих наночастицы тантала или цинка. При этом чуть большую эффективность в отношении исследованных бактериальных клеток демонстрировали материалы, для функционализации которых использовались наночастицы Ta. Надо отметить, что наночастицы и Ta, и Zn наносились в количествах, соответствующих установленным для них уровням минимальных ингибирующих концентраций [4, 24].

При исследовании противохимических защитных свойств этих материалов, было выявлено наличие зависимости остаточной активности фермента His₆-ОРН преимущественно от типа волокнистого материала (рисунок 1). Из этого следует, что при комбинировании разных модулей важным является выбор волокнистых материалов для унифицированной платформы.

Что же касается наночастиц фермента His₆-ОРН в составе создаваемых материалов, то в предыдущих исследованиях ему отводи-

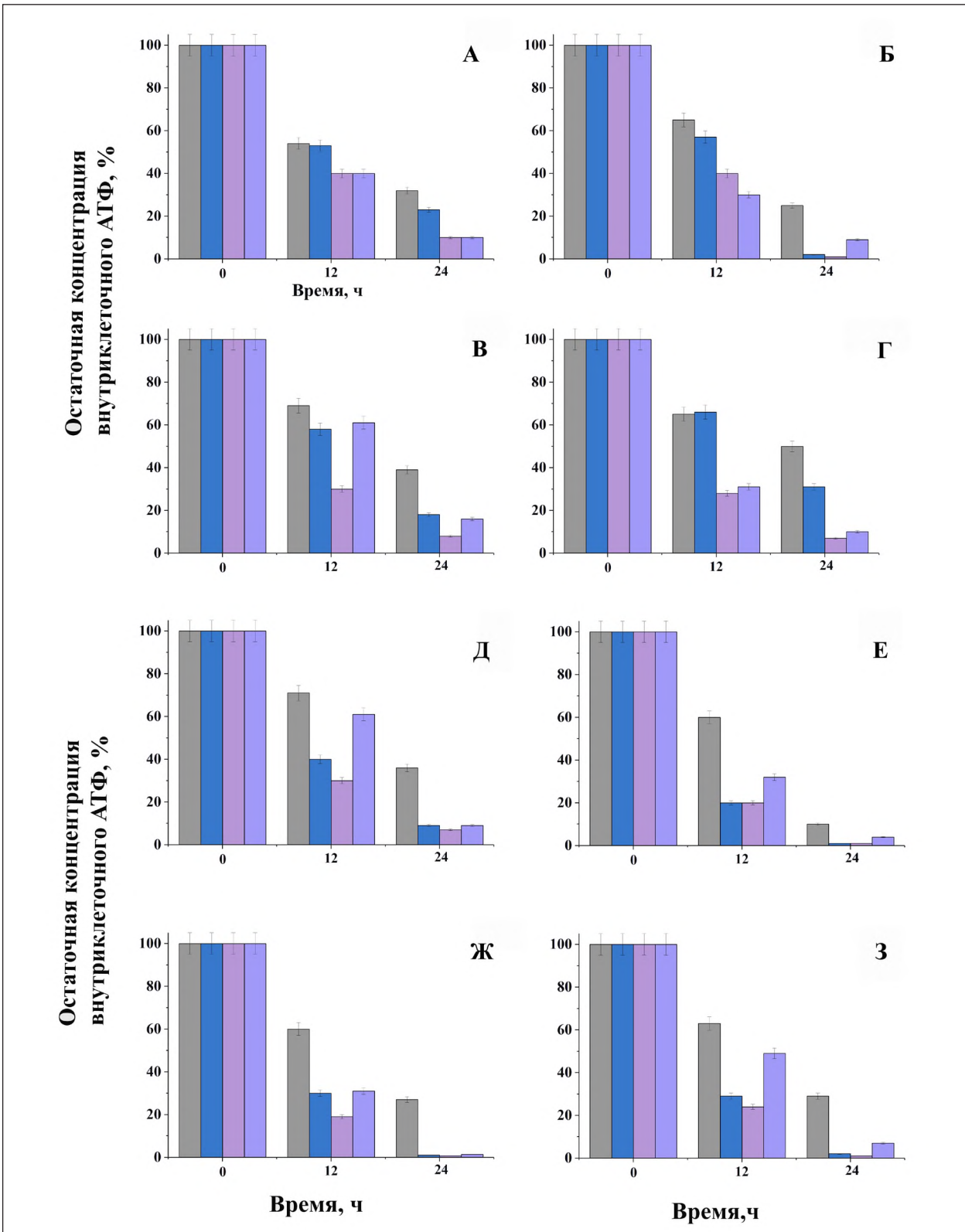


Рисунок 1 – Изменения концентрации АТФ в клетках бактерий *B. subtilis* (А, Б, В, Г) и *E. coli* (Д, Е, Ж, 3) при их экспонировании на различных волокнистых материалах: № 1.1 (А, Д), 2.1 (Б, Е), 5.4 (В, Ж) и 5.5 (Г, 3), обработанных карбоксилатом меди, наночастицами Та, образцами НЧ-His6-ОРН, полученными при pH 10,5, или их комбинациями. Концентрацию АТФ в клетках в начале эксперимента принимали за 100 %. Обозначения: ■ – контроль; ■ – наночастицы Та; ■ – наночастицы Та с НЧ-His₆-ОРН; ■ – карбоксилат Си и наночастицы Та с НЧ-His₆-ОРН (данные авторов)

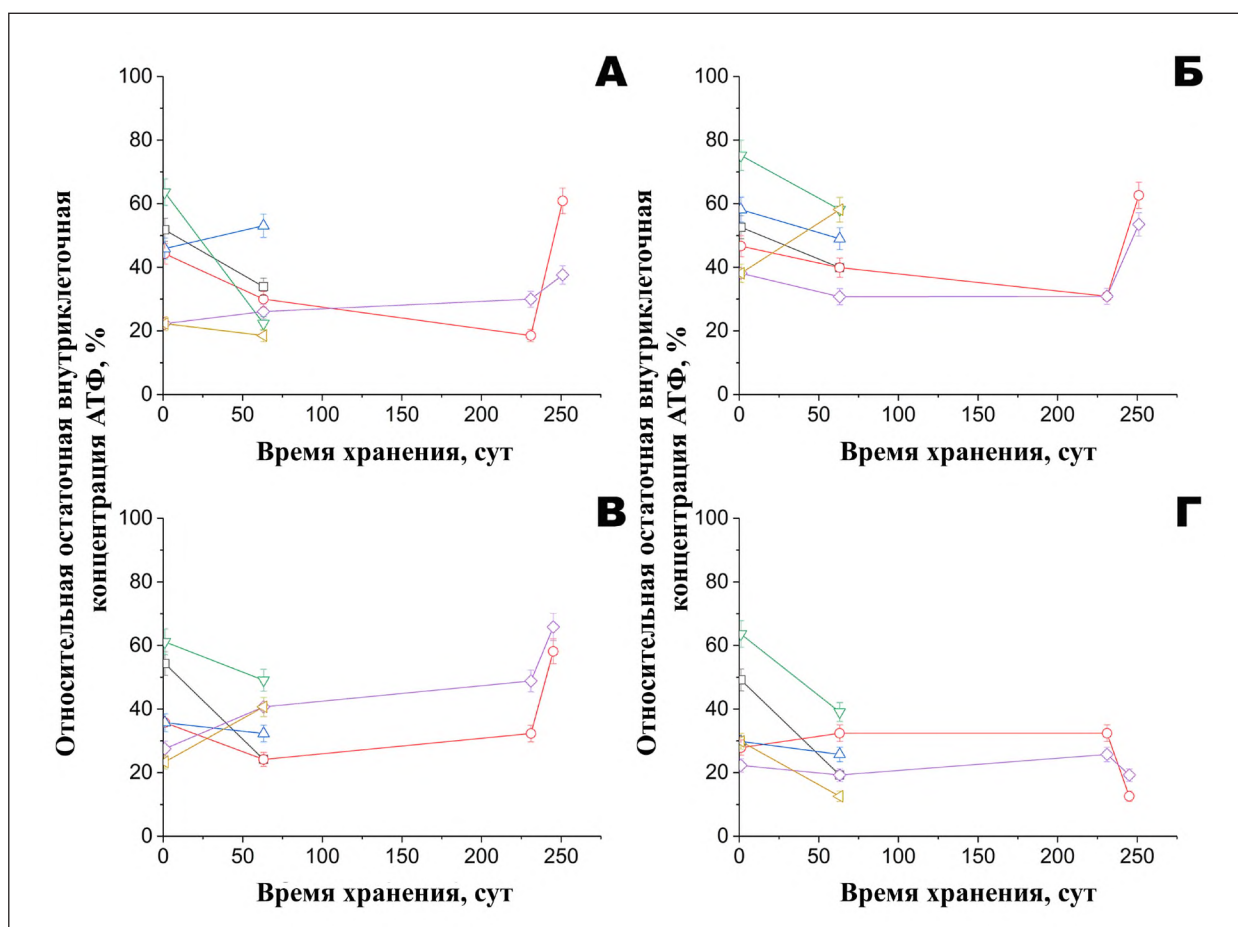


Рисунок 2 – Относительная остаточная концентрация АТФ в клетках бактерий *B. subtilis* через 1 сутки после их экспонирования на волокнистых материалах № 1.1 (А), 2.1 (Б), 5.4 (В), 5.5 (Г), модифицированных при pH 9.5 наночастицами Zn и Ta или их комбинациями с НЧ-His₆-ОРН или НЧ-ПЦА после их длительного хранения. Концентрацию АТФ в клетках, которые экспонировали на этих же материалах, обработанных только буфером без каких-либо наночастиц (т.е. контроль), принимали за 100 %. Обозначения: ▽ – наночастицы Zn, ▽ – наночастицы Zn вместе с НЧ-His₆-ОРН, ◇ – наночастицы Zn вместе с НЧ-ПЦА, □ – наночастицы Ta, ○ – наночастицы Ta вместе с НЧ-His₆-ОРН, △ – наночастицы Ta вместе с НЧ-ПЦА (данные авторов)

лась основная роль в биохимической детоксификации разных токсичных соединений (ФОС и микотоксинов), гидролиз которых для данного фермента хорошо изучен в разных средах [22, 23, 30–35].

Как и ранее для исследования бактерицидной активности, волокнистые материалы, функционализированные тремя модулями «Адгезионный», «Бактерицидный» и «Дегазирующий» («Биохимический»), содержащими карбоксилат Cu, наночастицы металла Ta и НЧ-His₆-ОРН, демонстрировали хорошее сохранение ферментативной активности. Так для материала № 5.4 остаточная ферментативная активность составляла 74 %, для материала № 2.1 – 60 %, а для материала № 5.5 – 33 %.

