



Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisus pärmseentele *Candida albicans* ja *Candida glabrata*

Magistritöö

Üliõpilane: Jekaterina Ovtšinnikova

Juhendaja: Dr. Kaja Kasemets,

Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut, Keskkonnatoksikoloogia Laboratooriumi vanemteadur

Õppekava: Rakenduskeemia ja biotehnoloogia

Tallinn 2022



Toxicity of silver-chitosan nanocomposites to yeast *Candida albicans* and *Candida glabrata*

Master's thesis

Student: Jekaterina Ovtšinnikova

Supervisor: Dr. Kaja Kasemets,

National Institute of Chemical Physics and Biophysics, Laboratory of Environmental Toxicology,
Senior Research Fellow

Curriculum: Applied chemistry and biotechnology

Tallinn 2022

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Jekaterina Ovtšinnikova

allkirjastatud digitaalselt

26.05.2022

Töö vastab magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Dr. Kaja Kasemets

allkirjastatud digitaalselt

26.05.2022

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees:

Sisukord

Annotatsioon.....	6
Abstract	7
Lühendid	8
Sissejuhatus	9
1. Kirjanduse ülevaade.....	10
1.1. Haiglainfektsioonid	10
1.1.1. Pärmseente põhjustatud infektsioonid	10
1.2. Sünteetilised nanoosakesed	12
1.2.1. Hõbeda nanoosakesed	13
1.3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiidid	14
1.3.1. Kitosaan	14
1.3.2. Kitosaani toksilisus mikroorganismidele.....	15
1.3.3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisus mikroorganismidele.....	16
2. Töö eesmärgid.....	18
3. Materjalid ja meetodid	19
3.1. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees	19
3.1.1. Trinaatriumtsitraadiga.....	19
3.1.2. Naatriumboorhüdriidiga.....	20
3.2. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide füüsikalisk-keemiline iseloomustamine	21
3.2.1. Hüdrodünaamiline suurus ja pinnalaeng.....	21
3.2.2. Ultravioletne-nähtav spektroskoopia.....	22
3.2.3. Hõbeda ioonide vabanemine (lahustuvus).....	22
3.3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide, kitosaani, hõbenitraadi ja amfoteritsiin B toksilisuse testimine	22
3.3.1. Testorganismid ja kultiveerimise tingimused	23
3.3.2. Elulevuse test - Spot test	23
3.4. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide ja rakkude vaheliste interaktsioonide uuringud	24
3.4.1. Lävivoolutsütomeetria	24
3.4.2. Laser-skaneeriv konfokaalmikroskoopia	24
4. Tulemused ja diskussioon	26
4.1. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide füüsikalisk-keemilised omadused	26
4.1.1. Hüdrodünaamiline suurus ja pinnalaeng.....	26
4.1.2. Ultravioletne-nähtav spektroskoopia.....	27
4.1.3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide lahustumine	29
4.2. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide, kitosaani, hõbenitraadi ja amfoteritsiin B toksilisus ...	29
4.2.1. <i>Candida albicans</i>	30
4.2.2. <i>Candida glabrata</i>	32

4.3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide ja rakkude vahelised interaktsioonid	33
4.3.1. Lävivoolutsütomeetria	34
4.3.2. Laser-skaneeriv konfokaalmikroskoopia	35
Kokkuvõte	38
Summary.....	39
Tänuavaldused	40
Kasutatud kirjandus.....	41
Lisad.....	47

Annotatsioon

Üheks väga aktuaalseks ja järjest tõsisemaks meditsiiniliseks probleemiks on kujunenud nii haiglainfektsioonid kui ka patogeensete bakterite ja seente antibiootikumi- ja ravimiresistentsuse teke. *Candida* spp on üks peamisi pärmseeni, mis võib põhjustada ohtlikke seeninfektsioone ja seda eriti immuunpuudulikkusega patsientidel. Seega on oluline uute seenevastaste ravimite väljatöötamine, et ravida erineva raskusastmega (haigla)infektsioone. Üheks perspektiivseks suunaks infektsioonide ravis on antimikroobsete nanoosakeste kasutamine. Näiteks metallilised nanoosakesed, eriti hõbeda nanoosakesed, on muutunud üha olulisemaks biomeditsiinilistes rakendustes, sh haavaravis, aga ka pinnakattematerjalides.

Antud töö eesmärgiks oli sünteesida hõbeda-kitosaani nanokomposiite (CSnAg), kasutades madala molekulmassiga kitosaani (50–190 kDa) ja redutseerides hõbenitraati kas trinaatriumtsitraadi (TSC) või naatriumboorhüdriidiga (NaBH_4). Kokku sünteesiti kuus nanokomposiiti, kasutades kahte sünteesimeetodit ja erinevaid hõbeda ning kitosaani massisuhteid (1:0.3, 1:1 ja 1:3). Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide füüsikalise-keemiliseks iseloomustamiseks mõõdeti nende neeldumine spektri ultravioletses ja nähtavas osas, hüdrodünaamiline suurus, pinnalaeng (ζ -potentsiaal) ja lahustuvus deioniseeritud vees.

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide mürgisust pärmseentele *Candida albicans* ATCC 10231 ja *Candida glabrata* ATCC 90030 uuriti elulevuse testiga (Spot test), määrares CSnAg minimaalse fungitsiidse kontsentratsiooni (MFK). Võrdlevalt uuriti ka hõbenitraadi, kitosaani ja seenevastase ravimi amfoteritsiin B mürgisust. CSnAg ja pärmirakkude interaktsioonide uurimiseks kasutati läbivoolutsütomeetria ja laser-skaneerivat konfokaalmikroskoopi. Mudelorganismideks valiti *C. albicans* ja *C. glabrata*, sest need liigid on ühed peamised seeninfektsioone põhjustavad pärmseened.

Töö tulemused näitasid, et trinaatriumtsitraadiga (CSnAg-TSC) ja naatriumboorhüdriidiga (CSnAg- NaBH_4) sünteesitud nanokomposiitide hüdrodünaamiline suurus oli vastavalt 102–120 nm ja 36–383 nm ning kõikide nanokomposiitide pinnalaeng (ζ -potentsiaal) oli positiivne. Kõige mürgisemad olid nanokomposiidid hõbeda-kitosaani massisuhtega 1:3 (CSnAg-TSC ja CSnAg- NaBH_4 24-t MFK-d olid *C. albicans*'ile vastavalt 9.38 ja 1.17 mg Ag/L ning *C. glabrata*'le 17.5 ja 1.51 mg Ag/L), mis olid võrreldavad või mürgisemad kui seenevastane ravim amfoteritsiin B (24-t MFK olid vastavalt 29.2 ja 18.8 mg/L). Läbivoolutsütomeetria ja laser-skaneeriva konfokaalmikroskoobi uuringud näitasid, et hõbeda-kitosaani nanokomposiidid olid kinnitunud rakkude pinnale.

Magistritöö tehti Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudi Keskkonnatoksikoloogia laboris.

Abstract

The emerging microbial infections and the development of drug resistance in pathogenic fungi have become serious medical problems. *Candida* spp is recognized as an important opportunistic pathogen that can promote mild to life-threatening infections, especially in the case of immunocompromised patients. A particularly serious problem is the development of resistance to the used drugs. Thus, novel therapeutics against fungal pathogens are needed. Nanotechnology has the potential to combat drug resistance. For example, metal nanoparticles, especially silver, have become promising candidates for biomedical applications such as wound dressings.

In this study, silver chitosan nanocomposites (CSnAg) were synthesized by reduction of silver nitrate with trisodium citrate (TSC) or sodium borohydride (NaBH_4) in the presence of low molecular weight chitosan (50–190 kDa). Altogether six CSnAg with different silver-chitosan weight ratios (1:0.3, 1:1 and 1:3) were synthesized. Ultraviolet-visible spectroscopy, hydrodynamic size, surface charge (ζ -potential) and solubility were measured for physicochemical characterization of nanocomposites.

Candida albicans ATCC 10231 and *C. glabrata* ATCC 90030 were chosen as model organisms to evaluate the antifungal activity of CSnAg. A viability test (Spot test) was selected to determine the minimal fungicidal concentration (MFC). The toxicity of silver nitrate, chitosan and the antifungal drug amphotericin B were also compared. A flow cytometer and laser-scanning confocal microscope were used to study the interactions between silver-chitosan nanocomposites and yeast cells. *C. albicans* and *C. glabrata* were selected for the study because these species are one of the main yeasts causing nosocomial infections.

