

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ MICROBIOLOGY AND VIROLOGY

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ И ОКСИДОВ МЕДИ

Невежина А.В.,
Фадеева Т.В.

ФГБНУ «Иркутский научный
центр хирургии и травматологии»
(664003, г. Иркутск,
ул. Борцов Революции, 1, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Невежина Анна Владимировна,
e-mail: n4nnna@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Распространение полирезистентных к современным антимикробным препаратам штаммов микроорганизмов по-прежнему остаётся актуальной проблемой лечения и профилактики инфекционных заболеваний и общественного здравоохранения в целом.

В настоящее время активно изучается возможность применения нанопрепаратов металлов в различных областях медицины. Наночастицы металлов и оксидов металлов являются перспективными антимикробными агентами и вызывают растущий интерес благодаря своей эффективности. Металлические частицы меди в наномасштабе продемонстрировали высокую антимикробную активность против различных видов грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов. Учитывая потенциал наночастиц меди и её оксидов в противомикробной терапии, мы представляем обзор современного состояния исследований, связанных с их антимикробными свойствами, рассмотрением механизмов действия, ключевых факторов, влияющих на антимикробную активность, в том числе полимерной матрицы. Рассмотрены вопросы токсичности и устойчивости к меди. Показано преимущество наночастиц меди и оксидов меди перед другими металлическими наночастицами.

Обобщённые в этом обзоре исследования показали перспективность наночастиц меди в создании новых антимикробных препаратов, которые в будущем могут быть использованы для контроля, профилактики и лечения различных заболеваний.

Ключевые слова: медь, оксиды меди, наночастицы, нанокomпозиты, антимикробная активность, патогенные микроорганизмы, цитотоксичность

Статья получена: 20.10.2021
Статья принята: 03.12.2021
Статья опубликована: 28.12.2021

Для цитирования: Невежина А.В., Фадеева Т.В. Перспективы создания антимикробных препаратов на основе наночастиц меди и оксидов меди. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(6-2): 37-50. doi: 10.29413/ABS.2021-6.6-2.5

PROSPECTS FOR THE CREATION OF ANTIMICROBIAL PREPARATIONS BASED ON COPPER AND COPPER OXIDES NANOPARTICLES

**Nevezhina A.V.,
Fadeeva T.V.**

Irkutsk Scientific Centre of
Surgery and Traumatology
(Bortsov Revolyutsii str. 1, Irkutsk
664003, Russian Federation)

Corresponding author:
Anna V. Nevezhina,
e-mail: n4nnna@yandex.ru

ABSTRACT

The spread of strains of microorganisms that are multidrug resistant to modern antimicrobial drugs is still an urgent problem in the treatment and prevention of infectious diseases and public health in general.

Currently, the possibility of using metal nanopreparations in various fields of medicine is being actively studied. Nanoparticles of metals and metal oxides are promising antimicrobial agents and are attracting growing interest due to their effectiveness. Nanoscale copper metal particles have shown high antimicrobial activity against various types of gram-positive and gram-negative bacteria, as well as fungi. Taking into account the potential of copper nanoparticles in antimicrobial therapy, we present an overview of the current state of research related to their antimicrobial properties, consideration of the mechanisms of action, key factors affecting antimicrobial activity, including the polymer matrix. The issues of toxicity and resistance to copper are considered. The advantage of copper nanoparticles over other metal nanoparticles is shown.

The studies summarized in this review have shown the promise of copper nanoparticles in the creation of new antimicrobial drugs that can be used in the future to control, prevent, and treat various diseases.

Key words: copper, copper oxides, nanoparticles, nanocomposites, antimicrobial activity, pathogenic microorganisms, cytotoxicity

Received: 20.10.2021
Accepted: 03.12.2021
Published: 28.12.2021

For citation: Nevezhina A.V., Fadeeva T.V. Prospects for the creation of antimicrobial preparations based on copper and copper oxides nanoparticles. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(6-2): 37-50. doi: 10.29413/ABS.2021-6.6-2.5

ВВЕДЕНИЕ

В связи с необходимостью профилактики и лечения заболеваний, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, без использования антибиотиков образовалось инновационное направление разработки наноматериалов с антимикробными свойствами. Нанокompозиты являются многообещающей альтернативой антибактериальным препаратам, поскольку обладают рядом антимикробных механизмов, включая нарушение клеточной мембраны, диффузию и разрушение внутренних компонентов клетки, таких как ДНК, РНК и ферменты, а также высвобождение ионов с антимикробной активностью. В настоящее время известно множество наночастиц металлов, обладающих антибактериальным действием, например Ag, Au, Cu, Zn, Fe, Mn и др. [1]. Чаще всего в нанокompозитах используют эти металлы или же их оксиды, реже – эти металлы в других химических соединениях, например Ag₂S, AgNO₃. Кроме того, становятся популярны разработки многокомпонентных материалов путём комбинирования различных наночастиц или наночастиц оксидов металлов, которые приводят к более высокой антибактериальной активности, чем отдельные компоненты, и при гораздо более низких концентрациях [1, 2].

Наиболее распространёнными являются нанокompозиты с наночастицами серебра, благодаря своим эффективным антимикробным свойствам и низкой токсичности для клеток животных. Также успешно подавляют рост бактерий нанокompозиты с частицами меди. Препараты на основе меди широко используются против целого ряда микроорганизмов, вызывающих заболевания. Имеются исторические свидетельства использования меди человеческими цивилизациями в качестве антибактериального агента задолго до научного этапа развития микробиологии [3]. Медь имеет ряд преимуществ, она недорога и имеется на Земле в достаточном количестве, что позволяет производить из неё множество материалов. К тому же медь обладает низкой токсичностью по сравнению с другими металлами, так как в низких концентрациях медь участвует в метаболических процессах [4].

Медь необходима для большинства организмов в качестве кофактора ключевых ферментов, участвующих в фундаментальных процессах [5]. Медьзависимые ферменты во всех таксономических группах действуют в различных процессах, включая окислительное фосфорилирование (цитохромоксидаза), гомеостаз железа (церулоплазмин, гефестин), пигментацию (тирозиназа, лакказа), дисмутацию супероксида (супероксиддисмутазы) и образование соединительной ткани (лизилоксидазы) [6]. Медь используется иммунной системой хозяина для уничтожения бактерий, так как способна усиливать окислительный стресс в макрофагах, а дефицит меди приводит к угнетению иммунитета [7]. В исследовании поверхностей с противомикробным покрытием против *S. aureus*, *E. coli* и *L. monocytogenes* медь продемонстрировала больший антимикробный

потенциал, чем серебро, цинк и титан [8]. Было показано, что наночастицы меди имеют более высокое сродство к аминам и карбоксильным группам и показывают более высокую плотность на поверхности *B. subtilis*, чем наночастицы серебра, что приводит к более высокой антимикробной активности. Существуют данные, которые подтверждают вывод о том, что медь лучше действует на *B. subtilis* по сравнению с наночастицами серебра, но не на *S. aureus* и *E. coli* [9]. Медь способна проявлять антибактериальные свойства как в аэробной, так и в анаэробной среде [10]. Наночастицы Cu проявляют большую антибактериальную активность, чем наночастицы CuO, что может быть связано с лучшим переносом электронов между бактериями и наночастицами Cu [11].

Необходимость создания новых антимикробных наноматериалов широкого спектра действия без использования классических антибиотиков на основе нанопрепаратов меди и её оксидов, несомненно, важна. Мы представляем обзор современного состояния исследований, связанных с их антимикробными свойствами. В этом обзоре обобщены и обсуждаются предлагаемые механизмы, лежащие в основе их антибактериальной активности. Также отмечены закономерности антимикробной активности наночастиц меди и оксидов меди от их размера, формы, морфологии, концентрации и других факторов, в том числе полимерной матрицы. Уделено внимание исследованиям по стабилизации наночастиц полимерными матрицами, позволяющими эффективно избегать образования «белковой короны», также экологичному «зелёному» биосинтезу наночастиц, в котором компоненты биологически активных веществ являются стабилизаторами. Рассмотрены и проанализированы вопросы токсичности и устойчивости к меди, особенно связанные с механизмами действия, цитосовместимости.

МЕХАНИЗМЫ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НАНОКОМПОЗИТОВ МЕДИ И ЕЁ ОКСИДОВ

Существуют несколько объяснений взаимодействия наноматериалов с микробами, однако механизмы, ответственные за антимикробные свойства металлических наноматериалов, не до конца изучены. Эти механизмы могут быть направлены на несколько участков-мишеней, таких как клеточная мембрана, мембраносвязанные белки, нуклеиновые кислоты, а также на ингибирование активности ферментов [12]. Антибактериальная активность нанокompозитов меди является комбинацией различных механизмов и схожа с действием нанокompозитов других металлов.