В случае использования наночастиц Zn вместо наночастиц Ta в «Бактерицидном» модуле активность фермента составляла от 30 до 40 % для материалов № 5.5, 5.4, 2.1 соответ-

ственно. Было установлено, что использование материалов № 5.5, 5.4, 2.1 является предпочтительным для максимизации активности фермента His₆-ОРН в отношении его субстратов.

Таким образом, проведенные исследования продемонстрировали возможность совмещения модулей, содержащих карбоксилаты металлов, наночастицы металлов и наночастицы стабилизированного фермента для множественной функционализации одного и того же волокнистого материала. При этом сами волокнистые материалы в результате последовательного нанесения на их поверхность модульных рецептур, содержащих металлические и ферментные наночастицы, приобретали биоцидные и противохимические защитные свойства.

Влияние типа фермента на комбинированное действие наночастиц металлов и ферментативных комплексов при функционализации волокнистых материалов. Для

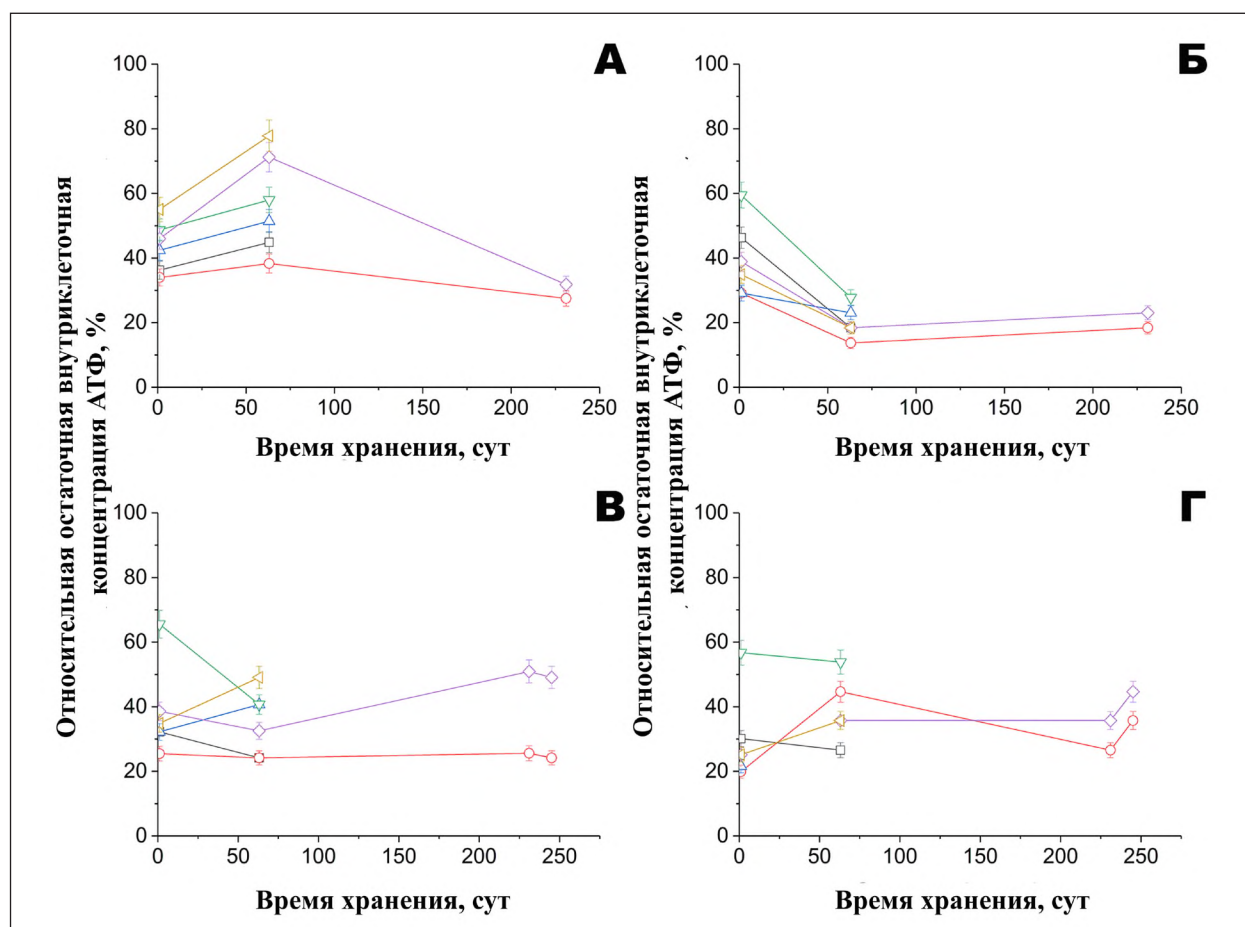


Рисунок 3 – Относительная остаточная концентрация АТФ в клетках бактерий *E. coli* через 1 сутки после их экспонирования на волокнистых материалах № 1.1 (А), 2.1 (Б), 5.4 (В), 5.5 (Г), модифицированных при pH 9.5 наночастицами Zn и Ta или их комбинациями с НЧ- His_6 -ОРН или НЧ-ПЦА после их длительного хранения. Концентрацию АТФ в клетках, которые экспонировали на этих же материалах, обработанных только буфером без каких-либо наночастиц (т.е. контроль), принимали за 100 %. Обозначения: ∇ – наночастицы Zn, $\triangle$ – наночастицы Zn вместе с НЧ- His_6 -ОРН, $\diamond$ – наночастицы Zn вместе с НЧ-ПЦА, $\square$ – наночастицы Ta, $\circ$ – наночастицы Ta вместе с НЧ- His_6 -ОРН, Δ – наночастицы Ta вместе с НЧ-ПЦА (данные авторов)

исследования возможного влияния типа фермента на комбинированное действие наночастиц металлов в составе функционализированного материала, на который также наносились наночастицы ферментного комплекса, кроме НЧ- His_6 -ОРН были использованы наночастицы ПЦА (НЧ-ПЦА), обладающие гидролитическим действием. Эти образцы после получения не были как-либо дополнительно изолированы для создания специальных и/или стерильных условий и хранились при 10 °С (до 251 сут). На примере функционализированных волокнистых материалов (№ 1.1, 2.1, 5.4 и 5.5) было показано (рисунки 2–3), что в большинстве случаев антибактериальная активность сохраняется (или даже улучшается) в течение, как минимум, 230 сут.

Как следует из полученных данных, наноконструкции ПЦА оказались менее стабильными по своим характеристикам при нанесении их

на материалы № 1.1, 5.4. по сравнению с наночастицами фермента His_6 -ОРН. Было установлено, что максимальной стабильностью и эффективностью действия в отношении клеток грамположительных и грамотрицательных бактерий обладали материалы, модифицированные наночастицами Ta и НЧ- His_6 -ОРН.

Таким образом, изучение комбинированного действия модулей самодезинфекции и химического самоочищения волокнистых материалов, обработанных модульными рецептурами, содержащими наноразмерные металлы и ферментные наноконструкции, показало, что ПЦА в составе применявшихся наночастиц фермент-полиэлектролитного комплекса оказалась менее стабильной по своим характеристикам при нанесении ее на материалы № 1.1 и 5.4.

Установление принципиальной возможности комбинирования металлосодержащих наночастиц, биоцидных веществ и фер-

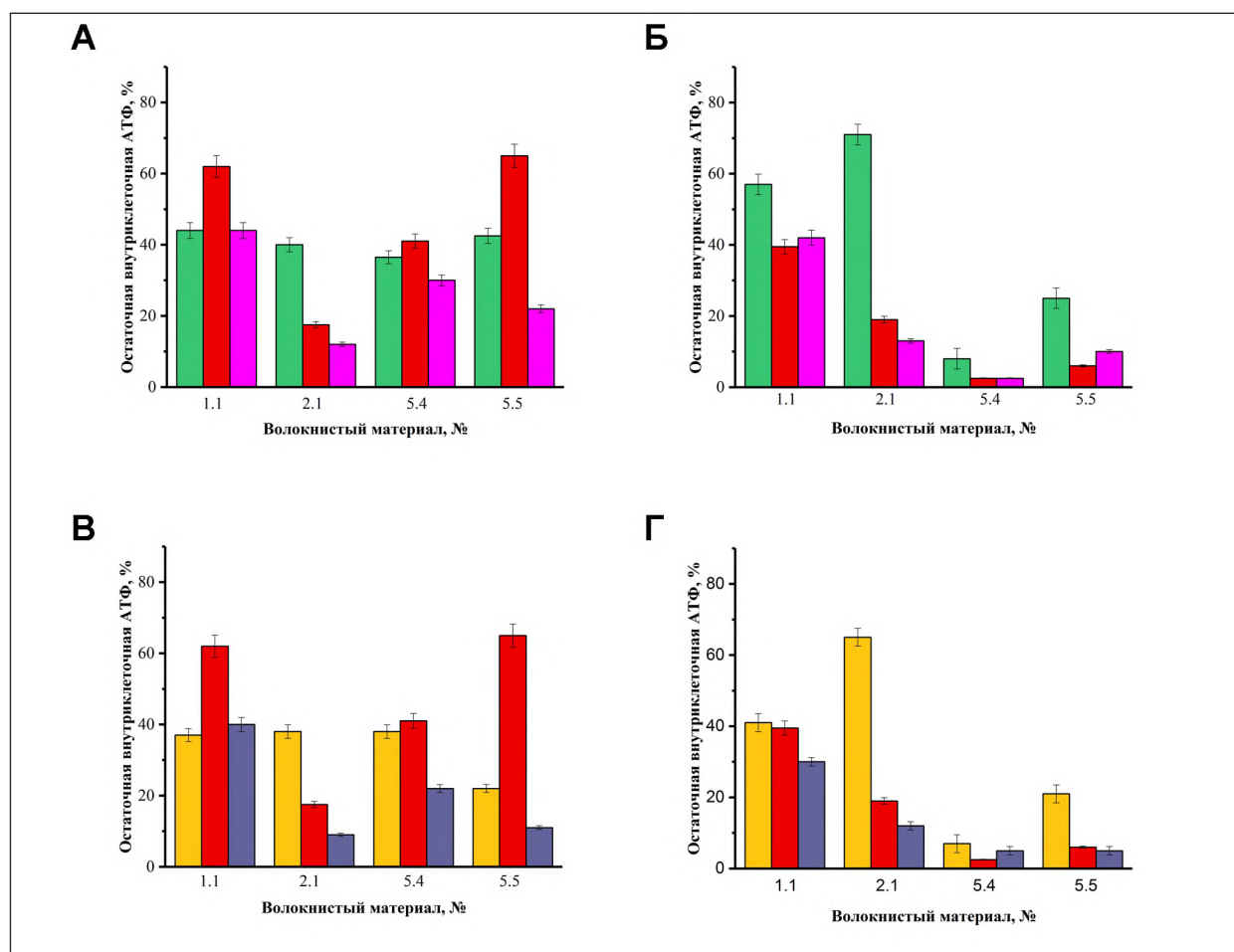


Рисунок 4 – Остаточная концентрация АТФ (%) в клетках бактерий *B. subtilis* (А,В) и *E. coli* (Б,Г) через 24 ч их экспонирования на волокнистых материалах № 1.1, 2.1, 5.4 и 5.5, обработанных наночастицами Zn (А, Б) или Ta (В, Г), образцами НЧ-His₆-ОРН, приготовленными при pH 10,5, или их комбинациями. Концентрацию АТФ в клетках, экспонированных на этих же материалах без обработки наночастицами (т.е. контроль), принимали за 100 %. Обозначения: ■ – наночастицы Zn, ■ – НЧ-His₆-ОРН, ■ – наночастицы Zn вместе с НЧ-His₆-ОРН, ■ – наночастицы Ta, ■ – наночастицы Ta вместе с НЧ-His₆-ОРН (данные авторов)

ментных нанокомплексов для множественной функционализации волокнистых материалов. Отобранные для функционализации волокнистые материалы № 1.1, 2.1, 5.4, 5.5 были модифицированы путем последовательного нанесения на их поверхность наночастиц Ta или Zn в этаноле. Далее был удален органический растворитель, который негативно влияет на активность фермента His₆-ОРН, и после этого нанесены фермент-полиэлектrolитные комплексы, полученные в оптимальных для них условиях (pH 10,5). Приготовленные в такой последовательности образцы функционализированных волокнистых материалов сравнивали по эффективности их бактерицидного действия с теми, что были модифицированы лишь наночастицами металлов (рисунок 4–5).