The results showed that the hydrodynamic size of CSnAg-TSC and CSnAg- NaBH_4 was approximately 102–120 nm and 36–383 nm, respectively, and the surface charge (ζ -potential) was positive (The most toxic were CSnAg with the silver-chitosan weight ratio of 1:3 (CSnAg-TSC and CSnAg- NaBH_4 24-h MFC for *C. albicans* and *C. glabrata* were 9.38 and 1.17 mg Ag/L, and 17.5 and 1.51 mg Ag/L, respectively), which were comparable or less than amphotericin B toxicity (24-h MFK for *C. albicans* and *C. glabrata* were 29.2 and 18.8 mg/L, respectively). Flow cytometry and laser scanning confocal microscopy studies showed that the nanocomposites have adhered to the cell surface.

The study was carried out in the Laboratory of Environmental Toxicology of the National Institute of Chemical Physics and Biophysics.

Lühendid

AAS - aatomiabsorptsioonspektroskoopia

AgNPs - hõbeda nanoosakesed

AgNPs-Cit - tsitraadiga stabiliseeritud hõbeda nanoosakesed

CLSM – laser-skaneeriv konfokaalmikroskoop (ingl. *confocal laser scanning microscopy*)

CsAg - hõbeda-kitosaani nanokomposiidid

CsAg_0.3 - hõbeda -kitosaani massisuhe 1:0.3

CsAg_1 - hõbeda -kitosaani massisuhe 1:1

CsAg_3 - hõbeda -kitosaani massisuhe 1:3

CsAg-TSC - trinaatriumtsitraadiga sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiidid

CsAg-NaBH₄ – naatriumboorhüdriidiga sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiidid

DD - deatsetüülimise aste (ingl. *degree of deacetylation*)

d_H - hüdrodünaamiline suurus

DLS - dünaamiline valguse hajumine (ingl. *dynamic light scattering*)

ESKAPE bakterid – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*

HAI - haiglainfektsioonid

MFK - minimaalne fungitsiidne kontsentratsioon

MQ - deioniseeritud vesi

MW - molekulmass

NO - nanoosakesed

PDI - polüdisperssuse indeks

PFA - paraformaldehüüd

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (ingl. *reactive oxygen species*)

SPR - nanoosakeste neeldumisspekter (ingl. *surface plasmon resonance*)

SSC - külghajuvus (ingl. *side scatter*)

UV-Vis - Ultravioletne-nähtav spektroskoopia (ingl. *UV-visible spectrophotometry*)

YPD - pärmiekstrakti-peptooni sööde (ingl. *Yeast Extract Peptone Dextrose meedium*)

Sissejuhatus

Seenpatogeenid põhjustavad igal aastal maailmas vähemalt 13 miljonit haigust ja 1,5 miljonit surma ning enamasti on ohus nõrgenenud immuunsüsteemiga inimesed (Bongomin *et al.*, 2017). Seennakkuste ravi on keeruline nii mittespetsiifiliste sümptomite esinemise tõttu kui ka resistentsuse tekkele seenevastastele ravimitele. Vaatamata sellele, et *Candida* spp. leidub inimese mikrobioomis, on see samas kõige levinum seeninfektsioonide põhjustajaid (Bongomin *et al.*, 2017; Sampaio and Pais 2014; Pappas *et al.*, 2018).

Mikroobide resistentsuse teke paljude antibiootikumide ja ravimite suhtes on muutumas üha suuremaks probleemiks meditsiinis (Perlin *et al.*, 2017) ja seetõttu otsitakse uusi ravimeid infektsioonide ennetamiseks ja raviks. Nanotehnoloogiad võimaldavad sünteesida uudseid antimikroobseid nanoosakesi erinevateks biomeditsiinilisteks rakendusteks, näiteks haavaplaastrites ja implantaatides, et ravida ja vähendada infektsioonide ja resistentsete tüvede teket ja levikut (Khan *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020). Hõbeda nanoosakesed on kõige sagedamini kasutatavad nanoosakesed biomeditsiinis, kuna neil on tõestatud antimikroobsed omadused (Hajipour *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2022).

Kitosaan on polüsahhariid, mida toodetakse kitiinist. Kitosaan on biolagunev, biosobiv, mittetoksiline ja antimikroobse ja haava paranemist soodustava toimega ning seetõttu perspektiivne kasutada mitmesugustes biomeditsiinilistes materjalides (Ahmed & Ikram, 2016). Kitosaani saab kasutada ka redutseeriva ja stabiliseeriva polümeerina metalliliste nanoosakeste sünteesil (Mirda *et al.*, 2021). Nii hõbe kui ka kitosaan on antimikroobsed ja eeldatakse, et nende koostoimes võib tekkida sünergia, mis muudab nanokomposiidid veelgi efektiivsemaks (Hajipour *et al.*, 2012; Bibire *et al.*, 2022).

Antud uurimistöö eesmärk oli (i) sünteesida hõbeda-kitosaani nanokomposiite (CSnAg), kasutades madala molekulmassiga kitosaani (50–190 kDa) ja redutseerides hõbenitraati trinaatriumsitraadi (TSC) või naatriumboorhüdriidiga (NaBH₄), (ii) füüsikalis-keemiliselt iseloomustada ning (iii) määrata nende mürgisust pärmseentele *Candida albicans* ATCC 10231 ja *Candida glabrata* ATCC 90030 ja (iv) uurida nanokomposiitide ja pärmirakkude vahelisi interaktsioone, kasutades läbivoolutsütomeetriat ning laser-skaneerivat konfokaalmikroskoopi. *C. albicans* ja *C. glabrata* valiti uuringusse, sest need liigid on ühed peamised seeninfektsioone põhjustavad pärmseened. Lisaks testiti ka hõbenitraadi, kitosaani ja seenevastase ravimi amfoteritsiin B.

Kokku sünteesiti kuus hõbeda-kitosaani nanokomposiiti, kasutades kahte sünteesimeetodit ja kolme erinevat hõbeda-kitosaani massisuhet (1:0.3, 1:1, 1:3). Läbivoolutsütomeetria ja konfokaalmikroskoopia analüüs näitas, et kõik osakesed kinnitused rakku pinnale. Kõige toksilisemad olid nanokomposiidid massisuhetega 1:3.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Haiglainfektsioonid

Haiglanakkused e. nosokomiaalsed nakkused on infektsioonid, mis on saadud tervishoiuasutustes. Nakkus levib patsiendile kliinilises keskkonnas erineval viisil ja selle põhjuseks võib olla nii meditsiiniliste seadmete ja materjalide saastumine kui ka õhu kaudu levivad piisknakkused. Nakkus võib pärineda väliskeskkonnast, teiselt patsiendilt või haiglapersonalilt. Mõnel juhul pärineb mikroorganism patsiendi enda naha mikrobiotast, muutudes oportunistlikuks pärast operatsiooni või protseduure, mis kahjustavad naha kaitsvat barjääri (Monegro *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2017).

Haiglainfektsioonide (*HAI-hospital-acquired-infections*) hulka kuuluvad näiteks kateetrite kasutamise seotud kuseteede infektsioonid, haavainfektsioonid ja sundventileerimisega seotud kopsupõletikud (Abdullah, 2021). Haiglainfektsioonidega võib kaasneda mitmeid tüsistusi ning need on seotud kõrge haigestumuse ja suremusega (Khan *et al.*, 2017). Haiglainfektsioonide risk sõltub rakendatavatest infektsioonitõrjetavatest, patsiendi immuunseisundist ja erinevate patogeenide levimusest keskkonnas. HAI riskifaktoriteks on patsiendi immuunpuudulikkus, kõrge vanus, haiglas viibimise kestus, kaasnevad haigused, mehaaniline ventilatsioon, invasiivsed protseduurid ja viibimine intensiivravi osakonnas (WHO, 2011; Khan *et al.*, 2017).

Nahal on loomulik barjäär nakkustekitajate vastu, kuid iga operatsiooni või haavaga, mis seda kahjustab võib kaasneda infektsioon. Kirurgiliste haavade infektsioonid on ühed levinumad haiglainfektsioonid Euroopas ja neid seostatakse pikema operatsioonijärgse haiglaraviga, täiendavate kirurgiliste protseduuride ja suurema suremusega (ECDC 2019).

Bakterid on kõige levinumad haiglanakkusi põhjustavad patogeenid (Khan *et al.*, 2017). Enim ohtlikke haiglanakkusi on põhjustatud nn. ESKAPE bakterite poolt: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Enterobacter* spp. (Mulani *et al.*, 2019). Lisaks bakteritele põhjustavad infektsioone ka patogeensed pärmseened (CDC 2020).