Исследования показывают, что антибактериальная активность наночастиц (Nps) на основе меди намного превосходит антибактериальную активность обычной поверхности меди, в основном из-за небольшого размера (высокая площадь поверхности по сравнению с объёмом) и более высокой проникающей спо-

способностью в микробную стенку [12]. Известно, что ионная форма меди Cu^+ значительно более бактерицидна, чем Cu^{2+} , благодаря своей способности свободно проникать через бактериальные мембраны и инактивировать внутриклеточные кластеры железа и серы [13]. Основной антимикробной стратегией меди и наночастиц меди является так называемое «контактное уничтожение», при котором происходит контакт Cu -содержащих поверхностей или Cu -NPs, высвобождающих ионы меди, с микробной поверхностью [3]. Хотя единого мнения относительно точных последовательных событий «контактного уничтожения» не существует, известно, что высвобожденные ионы меди продуцируют активные формы кислорода (АФК) на поверхности бактерий и приводят к разрушению клеточной мембраны (денатурация белков в бактериальной мембране вызывает бактериолизический эффект). Кроме того, высвобождаемые из наночастиц ионы меди, имеющие положительный заряд, могут связываться с отрицательно заряженными компонентами клеточной стенки посредством электростатических взаимодействий, которые изменяют заряд мембраны, разрушая её [14]. Также при контакте острых граней наночастицы с мембраной клетки происходит её механическое повреждение. Достигнув мембраны, наночастицы могут проникать в цитоплазму за счёт эндоцитоза или прямой диффузии [4]. Затем, после проникновения ионов через клеточную мембрану, происходит генерация АФК с последующим повреждением ДНК, белков, митохондрий, липидов и мембран, что в итоге приводит к гибели клетки [2]. Предполагается, что в аэробных условиях медь катализирует образование гидроксильных радикалов посредством реакций Фентона, вызывая металл-индуцированный окислительный стресс. Первоначально эта реакция была открыта при окислении железа (II) перекисью водорода до железа (III) с образованием гидроксильного радикала и гидроксид-иона. На сегодняшний день известно и описано, что реакция Фентона возможна с другими металлами, в том числе медью, кобальтом, никелем [15]. Ионы меди могут также конкурировать с ионами других металлов за сайты связывания с белками, что приводит к нарушению функции белка [16]. Одной из важнейших клеточных мишеней АФК является ДНК. Окисление оснований, особенно гуанина, может быть мутагенным [17]. Наночастицы оксидов меди (CuO и Cu_2O) так же первоначально повреждают клеточную оболочку посредством «контактного уничтожения». Дальнейший механизм повреждения может различаться для CuO -NPs и Cu_2O -NPs. В исследовании Meghana S. et al. в качестве главного механизма токсичности Cu_2O по отношению к *E. coli* было обнаружено образование комплекса Cu (I) с пептидами. В этом случае Cu_2O инактивировал фумаразу А. Такой механизм не наблюдался в случае с CuO , а ключевым механизмом токсичности этого оксида была генерация свободных радикалов. В сравнительном исследовании Cu_2O -NPs оказались более эффективны против *E. coli*, чем CuO -NPs [13]. Это свидетельствует о её тесной связи со степенью окисления оксидов меди.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА АНТИМИКРОБНУЮ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ И ЕЁ ОКСИДОВ

Антибактериальная способность наноконструкций меди тесно связана с морфологией наночастиц, т. е. размером и формой, скоростью высвобождения ионов из матрицы, площадью поверхности матрицы [18], а также свойствами среды (рН, температура и т. д.).

Влияние размера и формы наночастиц и рН среды на противомикробные свойства. Наночастицы – это частицы размером не более 100 нм. Согласно имеющимся данным, чем меньше наночастицы, тем большей антимикробной активностью они обладают. Это может быть связано с тем, что уменьшение размера частиц приводит к увеличению числа поверхностных атомов, что приводит к более эффективному контакту клетки с частицами и к более высокой вероятности проникновения их в клетку [19]. Однако существует ряд исследований, вносящих противоречие в это предположение. Например, при исследовании действия наночастиц меди (Cu -NPs) на *X. oryzae* было выявлено, что оптимальный размер наночастиц, при котором наблюдалась лучшая антибактериальная эффективность, составлял 28 нм, а наночастицы большего (33 нм) и меньшего (18 нм, 24 нм) размера были менее эффективны [20]. Вероятно, это может быть следствием других различных механизмов взаимодействия клетки и наноконструкта. По данным S. Zhang et al., существует оптимальный радиус наночастиц для эндоцитоза, одного из важнейших механизмов проникновения наночастиц в клетку, который находится в диапазоне 25–30 нм [21]. А при взаимодействии меньших размеров наночастиц (10 нм) с бактериальной мембраной более важную роль играет гидрофобный или гидрофильный характер наночастицы и клеточной поверхности, что подробно разобрано в обзоре L. Tamayo et al. [4]. Немаловажную роль в эффективности наноконструкта играет форма наночастиц. В настоящее время успешно проводится синтез наночастиц меди с различной формой, таких как сферы, пятиугольники, кубы, тетраэдры, октаэдры и др. Было выявлено, что наночастицы треугольной формы проявляют лучшую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, чем сферические, поскольку их острые края могут легче проникать через клеточные мембраны [2]. В другом исследовании сравнивали наночастицы с различной формой и не обнаружили существенной разницы в антибактериальных свойствах, хотя было показано, что наночастицы с формой листов и цилиндров имеют гораздо большую площадь контакта для разрушения мембран, чем сферы [22].

При различных значениях рН один и тот же наноконструкт или наночастица может проявлять различный антибактериальный эффект. Помимо наночастиц матрица тоже может обладать антимикробным эффектом. К примеру, хитозан обладает антимикробной активностью в кислой среде [23]. В недавнем исследовании наблюдали значительный рост эффективности наночастиц Cu_2O в слабокислой среде, по сравнению с нейтральной и слабощелочной [24]. В другом исследовании наночастиц CuO выявили аналогичную зависимость от рН [25].

Влияние гидрофильности и гидрофобности нанокompозитов на противомикробные свойства. В зависимости от типа поверхности гидрофобность клетки может повышать склонность микроорганизмов к адгезии. Более гидрофобные клетки сильнее прилипают к гидрофобным поверхностям, тогда как гидрофильные клетки прочнее прикрепляются к гидрофильным поверхностям. С одной стороны, гидрофобные клетки лучше прилипают к нанокompозитам с гидрофобной поверхностью, что может повысить антибактериальную эффективность. С другой, они способны вызывать коррозии и образовывать трудно разлагаемые биоплёнки, к тому же они могут легко накапливаться на органических загрязнителях и разлагать их [26].

Улучшенная гидрофильность и смачиваемость наноматериала обеспечивают возможность самоочистки покрытий и делают покрытия менее подверженными загрязнению бактериями и другими загрязняющими веществами [27]. Также было показано, что повышенная гидрофильность наноматериала может эффективно предотвращать адгезию бактерий и рост биоплёнок [28]. Недавние исследования показали, что супергидрофобные поверхности обладают значительным антибактериальным потенциалом и при контроле коррозионной стойкости и смачиваемости супергидрофобной медной подложки появляется возможность поддерживать бактерицидное действие медных подложек в течение длительного времени, одновременно избегая чрезмерной коррозионной деградации и выделения ионов меди в окружающую среду [29].

В настоящее время многие исследования направлены на разработку средств, ингибирующих и разрушающих биоплёнку. Согласно данным, около 80 % микробных инфекций человека являются результатом образования биоплёнок [30]. Одна из стратегий предотвращения бактериальной колонизации поверхностей – создание супергидрофобных поверхностей, обладающих «эффектом лотоса». Благодаря сочетанию контролируемой шероховатости поверхности и покрытий с низкой поверхностной энергией супергидрофобные поверхности отталкивают жидкости, самоочищаются и предотвращают образование биоплёнок [31]. Показано, что за счёт увеличения гидрофильных характеристик матрицы можно улучшить высвобождение ионов из полимерных композитов [32].

Стабилизация наночастиц полимерными матрицами. «Зелёный» синтез. Одной из основных проблем при использовании наночастиц является их стабилизация. Сохранение определённых свойств наночастиц, таких как состав, форма, размер, степень агрегации, является первоочередной задачей при создании нанокompозитов. В настоящее время появляется всё большее количество исследований по созданию различных альтернативных полимерных матриц, защищающих нанокompозиты от окисления, ограничивающих их адгезию, усиливающих антимикробные свойства и продлевающих срок их действия. В качестве матриц для наночастиц меди используются различные полимеры, которые могут быть синтетическими (сополимер бутиленадипата с терефталатом, полистирол, полипропилен и др.) и природного происхождения (полисахариды, целлюлоза, крахмал, хитозан

и др.). Часто при контакте с биологической средой наноматериалы способны взаимодействовать с биомолекулами, особенно с белками, что приводит к образованию так называемой «белковой короны», в результате чего свойства наноматериала изменяются, снижается противомикробная эффективность и возникает иммунный ответ [33]. В настоящее время ведётся поиск матриц, эффективно избегающих образования «белковой короны». Как правило, гидрофобный наноматериал больше подвержен адсорбированию белков, чем гидрофильный [34].

В последнее время набирает популярность «зелёный» синтез, ключевыми факторами которого являются экологичность конечного продукта и использование экологически безопасного процесса. Поскольку область «зелёной» нанотехнологии является относительно новой, проблема заключается в контроле размера и морфологии наночастиц из-за различных характеристик и составов биологических сред, используемых во время синтеза. Для «зелёного» синтеза используют бактерии, грибы, дрожжи, водоросли или растения, которые способны за счёт своих метаболических процессов восстанавливать ионы металлов с образованием наночастиц металлов. Наиболее широко рассматриваются растения из-за наличия эффективных фитохимических веществ в различных растительных экстрактах, особенно в листьях, таких как кетоны, альдегиды, флавоноиды, амиды, терпеноиды, карбоновые кислоты, фенолы и аскорбиновая кислота, которые играют большую роль в восстановлении ионов меди и стабилизируют наночастицы меди и оксидов меди [35].