С течением времени на образцах самих волокнистых материалов № 1.1, 2.1, 5.4, 5.5 без их дополнительной модификации какими-либо

наночастицами наблюдалась частичная гибель клеток как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Однако функционализация исследуемых материалов наночастицами и, в особенности, комбинацией наночастиц металлов и ферментных полиэлектролитных комплексов значительно ускоряла элиминирование клеток микроорганизмов вплоть до полного их уничтожения.

Максимальная степень элиминирования клеток наблюдалась в случае материалов № 2.1, 5.4, 5.5, функционализированных комбинацией наночастиц металла Ta с НЧ-His₆-ОРН или НЧ-ПЦА.

В отличие от His₆-ОРН, оптимум действия ПЦА смещен к нейтральным значениям pH, поэтому для сравнения этих ферментов было использовано pH 9,5, соответствующее среднему значению pH между оптимумами действия ферментов, выбранных для этой работы.

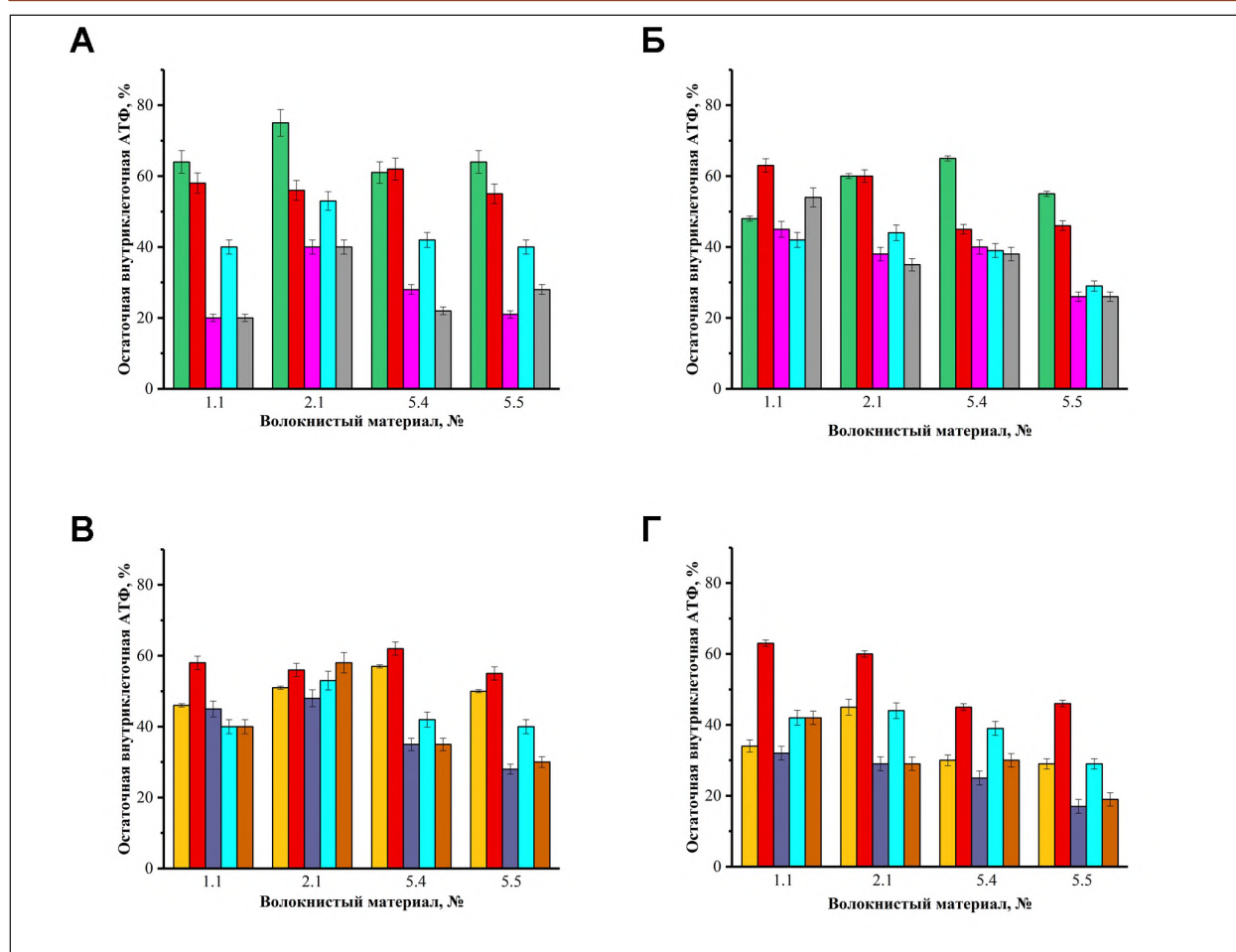


Рисунок 5 – Остаточная концентрация АТФ (%) в клетках бактерий *B. subtilis* (А, В) и *E. coli* (Б, Г) через 24 ч их экспонирования на волокнистых материалах № 1.1, 2.1, 5.4 и 5.5, обработанных наночастицами Zn (А, Б) или Ta (В, Г), образцами НЧ-His₆-ОРН или НЧ-ПЦА, полученными при рН 9,5, или их комбинациями. Концентрацию АТФ в клетках, экспонированных на этих же материалах, обработанных только буферным раствором (т.е. контроль), принимали за 100 %. Обозначения: ■ – наночастицы Zn, ■ – НЧ-ПЦА, ■ – наночастицы Zn вместе с НЧ-ПЦА, ■ – НЧ-His₆-ОРН, ■ – наночастицы Zn вместе с НЧ-His₆-ОРН, ■ – наночастицы Ta, ■ – наночастицы Ta вместе с НЧ-ПЦА, ■ – наночастицы Ta вместе с НЧ-His₆-ОРН (данные авторов)

При снижении рН от 10,5 до 9,5 (рисунок 5) комбинированная функционализация волокнистых материалов наночастицами металлов и ферментных комплексов также показала улучшенную эффективность бактерицидного действия в сравнении с другими вариантами обработки. Однако при этом значении рН уже не удалось достичь полного элиминирования клеток к 24 часу.

Следует отметить, что волокнистые материалы, совместно функционализированные наночастицами металлов и ферментов (НЧ-ПЦА или НЧ-His₆-ОРН), демонстрировали практически одинаковую степень элиминирования клеток, но при этом наночастицы Ta оказались чуть более эффективными в своем действии по отношению к клеткам *E. coli*, а наночастицы Zn – по отношению к клеткам *B. subtilis*. Также были выявлены различия в зависимости по-

лучаемого эффекта от использованного типа волокнистого материала. В частности, материалы № 2.1, 5.4 и 5.5 были более эффективны в своем антибактериальном действии в отношении клеток *E. coli*, а материалы № 1.1, 5.4 и 5.5 – в отношении клеток *B. subtilis*. Таким образом, материалы № 5.4 и 5.5 проявляли более универсальный антимикробный эффект при рН 9,5.

Что касается каталитической активности, проявляемой наночастицами ферментных комплексов, то наблюдалась зависимость остаточной активности преимущественно от типа используемого волокнистого материала в полном соответствии с ранее полученными результатами. Так, использование материалов № 2.1, 5.4 и 5.5 было предпочтительнее для максимизации активности, проявляемой в отношении параоксона.