Üheks oluliseks mikroorganismide (nii bakterid kui ka pärmseened) virulentsusteguriks on nende võime moodustada biokilet, mis toimib füüsilise barjäärina ravimitele ja seeläbi nende toime avaldumisele (Garcia *et al.*, 2018). Mikroorganismid võivad moodustada biokilet nii meditsiiniseadmetel (südameklapid, kateetrid, hambaproteesid, implantaadid) (Pappas *et al.*, 2018) kui ka haavadel.

1.1.1. Pärmseente põhjustatud infektsioonid

Invasiivseid seeninfektsioone põhjustavad patogeenid kuuluvad peamiselt perekondadesse *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* ja *Pneumocystis* (Mayer *et al.*, 2013; Bongomin *et al.*, 2017). Epidemioloogilised uuringud on näidanud, et seennakkusi põhjustavad eelkõige erinevad *Candida albicans* tüved, mis võivad põhjustada kõrget suremust riskirühmades (HIV-nakkusega, elundisiirdamise-, keemiaravi- ja intensiivravi patsiendid) (Silva *et al.*, 2012). Samas on suurenenud

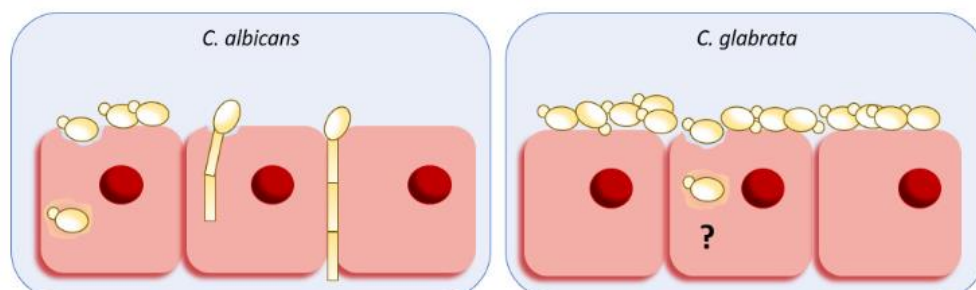
ka *C. glabrata*, *C. parapsilosis*'e, *C. tropicalis*'e, *C. krusei* ja *C. auris*'e osakaal seennakkuste põhjustajatena (Krcmery & Barnes, 2002).

Uuringud on näidanud, et kandidoosi esinemissagedus sõltub geograafilisest piirkonnast, kohalikust epidemioloogiast, patsiendi vanusest ja muudest teguritest (Guinea 2014; Sampaio and Pais 2014). Ameerika Ühendriikides ja Loode-Euroopas on levinuim liik *C. glabrata* ja seda peamiselt üle 60 aastaste ja siirdatud elunditega patsientidel. Ladina-Ameerikas, Lõuna-Euroopas, Indias ja Pakistanis aga esineb seennakkusi, mis on põhjustatud eelkõige pärmseente *C. parapsilosis* ja *C. tropicalis* poolt (Pappas *et al.*, 2018).

Mitmed *Candida* perekonna liigid on normaalne osa inimese mikrobiotast ning pärmseened elavad inimese limaskestadel (suus, tupes seedetraktis) ja nahal. Sellegipoolest võib *Candida* spp osutada oportunistlikuks patogeeniks, kui inimese immuunsus on häiritud, põhjustades ulatuslikku limaskestade kolonisatsiooni ning lokaalset ja/või süsteemset infektsiooni (Costa-de-Oliveira & Rodrigues, 2020).

Candida võib inimestel põhjustada nii pindmisi kui ka süsteemseid infektsioone. Naha ja limaskestade seennakkusi soodustavad muutused normaalses mikrobiotas (näiteks antibiootikumiravi tagajärjel) ja immuunsuses, veresoonte ja kuseteede kateetrite kasutamine ning kirurgilised- ja põletushaavad (Cortés & Corrales, 2019).

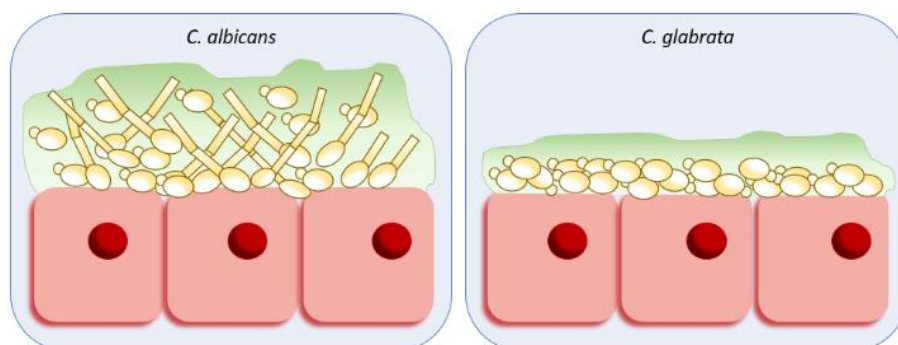
Enim seennakkusi põhjustavatel pärmseentel *C. albicans* ja *C. glabrata* on aga erinev patogeensuse mehhanism, mis on seotud üleminekuga pärmi- ja hüüfaalvormi vahel, adhesiinide ja invasiinide ekspressiooniga rakupinnal ning hüdrofüütiliste ensüümide sekretsiooniga (Galocha *et al.*, 2019). Pärm-hüüfi dimorfism on iseloomulik *C. albicans* rakkudele ja eelkõige hüfaalset morfoloogiat seostatakse *C. albicans*'i suurema patogeensusega ning biokile moodustumise ja koeinvasiooni võimega (Mayer *et al.*, 2013). *C. glabrata*' hüfaalne vorm aga puudub (Minic & Pejic, 2018; Krcmery & Barnes, 2002). *C. albicans*'i morfoloogia sõltub ka keskkonnatingimustest. Näiteks madalama pH (< 6) juures kasvavad *C. albicans*'i rakud valdavalt pärmi kujul, kuid kõrgema pH juures (>7) indutseeritakse hüüfide kasv. Mitmed keskkonnatingimused nagu toitainete puudus, seerumi ja N-atsetüülglükoosamiini olemasolu, füsioloogiline temperatuur ja CO₂ soodustavad hüüfide teket (Mayer *et al.*, 2013).



Joonis 1. Skeem pärmseente *C. albicans* ja *C. glabrata* epiteelkoerakkude kahjustustest ja seene invasioonist (Galocha *et al.*, 2019).

C. glabrata kudesis/rakke kahjustav võime on väiksem kui *C. albicans*'l ja kudede invasiooni mehhanismid on enamasti teadmata (Joonis 1). Arvatakse, et kaasinfektsioon koos teiste mikroorganismidega võib olla *C. glabrata* üheks invasiivsuse põhjustajaks, kuna *C. glabrata*'t on sageli isoleeritud koos pärmseenega *C. albicans* (Galocha *et al.*, 2019).

Teine oluline virulentsustegur, mis mängib pärmseente patogeneesis suurt rolli, on nende biokile moodustamise võime, mis oluliselt raskendab ka seenevastast ravi. Kui *C. albicans*'i biokile koosneb hüüfide, pseudohüüfide ja pärmirakkude võrgustikust (Mayer *et al.*, 2013), siis *C. glabrata* biofilm koosneb ainult pärmirakkudest (Rodrigues *et al.*, 2017; Galocha *et al.*, 2019) (Joonis 2).



Joonis 2. Skeem pärmseente *C. albicans* ja *C. glabrata* biokile moodustumisest epiteelkoerakkude pinnal (Galocha *et al.*, 2019).

Pärmseente poolt põhjustatud infektsioonide ravis kasutatakse erinevaid seenevastaseid ravimeid: asoolid (flukonasool, itrakonasool, vorikonasool, posakonasool), polüeenid (amfoteritsiin B) ja ehhinokandiinid (kaspofungiin, mikafungiin, anidulafungiin) (Costa-de-Oliveira & Rodrigues, 2020). *C. albicans*'i ravimiresistentsuse esinemine asoolide ja ehhinokandiinide suhtes on tänapäeval kasvav meditsiiniline probleem (Costa-de-Oliveira & Rodrigues, 2020). Samuti on näidatud *C. glabrata* resistentsuse teket flukonasooli suhtes (Minic & Pejčić, 2018; Rodrigues *et al.*, 2017).