ЗАВИСИМОСТЬ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ ОТ ТИПА МИКРООРГАНИЗМОВ

Наночастицы меди проявляют выраженное бактериостатическое и бактерицидное действие. Многочисленные предыдущие исследования показали, что нанокompозиты с наночастицами меди обладают антимикробной активностью в отношении многих грамположительных и грамотрицательных видов бактерий, среди которых *E. coli*, *E. faecalis*, *S. mutans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, но не проявляют активности против *A. baumannii* [36]. Также сообщалось об эффективных противогрибковых свойствах, в числе которых *C. albicans* и *A. niger* [37]. CuO-NPs проявляют антимикробную активность в отношении различных типов грамотрицательных, грамположительных бактерий и патогенных грибов, включая *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* [37]. Cu₂O-NPs проявляют сильную антимикробную активность против как грамположительных (*B. subtilis* CN2), так и грамотрицательных (*P. aeruginosa* CB1) бактерий с минимальной ингибирующей концентрацией 62,5 мкг/мл при pH 5 [24]. В другом исследовании Cu₂O-NPs показали отличную антибактериальную активность против как грамположительных (*S. aureus*), так и грамотрицательных (*E. coli*) штаммов бактерий [38].

Антибактериальная активность нанокompозитов меди и оксидов меди в зависимости от типа матрицы, размера и формы наночастиц суммирована в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1
НАНОКОМПЗИТЫ МЕДИ И ОКСИДОВ МЕДИ, И ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ
ЭФФЕКТ

NP _s *	Форма и размер наночастиц (D, нм)	Матрица**	Штаммы	Антимикробный эффект	Ссылка
CuO	Полусферическая (35–11 нм)	PCL	<i>C. albicans</i> (ATCC MYA-2876), <i>C. glabrata</i> (ATCC 2001) и <i>C. tropicalis</i> (ATCC 750)	Рост <i>C. albicans</i> и <i>C. glabrata</i> подавлялся на 53 % при концентрации 200 мМ CuO-NPs; в то время как <i>C. tropicalis</i> – до 59 %.	[39]
Cu	Сферическая (4–46 нм)	C	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> и <i>S. aureus</i>	Значения МИК и MBC Cu-NPs + C против <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> и <i>S. aureus</i> составляли 7,5, 7,5, 11,25 мкг/мл и 22,5, 11,25 и 30 мкг/мл соответственно	[40]
Cu, Cu ₂ O	Сферическая Cu (26 нм), полиэдрическая Cu ₂ O (80–160 нм)	PВАТ	<i>A. baumannii</i> (ABA 538), <i>E. faecalis</i> (6.4), <i>S. aureus</i> (ATCC) и <i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	В концентрации 3 % Cu-NPs и Cu ₂ O-NPs в PВАТ активны против <i>E. faecalis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , но не против <i>A. baumannii</i>	[36]
CuO	Нанопласти CuO на плёнке BC/GO-CuO. CuO с диапазоном длин 50–200 нм и шириной от 20–50 нм	BC / GO	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538), <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> (DH5α), <i>P. aeruginosa</i> (NCTC 2000)	BC / GO-CuO-NPs показал антимикробную активность против всех штаммов в концентрации от 5 %	[41]
CuO	Полусферическая (35 нм)	PCL	<i>E. coli</i> (ATCC25922), <i>S. mutans</i> (ATCC25175), <i>K. oxytoca</i> (ATCC13182), <i>S. aureus</i> (ATCC25923), <i>P. aeruginosa</i> (ATCC27853), <i>B. subtilis</i> (ATCC19163)	Лучшие результаты ингибирования PCL-CuO-NPs были против <i>P. aeruginosa</i> (МИК 25 мМ). <i>K. oxytoca</i> и <i>S. aureus</i> показали только небольшую зону ингибирования при концентрации 200 мМ CuO-NPs. Ингибирования других протестированных бактерий было незначительным ни при какой концентрации PCL-CuO-NPs	[42]
PANI	Сферическая (6,0 ± 0,2 нм)	PANI	<i>E. coli</i> (ATCC 25922), <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) <i>C. albicans</i> (ATCC 10259)	Уменьшение на 99,9 % <i>E. coli</i> и <i>S. aureus</i> и уменьшение количества грибов (97,9 %) с PANI-Cu-NPs при максимальной концентрации 20 ppm	[43]
Cu	Сферическая (37 нм)	Глицерин- поливиниловый спирт	<i>E. faecalis</i> (CCM 4424), <i>E. coli</i> (DBM 3138)	Ингибирование роста бактерий наблюдали при концентрациях PVA-Cu-NPs 2,5–10 мг/мл	[44]
Cu	Стержнеобразная (40 ± 10 нм)	Хитозан	<i>E. coli</i> (ATCC 35218), <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	МИК 100 мкг/мл (1,57 мМ) в медь-хитозановом композите	[45]
CuO	Сферическая (103,65 нм)	Без матрицы	<i>T. rubrum</i>	Наивысшая эффективность ингибирования роста наблюдалась при высокой концентрации (100 мкг/мл) и длительном времени воздействия (3 часа)	[46]
Cu	Сферическая (250 нм)	Покровные аскорбиновой кислотой	<i>C. albicans</i>	МИК 500 мкг/мл	[47]
CuO	Форма не приведена (26 нм)	RGO	<i>E. coli</i>	МИК 240 мкг/мл	[48]

Примечание. NP_s – наночастицы; PCL – поликапролактон; C – углерод; PВАТ – полибутиленадипаттерефталат; BC/GO – бактериальная целлюлоза/оксид графена; PANI – полианилин; RGO – графен-оксид восстановленный.

Также на антимикробный потенциал наноконструкций влияет толщина клеточной стенки микроорганизмов. Структуры клеточной стенки грамотрицательных бактерий и грамположительных бактерий существенно различаются. Стенка грамположительных бактерий содержит толстый слой пептидогликана, присоединённого к тейхоевой кислоте. У грамотрицательных бактерий клеточная стенка состоит из тонкого слоя пептидогликана и внешней мембраны, а между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной есть свободное пространство. Более толстый слой пептидогликана у грамположительных бактерий определяет их более высокую устойчивость к наноконструкциям. Это согласуется с рядом данных о том, что наноконструкции меди показывают высокую антибактериальную активность против грамотрицательных, но не против грамположительных бактерий [4]. Клеточная стенка дрожжей состоит из внешних слоёв, обогащённых маннопротеинами (гликозилированными полипептидами), и внутреннего слоя, обогащённого хитином, полисахаридами, которые создают полисахаридный матрикс, составляющих основу каркаса [43].

Кроме того, большую озабоченность вызывают грибковые инфекции, особенно в виде внутрибольничных инфекций. Грибковые инфекции могут приводить к заболеваемости и смертности, особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом, при иммуносупрессии из-за диабета, у реципиентов трансплантатов органов. Как и в случае с бактериями, многие грибы могут создавать биоплёнки [14].

В исследовании наночастиц CuO было показано слабое влияние на виды *Candida* [49]. В другом исследовании свойства наночастицы CuO были улучшены интеграцией в полимерные матрицы (PCL-CuO-NPs) и обладали значительным противогрибковым действием на виды *C. albicans*, *C. glabrata* и *C. tropicalis* [39]. В исследовании фунгистатической активности наночастиц CuO сферической формы размером от 20 до 180 нм против *T. rubrum* и их наивысшая эффективность ингибирования роста наблюдалась при высокой концентрации (100 мкг/мл) и длительном времени воздействия (3 часа) [46]. Результаты другого исследования показали, что наночастицы Cu эффективны в борьбе с устойчивыми к флуконазолу *C. albicans* (МИК и МБК Cu-NPs против *C. albicans* составляли 2,5 и 5 мкг/мл соответственно) [50]. Сферические наночастицы меди, покрытые аскорбиновой кислотой, диаметром 250 нм проявляли устойчивую противогрибковую активность против *C. albicans* через 24 и даже 48 часов инкубации (МИК 500 мкг/мл) [47]. Существенный ингибирующий эффект наблюдался на скорость роста *A. niger* при различных концентрациях наночастиц Cu. Наночастицы Cu показали более сильную противогрибковую активность, чем CuSO₄ при одних используемых концентрациях [51].

УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К МЕДИ

Различные микроорганизмы успешно адаптировались к присутствию нескольких металлов за счёт исполь-

зования механизмов устойчивости к металлам, кодируемых хромосомами, плазмидами или транспозонами, и поэтому гены устойчивости могут очень эффективно передаваться другим членам сообщества. Когда уровни концентрации металлов слишком высоки, бактерии обычно реагируют экспрессией специфических систем устойчивости к металлам, таких как АТФазы Р-типа, металлотионеины, насосы оттока RND и/или переносчики CDF [52]. Основные механизмы толерантности к меди у бактерий включают:

1) трансмембранный экспорт меди, происходящий из цитоплазмы в периплазматическое пространство или во внеклеточную среду;

2) связывание меди металлотионеинами;

3) окисление Cu (I) мультиоксидазами меди с образованием менее токсичного иона Cu (II) [6].