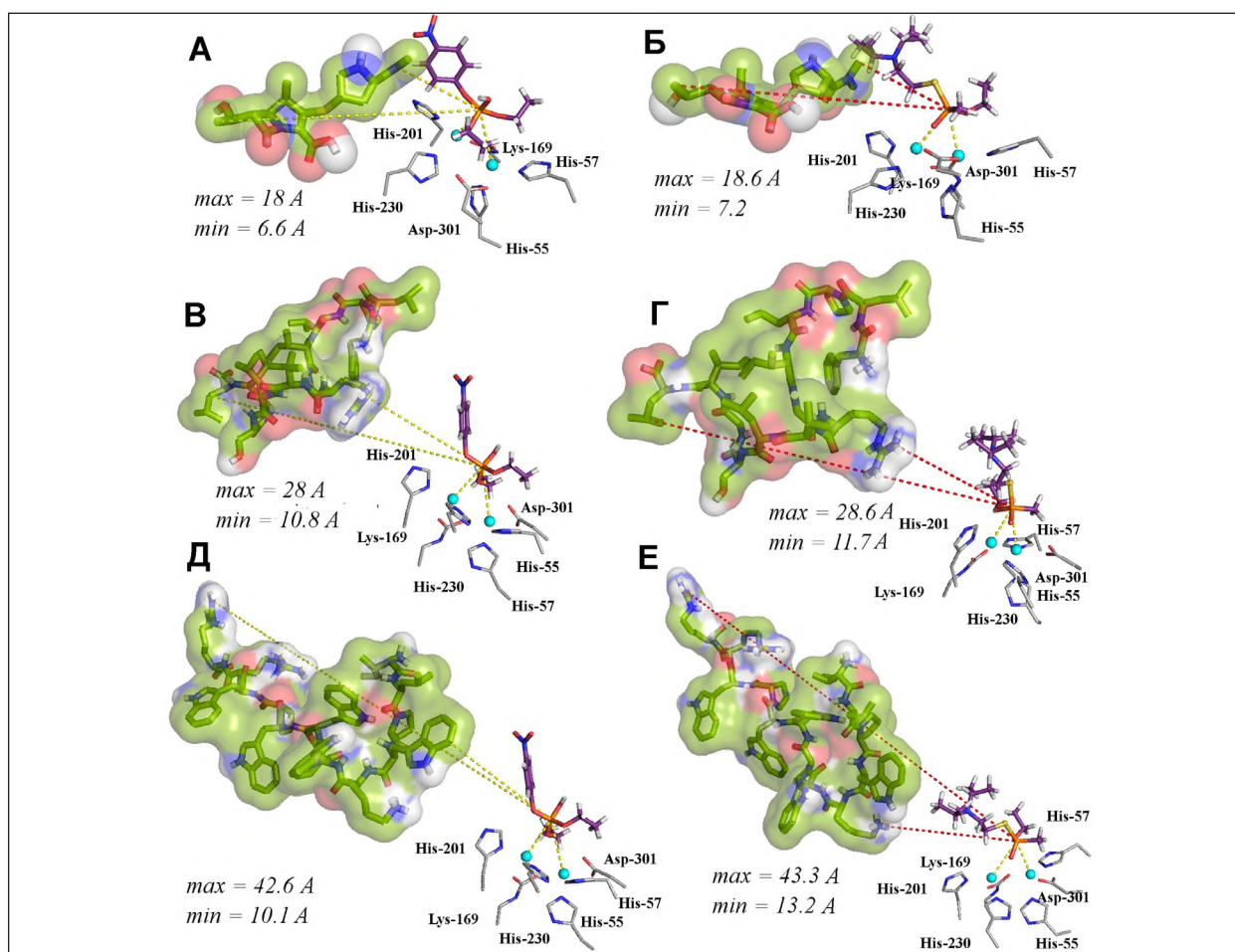


Рисунок 6 – Модели молекулярного взаимодействия параоксона (А, В, Д) и вещества ви-икс (Б, Г, Е) с активным центром фермента His₆-ОРН при pH 7,5 в присутствии меропенема (А, Б), темпорина А (В, Г), и индолицидина (Д, Е). Молекулы ФОС представлены фиолетовым цветом, антибиотики – зеленым. Ключевые аминокислотные остатки активного центра и ионы Co²⁺ окрашены в серый и голубой цвет соответственно.

Максимальное (max) и минимальное (min) расстояние от молекулы ФОС до молекулы антибиотика указано в ангстремах (Å) (данные авторов)

Как и ранее было установлено для проявления бактерицидной активности, волокнистые материалы, совместно функционализированные наночастицами Та и НЧ-His₆-ОРН, демонстрировали наилучшее сохранение ферментативной активности почти до 74 % в случае материала № 5.4. Наночастицы при этом не предотвращали элюирования фермента из материала. Необходимо отметить, что наиболее стабильными оказались образцы на основе материала № 2.1, не зависимо от того, какие наночастицы были использованы для его функционализации.

Таким образом, была продемонстрирована принципиальная возможность комбинирования металлсодержащих наночастиц и ферментных нанокомплексов для множественной модификации одного и того же волокнистого материала. Были установлены условия, позволяющие повысить эффективность реализации

примененного подхода к функционализации материалов, и выявлены основные факторы, определяющие эффективность такой одновременной модификации.

Определение возможности функционализации волокнистых материалов наноразмерными ферментными препаратами в комбинации с низкомолекулярными антибиотиками. Для определения возможности проведения функционализации волокнистых материалов наноразмерными ферментными препаратами в комбинации с антибиотиками, которые использовались для придания материалам биоцидных свойств, были проведены исследования по проверке работы ферментов His₆-ОРН и ПЦА в комбинации с биоцидными веществами, которые использовали вместо металлсодержащих наночастиц. Предварительно была проведена оценка возможных межмолекулярных взаимодействий антибиотиков с

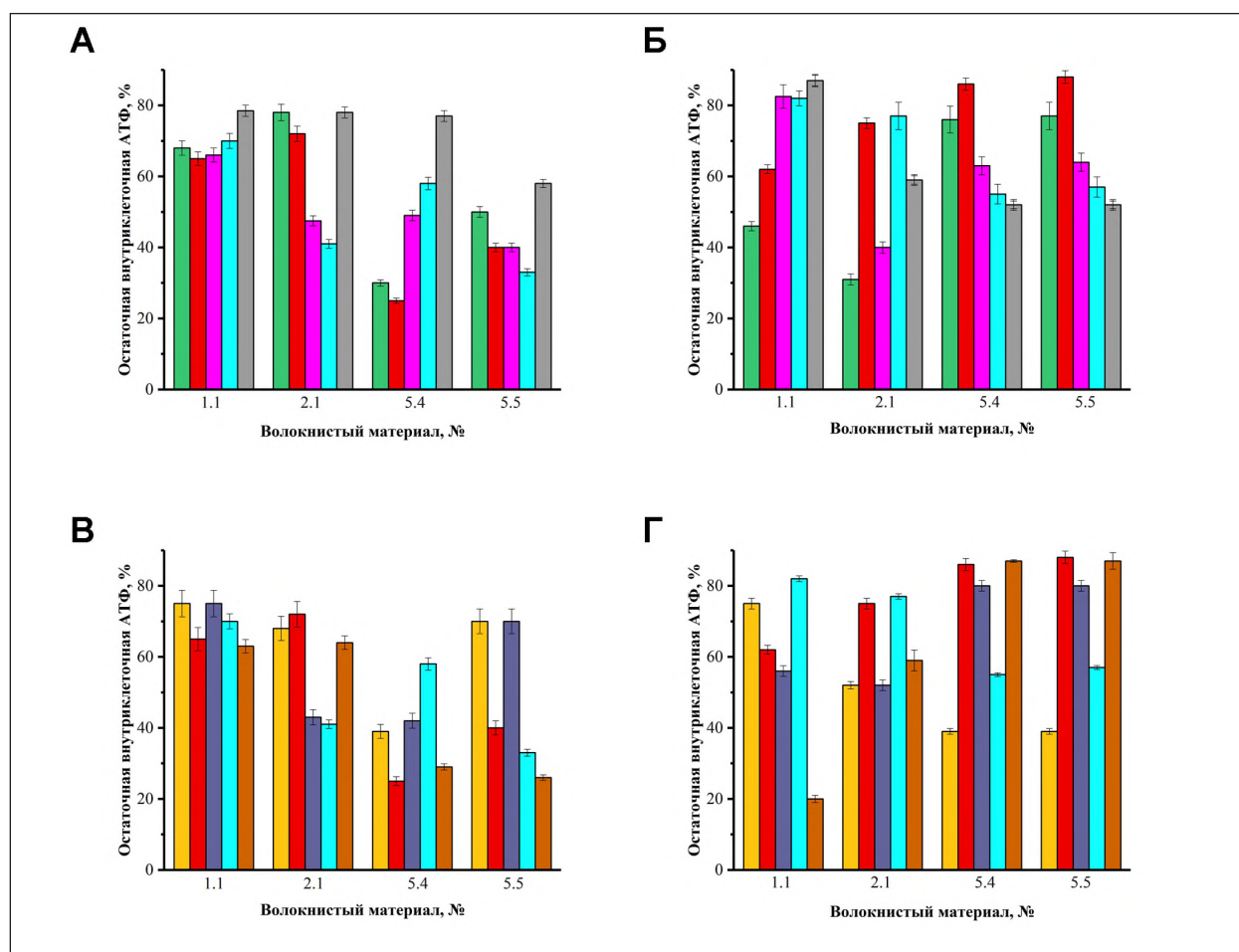


Рисунок 7 – Остаточная концентрация АТФ (%) в клетках бактерий *B. subtilis* (А, В) и *E. coli* (Б, Г) через 24 ч их экспонирования на волокнистых материалах № 1.1, 2.1, 5.4 и 5.5, обработанных полимиксином В (А, Б) или полимиксином Е (В, Г), образцами НЧ-His₆-ОРН или НЧ-ПЦА, сформированными при pH 7,4, или их комбинациями. Концентрацию АТФ в клетках, экспонированных на этих же материалах, обработанных только буфером (т.е. контроль), принимали за 100 %. Обозначения: ■ – полимиксин В, ■ – НЧ-ПЦА, ■ – НЧ-His₆-ОРН, ■ – полимиксин В вместе с пенициллинацелазой/ПГК₅₀, ■ – полимиксин В вместе с НЧ-His₆-ОРН, ■ – полимиксин Е, ■ – полимиксин Е вместе с НЧ-ПЦА, ■ – полимиксин Е вместе с НЧ-His₆-ОРН (данные авторов)

ферментом методом компьютерного моделирования (молекулярного докинга).

Надо отметить, что ранее в ряде работ [23, 26–28] уже было проведено аналогичное исследование с использованием компьютерного моделирования полиэлектролитных комплексов ферментов (His₆-ОРН и ПЦА) с разными широко применяемыми антибиотиками и антимикробными пептидами. Круг потенциальных соединений, способных стать хорошими партнерами для данных ферментов в комбинированных препаратах в принципе был установлен. Однако не исследованным оставалось влияние образующихся наноккомплексов антибиотиков с ферментами на взаимодействие последних с их обычными субстратами, в частности, в случае фермента His₆-ОРН такими субстратами представлялись молекулы ФОС. В этой

связи было проведено компьютерное моделирование взаимодействий параоксона и вещества ви-икс с активным центром His₆-ОРН в присутствии ряда антибиотиков (меропенема, индолицидина и темпорина А). На рисунке 6 представлены полученные модели межмолекулярных взаимодействий разных ФОС (параоксона и вещества ви-икс) с активным центром His₆-ОРН при pH 7,5 в присутствии указанных антибиотиков.