1.2. Sünteetilised nanoosakesed

Sünteetilised nanoosakesed (NO) on inimese poolt sünteesitud osakesed, mille suurus on 1 kuni 100 nanomeetrit. Nanoosakeste suuruse vähenemine toob kaasa osakeste eripinna eksponentsiaalse suurenemise muutes seeläbi nanomaterjali pinna reaktiivsemaks (Gatoo *et al.*, 2014). On näidanud, et NO toksilisus sõltub osakeste suurusest ja eripinnast, koostisest ja kujust (Jeong *et al.*, 2014; Agnihotri *et al.*, 2014; Szerencsés *et al.*, 2020). Osakeste väiksusel on oluline roll nende mõjus rakkudele. Mida väiksem on nanoosake, seda suurem on tema rakkudega kokkupuutes olev pind (Honary *et al.*, 2011). Nanoosakesed võivad seonduda rakkudega ja siseneda bioloogilistesse süsteemidesse ning interakteeruda rakusiseste makromolekulidega ja häirida seeläbi nende bioloogilisi funktsioone. On näidatud, et NO toksilisus mikroorganismidele suureneb koos osakeste suuruse vähenemisega (Ivask *et al.*, 2014; Kasemets *et al.*, 2016, 2019; Kubo *et al.*, 2018). Lisaks NO suurusel on oluline roll ka osakeste pinnalaengul kuna positiivselt laetud nanoosakesed võrreldes negatiivselt laetud või neutraalsete nanoosakestega võivad paremini seonduda rakkudega, mis on reeglina negatiivse pinnalaenguga (Gatoo *et al.*, 2014).

Tänapäeval kasutatakse nanoosakesi juba tarbekaupades, kosmeetikas, tervishoius, biomeditsiinis ja vähiravis (Khan *et al.*, 2017). Biomeditsiinis kasutatakse peamiselt metallilisi nanoosakesi (Ag, CuO ja ZnO) nende antimikroobsete omaduste tõttu (Vimbela *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2022). Enim kasutakse hõbeda nanoosakesi (Ag-NO) kuna hõbe on kõige biotsiidsema toimega (Agnihotri *et al.*, 2014).

1.2.1. Hõbeda nanoosakesed

Hõbedat on kasutatud meditsiinis juba tuhandeid aastaid (Xu *et al.*, 2020; Medici *et al.*, 2019). Hõbeda nanoosakesi (AgNPs) kasutatakse tänapäeval tarbekaupades, kosmeetikas, tekstiili- ja toiduainete tööstuses (pakkematerjalid), meditsiinis (kirurgilised katted, implantaadid, haavaplaastrid) ja vee desinfitseerimisel (Agnihotri *et al.*, 2014; Medici *et al.*, 2019; Yin *et al.*, 2020).

Hõbeda nanoosakestel on näidatud nii bakterite (Kubo *et al.*, 2018), seente- (Kulatunga *et al.*, 2017) kui ka viiruste vastast toimet (Khodashenas & Ghorbani, 2019). Lisaks, erinevalt "klassikalistest" antibiootikumidest, on näidatud, et AgNPs on ka efektiivsed inhibeerima biokilede teket ja mikroobide kasvu (Suppi *et al.*, 2015; Kamikawa *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2021). Hõbeda nanoosakesed võivad pärssida gram-positiivsete bakterite (*Staphylococcus aureus* ja *Bacillus* sp. jt), gram-negatiivsete bakterite (*Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Klebsiella* sp.) ja patogeensete seente (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida* sp.) kasvu (Xu *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2019; Mirda *et al.*, 2021). On näidatud, et nanohõbe võib pärssida ka antibiootikumiresistentseid baktereid ja ravimiresistentseid pärmseeni, kuid samas pole eriti näidatud hõbeda suhtes resistentsete tüvede teket (Xu *et al.*, 2020; Agnihotri *et al.*, 2014). Tänu suurele eripinnale on hõbeda nanoosakestel märkimisväärne antimikroobne toime isegi madalal kontsentratsioonil (Li *et al.*, 2021; Yin *et al.*, 2020; Pareek *et al.*, 2018).

Hiljutised uuringud on näidanud, et hõbeda nanoosakeste suurus, kuju, pinnakate ja -laeng määravad ära nende antimikroobse toime ja efektiivsuse (Szerencses *et al.*, 2020; Vazquez-Munoz *et al.*, 2020). Üldiselt, kui osakeste suurus väheneb, suureneb nende antimikroobsus märkimisväärselt (Ivask *et al.*, 2014; Agnihotri *et al.*, 2014; Vimbela *et al.*, 2017; Kasemets *et al.*, 2019). Sfääriliste, kolmnurksete, lineaarsete ja kuubi-kujuliste AgNPs antibakteriaalsuse võrdlemisel on näidatud, et sfäärilistel hõbeda nanoosakestel on tugevam antibakteriaalne toime ja neid peetakse praktilistes rakendustes kõige sobivamaks kas kolloidsel või immobiliseeritud kujul (Agnihotri *et al.*, 2014; Khodashenas & Ghorbani, 2019; Xu *et al.*, 2020). Hõbeda nanoosakeste sünteesil kasutatavad stabilisaatorid võivad mõjutada osakeste suurust, kuju, stabiilsust ja pinnalaengut, mis omakorda võib mõjutada jällegi NO toksilisust (Verma *et al.*, 2015; Khodashenas & Ghorbani, 2019; Xu *et al.*, 2020).

Hõbeda nanoosakeste toksilisus on otseselt seotud osakestelt vabanenud hõbeda ioonide hulgaga (Yin *et al.*, 2020). On näidatud, et AgNPs mõjutavad ka rakkude membraanipotentsiaali ja kahjustavad rakumembraani. AgNPs võivad kinnituda raku pinnale, põhjustades rakukesta ja membraani struktureid ja funktsionaalseid muutusi (membraani destabiliseerimine, pooride moodustumine ja tsütoplasma lekkimine). Kuna hõbeda ioonid seonduvad tiool- ja aminorühmadega, siis põhjustab see omakorda valkude ja ensüümide inaktiveerimise ja

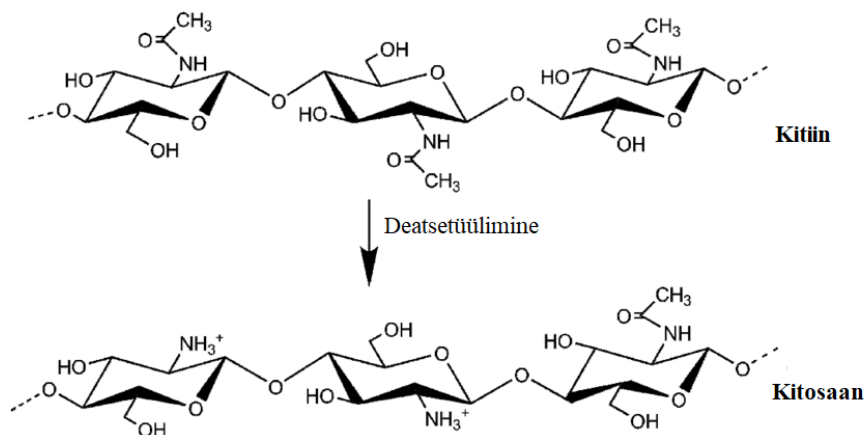
denatureerimise ning DNA kahjustusi (Szerencses *et al.*, 2020; Kamikawa *et al.*, 2014; le Ouay & Stellacci, 2015; Stensberg *et al.*, 2011). On näidatud, et hõbeda nanoosakesed takistavad pärmseene *C. albicans* biokile moodustumist *in vitro*, pärssides filamentide teket ning häirides rakuseina terviklikkust (Szerencses *et al.*, 2020).

1.3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiidid

Hõbeda-kitosaani nanokomposiidid koosnevad hõbeda nanoosakestest ja kitosaanist. Nii hõbeda nanoosakestel kui ka kitosaanil on antimikroobsed omadused (Hajipour *et al.*, 2012; Bibire *et al.*, 2022), mis koostoimes võivad veelgi võimenduda.

1.3.1. Kitosaan

Kitosaan on polüsahhariid, α (1-4) 2-amino-2-deoksü β -D-glükaan, mis saadakse kitiini deatsetüülimise teel aluselises keskkonnas (Joonis 3). Kitiini on molluskite, putukate ja vähiladsete skeleti põhikomponent (Ahmed & Ikram, 2016).



Joonis 3. Kitosaani süntees kitiini deatsetüülimise teel (modifitseeritud Nilsen-Nygaard *et al.*, 2015).

Kitosaan ei lahustu vees kuid lahustub näiteks nõrgalt happelises keskkonnas (1% äädikhappes), aminorühmade protoneerimise tõttu ($pK_a \sim 6.4$). Keskkonna pH ja ioontugevus mõjutavad oluliselt kitosaani lahustuvust ja viskoossust (Ahmed & Ikram, 2016).