Гены, обеспечивающие устойчивость бактерий к меди, часто присутствуют в плазмидах и организованы в оперон. Устойчивость к меди кодируется генами *cop* (*copA*, *copB*, *copC* и *copD*) и генами *pco* (*pcoA*, *pcoB*, *pcoC* и *pcoD*). Традиционная система *Cop/Pco* состоит из семи белков, CopABCDERS. CopA – АТФаза Р-типа, которая перекачивает Cu (I) из цитоплазмы к периплазме [53]. Другой ген *copA*, кодирующий мультиоксидазу меди, широко присутствует в штаммах Cu-резистентных бактерий и может представлять собой маркер для изучения Cu-резистентности у бактерий [54]. CopD и CopB представляют собой белки внутренней и внешней мембраны соответственно. CopE представляет собой растворимый белок, который связывает Cu (I) и предположительно связывает медь в периплазме. CopC считается периплазматическим шапероном меди. Белки PcoABCD гомологичны белкам CopABCD, но первоначально были идентифицированы на плазмидах [53]. Система Cus (чувствительность к Cu) воспринимает медь и запускает последующую внутриклеточную активность по её удалению. Эту систему белков у грамотрицательных бактерий также называют системой оттока и системой устойчивости, потому что она считывает количество меди и экспортирует её, чтобы продлить жизнь бактерий в присутствии Cu-атаки со стороны макрофагов хозяина [55].

Металлотионеины широко распространены среди эукариот, однако они также были обнаружены у некоторых прокариот, включая цианобактерии, псевдомонады и микобактерии. Их роль заключается в связывании, изоляции и буферизации избытка внутриклеточного металла. Бактериальные металлотионеины известны с середины 1980-х годов, но до недавнего времени обнаруживались только в грамотрицательной цианобактерии *Synechococcus* как белок SmtA, участвующий в детоксикации цинка. Недавно также было доказано присутствие металлотионеинов в *S. choleraesuis* и многих бактериях рода *Pseudomonas*. Присутствие металлотионеинов в *M. tuberculosis* может играть ключевую роль в вирулентности этих бактерий. Эти бактерии способны накапливать от 20 до 500 мМ Cu в микобактериальных фагосомах [56]. В дрожжах эти белки так же обеспечивают защиту от токсичности меди за счёт хелатирования избыточных ионов меди в клетке, например, два металлотионе-

ина CUP1 и Crs5 микроскопического грибка *S. cerevisiae* преимущественно связываются с медью, а также способны связываться с ионами цинка и кадмия [56].

Из устойчивой к меди *E. coli*, выделенной от свиней, получавших пищу с добавлением сульфата меди, была выделена плаزمид рRJ 1004. Эта плазмид придаёт устойчивость к солям меди благодаря плазмидным генам устойчивости к меди *рсо*. Штаммы *E. coli*, несущие детерминант *рсо*, могут переносить примерно в пять раз более высокие концентрации ионов меди, чем штаммы дикого типа. Были сообщения об устойчивости к меди у множества видов бактерий, в том числе *X. campestris* [57], *K. aerogenes* [58], *S. pneumoniae* [59]. Некоторые из механизмов устойчивости пассивны. Так, у *K. aerogenes*, вероятно, он связан с высокими уровнями внеклеточного полисахарида, продуцируемого этими штаммами [6]. Многочисленными исследованиями установлена роль антиоксидантных ферментов микроорганизмов в защите от окислительного стресса. Например, считается, что стафилоксантин – пигмент, покрывающий бактерию *S. aureus*, – в первую очередь отвечает за защитный механизм бактерии, обеспечивающий её устойчивость к атаке активных форм кислорода [43], что может дополнительно влиять на устойчивость к воздействию наночастиц меди. Ряд ферментов могут превращать АФК в менее токсичные продукты. Среди наиболее важных из них – каталазы, пероксиредоксины и супероксиддисмутазы, а также глутатион и связанная с ним система ферментов [17].

ТОКСИЧНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ И ОКСИДОВ МЕДИ

Медь, как менее токсичный элемент, оказывает серьёзное токсическое воздействие только при высоких концентрациях. Токсичность наноконструкций на основе меди зависит от состава и характеристик матрицы, размера и морфологии, и факторов окружающей среды. В настоящее время токсические эффекты меди и её соединений хорошо изучены, однако продолжают исследовать токсические эффекты меди в форме наночастиц. Токсичность меди в организме обусловлена с её свободной фракцией, не связанной с церулоплазмином [60]. Нарушения метаболизма меди приводят к тяжёлым метаболическим синдромам, таким как болезнь Вильсона (избыток меди) и Менкеса (недостаток меди). Смертельная доза проглоченной меди составляет от 10 до 20 г [61]. Мишенями для острого токсикоза медью являются желудочно-кишечный тракт, печень, почки, органы кроветворения, сердечно-сосудистая система и ЦНС. Сообщений о скелетно-мышечных, кожных, окулярных, иммунологических, канцерогенных, репродуктивных нарушениях у людей после перорального приёма солей меди, даже при высоких концентрациях, очень мало [62].

Желудочно-кишечный тракт является основным регулятором гомеостаза меди, так как около 50 % меди выводится с желчью, а оставшаяся половина выводится че-

рез другие желудочно-кишечные выделения [63]. Приём внутрь более 1 г сульфата меди вызывает симптомы отравления. Сульфат меди увеличивает уровни апоптоза, старения, митохондриальной дисфункции и экспрессию нескольких стрессовых белков [63]. Наночастицы CuO цитотоксичны по отношению к клеткам кишечника крысы в концентрации более 5 мкг/мл после 4- и 24-часового воздействия и человека в концентрации более 5 мкг/мл после 24-часового воздействия, причём в клетках крысы наночастицы CuO показали большую цитотоксичность, чем CuSO₄. В этом же исследовании показали, что наночастицы Cu₂O-PVP (поливинилпирролидон) могут образовывать растворимую медь, тогда как наночастицы CuO остаются неизменными. Данные свидетельствуют о том, что наночастицы Cu₂O-PVP токсичны из-за их растворения и преобразования в ионы Cu, тогда как наночастицы CuO обладают цитотоксичностью, не растворяясь с образованием ионов Cu [64].

В исследовании влияния добавления препаратов меди в пищу крыс в дозировке 6,5 мг/кг было выявлено, что наночастицы Cu по сравнению с CuS и CuCO₃ вызвали более низкую экскрецию Cu с фекалиями и мочой, увеличили накопление Cu в ткани мозга и вызывали некротические поражения печени [65].

Сравнительное исследование на крысах наночастиц (25 нм) и микрочастиц меди (14–25 мкм) *in vivo* показало, что наночастицы Cu вызывали повреждение эритроцитов, тимуса, селезёнки, печени и почек при дозе ≥ 200 мг/кг в сутки, но микрочастицы не вызывали каких-либо побочных эффектов даже в самой высокой дозе ≥ 400 мг/кг в сутки. Авторы полагают, что большая площадь поверхности и высокая растворимость в физиологической среде наночастиц напрямую повлияли на токсикологические реакции и биораспределение при пероральном введении [66].

По данным I. Na и D.C. Kennedy, тестируемые на клеточных линиях человека (HepG2 A549 и SH-SY5Y) наночастицы меди размером 40–60 нм были более цитотоксичными, чем наночастицы меньшего или большего размера. Эти частицы легче поглощались клетками и демонстрировали различную динамику стабильности в средах для культивирования клеток. Ещё неясно, почему наночастицы среднего размера проявляют такие свойства по сравнению как с более крупными, так и с более мелкими частицами [67].

При изучении влияния наночастиц Cu на крысах было показано снижение уровня ядерных рецепторов, что привело к значительному снижению мРНК и активности печёночных ферментов CYP450. Молекулярные механизмы, ответственные за эти токсические эффекты, включают сигнальные пути NF-κB, MAPK и STAT5 [68].

При одном и том же уровне дозы биологически синтезированные CuO-NPs вызывали более сильные токсические эффекты, чем химически синтезированные CuO-NPs [69].

Все данные предоставляют новые доказательства того, что существует острая необходимость предотвращения неблагоприятного воздействия наночастиц меди и оксидов меди на макроорганизм. Стабилизированные

матрицами наночастицы показывают более эффективные биоцидные свойства, а модифицированное высвобождение ионов позволяет уменьшать цитотоксичность. Цитотоксичность меди наблюдалась как при физиологических, так и при патологических условиях, поэтому существуют перспективы создания лекарств от рака на основе меди, которые вызывают апоптотический ответ в раковых клетках. Например, наночастицы альбумина в качестве носителей для Cu-NPs подавляли жизнеспособность раковых клеток и в то же время были менее токсичны для нормальных клеток, чем «чистые» Cu-NPs [70].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, представленные в данном обзоре ведущие достижения в области разработки наноконструктивных материалов меди с подтверждёнными высокими антимикробными свойствами показали перспективность создания на их основе новых универсальных лекарственных средств, успешного их использования в противомикробной терапии различных заболеваний, а также создания изделий медицинского назначения (имплантаты, антибактериальные покрытия и т. д.) и систем целенаправленной доставки лекарственных средств. Наночастицы меди и её оксида представляют большой интерес из-за проявления каталитической, антибактериальной и противогрибковой активности наряду с низкой цитотоксичностью в различных областях применения.