Было показано, что вероятность реального присутствия антибиотиков и молекул ФОС в активном центре His₆-ОРН при их одновременном появлении в среде с ферментом крайне низка. В этой связи конкурентный тип ингибирования фермента такими антибиотиками при катализе гидролиза ФОС может быть полностью исключен. Наименьшее влияние на активность фермента в отношении обоих иссле-

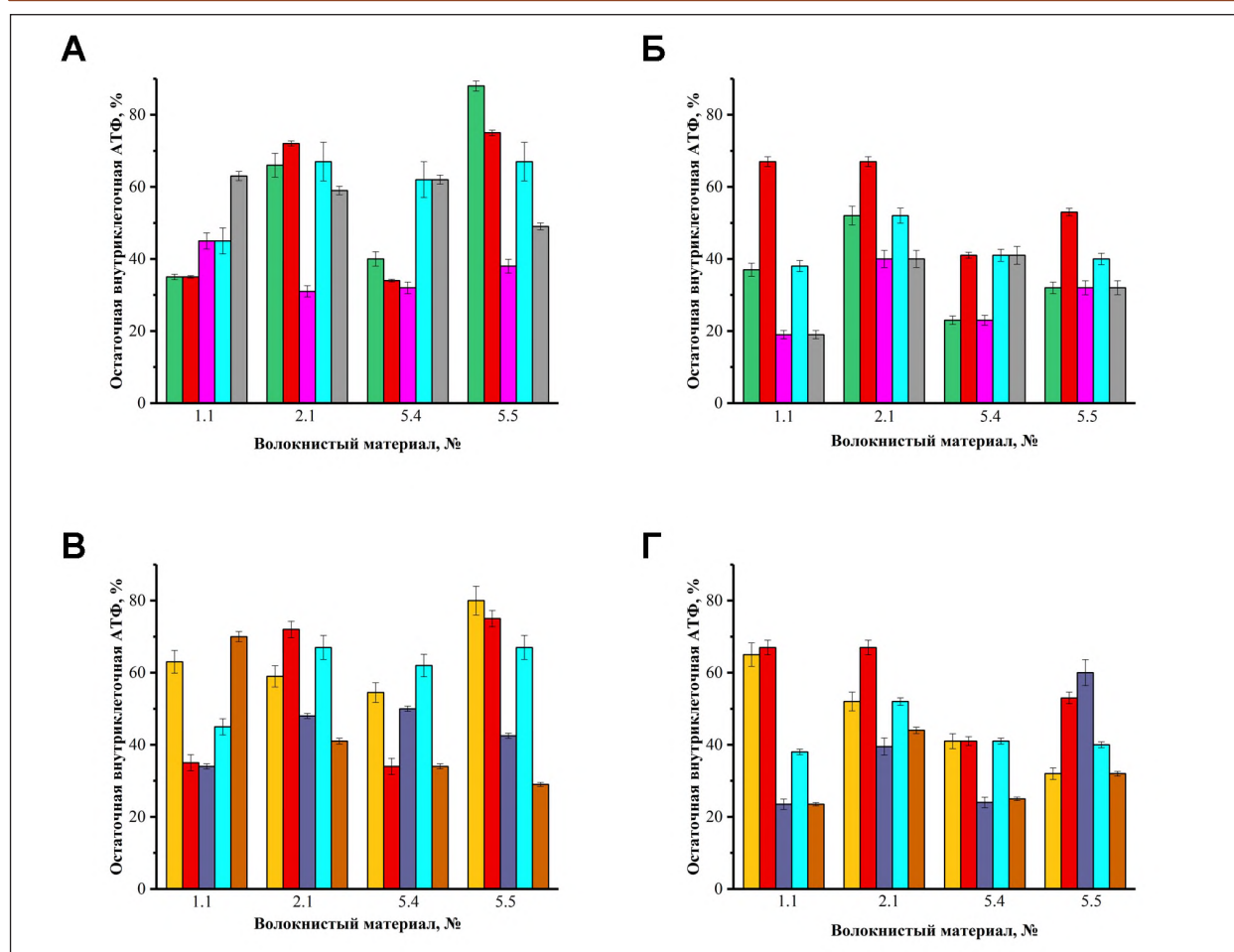


Рисунок 8 – Остаточная концентрация АТФ (%) в клетках бактерий *B. subtilis* (А, В) и *E. coli* (Б, Г) через 24 ч их экспонирования на волокнистых материалах № 1.1, 2.1, 5.4 и 5.5, обработанных полимиксином В (А, Б) или полимиксином Е (В, Г), образцами НЧ- His_6 -ОРН или НЧ-ПЦА, сформированными при pH 9,5, или их комбинациями. Концентрацию АТФ в клетках, экспонированных на этих же материалах, обработанных только буфером (т.е. контроль), принимали за 100 %. Обозначения: ■ – полимиксин В, ■ – НЧ-ПЦА, ■ – НЧ- His_6 -ОРН, ■ – полимиксин В вместе с пенициллинацелазой/ПГК₅₀, ■ – полимиксин В вместе с НЧ- His_6 -ОРН, ■ – полимиксин Е, ■ – полимиксин Е вместе с НЧ-ПЦА, ■ – полимиксин Е вместе с НЧ- His_6 -ОРН (данные авторов)

дованных ФОС было отмечено для меропенема (т.е. самого компактного из антибиотиков).

Для проведения дальнейших исследований были использованы более «массивные» антимикробные агенты, такие как, например, колистин (полимиксин Е) и полимиксин В [27], которые не должны были мешать катализу. К тому же они проявили себя наилучшим образом по уровню антибактериальной активности в сравнении с индолицидином и темпорином А. Поэтому далее материалы № 1.1, 2.1, 5.4 и 5.5 были последовательно функционализированы отобранными антибиотиками, а затем и ферментными наноконструкциями.

В отличие от наночастиц Zn и Ta, растворенных в этаноле и использованных для комбинированного действия с ферментными на-

нокомплексами, растворы полимиксинов были приготовлены в воде или в том же буфере, что и ферменты. Поэтому эти растворы наносились одновременно с ферментами (впоследствии различий от последовательной или одновременной функционализации такими комбинациями выявить не удалось).

Была исследована антибактериальная активность полученных функционализированных волокнистых материалов. Результаты представлены на рисунках 7, 8. Как видно из представленных графиков, структура волокнистых материалов существенно влияла на эффективность действия комбинированных препаратов полимиксинов с наноконструкциями ферментов.

Образцы НЧ- His_6 -ОРН, сформированные при pH 7,4, занимали промежуточное поло-

Таблица 1 – Результаты молекулярного докинга антимикробных веществ к поверхности димерной молекулы фермента His₆-ОРН (данные авторов)

Антимикробное вещество	рН	Аффинность взаимодействия молекул, кДж/моль	Площадь поверхности димера фермента, занимаемая антимикробным веществом, %	
			Возле активного центра фермента	По всей поверхности димера
Даптомицин	7,5	-30,0±0,8	0,4	11,9
	10,5	-27,6±0,9	0,4	12,0
Лактоферрицин	7,5	-26,8±2,1	0,2	18,3
	10,5	-27,6±2,1	0,2	19,7
Бацитрацин	7,5	-24,3±1,2	0,1	11,4
	10,5	-27,2±1,2	0,1	14,2

жение, хотя для них и было выявлено некоторое предпочтение в использовании волокнистого материала № 2.1, а также полимиксина В в качестве наносимого антибактериального агента.

Из рисунка 8 следует, что при увеличении рН до 9,5 комбинирование полимиксина В с образцами НЧ-His₆-ОРН проявляла биоцидные свойства по отношению к клеткам бактерий как *B. subtilis*, так и *E. coli* не зависимо от используемого волокнистого материала.

Образцы НЧ-ПЦА демонстрировали сопоставимую бактерицидную эффективность действия лишь в комбинации с колистином (на материалах № 2.1, 5.4, 5.5 по отношению к клеткам *B. subtilis* и на материалах № 1.1, 2.1, 5.5 по отношению к клеткам *E. coli*) и гораздо реже с полимиксином В (на материалах № 1.1, 2.1, 5.5 в отношении клеток *E. coli*).

В дополнение к описанным выше экспериментам по использованию антибиотиков одновременно с наноразмерными ферментными комплексами были проведены исследования с антимикробными пептидами, которые включали в наноконструкции с His₆-ОРН вместо полиглутаминовой кислоты, использовавшейся в предыдущих экспериментах для получения НЧ-His₆-ОРН. Был изучен ряд антимикробных пептидов *in silico*, которые, могли представлять интерес для их введения в волокнистые материалы, с точки зрения возможности расширения спектра функционализированных материалов с антимикробным действием (таблица 1).

Для комбинирования с ферментом были исследованы бацитрацин, лактоферрицин, даптомицин. Все эти антимикробные агенты представляют собой циклические полипептиды, обладают ярко выраженной биоцидной активностью в отношении бактериальных клеток, а в случае бацитрацина еще и к клеткам дрожжей, архей и к спорам мицелиальных грибов (аскомицетам) [35–37].

Согласно данным, полученным при рН 7,5 и 10,5, было установлено, что эти антимикробные агенты могут взаимодействовать с поверхностью димерной молекулы His₆-ОРН, при этом

уровень энергии связывания свидетельствует в пользу того, что такое нековалентное взаимодействие может быть достаточно прочным. Следует отметить, что все исследованные антимикробные пептиды минимально перекрывали область активного центра, особенно бацитрацин, и это должно было способствовать сохранению ферментом его каталитических характеристик.

Последующие эксперименты по определению каталитических характеристик приготовленных ферментных комплексов His₆-ОРН на примере бацитрацина полностью подтвердили выводы, сделанные на основе данных компьютерного молекулярного докинга: величины константы Михаэлиса (Km) и константы эффективности каталитического действия (Vmax/Eo), выявленные для His₆-ОРН в присутствии антимикробного вещества, практически не изменились [37] в сравнении с характеристиками, установленными в реакциях, где бацитрацин отсутствовал.

Добавление в реакционную среду с His₆-ОРН и бацитрацином наночастиц Та никак не отражалось на активности фермента, тогда как в случае наночастиц Zn ферментативная активность снижалась почти на 15 %. В этой связи далее были исследованы комбинации His₆-ОРН, бацитрацина и наночастиц Та.

Антимикробная активность полученных нековалентных комплексов His₆-ОРН с бацитрацином в присутствии и в отсутствии наночастиц Та была наибольшей в отношении клеток дрожжей (*Candida* sp., *Saccharomyces cerevisiae*) и приводила к их полной гибели [37]. Вместе с тем, была установлена антибактериальная и противогрибковая активность (в отношении спор мицелиальных грибов рода *Penicillium* и *Aspergillus*), при полном сравнении ферментативной активности в реакциях детоксификации различных ФОС и микотоксинов. Ключевую роль в таких эффектах могли бы сыграть сочетания антимикробных агентов и аддитивно функционирующими с ними наночастицами металлов.