Kitosaan on happelises keskkonnas polükatioonne polümeer ja seondub seetõttu negatiivselt laetud molekulidega nagu valgud, anioonsed polüsahhariidid (nt alginaat ja karrageen), rasvhapped, sapphapped ja fosfolipiidid (Ke *et al.*, 2021). Samuti võib kitosaan, NH_2 ja OH funktsionaalrühmade tõttu kelaatida metallioone nagu raud, vask, kaadmium ja magneesium (Akmaz *et al.*, 2013). Kitosaani kasutatakse ka redutseeriva aine ja stabiliseeriva polümeerina metalliliste (näiteks hõbe) nanoosakeste sünteesil (Alburquenque *et al.*, 2010).

Kitosaani omadusi mõjutavad peamiselt tema molekulmass (MW) ja deatsetüülimise aste (DD), mis näitab deatsetüülitud rühmade osakaalu. Kitosaani klassifitseeritakse eelkõige tema molekulmassi

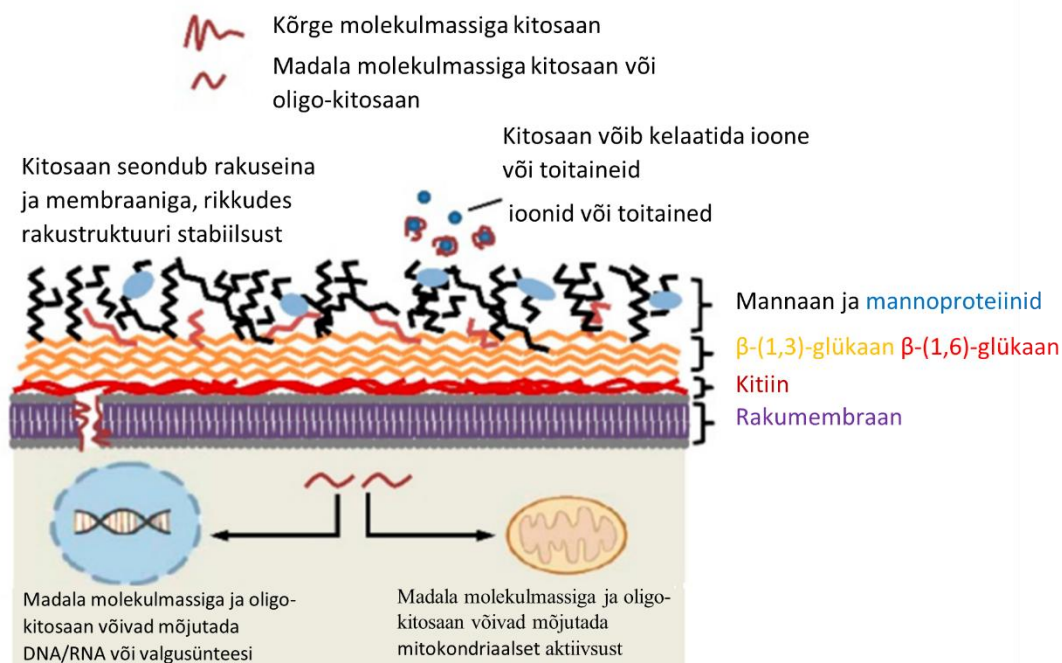
alusel: madala (50–190 kDa), keskmise (190–310 kDa) ja suure molekulmassiga kitosaan (310–375 kDa) (Ke *et al.*, 2021).

Kitosaani peetakse perspektiivseks kasutada biomeditsiinis, kuna ta on biolagunev, biosobiv, mittetoksiline ja antimikroobne (Alburquenque *et al.*, 2010; Ahmed & Ikram, 2016). Kitosaan soodustab ka haavade paranemist, stimuleerides hemostaasi ja kiirendades kudede taastumist. Hemostaasi esimeses etapis aitab kitosaan peatada verejooksu, käivitades trombotsüütide ja punaste vereliblede agregatsiooni, millele järgneb teine etapp, mida iseloomustab fibrini lahustumise pärssimine. Lisaks inhibeeritakse bakterite kasvu. Viimases etapis aitab granulatatsioonikoe areng kaasa naha kiirele paranemisele (Bibire *et al.*, 2022).

1.3.2. Kitosaani toksilisus mikroorganismidele

Kitosaanil on antimikroobsed omadused, mis tulenevad eelkõige tema katioonsest olemusest. Kitosaan võib pärssida paljusid baktereid (*Bacillus cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella enterica*) ja pärmseeni (*Saccharomyces cerevisiae*, *C. albicans*, *C. glabrata* ja *C. krusei*) (Alburquenque *et al.*, 2010; Ke *et al.*, 2021; Garcia *et al.*, 2018).

Kitosaani füüsikalise-keemilised ja bioloogilised omadused sh antimikroobsus sõltuvad eelkõige kitosaani molekulmassist, deatsetüülimise tasemest ja keskkonnatingimustest (Ahmed & Ikram, 2016; Alburquenque *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2018).



Seen

Joonis 4. Madala- ja kõrge molekulmassiga kitosaani seenevastased toimetehhanismid (modifitseeritud Ke *et al.*, 2021).

On näidatud, et madala molekulmassiga kitosaan pärssib seente mütseeli kasvu tõhusamalt kui suure molekulmassiga kitosaan. Kitosaani antimikroobsus väheneb pH tõusuga ja kaob suuresti pH 7

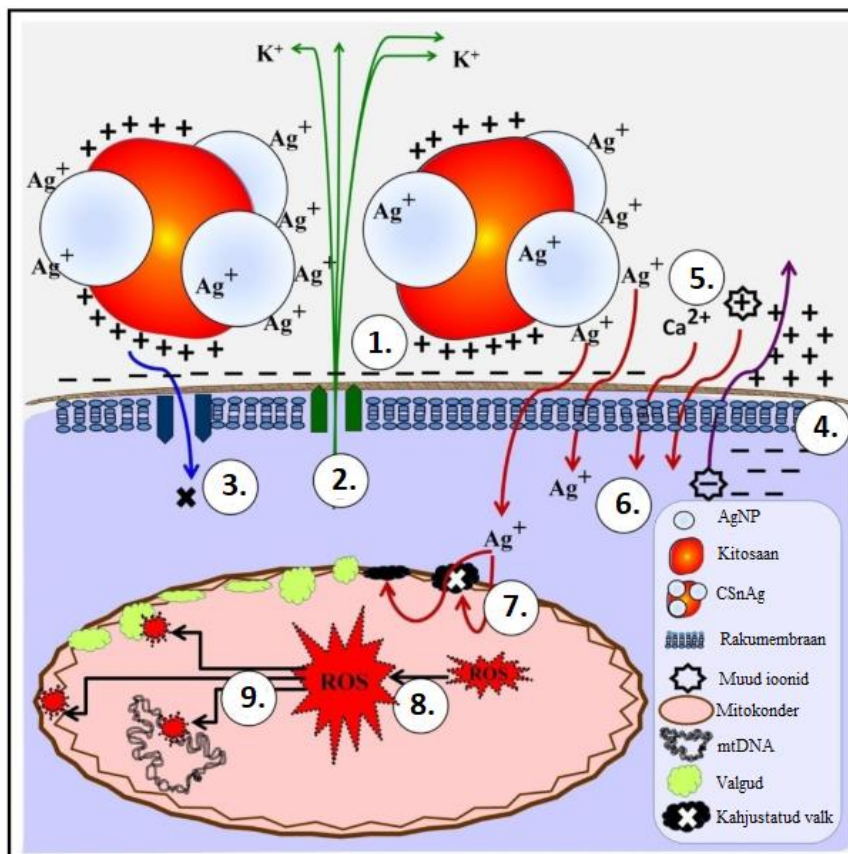
juures, mis võib olla tingitud aminorühmade deprotoneerumisest (Yilmaz Atay, 2020; Ahmed & Ikram, 2016).

Kitosaani peamine toimemehhanism mikroobidele on elektrostaatiline seondumine kitosaani protoneeritud aminorühmadele ja negatiivselt laetud rakuseinale/membraanile, põhjustades rakukesta/membraani kahjustusi ja rakusiseste komponentide leket (Garcia *et al.*, 2018). Deatsetüülimise astme (DD) suurendamine põhjustab protoneeritud aminorühmade osakaalu suurenemist ja seeläbi ka elektrostaatilist seondumist rakuseinaga. Seega on kõrge DD-ga kitosaanil tugevam elektrostaatiline interaktsioon mikroobirakkudega, mille tulemuseks on sageli tugevam antimikroobne toime (Ke *et al.*, 2021; Bibire *et al.*, 2022; Garcia *et al.*, 2018).