Вместе с тем, с целью лучшего понимания их биологических, в том числе антибактериальных свойств, требуется продолжение исследований в этой области. В сравнении с другими, особенно серебряными наночастицами, а также частицами других благородных металлов, медные на сегодняшний день менее исследованы. Точный механизм действия наночастиц меди и её оксидов на микро- и макроорганизм нуждается в дальнейшем изучении. Недостаточно исследований в отношении токсичности наночастиц, особенно связанных с механизмами действия. Необходимо пополнение экспериментальных данных *in vivo* об их антимикробной активности с учётом возможного токсического действия на живые ткани, клетки человека.

Необходимо также продолжение и стимулирование исследований в области «зелёного» синтеза – биологического метода получения металлических наночастиц из солей металлов с использованием в качестве восстанавливающих и стабилизирующих агентов экстрактов растений, которые могут стать альтернативой существующим на данный момент современным антимикробным препаратам.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мелешко А.А., Афиногенова А.Г., Афиногенов Г.Е., Спиридонова А.А., Толстой В.П. Антибактериальные неорга-

нические агенты: эффективность использования многокомпонентных систем. *Инфекция и иммунитет*. 2020; 10(4): 639-654. doi: 10.15789/2220-7619-AIA-1512

2. Díez-Pascual AM. Antibacterial action of nanoparticle loaded nanocomposites based on graphene and its derivatives: A mini-review. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(10): 3563. doi: 10.3390/ijms21103563

3. Mitra D, Kang ET, Neoh KG. Antimicrobial copper-based materials and coatings: Potential multifaceted biomedical applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020; 12(19): 21159-21182. doi: 10.1021/acsmi.9b17815

4. Tamayo L, Azócar M, Kogan M, Riveros A, Páez M. Copper-polymer nanocomposites: An excellent and cost-effective biocide for use on antibacterial surfaces. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016; 1(69): 1391-1409. doi: 10.1016/j.msec.2016.08.041

5. Dennison C, David S, Lee J. Bacterial copper storage proteins. *J Biol Chem*. 2018; 293(13): 4616-4627. doi: 10.1074/jbc.TM117.000180

6. Ladomersky E, Petris MJ. Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics*. 2015; 7(6): 957-964. doi: 10.1039/c4mt00327f

7. Stafford SL, Bokil NJ, Achard ME, Kapetanovic R, Schembri MA, McEwan AG, et al. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: Emerging roles for zinc and copper. *Biosci Rep*. 2013; 33(4): e00049. doi: 10.1042/BSR20130014

8. Akhidime ID, Saubade F, Benson PS, Butler J, Olivier S, Kelly P, et al. The antimicrobial effect of metal substrates on food pathogens. *Food Bioprod Process*. 2019; 113: 68-76. doi: 10.1016/j.fbp.2018.09.003

9. Sánchez-Sanhuesa G, Fuentes-Rodríguez D, Bello-Toledo H. Copper nanoparticles as potential antimicrobial agent in disinfecting root canals. A systematic review. *Int J Odontostomat*. 2016; 10(3): 547-554. doi: 10.4067/S0718-381X2016000300024

10. Macomber L, Imlay JA. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(20): 8344-8349. doi: 10.1073/pnas.0812808106

11. Vimbela GV, Ngo SM, Frazee C, Yang L, Stout DA. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12: 3941-3965. doi: 10.2147/IJN.S134526

12. Pinto RJB, Daina S, Sadocco P, Neto CP, Trindade T. Antibacterial activity of nanocomposites of copper and cellulose. *Biomed Res Int*. 2013; 2013(1-2): 280512. doi: 10.1155/2013/280512

13. Meghana S, Kabra P, Chakraborty S, Padmavathy N. Understanding the pathway of antibacterial activity of copper oxide nanoparticles. *RSC Advances*. 2015; 5(16): 12293-12299. doi: 10.1039/C4RA12163E

14. Cheeseman S, Christofferson AJ, Kariuki R, Cozzolino D, Daeneke T, Crawford RJ, et al. Antimicrobial metal nanomaterials: From passive to stimuli-activated applications. *Adv Sci (Weinh)*. 2020; 7(10): 1902913. doi: 10.1002/adv.201902913

15. Pham AN, Xing G, Miller CJ, Waite TD. Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *J Catal*. 2013; 301: 54-64. doi: 10.1016/j.jcat.2013.01.025

16. Ma Y, Chen Y, Huang J, Zhang Z, Zhao D, Zhang X, et al. A novel colloidal deposition method to prepare copper nanoparticles/polystyrene nanocomposite with antibacterial activity and its comparison to the liquid-phase in situ reduction method. *Chem Pap*. 2020; 74: 471-483. doi: 10.1007/s11696-019-00888-6

17. Fang FC. Antimicrobial actions of reactive oxygen species. *mBio*. 2011; 2(5): e00141-11. doi: 10.1128/mBio.00141-11
18. Yang Z, Hao X, Chen S, Ma Z, Wang W, Wang C, et al. Long-term antibacterial stable reduced graphene oxide nanocomposites loaded with cuprous oxide nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2019; 533: 13-23. doi: 10.1016/j.jcis.2018.08.053
19. Zakharova OV, Godymchuk AY, Gusev AA, Gulchenko SI, Vasyukova IA, Kuznetsov DV. Considerable variation of antibacterial activity of Cu nanoparticles suspensions depending on the storage time, dispersive medium, and particle sizes. *Biomed Res Int*. 2015; 2015(3): 412530. doi: 10.1155/2015/412530
20. Majumdar TD, Singh M, Thapa M, Dutta M, Mukherjee A, Ghosh CK. Size-dependent antibacterial activity of copper nanoparticles against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* – A synthetic and mechanistic approach. *Colloids Interface Sci Commun*. 2019; 32: 100190. doi: 10.1016/j.colcom.2019.100190
21. Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G, Suresh S. Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Adv Mater*. 2009; 21: 419-424. doi: 10.1002/adma.200801393
22. Yao D, Guo Y, Chen S, Tang J, Chen Y. Shaped core/shell polymer nanoobjects with high antibacterial activities via block copolymer microphase separation. *Polymer*. 2013; 54(14): 3485-3491. doi: 10.1016/j.polymer.2013.05.005
23. Usman M, El Zowalaty M, Shameli K, Zainuddin N, Salama M, Ibrahim NA. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8: 4467-4479. doi: 10.2147/IJN.S50837
24. Bezza FA, Tichapondwa SM, Chirwa EMN. Fabrication of monodispersed copper oxide nanoparticles with potential application as antimicrobial agents. *Sci Rep*. 2020; 10: 16680. doi: 10.1038/s41598-020-73497-z
25. Hsueh YH, Tsai PH, Lin KS. pH-dependent antimicrobial properties of copper oxide nanoparticles in *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(4): 793. doi: 10.3390/ijms18040793
26. Krasowska A, Sigler K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front Cell Infect Microbiol*. 2014; 4: 112. doi: 10.3389/fcimb.2014.00112
27. Chen Y, Ding Y, Zheng J. A polymer nanocomposite coating with enhanced hydrophilicity, antibacterial and antibiofouling properties: role of polymerizable emulsifier/anionic ligand. *Chem Eng J*. 2019; 379: 122268. doi: 10.1016/j.cej.2019.122268
28. He M, Wang Q, Zhao W, Zhao C. A substrate-independent ultrathin hydrogel film as an antifouling and antibacterial layer for a microfiltration membrane anchored via a layer-by-layer thiol-ene click reaction. *J Mater Chem B*. 2018; 6(23): 3904-3913. doi: 10.1039/C8TB00937F
29. Emelyanenko AM, Pytskii IS, Kaminsky VV, Chulkova EV, Domantovsky AG, Emelyanenko KA, et al. Superhydrophobic copper in biological liquids: Antibacterial activity and microbiologically induced or inhibited corrosion. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020; 185: 110622. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110622
30. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*. 2018; 4(12): e01067. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e01067
31. Chan Y, Wu XH, Chieng BW, Ibrahim NA, Then YY. Superhydrophobic nanocoatings as intervention against biofilm-associated bacterial infections. *Nanomaterials*. 2021; 11(4): 1046. doi: 10.3390/nano11041046
32. Palza H, Quijada R, Delgado K. Antimicrobial polymer composites with copper micro- and nanoparticles: Effect of particle size and polymer matrix. *J Bioact Compat Polym*. 2015; 30(4): 366-380. doi: 10.1177/0883911515578870
33. Corbo C, Molinaro R, Parodi A, Toledano Furman NE, Salvatore F, Tasciotti E. The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. *Nano-medicine (Lond)*. 2016; 11(1): 81-100. doi: 10.2217/nmm.15.188
34. García-Álvarez R, Vallet-Regí M. Hard and soft protein corona of nanomaterials: Analysis and relevance. *Nanomaterials (Basel)*. 2021; 11(4): 888. doi: 10.3390/nano11040888
35. Singh J, Dutta T, Kim KH, Rawat M, Samddar P, Kumar P. 'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *J Nanobiotechnol*. 2018; 16(1): 84. doi: 10.1186/s12951-018-0408-4
36. Felipe Jaramillo A, Riquelme S, Montoya LF, Sánchez-Sanhueza G, Medinam C, Rojas D, et al. Influence of the concentration of copper nanoparticles on the thermo-mechanical and antibacterial properties of nanocomposites based on poly(butylene adipate-co-terephthalate). *Polym Compos*. 2019; 40: 1870-1882. doi: 10.1002/pc.24949
37. John MS, Nagoth JA, Zannotti M, Giovannetti R, Mancini A, Ramasamy KP, et al. Biogenic synthesis of copper nanoparticles using bacterial strains isolated from an antarctic consortium associated to a psychrophilic marine ciliate: Characterization and potential application as antimicrobial agents. *Mar Drugs*. 2021; 19(5): 263. doi: 10.3390/md19050263
38. Regmi A, Bhandari J, Bhattarai S, Gautam SK. Synthesis, characterizations and antimicrobial activity of cuprous oxide (Cu₂O) nanoparticles. *J Nepal Chem Soc*. 2019; 40: 5-10. doi: 10.3126/jncs.v40i0.27271
39. Muñoz-Escobar A, Reyes-López SY. Antifungal susceptibility of *Candida* species to copper oxide nanoparticles on polycaprolactone fibers (PCL-CuONPs). *PLoS One*. 2020; 15(2): e0228864. doi: 10.1371/journal.pone.0228864
40. Chen H, Wu J, Wu M, Jia H. Preparation and antibacterial activities of copper nanoparticles encapsulated by carbon. *New Carbon Mater*. 2019; 34(4): 382-389. doi: 10.1016/S1872-5805(19)30023-X
41. Xie YY, Hu XH, Zhang YW, Wahid F, Chu LQ, Jia SR, et al. Development and antibacterial activities of bacterial cellulose/graphene oxide-CuO nanocomposite films. *Carbohydr Polym*. 2020; 229: 115456. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115456
42. Muñoz-Escobar A, Ruiz-Baltazar ÁJ, Reyes-López SY. Novel route of synthesis of PCL-CuONPs composites with antimicrobial properties. *Dose Response*. 2019; 17(3): 1559325819869502. doi: 10.1177/1559325819869502
43. Bogdanović U, Vodnik V, Mitrić M, Dimitrijević S, Škapin SD, Žunič V, et al. Nanomaterial with high antimicrobial efficacy – copper/polyaniline nanocomposite. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015; 7(3): 1955-1966. doi: 10.1021/am507746m
44. Dobrovolný K, Ulbrich P, Švecová M, Rimpelová S, Malinčík J, Kohout M, et al. Copper nanoparticles in glycerol-polyvinyl alcohol matrix: In situ preparation, stabilisation and antimicrobial activity. *J Alloys Compd*. 2017; 697: 147-155. doi: 10.1016/j.jallcom.2016.12.144
45. Basumallick S, Rajasekaran P, Tetard L, Santra S. Hydrothermally derived water-dispersible mixed valence copper-chitosan