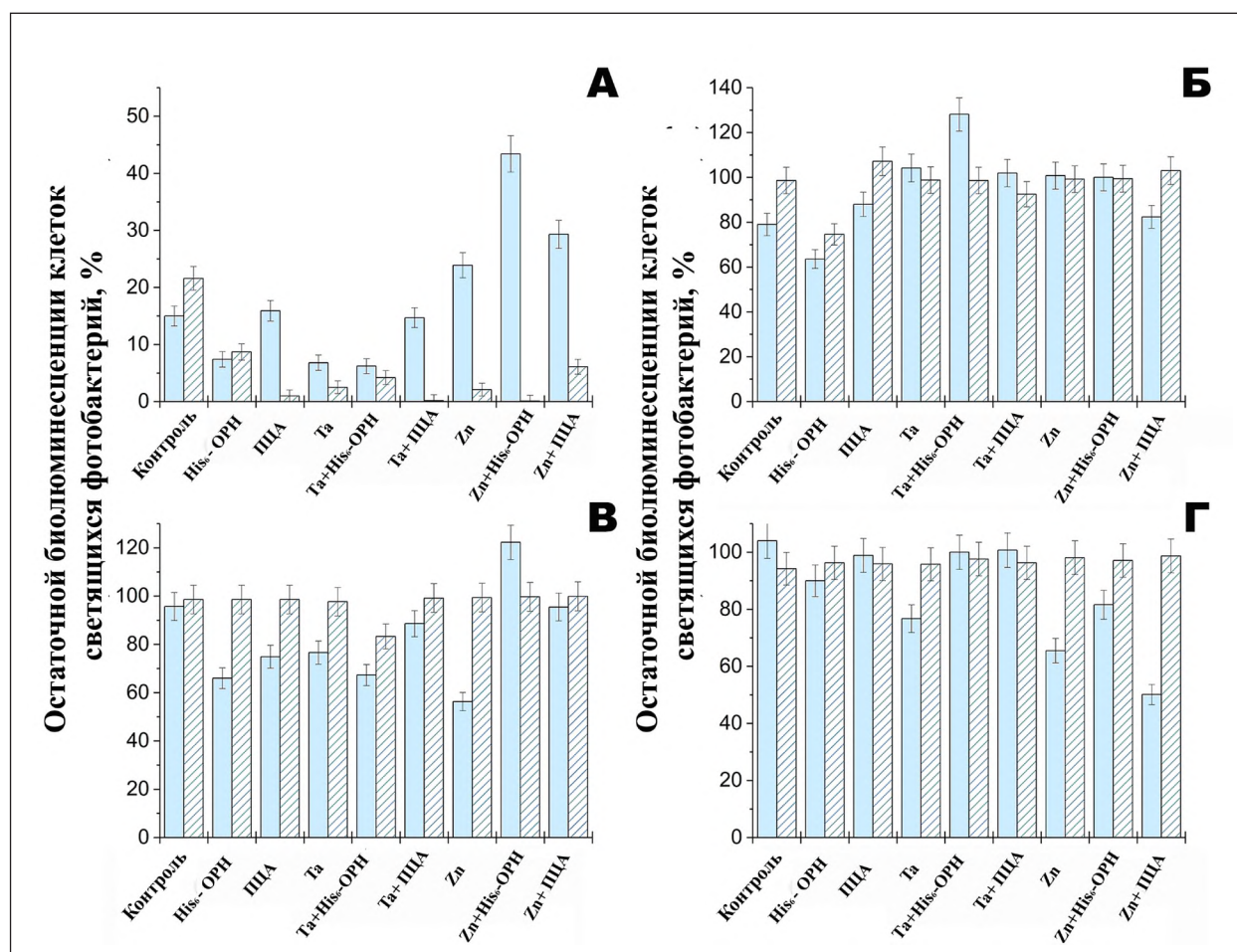


Рисунок 9 – Определение остаточной биолуминесценции клеток светящихся фотобактерий *Photobacterium* sp. 9.2, иммобилизованных в криогель ПВС, после их экспонирования с элюатом из волокнистых материалов № 1.1 (А), 2.1 (Б), 5.4 (В) и 5.5 (Г), функционализированных наночастицами Ta или Zn, наночастицами ферментных комплексов (His₆-ОРН или ПЦА) или их комбинациями. Комплексы ферментов готовили в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4, столбцы без штриховки) или в карбонатном буфере (рН 9,5, столбцы заштрихованы), аналогичные буферы наносили на необработанные материалы в качестве контроля. Величину биолуминесценции клеток до их контакта с элюатом принимали за 100 %. За время анализа контрольные образцы в физрастворе (т.е. без контакта с каким-либо материалом) полностью сохраняли свою биолуминесценцию (данные авторов)

Таким образом, для приобретения антимикробных свойств волокнистые материалы могут быть функционализированы не только комбинацией наночастиц металлов с ферментными препаратами, но и комбинацией классических антибиотиков и антимикробных пептидов с ферментами.

Оценка биотоксических свойств модифицированных волокнистых материалов, обладающих самодезинфицирующими и самоочищающими свойствами за счет комбинированного действия наночастиц металлов и наноразмерных ферментных комплексов. Были проведены исследования по оценке ингибиторной способности элюатов с волокнистых материалов, функционализированных карбоксилатами металлов, наночастицами

металлов и ферментными нанокомплексами в отношении индивидуальных чувствительных ферментов. В качестве таких ферментов были использованы люцифераза светляков, ацетил- и бутирилхолинэстераза (из электрического угря и сыворотки крови лошади соответственно). Ни в одном из исследованных случаев не было установлено ингибирования ферментативной активности. Кроме этого, была использована еще одна чувствительная к экотоксикантам биосистема, используемая широко в мире, основанная на применении светящихся фотобактерий *Photobacterium* sp. 9.2, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта [24]. Было показано, что предел обнаружения для наночастиц Ta и Zn при использовании такой биоана-

литической системы составляет 10 и 150 нг/мл соответственно [8, 9].

Анализ элюатов из функционализированных материалов показал (рисунок 9), что волокнистый материал № 1.1 сам по себе обладает определенной экотоксичностью, которая повышается при его функционализации наночастицами металлов, ферментных комплексов или их комбинациями (за исключением образцов, полученных при pH 7,4 с использованием НЧ-ПЦА или наночастиц Та совместно с НЧ-ПЦА, или всех трех вариантов с наночастицами Zn).

Используя указанный метод, были проанализированы образцы волокнистых материалов № 2.1, 5.4, 5.5, функционализированные наночастицами разных металлов, наночастицами ферментных комплексов или их комбинациями.

Волокнистый материал № 2.1 хотя и в гораздо меньшей степени, но тоже проявлял некоторую токсичность при обработке буфером с pH 7,4. Эта собственная токсичность материала № 2.1 хотя может быть нивелирована функционализацией его при pH 9,5 или привлечением при любой обработке наночастиц (за исключением варианта обработки при pH 7,4 с наночастицами Zn совместно с НЧ-ПЦА).

У материала № 5.4 не было зафиксировано собственной токсичности. Однако его функционализация при pH 7,4 самими ферментами, любыми вариантами с наночастицами Та или Zn приводила к возникновению токсического эффекта. Только единственный случай стимулирования токсичности при pH 9,5 для этого материала был обнаружен при его функционализации наночастицами Та совместно с НЧ-His₆-ОРН.

Материал № 5.5, как и 5.4 не обладал токсичностью при pH 9,5, но таковая возникала после функционализации при pH 7,4 только наночастицами Та или с наночастицами Zn.

Таким образом, на основании проведенных исследований по оценке физиолого-гигиенических свойств самодегазирующих и самоочищающихся волокнистых материалов можно заключить, что образцы волокнистых материалов № 2.1, 5.4, 5.5, функционализированные наночастицами металлов, ферментами или их комбинациями были нетоксичны при их получении именно при pH 9,5. Степень элюирования металлических наночастиц с волокнистых материалов № 5.4 и 5.5 при pH 7,4 составила менее 20 и 50 % от нанесенного количества в случае наночастиц Та и Zn соответственно. Эти потери полностью или частично исключались за счет введения ферментов, что в пользу про-

ведения комбинированной модификации волокнистых материалов.

Выявленная токсичность материала № 1.1 может отчасти объяснять его антибактериальную активность (за исключением клеток *E. coli*, которым этот материал «нравился», и они лучше удерживались в нем, сохраняя более высокие уровни АТФ), а также инактивирующее действие в отношении His₆-ОРН и комплексов на основе этого фермента.

Проведенные исследования самодегазирующих и самоочищающихся волокнистых материалов позволили заключить, что образцы волокнистых материалов № 2.1, 5.4, 5.5, функционализированные наночастицами металлов, ферментами или их комбинациями не могут оказывать негативное физиолого-гигиеническое воздействие на организм человека при использовании защитных костюмов, изготовленных из данных материалов. При этом лучшие результаты могут быть получены при комбинировании наночастиц биологически инертного тантала и стабилизированного фермента в полиэлектrolитном комплексе, который, как установлено, не вызывает негативных иммунных реакций человека даже при попадании их в кровоток [22].

Заключение

Проведенные исследования продемонстрировали возможность комбинирования модулей, содержащих карбоксилаты металлов, наночастицы металлов и ферментные наноконплексы для множественной функционализации одних и тех же волокнистых материалов, которые приобретали биоцидные и противохимические защитные свойства. Изучение комбинированного действия модулей самодезинфекции и химического самоочищения волокнистых материалов, обработанных модульными рецептурами, содержащими наноразмерные металлы и ферментные наноконплексы, показало, что наноразмерные комплексы фермента ПЦА оказались менее стабильными по своим характеристикам, при нанесении их на материалы № 1.1, 5.4 по сравнению с наноконплексами His₆-ОРН. Установлено, что максимальной стабильностью и эффективностью действия в отношении клеток как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий обладали материалы, функционализированные наночастицами Та и наночастицами полиэлектrolитного комплекса фермента His₆-ОРН.

Продемонстрирована возможность комбинирования металлсодержащих наночастиц и ферментных наноконплексов для множественной функционализации одного и того же волокнистого материала, который приобретает свойства самоочищения (нейтрализации ФОС, микотоксинов) и самодезинфекции (бактери-

цидности). Подобраны условия для повышения эффективности реализации такого подхода и определены факторы, определяющие эффективность такой одновременной модификации.

Установлена зависимость остаточной ферментной активности преимущественно от типа используемого волокнистого материала.

Проведены исследования по проверке активности ферментов His₆-ОРН и ПЦА в комбинации с другими биоцидными веществами – антибиотиками, вместо металлсодержащих наночастиц.

Для приобретения антимикробных свойств волокнистые материалы могут быть функционализированы не только комбинацией наночастиц металлов с ферментными препаратами, но и комбинацией низкомолекулярных антибиотиков с ферментами.

Добавление в реакционную среду с ферментом и антибиотиком (бацитрацином) наночастиц Та никак не отразилось на активности фермента His₆-ОРН, тогда как в случае наночастиц Zn активность снижалась почти на 15 %.

С точки зрения дальнейшего практического применения, функционализация наночастицами металлов имеет ряд следующих преимуществ по сравнению с антибиотиками в качестве основного компонента биоцидной рецептуры:

- количество наночастиц Zn и Та необходимо наносить в 5,6 и 21,7 раз меньше для достижения той же эффективности в сравнении с полимиксинами; поверхностная дозировка наночастиц Та составляет менее 5 мг/м² и позволяет в определенных условиях полностью элиминировать в течение 24 ч бактериальную, дрожжевую и споровую мицелиальную грибную контаминацию;

- полимиксины, исследованные в работе, все же являются медицинскими терапевтическими препаратами, а поэтому их применение для функционализации волокнистых материалов может дополнительно стимулировать ускорение развития антибиотикорезистентности к ним у микроорганизмов окружающей среды, в то время как использование сочетания наночастиц ферментных препаратов с наночастицами металлов гарантируют отсутствие развития такой резистентности;

- наночастицы металлов имеют разное биологическое значение, с точки зрения возможности их воздействия на метаболизм клеток и их ферменты, и поэтому более предпочтительным является применение именно наночастиц Та, проявляющих большую инертность по отношению к клеткам тела человека.