Mitmed uuringud on näidanud, et erineva molekulmassiga kitosaanidel on erinevad toimemehhanismid hallitus- ja pärmseentele. Suure molekulmassiga kitosaan seondub eelkõige seente rakuseinale, põhjustades rakukesta- ja membraanikahjustusi ja rakkude 'lekkimise'. Samas madala molekulmassiga kitosaan võib tungida rakkudesse ja seonduda valkude ja DNA-ga, põhjustades ensüümide inaktiveerumist ja valgusünteesi häireid (Joonis 4). Kitosaan võib inhibeerida mikroobide kasvu ka toitainete ja oluliste metallide kelaatimise kaudu (Ke *et al.*, 2021; Garcia *et al.*, 2018; Alburquenque *et al.*, 2010).

1.3.3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisus mikroorganismidele

Nii hõbe kui ka kitosaan on mikroobivastased ained ja eeldatakse, et koostoimes tekivad sünergia muudab sellised nanokomposiidid veelgi efektiivsemaks (Yilmaz Atay, 2020; Kulatunga *et al.*, 2017). On näidatud, et kitosaaniga stabiliseeritud hõbeda nanoosakestel on positiivne pinnalaeng, soodustades nanokomposiitide seondumist rakkudega (Ke *et al.*, 2021). Mitmed uuringud näitavad, et kitosaani-Ag⁺ ja kitosaani-Zn⁺ kompleksil oli tugevam mikroobivastane toime, kui kitosaanil endal (Yilmaz Atay, 2020). Eelkõige on näidanud kulla-, hõbeda- või vasega seotud kitosaani nanoosakeste toimet gram-positiivsete ja gram-negatiivsete bakterite vastu (Yilmaz Atay, 2020). Näiteks näitasid varasemad uuringud, et kui loomade haavakatsetes lisati kitosaani-kiledele hõbeda nanoosakesi, oli haava paranemiskiirus oluliselt kõrgem võrreldes kontrolliga (Ma *et al.*, 2017). Seega võivad kitosaani ja hõbeda vahelise sünergilise toime tõttu hõbeda-kitosaani nanokomposiidid olla perspektiivsed kasutada patogeensete mikroorganismide kasvu pärssimisel, sealhulgas ka multiresistentsete bakterite ja seente vastu (Joonis 5). Kuna kitosaanil on lisaks antimikroobsetele omadustele ka haavaparanemist soodustav toime, siis saaks kitosaani-hõbeda nanokomposiite kasutada haavaravis (Ahmed & Ikram, 2016; Wei *et al.*, 2009; Polinarski *et al.*, 2021).



Joonis 5. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toimemehhanism seenerakkudele. 1. Positiivselt laetud osakesed seostuvad negatiivselt laetud rakkudega. Polükatioonse kitosaani seondumine põhjustab K⁺ liikumise rakupinnale. 2. Ionide tasakaalu rikkumine viib K⁺ edasisele väljavoolule rakust. 3. K⁺ sissevool on ebaefektiivne, kuna K⁺ nihkub membraanist eemale. 4. Rakumembraan muutub hüperpolariseerituks. 5. Katioonide sissevool ja anioonide väljavool. Sissevool sisaldab palju rakuväliseid katioone ja Ag⁺. 6. Sissevoolu katioonid mõjutavad biokeemilisi reaktsioone. 7. Ag⁺ interakteerub mitokondri membraanivalkudega, mille tagajärjeks häirub elektronide ülekanne. 8. Hingamisteede ensüümide häirimine suurendab reaktiivsete hapnikuühendite (*ingl.* ROS – *reactive oxygen species*) teket. 9. ROS-i suurenenud tase mitokondrites põhjustab bioloogiliste makromolekulide oksüdatsiooni, põhjustades mitokondrihäireid. Muutused raku läbilaskvuses, rakumembraani destabiliseerimine ja mitokondrite talitlushäired võivad indutseerida apoptoosi (*modifitseeritud Kulatunga et al., 2017*).

2. Töö eesmärgid

Magistritöö eesmärgiks oli:

1. Sünteesida hõbeda-kitosaani nanokomposiite, kasutades madala molekulmassiga kitosaani ja hõbeda taandamist trinaatriumtsitraadiga või naatriumboorhüdriidiga.
2. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide füüsikalise-keemilise iseloomustamine (hüdrodünaamiline suurus, pinnalaeng, ultravioletne-nähtav spekter ja lahustuvus).
3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisuse testimine pärmseentele *Candida albicans* ATCC 10231 ja *C. glabrata* ATCC 90030
4. Nanokomposiitide ja pärmirakkude vaheliste interaktsioonide uuringud, kasutades läbivoolutsütomeetria ja laser-skaneeriva konfokaalmikroskoobi analüüsi.

3. Materjalid ja meetodid

Kõik töös kasutatud kemikaalid (Sigma-Aldrich) olid analüütilise puhtusastmega. Lahuste valmistamiseks kasutati deioniseeritud vett (Milli-Q). Hõbeda-kitosaani nanoosakeste sünteesil kasutati madala molekulmassiga (50–190 kDa) kitosaani ja hõbenitraati. Kitosaani alglahus (10 g/L) 1% äädikhappes valmistati vähemalt 2 päeva enne nanokomposiitide sünteesi ja edasised lahjendused tehti MQ vees.

3.1. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide sünteesil kasutati kahte erinevat meetodit: hõbenitraadi (AgNO_3) redutseerimist (i) trinaatriumtsitraadiga ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) või (ii) naatriumboorhüdriidiga (NaBH_4).

3.1.1. Trinaatriumtsitraadiga

Sünteesiks kasutatavad lahused valmistati deioniseeritud vees (MQ) ja filtreeriti läbi 0.2- μm süstlafiltri (Sarstedt): AgNO_3 (1 g Ag/L), $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (10 g/L), sidrunhape ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) (10 g/L). Kitosaani lahus (1 g/L) filtreeriti läbi 0.47- μm süstlafiltri (Sarstedt).

Hõbeda nanoosakeste (AgNPs) süntees (Joonis 6):

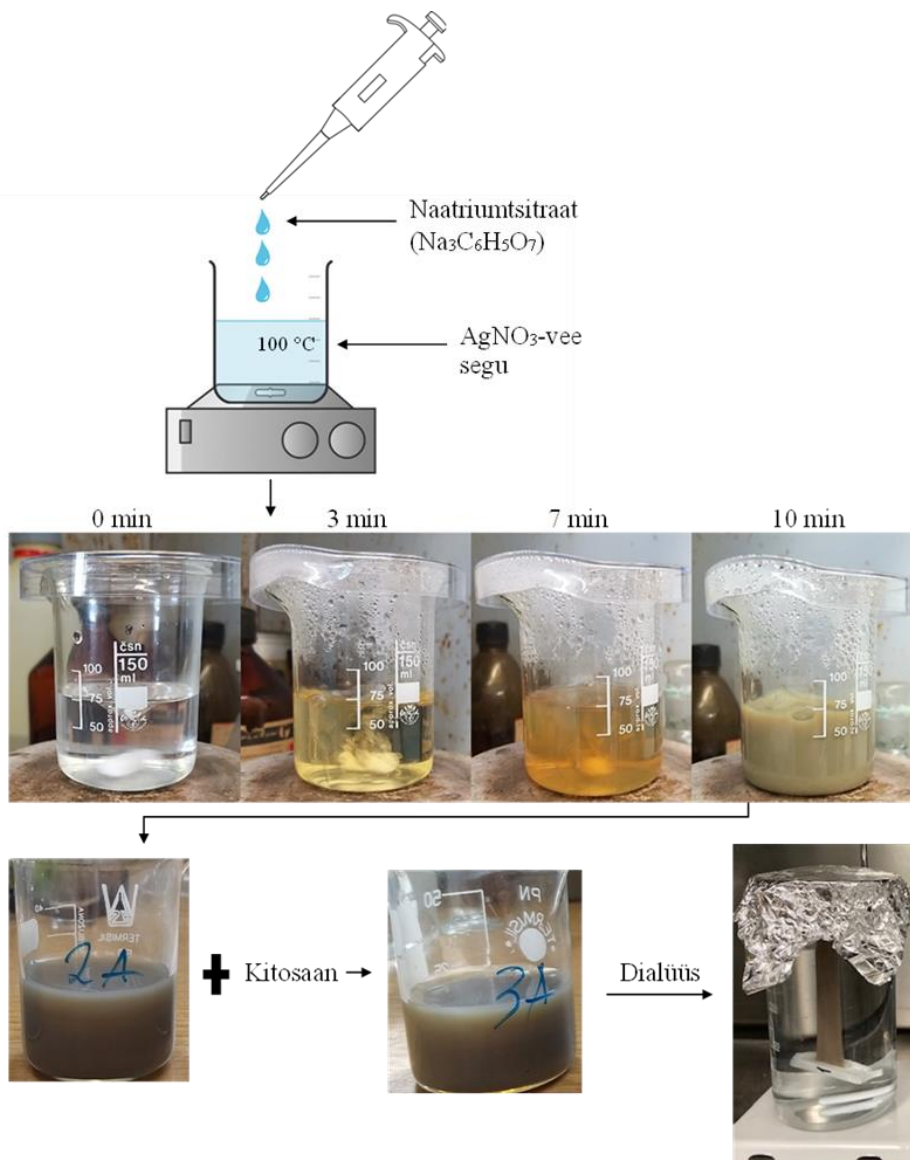
1. Keeduklaasi lisati 56 ml MQ-vett ja 10 ml AgNO_3 lahust ning asetati termostateeritavale magenetsegajale (200 rpm) (Heidolph, Saksamaa). Segu kuumutati keemiseni ja lisati 4 ml trinaatriumtsitraati. Lahuse värvus muutus värvitust helekollaseks ~3–4 minuti jooksul ja 10 minuti möödudes tumehalliks. Seejärel jahutati suspensioon toatemperatuurini.
2. AgNPs suspensiooni pH reguleeriti 1% sidrunhappega ~4.8-ni (alglahuse pH ~7.0) ja lisati kitosaani lahus (1 g/L), saades kolm erineva hõbeda ja kitosaani massisuhtega nanokomposiiti (1:0.3 1:1 ja 1:3) (Tabel. 1).