nanocomposite as exceptionally potent antimicrobial agent. *J Nanopart Res.* 2014; 16: 2675. doi: 10.1007/s11051-014-2675-9

46. Kadhim A, Haleem AM, Abbas RH. Copper oxide NPs: Synthesis and their anti-dermatophyte activity against *Trichophyton rubrum*. *Engineering and Technology Journal.* 2019; 35(3): 276-281.

47. Beltrán-Partida E, Valdez-Salas B, Valdez-Salas E. Synthesis, characterization, and in situ antifungal and cytotoxicity evaluation of ascorbic acid-capped copper nanoparticles. *J Nanomater.* 2019; 2019: 5287632. doi: 10.1155/2019/5287632

48. Xu X, Shen J, Qin J, Duan H, He G, Chen H. Cytotoxicity of bacteriostatic reduced graphene oxide-based copper oxide nanocomposites. *JOM.* 2019; 71(1): 294-301. doi: 10.1007/s11837-018-3197-1

49. Amiri M, Etemadifar Z, Daneshkazemi A, Nateghi M. Antimicrobial effect of copper oxide nanoparticles on some oral bacteria and *Candida* species. *J Dent Biomater.* 2017; 4(1): 347-352.

50. Ubaid R, Sah SK, Srinivasan H. Effect of biosynthesized copper nanoparticles (cunps) on the growth and biofilm formation of fluconazole-resistant *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2019; 9(1): 21-24. doi: 10.15414/jmbfs.2019.9.1.21-24

51. Abdelghany T, Bakri M, Al-Rajhi A, Al Abboud M, Alawlaqi M, Rhaman A, et al. Impact of copper and its nanoparticles on growth, ultrastructure, and laccase production of *Aspergillus niger* using Corn Cobs Wastes. *Bioresources.* 2020; 15(2): 3289-3306. doi: 10.15376/biores.15.2.3289-3306

52. Chudobova D, Dostalova S, Ruttkay-Nedecky B, Guran R, Rodrigo MAM, Tmejova K, et al. The effect of metal ions on *Staphylococcus aureus* revealed by biochemical and mass spectrometric analyses. *Microbiol Res.* 2015; 170: 147-156. doi: 10.1016/j.micres.2014.08.003

53. Lawton TJ, Kenney GE, Hurley JD, Rosenzweig AC. The CopC family: Structural and bioinformatic insights into a diverse group of periplasmic copper binding proteins. *Biochemistry.* 2016; 55(15): 2278-2290. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00175

54. Altimira F, Yáñez C, Bravo G, González M, Rojas LA, Seeger M. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiol.* 2012; 12: 193. doi: 10.1186/1471-2180-12-193

55. Doerrer L. Cu in biology: Unleashed by O₂ and now irreplaceable. *Inorganica Chim Acta.* 2017; 481: 4-24. doi: 10.1016/j.ica.2017.11.051

56. Chatterjee S, Kumari S, Rath S, Priyadarshane M, Das S. Diversity, structure and regulation of microbial metallothionein: metal resistance and possible applications in sequestration of toxic metals. *Metallomics.* 2020; 12(11): 1637-1655. doi: 10.1039/d0mt00140f

57. Lai YR, Lin CH, Chang CP, Ni HF, Tsai WS, Huang CJ. Distribution of copper resistance gene variants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. *Plant Protect Sci.* 2021; 57: 206-216. doi: 10.17221/160/2020-PPS

58. Wu F, Ying Y, Yin M, Jiang Y, Wu C, Qian C, et al. Molecular characterization of a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain R46 isolated from a rabbit. *Int J Genomics.* 2019; 2019: 5459190. doi: 10.1155/2019/5459190

59. Shafeeq S, Yesilkaya H, Kloosterman T, Narayanan G, Wandel M, Andrew P, et al. The Cop operon is required for copper homeostasis and contributes to virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 2011; 81(5): 1255-1270. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07758.x

60. Poujois A, Poupon J, Woimant F. Chapter 22 – Direct determination of non-ceruloplasmin-bound copper in plasma. In: Kerkar N, Roberts EA (eds.). *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Academic Press, 2019; 249-255. doi: 10.1016/B978-0-12-810532-0.00022-7

61. Gray JP, Suhali-Amacher N, Ray SD. Chapter 19 – Metals and metal antagonists. In: Sidhartha D. Ray (eds.). *Side Effects of Drugs Annual*. Elsevier, 2017; 39: 197-208. doi: 10.1016/bs.seda.2017.07.001

62. National Research Council (US) Committee on Copper in Drinking Water. *Copper in Drinking Water*. Washington, DC: The National Academies Press; 2000. doi: 10.17226/9782

63. Royer A, Sharman T. *Copper toxicity*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021: 1-7. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557456/> [date of access: 29.06.2021].

64. Henson T, Navratilova J, Griggs J, Bradham K, Bradham KD, Rogers KR, et al. *In vitro* intestinal toxicity of copper oxide nanoparticles in rat and human cell models. *Nanotoxicology.* 2019; 13(6): 795-811. doi: 10.1080/17435390.2019.1578428

65. Cholewińska E, Ognik K, Fotschki B, Zduńczyk Z, Juśkiewicz J. Comparison of the effect of dietary copper nanoparticles and one copper (II) salt on the copper biodistribution and gastrointestinal and hepatic morphology and function in a rat model. *PLoS One.* 2018; 13(5): e0197083. doi: 10.1371/journal.pone.0197083

66. Lee IC, Ko JW, Park SH, Shin NR, Shin IS, Moon C, et al. Comparative toxicity and biodistribution assessments in rats following subchronic oral exposure to copper nanoparticles and microparticles. *Part Fibre Toxicol.* 2016; 13(1): 56. doi: 10.1186/s12989-016-0169-x

67. Na I, Kennedy DC. Size-specific copper nanoparticle cytotoxicity varies between human cell lines. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(4): 1548. doi: 10.3390/ijms22041548

68. Tang H, Xu M, Luo J, Zhao L, Ye G, Shi F, et al. Liver toxicity assessments in rats following sub-chronic oral exposure to copper nanoparticles. *Environ Sci Eur.* 2019; 31: 30. doi: 10.1186/s12302-019-0214-0

69. El Bialy BE, Hamouda RA, Abd Eldaim MA, El Ballal SS, Heikal HS, Khalifa HK, et al. Comparative toxicological effects of biologically and chemically synthesized copper oxide nanoparticles on mice. *Int J Nanomedicine.* 2020; 15: 3827-3842. doi: 10.2147/IJN.S241922

70. Azizi M, Ghourchian H, Yazdian F, Dashtestani F, Alizadeh-Zeinabad H. Cytotoxic effect of albumin coated copper nanoparticle on human breast cancer cells of MDA-MB 231. *PLoS One.* 2017; 12(11): e0188639. doi: 10.1371/journal.pone.0188639