Оценка физиолого-гигиенических свойств самодегатирующихся и самоочищающихся волокнистых материалов позволила заключить, что образцы исследованных волокнистых материалов № 2.1, 5.4, 5.5, функционализированные наночастицами металлов, ферментами или их комбинациями не могут оказывать негативного физиолого-гигиенического воздействия на организм человека при использовании защитных костюмов, изготовленных из данных материалов. Лучшие результаты таких материалов могут быть получены при комбинировании наночастиц биологически инертного Та и стабилизированного фермента в полиэлектrolитном комплексе, который, не вызывает негативных иммунных реакций человека даже при попадании их в кровоток.

Вклад авторов / Authors Contribution

Все авторы внесли свой вклад в концепцию рукописи, участвовали в обсуждении и написании этой рукописи, одобрили окончательную версию. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи. / All authors contributed to the conception of the manuscript, the discussion, and writing of this manuscript, approved the final version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-29-17069).

Список источников/References

1. Завьялов В.В., Кужелко С.В., Завьялова Н.В. и др. Современные направления создания новых защитных материалов и тканей для средств индивидуальной и коллективной защиты от токсичных химика-

тов и клеток патогенов // Вестник войск ПХБ защиты. 2019. Т. 3. № 3. С. 217–254. EDN: DEOJVF.
<https://doi.org/10.358.25/2587-5728-2019-3-3-217-254>

Zavyalov V.V., Kujelko S.V., Zavyalova N.V., et al. Modern directions of creating new protective materials and tissues for means of individual and collective protection against toxic chemicals and pathogenic microorganisms // Journal of NBC Protection Corps. 2019. V. 3. № 3. P. 217–254. EDN: DEOJVF.
<https://doi.org/10.358.25/2587-5728-2019-3-3-217-254> (in Russian).

2. Завьялов В.В., Завьялова Н.В., Холстов В.И. и др. Стратегия разработки современных средств защиты на основе металлоорганических комплексов с заданными свойствами // Вестник войск ПХБ защиты. 2020. Т. 4. № 3. С. 305–337. EDN: UJYEYL. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2020-4-3-305-327>

Zavyalov V.V., Zavyalova N.V., Kholstov V.I., et al. Strategy for development of modern protective equipment based on organometallic complexes with desired properties // Journal of NBC Protection Corps. 2020. V. 4. № 3. P. 305–337. EDN: UJYEYL. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2020-4-3-305-337> (in Russian).

3. Завьялов В.В., Завьялова Н.В., Холстов В.И. и др. Использование модульности как принципа построения материалов на основе металлоорганических каркасных структур с заданными свойствами для создания современных средств защиты // Вестник войск ПХБ защиты. 2021. Т. 5. № 2. С. 165–172. EDN: MVUOJD. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-2-165-172>

Zavyalov V.V., Zavyalova N.V., Kholstov V.I., et al. Use of Modularity as a Principle of Design of Metal-organic Framework-based Materials with Specified Properties for Creating Modern Protective Equipment // Journal of NBC Protection Corps. 2021. V. 5. № 2. P. 165–172. EDN: MVUOJD. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-2-165-172> (in Russian).

4. Завьялов В.В., Завьялова Н.В., Холстов В.И. и др. Бактерицидные свойства модульных защитных материалов // Вестник войск ПХБ защиты. 2022. Т. 6. № 2. С. 123–136. EDN: OMBIWN. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2022-6-2-113-126>

Zavyalov V.V., Zavyalova N.V., Kholstov V.I., et al. Bactericidal properties of modular protective material // Journal of NBC Protection Corps. 2022. V. 6. № 2. P. 123–136. EDN: OMBIWN. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2022-6-2-123-136> (in Russian).

5. Завьялов В.В., Завьялова Н.В., Холстов В.И. и др. Противохимические свойства модульных защитных материалов // Вестник войск ПХБ защиты. 2022. Т. 6. № 1. С. 12–27. EDN: RGJUUV. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-6-1-12-27>

Zavyalov V.V., Zavyalova N.V., Kholstov V.I., et al. Anti-chemical properties of modular protective material // Journal of NBC Protection Corp. 2022. V. 6. № 1. С. 12–27. EDN: RGJUUV. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-6-1-12-27> (in Russian).

6. Leont'ev V.K., Pogorelski I.P., Frolov G.A. et al. Antibacterial properties aqueous colloid solutions of metal and metal oxide nanoparticles against dental plaque bacteria // Nanotechnol. Russia. 2018. V. 13. P. 195–198. <https://doi.org/10.1134/S1995078018020040>

7. Gunalan S., Sivaraj R. Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens // Prog. Nat. Sci. Mater. Int. 2012. V. 22. P. 693–700. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2012.11.015>

8. Deryabina D.G., Efremova L.V., Karimov I.F. et al. Comparative sensitivity of the luminescent *Photobacterium phosphoreum*, *Escherichia coli*, and *Bacillus subtilis* strains to toxic effect of carbon-based nanomaterials and metal nanoparticles // Microbiology. 2016. V. 85. P. 198–206.

9. Vidovic S., Elder J., Medihala P. et al. ZnO nanoparticles impose a panmetabolic toxic effect along with strong necrosis, inducing activation of the envelope stress response in *Salmonella enterica* serovar enteritidis // Antimicrob. Agents Chemother. 2015. V. 59. № 6. P. 3317–3338. <https://doi.org/10.1128/AAC.00363-15>

10. Azam A., Ahmed A. S., Oves M. et al. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study // Int. J. Nanomedicine. 2012. V. 7. P. 6003–6009. <https://doi.org/10.2147/IJN.S35347>

11. Khashan K.S., Sulaiman G.M., Abdulameer F.A. Antibacterial activity of TiO₂ nanoparticles prepared by one-step laser ablation in liquid // Applied Sciences. 2021. V. 11. P. 4623. <https://doi.org/10.3390/app11104623>

12. Guo B.L., Han P., Guo L.C. et al. The antibacterial activity of Ta-doped ZnO nanoparticles // Nanoscale Res. Lett. 2015. V. 10. P. e336. <https://doi.org/10.1186/s1167-015-1047-4>

13. Ansari S.A., Oves M., Satar R. et al. Antibacterial activity of iron oxide nanoparticles synthesized by coprecipitation technology against *Bacillus cereus* and *Klebsiella pneumonia* // Pol. J. Chem. Technol. 2017. V. 19. № 4. P. 110–115. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2018.11.005>

14. Akbar A., Sadiqi M.B., Ali I. et al. Synthesis and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2019. V. 17. P. 36–42. <https://doi.org/10.1016/J.bio.ag.bi.2019-17-36-42>

15. Hayden S.C., Zhao G., Saha K. et al. Aggregation and interaction of cationic nanoparticles on bacterial surfaces // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. P. 6920–6923. <https://doi.org/10.1021/ja301167y>

16. Kumar R., Umar G., Nalva H.S. Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: A review // *Ceram. Int.* 2017. V. 43. № 5. P. 3940–3961. <https://doi.org/10.1016/CERAMINT.2016.12.062>
17. Allzahrani K.E., Niazy A.A., Alswieleh A.M. Antibacterial activity of trimental (CuZnFe) oxide nanoparticles // *Int. J. Nanomedicine*. 2018. V. 13. P. 77–87. <https://doi.org/10.2147/IJN.S154218>
18. Heng B.C., Zhao X., Xiong S. et al. Toxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) is accentuated by oxidative stress // *Food Chem. Toxicol.* 2010. V. 48. P. 1762–1766. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.023>
19. Díez-Pascual, A.M. Recent progress in antimicrobial nanomaterials // *Nanomaterials*. 2020. V. 10. P. 2315. <https://doi.org/10.3390/nano10112315>
20. Леонтьев В.К., Кузнецов Д.В., Фролов Г.А., и др. Антибактериальные эффекты наночастиц металлов // *Российский стоматологический журнал*. 2017. Т. 21. № 6. С. 304–307. <https://doi.org/10.18821/1728-2802-2017-21-6-304-307>
21. Leont'ev V.K., Kuznetsov D.V., Frolov G.A., et al. Antibacterial effects of nanoparticles of metals // *Rossiyskii stomatologicheskii zhurnal*. 2017. V. 21. № 6. P. 304–307. <https://doi.org/10.18821/1728-2802-2017-21-6-304-307> (in Russian).
22. Lyagin I., Stepanov N., Frolov G., Efremenko E. Combined modification of fiber materials by enzymes and metal nanoparticles for chemical and biological protection // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 1359. <https://doi.org/10.3390/ijms23031359>
23. Efremenko E.N., Lyagin I.V., Klyachko N.L. et al. A simple and highly effective catalytic nanozyme scavenger for organophosphorus neurotoxins // *J. Control. Release*. 2017. V. 247. P. 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.037>
24. Lyagin I.V., Efremenko E.N. Biomolecular engineering of biocatalysts hydrolyzing neurotoxic organophosphates // *Biochimie*. 2018. V. 144. P. 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.10.023>
25. Frolov G., Lyagin I., Senko O., et al. Metal nanoparticles for improving bactericide functionality of usual fibers // *Nanomaterials*. 2020. V. 10. № 9. P. 1724. <https://doi.org/10.3390/nano10091724>
26. Efremenko E., Lyagin I., Aslanli A. et al. Carrier variety used in immobilization of His₆-OPH extends its application areas // *Polymers*. 2023. V. 15. P. 591. <https://doi.org/10.3390/polym15030591>
27. Завьялов В.В., Завьялова Н.В., Холстов В.И. и др. Модульные защитные материалы, нейтрализующие токсины // *Вестник войск РХБ защиты*. 2022. Т. 6. № 3. С. 229–242. EDN: HQPBUU. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2022-6-3-229-242> (in Russian).
28. Zavyalov V.V., Zavyalova N.V., Kholstov V.I. et al. Modular protective materials neutralizing toxins (organophosphorus compounds and mycotoxins) and exhibiting biocidity to gram-positive and gram-negative bacterial cells // *Journal of NBC Protection Corps*. 2022. V. 6. № 3. P. 229–242. EDN: HQPBUU. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2022-6-3-229-242>
29. Aslanli A., Lyagin I., Efremenko E. et al. Bacterial cellulose containing combinations of antimicrobial peptides with various QQ enzymes as a prototype of an «Enhanced Antibacterial» dressing: *in silico* and *in vitro* // *Pharmaceutics*. 2020. V. 12. № 12. P. e1155. <https://doi.org/10.3390/12121155>
30. Aslanli A., Lyagin I., Efremenko E. Novel approach to Quorum Quenching rational desing of antibacterials in combination with hexahistidine-tagged organophosphorus hydrolase // *Biol. Chem.* 2018. V. 399. № 8. P. 869–879. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0162>
31. Aslanli A., Lyagin I., Efremenko E. Charges' interaction in polyelectrolyte (nano)complexing of His₆-OPH with peptides: unpredictable results due to imperfect or useless concept // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 140. P. 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.137>
32. Ефременко Е.Н., Лягин И.В. Современные биокатализаторы на основе гексагистидинсодержащей фосфорорганической гидролазы для химической и биологической защиты // *Вестник войск РХБ защиты*. 2019. Т. 3. № 2. С. 111–116. EDN: LIWCHM. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2019-3-2-111-116>
33. Efremenko E.N., Lyagin I.V. Advanced biocatalysts based on hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase for chemical and biological defense // *Journal of NBC Protection Corps*. 2019. V. 3. No 2. P. 111–116. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2019-3-2-111-116>. EDN: LIWCHM (in Russian).
34. Ефременко Е.Н., Завьялов В.В., Завьялова Н.В. и др. Фильтрующе-сорбирующий самодегазирующий материал для средств индивидуальной защиты от воздействия фосфорорганических соединений. RU2330717 (10.08.2008)
35. Efremenko E.N., Zavyalov V.V., Zavyalova N.V. et al. Filtering-sorbing self-degassing material for personal protective equipment against the effects of organophosphorus compounds. RU2330717 (10.08.2008) (in Russian).
36. Фосфорорганические нейротоксины / Под ред. Варфоломеева С.Д., Ефременко Е.Н. РИОР: М. 2020. 380 с. <https://doi.org/10.29039/02026-5>
37. Varfolomeev S.D., Efremenko E.N. (Eds.) *Organophosphorus Neurotoxins*. 1st ed.; Publ. Center RIOR: Moscow. 2020. 380 p. <https://doi.org/10.29039/02026-5> (in Russian).