Samuti sünteesiti selle skeemi järgi ka tsitraadiga stabiliseeritud hõbeda nanoosakesed (AgNPs-Cit), kuid ilma järgneva pH reguleerimise ja kitosaani lisamiseta.

Tabel 1. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (CSnAg) valmistamine.

CSnAg	AgNPs, mL	Kitosaan (1 g/L), ml	MQ, mL	Ag:CS (mg/L)	sisaldus
CSnAg_0.3	21.0	0.9	8.1	100:30	
CSnAg_1	21.0	3.0	6.0	100:100	
CSnAg_3	21.0	9.0	0	100:300	

Saadud CSnAg lahused viidi dialüüsikotti (poori suurus 12 kDa, Viskase, USA) ja dialüüsiti magnetsegajal (~200 rpm) 2 L MQ-vee vastu toatemperatuuril, vahetades 24 tunni möödudes vett, et vabaneda madalmolekulaarsetest ühenditest. Peale dialüüsi mõõdeti nanokomposiitide hõbeda sisaldus aatomabsorptsioonspektromeetriga (AAS) (ContraAA 800, Analytic Jena AG). Nanokomposiite säilitati suletud pudelites ~4°C juures külmikus.



Joonis 6. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide sünteesi skeem: hõbenitraadi redutseerimine trinaatriumtsitraadiga. Nanoosakeste moodustumist kinnitab kollakaspruuni värvuse tekkimine.

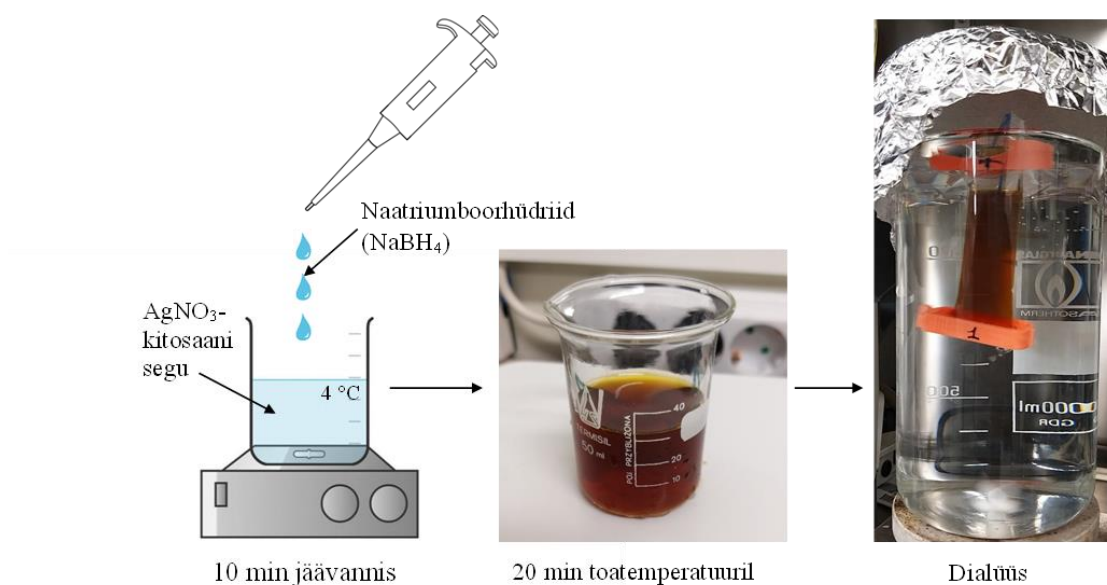
3.1.2. Naatriumboorhüdriidiga

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide süntees naatriumboorhüdriidiga toimus kitosaani juuresolekul jäävannis (Joonis 7).

Sünteesiks kasutatavad lahused valmistati deioniseeritud vees (MQ) ja filtreeriti läbi 0.2-µm süstlafiltri (Sarstedt): AgNO₃ (10 g Ag/L), NaBH₄ (1.55 g/L). Kitosaani lahus (10 g/L), valmistati 1% äädikahappes.

Segati kokku AgNO_3 ja kitosaani (Ag:CS) lahused massivahekorraga 1:0.3, 1:1 ja 1:3 ning peale seismist 30 min toatemperatuuril valguse eest kaitstult, filtreeriti läbi 0.47- μm süstlafiltri (Sarstedt).

Ag-kitosaani nanokomposiitide süntees toimus jääl, magnetsegajal, 200 rpm. Kokku segati 24.75 mL MQ vett ja 30 mL filtreeritud hõbeda-kitosaani lahust. Seejärel lisati tilkhaaval 2.25 mL värskelt valmistatud ja jahutatud NaBH_4 lahust. Peale NaBH_4 lisamist hoiti lahust veel 10 min jääl ja 20 min toatemperatuuril. CSnAg lahused viidi dialüüsikotti (poori suurus 12 kDa, Viskase, USA) ja dialüüsiti 2-korda 2 L DI-vee vastu toatemperatuuril, magnetsegajal, 200 rpm. Peale dialüüsi mõõdeti nanokomposiitide hõbeda sisaldus aatomabsorptsioonspektromeetriga (AAS) (ContraA 800, Analytic Jena AG). Nanokomposiite säilitati suletud pudelites $\sim 4^\circ\text{C}$ juures.



Joonis 7. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide sünteesi skeem: hõbenitraadi redutseerimine naatriumboorhüdriidiga.

3.2. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide füüsikalis-keemiline iseloomustamine

Hõbeda-kitosaani nanokomposiite (NK) füüsikalis-keemiliseks iseloomustamiseks ja stabiilsuse uuringuteks määrati NK hüdrodünaamiline suurus (d_H), pinnalaeng (ζ -potentsiaal), UV-Vis spekter ja lahustuvus (hõbeda ionide vabanemine).

3.2.1. Hüdrodünaamiline suurus ja pinnalaeng

NK hüdrodünaamilise suuruse ja ζ -potentsiaali mõõtmiseks kasutati dünaamilise valguse hajumise (DLS) meetodit, mis põhineb valguse hajutamisel ja osakeste Browni liikumisel lahuses. Analüüsi ajal läbib laser kolloidse lahuse, mis hajutab Browni liikumise tõttu erineva intensiivsusega valgust ja osakeste suurust määratakse Stokes-Einsteini võrrandi abil (Bhattacharjee, 2016; Bamal *et al.*, 2021).

Pinnalaengut (ζ -potentsiaal) määratakse proovilahuse elektroodi poole liikuvate laetud osakeste kiiruse mõõtmise teel välise elektrivälja juuresolekul. ζ -potentsiaali väärtus annab informatsiooni kolloidlahuse stabiilsuse kohta: nanoosakesi, mille ζ -potentsiaal on absoluutväärtuselt suurem või väiksem kui 30 mV peetakse dispersioonikeskkonnas väga stabiilseteks osakeste elektrostaatilise tõukumise tõttu (Yerragopu *et al.*, 2020; Savage *et al.*, 2019).