REFERENCES

1. Meleshko AA, Afinogenova AG, Afinogenov GE, Spiridonova AA, Tolstoy VP. Antibacterial inorganic agents: Efficiency of using multicomponent systems. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2020; 10(4): 639-654. (In Russ.). doi: 10.15789/2220-7619-AIA-1512

2. Díez-Pascual AM. Antibacterial action of nanoparticle loaded nanocomposites based on graphene and its derivatives: A mini-review. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(10): 3563. doi: 10.3390/ijms21103563

3. Mitra D, Kang ET, Neoh KG. Antimicrobial copper-based materials and coatings: Potential multifaceted biomedical applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020; 12(19): 21159-21182. doi: 10.1021/acsami.9b17815
4. Tamayo L, Azócar M, Kogan M, Riveros A, Páez M. Copper-polymer nanocomposites: An excellent and cost-effective biocide for use on antibacterial surfaces. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016; 1(69): 1391-1409. doi: 10.1016/j.msec.2016.08.041
5. Dennison C, David S, Lee J. Bacterial copper storage proteins. *J Biol Chem*. 2018; 293(13): 4616-4627. doi: 10.1074/jbc.TM117.000180
6. Ladomersky E, Petris MJ. Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics*. 2015; 7(6): 957-964. doi: 10.1039/c4mt00327f
7. Stafford SL, Bokil NJ, Achard ME, Kapetanovic R, Schembri MA, McEwan AG, et al. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: Emerging roles for zinc and copper. *Biosci Rep*. 2013; 33(4): e00049. doi: 10.1042/BSR20130014
8. Akhidime ID, Saubade F, Benson PS, Butler J, Olivier S, Kelly P, et al. The antimicrobial effect of metal substrates on food pathogens. *Food Bioprod Process*. 2019; 113: 68-76. doi: 10.1016/j.fbp.2018.09.003
9. Sánchez-Sanhueza G, Fuentes-Rodríguez D, Bello-Toledo H. Copper nanoparticles as potential antimicrobial agent in disinfecting root canals. A systematic review. *Int J Odontostomat*. 2016; 10(3): 547-554. doi: 10.4067/S0718-381X2016000300024
10. Macomber L, Imlay JA. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106(20): 8344-8349. doi: 10.1073/pnas.0812808106
11. Vimbela GV, Ngo SM, Frazee C, Yang L, Stout DA. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12: 3941-3965. doi: 10.2147/IJN.S134526
12. Pinto RJB, Daina S, Sadocco P, Neto CP, Trindade T. Antibacterial activity of nanocomposites of copper and cellulose. *Biomed Res Int*. 2013; 2013(1-2): 280512. doi: 10.1155/2013/280512
13. Meghana S, Kabra P, Chakraborty S, Padmavathy N. Understanding the pathway of antibacterial activity of copper oxide nanoparticles. *RSC Advances*. 2015; 5(16): 12293-12299. doi: 10.1039/C4RA12163E
14. Cheeseman S, Christofferson AJ, Kariuki R, Cozzolino D, Daeneke T, Crawford RJ, et al. Antimicrobial metal nanomaterials: From passive to stimuli-activated applications. *Adv Sci (Weinh)*. 2020; 7(10): 1902913. doi: 10.1002/advs.201902913
15. Pham AN, Xing G, Miller CJ, Waite TD. Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *J Catal*. 2013; 301: 54-64. doi: 10.1016/j.jcat.2013.01.025
16. Ma Y, Chen Y, Huang J, Zhang Z, Zhao D, Zhang X, et al. A novel colloidal deposition method to prepare copper nanoparticles/polystyrene nanocomposite with antibacterial activity and its comparison to the liquid-phase in situ reduction method. *Chem Pap*. 2020; 74: 471-483. doi: 10.1007/s11696-019-00888-6
17. Fang FC. Antimicrobial actions of reactive oxygen species. *mBio*. 2011; 2(5): e00141-11. doi: 10.1128/mBio.00141-11
18. Yang Z, Hao X, Chen S, Ma Z, Wang W, Wang C, et al. Long-term antibacterial stable reduced graphene oxide nanocomposites loaded with cuprous oxide nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2019; 533: 13-23. doi: 10.1016/j.jcis.2018.08.053
19. Zakharova OV, Godymchuk AY, Gusev AA, Gulchenko SI, Vasyukova IA, Kuznetsov DV. Considerable variation of antibacterial activity of Cu nanoparticles suspensions depending on the storage time, dispersive medium, and particle sizes. *Biomed Res Int*. 2015; 2015(3): 412530. doi: 10.1155/2015/412530
20. Majumdar TD, Singh M, Thapa M, Dutta M, Mukherjee A, Ghosh CK. Size-dependent antibacterial activity of copper nanoparticles against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* – A synthetic and mechanistic approach. *Colloids Interface Sci Commun*. 2019; 32: 100190. doi: 10.1016/j.colcom.2019.100190
21. Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G, Suresh S. Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Adv Mater*. 2009; 21: 419-424. doi: 10.1002/adma.200801393
22. Yao D, Guo Y, Chen S, Tang J, Chen Y. Shaped core/shell polymer nanoobjects with high antibacterial activities via block copolymer microphase separation. *Polymer*. 2013; 54(14): 3485-3491. doi: 10.1016/j.polymer.2013.05.005
23. Usman M, El Zowalaty M, Shameli K, Zainuddin N, Salama M, Ibrahim NA. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8: 4467-4479. doi: 10.2147/IJN.S50837
24. Bezza FA, Tichapondwa SM, Chirwa EMN. Fabrication of monodispersed copper oxide nanoparticles with potential application as antimicrobial agents. *Sci Rep*. 2020; 10: 16680. doi: 10.1038/s41598-020-73497-z
25. Hsueh YH, Tsai PH, Lin KS. pH-dependent antimicrobial properties of copper oxide nanoparticles in *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(4): 793. doi: 10.3390/ijms18040793
26. Krasowska A, Sigler K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front Cell Infect Microbiol*. 2014; 4: 112. doi: 10.3389/fcimb.2014.00112
27. Chen Y, Ding Y, Zheng J. A polymer nanocomposite coating with enhanced hydrophilicity, antibacterial and antibiofouling properties: role of polymerizable emulsifier/anionic ligand. *Chem Eng J*. 2019; 379: 122268. doi: 10.1016/j.cej.2019.122268
28. He M, Wang Q, Zhao W, Zhao C. A substrate-independent ultrathin hydrogel film as an antifouling and antibacterial layer for a microfiltration membrane anchored via a layer-by-layer thiol-ene click reaction. *J Mater Chem B*. 2018; 6(23): 3904-3913. doi: 10.1039/C8TB00937F
29. Emelyanenko AM, Pytskii IS, Kaminsky VV, Chulkova EV, Domantovsky AG, Emelyanenko KA, et al. Superhydrophobic copper in biological liquids: Antibacterial activity and microbiologically induced or inhibited corrosion. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020; 185: 110622. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110622
30. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EL. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*. 2018; 4(12): e01067. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e01067
31. Chan Y, Wu XH, Chieng BW, Ibrahim NA, Then YY. Superhydrophobic nanocoatings as intervention against biofilm-associated bacterial infections. *Nanomaterials*. 2021; 11(4): 1046. doi: 10.3390/nano11041046
32. Palza H, Quijada R, Delgado K. Antimicrobial polymer composites with copper micro- and nanoparticles: Effect of particle size and polymer matrix. *J Bioact Compat Polym*. 2015; 30(4): 366-380. doi: 10.1177/0883911515578870
33. Corbo C, Molinaro R, Parodi A, Toledano Furman NE, Salvatore F, Tasciotti E. The impact of nanoparticle protein corona