33. Lyagin I., Efremenko E. Enzymes, reacting with organophosphorus compounds as detoxifiers: diversity and functions // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 176. <https://doi.org/10.3390/ijms.2204761>
34. Lyagin I., Stepanov N., Maslova O. et al. Not a mistake but a feature: promiscuous activity of enzymes meeting mycotoxins // *Catalysts*. 2022. V. 12. P.m1095. <https://doi.org/10.3390/catal12101095>
35. Stepanov N., Senko O., Perminova I., Efremenko E. A new approach to assess the effect of various humic compounds on the metabolic activity of cells participating in methanogenesis // *Sustainability*. 2019. V. 11. P. 3158. <https://doi.org/10.3390/su11113158>
36. Ma J., Liu J., Zhang Y. et al. Bacitracin resistance and enhanced virulence of *Streptococcus suis* via a novel efflux pump // *BMC Vet. Res.* 2019. V. 15. e377. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2115-2>
37. Aslanli A., Domnin M., Stepanov N., Efremenko E. “Universal” antimicrobial combination of bacitracin and His₆-OPH with lactonase activity, acting against various bacterial and yeast cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 9400. <https://doi.org/10.3390/ijms23169400>

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации – Организация, представляющая условия для реализации Проекта, Российская Федерация, 111024, г. Москва, проезд Энтузиастов, 19.

Завьялов Василий Владимирович. Старший научный сотрудник отдела, канд. хим. наук, профессор АВН, член коллектива, выполняющего исследование.

Завьялова Наталья Васильевна. Главный научный сотрудник управления, доктор биол. наук, профессор, академик АВН, руководитель научного коллектива, выполняющего исследование.

Холстов Виктор Иванович. Руководитель научной школы 27 НЦ МО РФ, доктор хим. наук, профессор, почетный химик Российской Федерации, академик РАЕН и АВН, член-корр. РАР и АН.

Ковтун Виктор Александрович. Начальник «27 Научного центра» Министерства обороны Российской Федерации, канд. хим. наук, доцент.

ООО «Научно-исследовательский институт эластомерных материалов и изделий», Российская Федерация, 111024, г. Москва, Перовский проезд, 2, стр. 1.

Гореленков Валентин Константинович. Ведущий научный сотрудник, доктор хим. наук, профессор, член коллектива, выполняющего исследование.

НИТУ стали и сплавов, Российская Федерация, 119049, г. Москва, Ленинский проспект, д. 4.

Фролов Георгий Александрович. Доцент кафедры, канд. хим. наук, доцент, член коллектива, выполняющего исследование.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119234, Российская Федерация, г. Москва, Ленинские Горы, д. 1, стр. 3.

Лягин Илья Владимирович. Старший научный сотрудник, канд. хим. наук, член коллектива, выполняющего исследование.

Степанов Николай Алексеевич. Научный сотрудник, канд. тех. наук, член коллектива, выполняющего исследование.

Асланлы Айсель Гюлхан гызы. Научный сотрудник, канд. хим. наук.

Ефременко Елена Николаевна. Зав. лабораторией, доктор биол. наук, профессор, член коллектива, выполняющего исследование.

Контактная информация для всех авторов: 27nc_l@mil.ru
Контактное лицо: Завьялова Наталья Васильевна, 27nc_l@mil.ru

The Joint Action of Metal and Enzymatic Nanoparticles Used for Functionalization of Protective Self-Cleaning Materials Neutralizing Organophosphates and Possessing Bactericide Activity

V.V. Zavyalov¹, N.V. Zavyalova¹, V.I. Kholstov¹, V.A. Kovtun¹, G.A. Frolov²,
V.K. Gorelenkov³, I.V. Lyagin⁴, N.A. Stepanov⁴, A.G. Aslanli⁴, E.N. Efremenko⁴

¹Federal State Budgetary Establishment «27 Scientific Centre» of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Entuziastov passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation

²Limited Liability Company «Scientific Research Institute of Elastomer Materials and Products». Perovsky Passage, 2, Moscow 111024, Russian Federation

³National University of Science and Technology MISIS. Leninsky Avenue, 4, Moscow 119049, Russian Federation

⁴Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry. Lenin Hills, 1-3, Moscow 119991, Russian Federation

Received June 13, 2023. Accepted June 27, 2023.

The combination of several modules, including metal nanoparticles (tantalum or zinc), antimicrobial substances, enzyme nanocomplexes that provide self-purification (self-degassing) and multiple functionalization, makes it possible to create materials that provide protection against chemical and biological damaging agents. *The purpose of this work* is to study the combined effect of metal nanoparticles, other biocidal compounds, and nanosized enzyme complexes of hexidine-containing organophosphate hydrolase and penicillin acylase deposited on unified tissue platforms on organophosphorus compounds and bactericidal activity. *Materials and research methods.* The protective self-cleaning material was created on the basis of the principle of constructing modular materials with desired properties. Nanosized metal complexes and enzymatic non-covalent polyelectrolyte complexes with polyglutamic acid or antimicrobial peptides were applied to a tissue unified platform in a certain sequence and in a certain amount, and its antitoxic and antimicrobial properties were studied. *The discussion of the results.* With the simultaneous operation of several modules, subject to certain requirements for applying the quantity and sequence, the properties of the modules are preserved, which do not neutralize or disable the specific properties of the modules and do not interfere with other modules to perform their functions. The best results of such materials can be obtained by combining biologically inert Ta nanoparticles and a stabilized enzyme in a polyelectrolyte complex. To acquire antimicrobial properties, fibrous materials can be functionalized not only by a combination of metal nanoparticles with enzyme preparations, but also by a combination of low molecular weight antibiotics with enzymes. *Conclusions.* The studies performed have demonstrated the possibility of combining modules containing metal carboxylates, metal nanoparticles, and enzyme nanocomplexes for multiple functionalization of the same fibrous materials, which acquired biocidal and antichemical protective properties. New self-degassing materials have been obtained that have protective chemical and biological properties and high stability in terms of catalytic activity with respect to the main substrates of the introduced enzymes and bactericidal activity. The use of such approaches makes it possible to impart protective properties to almost any fabric or clothing made from it, on which the studied modules will be applied, which will provide the required level of protection for personnel and have a debilitating and chilling effect.

Keywords: bactericidal properties of the material; hexidine-containing organophosphate hydrolase; nanosized enzyme complex; nanosized metal complex; nanosized metals; penicillin acylase; protective chemical and biological properties; protective composite material and fabric; specific properties of modular materials.

For citation: Zavyalov V.V., Zavyalova N.V., Kholstov V.I., Kovtun V.A., Frolov G.A., Gorelenkov V.K., Lyagin I.V., Stepanov N.A., Aslanli, A.G., Efremenko E.N. The Joint Action of Metal and Enzymatic Nanoparticles Used for Functionalization of Protective Self-Cleaning Materials Neutralizing Organophosphates and Possessing Bactericide Activity // *Journal of NBC Protection Corps*. 2023. V.7. №. 2, P. 107–126. EDN: jzeivh.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2023-7-2-107-126>

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Funding. This work was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) (Grant № 18-29-17069).

References

See P. 121–124.

Authors

Federal State Budgetary Establishment «27 Scientific Centre» of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Entuziastov passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation.

Vasily Vladimirovich Zavyalov. Senior Researcher. Candidate of Chemical Sciences. Professor of the Academy of Military Sciences. Grant team member.

Natalya Vasilyevna Zavyalova. Leading Researcher. Doctor of Biological Sciences, Professor. Academician of the Academy of Military Sciences. Grant team member.

Viktor Ivanovich Kholstov. Member of the Dissertation Council of the «27 Scientific Centre» of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Doctor of Chemical Sciences, Professor. Honored Chemist of the Russian Federation. Academician of the Russian Academy of Natural Sciences and the Academy of Military Sciences. Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences and the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences.

Viktor Aleksandrovich Kovtun. Head of the Centre. Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor.

Limited Liability Company «Scientific Research Institute of Elastomer Materials and Products». Perovsky Passage, 2, Moscow 111024, Russian Federation.

Valentin Konstantinovich Gorelenkov. Leading Researcher. Doctor of Chemical Sciences, Professor. Grant team member.

National University of Science and Technology MISIS. Leninsky Avenue, 4, Moscow 119049, Russian Federation.

George Alexandrovich Frolov. Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor. Grant team member.

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry. Lenin Hills, 1-3, Moscow 119991, Russian Federation.

Ilya Vladimirovich Lyagin. Senior Researcher. Candidate of Chemical Sciences. Grant team member.

Nikolay Alekseevich Stepanov. Candidate of Technical Sciences. Grant team member.

Aysel Gulhan Aslanli, Scientific Researcher. Candidate of Chemical Sciences.

Elena Nikolayevna Efremenko. Laboratory Chief. Doctor of Biological Sciences, Professor. Grant team member.

Contact information for all authors: 27nc_1@mil.ru

Contact person: Natalya Vasilyevna Zavyalova; 27nc_1@mil.ru