- on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. *Nano-medicine (Lond)*. 2016; 11(1): 81-100. doi: 10.2217/nnm.15.188
34. García-Álvarez R, Vallet-Regí M. Hard and soft protein corona of nanomaterials: Analysis and relevance. *Nanomaterials (Basel)*. 2021; 11(4): 888. doi: 10.3390/nano11040888
35. Singh J, Dutta T, Kim KH, Rawat M, Samddar P, Kumar P. 'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *J Nanobiotechnol*. 2018; 16(1): 84. doi: 10.1186/s12951-018-0408-4
36. Felipe Jaramillo A, Riquelme S, Montoya LF, Sánchez-Sanhueza G, Medinam C, Rojas D, et al. Influence of the concentration of copper nanoparticles on the thermo-mechanical and antibacterial properties of nanocomposites based on poly(butylene adipate-co-terephthalate). *Polym Compos*. 2019; 40: 1870-1882. doi: 10.1002/pc.24949
37. John MS, Nagoth JA, Zannotti M, Giovannetti R, Mancini A, Ramasamy KP, et al. Biogenic synthesis of copper nanoparticles using bacterial strains isolated from an antarctic consortium associated to a psychrophilic marine ciliate: Characterization and potential application as antimicrobial agents. *Mar Drugs*. 2021; 19(5): 263. doi: 10.3390/md19050263
38. Regmi A, Bhandari J, Bhattarai S, Gautam SK. Synthesis, characterizations and antimicrobial activity of cuprous oxide (Cu₂O) nanoparticles. *J Nepal Chem Soc*. 2019; 40: 5-10. doi: 10.3126/jncs.v40i0.27271
39. Muñoz-Escobar A, Reyes-López SY. Antifungal susceptibility of *Candida* species to copper oxide nanoparticles on polycaprolactone fibers (PCL-CuONPs). *PLoS One*. 2020; 15(2): e0228864. doi: 10.1371/journal.pone.0228864
40. Chen H, Wu J, Wu M, Jia H. Preparation and antibacterial activities of copper nanoparticles encapsulated by carbon. *New Carbon Mater*. 2019; 34(4): 382-389. doi: 10.1016/S1872-5805(19)30023-X
41. Xie YY, Hu XH, Zhang YW, Wahid F, Chu LQ, Jia SR, et al. Development and antibacterial activities of bacterial cellulose/graphene oxide-CuO nanocomposite films. *Carbohydr Polym*. 2020; 229: 115456. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115456
42. Muñoz-Escobar A, Ruiz-Baltazar AJ, Reyes-López SY. Novel route of synthesis of PCL-CuONPs composites with antimicrobial properties. *Dose Response*. 2019; 17(3): 1559325819869502. doi: 10.1177/1559325819869502
43. Bogdanović U, Vodnik V, Mitrić M, Dimitrijević S, Škapin SD, Žunič V, et al. Nanomaterial with high antimicrobial efficacy – copper/polyaniline nanocomposite. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015; 7(3): 1955-1966. doi: 10.1021/am507746m
44. Dobrovolný K, Ulbrich P, Švecová M, Rimpelová S, Malinčík J, Kohout M, et al. Copper nanoparticles in glycerol-polyvinyl alcohol matrix: In situ preparation, stabilisation and antimicrobial activity. *J Alloys Compd*. 2017; 697: 147-155. doi: 10.1016/j.jallcom.2016.12.144
45. Basumallick S, Rajasekaran P, Tetard L, Santra S. Hydrothermally derived water-dispersible mixed valence copper-chitosan nanocomposite as exceptionally potent antimicrobial agent. *J Nanopart Res*. 2014; 16: 2675. doi: 10.1007/s11051-014-2675-9
46. Kadhim A, Haleem AM, Abbas RH. Copper oxide NPs: Synthesis and their anti-dermatophyte activity against *Trichophyton rubrum*. *Engineering and Technology Journal*. 2019; 35(3): 276-281.
47. Beltrán-Partida E, Valdez-Salas B, Valdez-Salas E. Synthesis, characterization, and in situ antifungal and cytotoxicity evaluation of ascorbic acid-capped copper nanoparticles. *J Nanomater*. 2019; 2019: 5287632. doi: 10.1155/2019/5287632
48. Xu X, Shen J, Qin J, Duan H, He G, Chen H. Cytotoxicity of bacteriostatic reduced graphene oxide-based copper oxide nanocomposites. *JOM*. 2019; 71(1): 294-301. doi: 10.1007/s11837-018-3197-1
49. Amiri M, Etemadifar Z, Daneshkazemi A, Nateghi M. Antimicrobial effect of copper oxide nanoparticles on some oral bacteria and *Candida* species. *J Dent Biomater*. 2017; 4(1): 347-352.
50. Ubaid R, Sah SK, Srinivasan H. Effect of biosynthesized copper nanoparticles (cunps) on the growth and biofilm formation of fluconazole-resistant *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol Food Sci*. 2019; 9(1): 21-24. doi: 10.15414/jmbfs.2019.9.1.21-24
51. Abdelghany T, Bakri M, Al-Rajhi A, Al Abboud M, Alawlaqi M, Rhaman A, et al. Impact of copper and its nanoparticles on growth, ultrastructure, and laccase production of *Aspergillus niger* using Corn Cobs Wastes. *Bioresources*. 2020; 15(2): 3289-3306. doi: 10.15376/biores.15.2.3289-3306
52. Chudobova D, Dostalova S, Ruttkay-Nedecky B, Guran R, Rodrigo MAM, Tmejova K, et al. The effect of metal ions on *Staphylococcus aureus* revealed by biochemical and mass spectrometric analyses. *Microbiol Res*. 2015; 170: 147-156. doi: 10.1016/j.micres.2014.08.003
53. Lawton TJ, Kenney GE, Hurley JD, Rosenzweig AC. The CopC family: Structural and bioinformatic insights into a diverse group of periplasmic copper binding proteins. *Biochemistry*. 2016; 55(15): 2278-2290. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00175
54. Altimira F, Yáñez C, Bravo G, González M, Rojas LA, Seeger M. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiol*. 2012; 12: 193. doi: 10.1186/1471-2180-12-193
55. Doerrer L. Cu in biology: Unleashed by O₂ and now irreplaceable. *Inorganica Chim Acta*. 2017; 481: 4-24. doi: 10.1016/j.ica.2017.11.051
56. Chatterjee S, Kumari S, Rath S, Priyadarshaneeta M, Das S. Diversity, structure and regulation of microbial metallothionein: metal resistance and possible applications in sequestration of toxic metals. *Metallomics*. 2020; 12(11): 1637-1655. doi: 10.1039/d0mt00140f
57. Lai YR, Lin CH, Chang CP, Ni HF, Tsai WS, Huang CJ. Distribution of copper resistance gene variants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. *Plant Protect Sci*. 2021; 57: 206-216. doi: 10.17221/160/2020-PPS
58. Wu F, Ying Y, Yin M, Jiang Y, Wu C, Qian C, et al. Molecular characterization of a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain R46 isolated from a rabbit. *Int J Genomics*. 2019; 2019: 5459190. doi: 10.1155/2019/5459190
59. Shafeeq S, Yesilkaya H, Kloosterman T, Narayanan G, Wandel M, Andrew P, et al. The Cop operon is required for copper homeostasis and contributes to virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*. 2011; 81(5): 1255-1270. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07758.x
60. Poujois A, Poupon J, Woimant F. Chapter 22 – Direct determination of non-feruloyl-bound copper in plasma. In: Kerkar N, Roberts EA (eds.). *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*. Academic Press, 2019; 249-255. doi: 10.1016/B978-0-12-810532-0.00022-7

61. Gray JP, Suhali-Amacher N, Ray SD. *Chapter 19 – Metals and metal antagonists*. In: Sidhartha D. Ray (eds.). *Side Effects of Drugs Annual*. Elsevier, 2017; 39: 197-208. doi: 10.1016/bs.seda.2017.07.001
62. National Research Council (US) Committee on Copper in Drinking Water. *Copper in Drinking Water*. Washington, DC: The National Academies Press; 2000. doi: 10.17226/9782
63. Royer A, Sharman T. *Copper toxicity*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021: 1-7. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557456/> [date of access: 29.06.2021].
64. Henson T, Navratilova J, Griggs J, Bradham K, Bradham KD, Rogers KR, et al. *In vitro* intestinal toxicity of copper oxide nanoparticles in rat and human cell models. *Nanotoxicology*. 2019; 13(6): 795-811. doi: 10.1080/17435390.2019.1578428
65. Cholewińska E, Ognik K, Fotschki B, Zduńczyk Z, Juśkiewicz J. Comparison of the effect of dietary copper nanoparticles and one copper (II) salt on the copper biodistribution and gastrointestinal and hepatic morphology and function in a rat model. *PLoS One*. 2018; 13(5): e0197083. doi: 10.1371/journal.pone.0197083
66. Lee IC, Ko JW, Park SH, Shin NR, Shin IS, Moon C, et al. Comparative toxicity and biodistribution assessments in rats following subchronic oral exposure to copper nanoparticles and microparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2016; 13(1): 56. doi: 10.1186/s12989-016-0169-x
67. Na I, Kennedy DC. Size-specific copper nanoparticle cytotoxicity varies between human cell lines. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(4): 1548. doi: 10.3390/ijms22041548
68. Tang H, Xu M, Luo J, Zhao L, Ye G, Shi F, et al. Liver toxicity assessments in rats following sub-chronic oral exposure to copper nanoparticles. *Environ Sci Eur*. 2019; 31: 30. doi: 10.1186/s12302-019-0214-0
69. El Bialy BE, Hamouda RA, Abd Eldaim MA, El Ballal SS, Heikal HS, Khalifa HK, et al. Comparative toxicological effects of biologically and chemically synthesized copper oxide nanoparticles on mice. *Int J Nanomedicine*. 2020; 15: 3827-3842. doi: 10.2147/IJN.S241922
70. Azizi M, Ghourchian H, Yazdian F, Dashtestani F, AlizadehZeinabad H. Cytotoxic effect of albumin coated copper nanoparticle on human breast cancer cells of MDA-MB 231. *PLoS One*. 2017; 12(11): e0188639. doi: 10.1371/journal.pone.0188639

Сведения об авторах

Невежина Анна Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий и регенеративной медицины, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», e-mail: n4nna@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1551-5440>

Фадеева Татьяна Владимировна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий и регенеративной медицины, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», e-mail: fadeeva05@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4681-905X>

Information about the authors

Anna V. Nevezhina – Junior Research Officer at the Laboratory of Cell Technologies and Regenerative Medicine, Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, e-mail: n4nna@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1551-5440>

Tatiana V. Fadeeva – Dr. Sc. (Biol.), Leading Research Officer at the Laboratory of Cell Technologies and Regenerative Medicine, Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, e-mail: fadeeva05@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4681-905X>