NK hüdrodünaamilist suurust ja ζ -potentsiaali mõõdeti seadmega Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Osakeste d_H ja pinnalaengut mõõdeti kontsentratsioonil 10 mg Ag/L koheselt peale lahuse valmistamist (0 h) ja 24-tunni inkubeerimist 30°C juures 6-auguga plaadil (4 mL kaevus).

3.2.2. Ultravioletne-nähtav spektroskoopia

Ultravioletne-nähtav spektroskoopia (UV-Vis) on üks populaarsemaid meetodeid metalliliste nanoosakeste iseloomustamiseks (Desai *et al.*, 2012). Ag-nanoosakesed neelduvad lainepikkustel 400–500 nm (Bamal *et al.*, 2021). Metalliliste nanoosakeste optilised omadused põhinevad peamiselt nende pinnaplasmoni resonantsil, kus plasmon on nanoosakeste vabade elektronide kollektiivne võnkumine (Verma *et al.*, 2019).

NK analüüsiti kontsentratsioonil 10 mg Ag/L koheselt peale lahuse valmistamist (0 h) ja peale 24-tunni inkubeerimist 30°C juures 6-auguga plaadil (BD Falcon) (4 ml kaevus) UV-Vis spektrofotomeetriga (Thermo Scientific Multiskan® Spectrum).

3.2.3. Hõbeda ionide vabanemine (lahustuvus)

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide 24-tunni lahustuvust (hõbeda ionide vabanemist) analüüsiti nanoosakeste kontsentratsioonil 1 ja 10 mg Ag/L. Test viidi läbi 6-auguga plaadil (BD Falcon) 30°C juures. Mittelahustunud osakesed eraldati tsentrifuugimisel, kasutades filtratsioonituube Amicon Ultra-4 (Millipore, 3000 NMWL), 7500 rpm, 40 min, 30°C. 2850 μ L filtreeritud lahust viidi üle 5 mL tuubi ja lisati 150 μ L kontsentreeritud lämmastikhapet (HNO_3). Proove analüüsiti aatomabsorptsioonspektromeetriga (AAS) (ContrAA 800, Analytic Jena AG).

3.3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide, kitosaani, hõbenitraadi ja amfoteritsiin B toksilisuse testimine

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide seenevastast toimet hinnati elulevuse testiga (Spot test) (Suppi *et al.*, 2015). Lisaks nanokomposiitidele uuriti ka madala molekulmassiga kitosaani, hõbenitraadi ja positiivse kontrollina ka seenevastase ravimi amfoteritsiin B mürgisust.

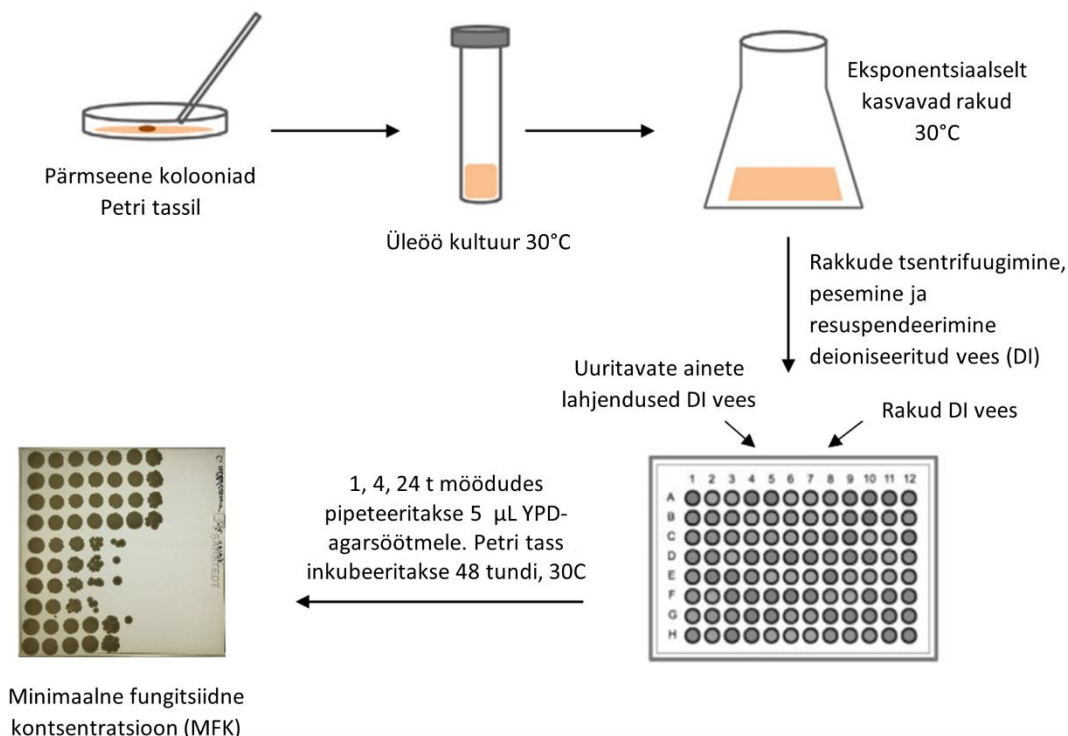
3.3.1. Testorganismid ja kultiveerimise tingimused

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisust testiti pärmseentele *Candida albicans* ATCC 10231 ja *Candida glabrata* ATCC 90030. Pärmseeni kasvatati pärmiekstrakti-peptoonsöötmes (YPD), mis sisaldas (1 L) 10 g pärmiekstrakti (Lab M) , 20 g peptooni (Lab M) ja 20 g glükoosi. Agarsöötmele lisati 15 g/L agarit (Lab M). YPD sööde autoklaaviti 120°C juures 15 minutit.

3.3.2. Elulevuse test - Spot test

Spot testis inkubeeriti pärmirakke koos uuritavate NK ja ainetega deioniseeritud vees (MQ) ning pipeteeriti erinevate ajavahemike järel (1, 4 ja 24 tundi) "täpina" (5 µL) YPD-agarsöötmele, et hinnata pärmirakkude elulevust (koloonia moodustamist).

Spot testi (Joonis 8) läbiviimiseks lahjendati üleöö kultuuri YPD söötmes optilise tiheduseni (OD_{600nm}) 0,25 ja kasvatati eksponentsiaalse kasvufaasini inkubaator-loksutil, 200 rpm, 30°C, ~3.5 tundi kuni kultuuri optilise tiheduseni $OD_{600nm} \sim 1.0$. Kultuur pesti söötimest puhtaks tsentrifuugimisega ning sade võeti üles deioniseeritud vees. Selleks tsentrifuugiti kultuuri üks kord 8500 rpm 10 minutit, et vabaneda kasvusöötimest ning lisati sademele 1,5 mL DI vett ja viidi 2-mL mikrotuubi (Eppendorf) ja tsentrifuugiti 2 korda 10000 rpm, 1 minut, valades igakord pealt ära supernatandi ja lisades samas mahus DI vett. Peale viimast tsentrifuugimist lahjendati raku suspensiooni OD_{600nm} väärtuseni 1.2.



Joonis 8. Spot testi skeem (modifitseeritud Suppi *et al.*, 2015).

96-auguga mikrotiiterplaadi (BD Falcon) süvendisse viidi 75 µL erineva kontsentratsiooniga uuritavat ainet (lahjendused DI vees) ja lisati 75 µL kultuuri. Seejärel inkubeeriti proove 30°C juures pimedas, loksutamata. 1, 4 ja 24 tunni möödudes viidi 5 µL eksponeeritud ja mitte-eksponeeritud (kontroll) kultuuri YPD plaadile.

72 tunni möödudes hinnati visuaalselt kolooniate moodustumist agarsöötmel ning määrati minimaalne fungitsiidne kontsentratsioon (MFK) – väikseim testitud kontsentratsioon, mis tapab pärmseened (ei teki enam kolooniat agarsöötmel). Iga katset korrati kolm korda.

3.4. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide ja rakkude vaheliste interaktsioonide uuringud

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide ja pärmirakkude vaheliste interaktsioonide (seondumine rakkudega) uurimiseks kasutati läbivoolutsütomeetria ja laser-skaneerivat konfokaalmikroskoopiat.

3.4.1. Läbivoolutsütomeetria

Hõbeda-nanokomposiitide ja pärmseente vaheliste interaktsioonide uuringus kasutati läbivoolutsütomeetria, mis põhines külghajuvuse (SSC) signaali ja selle muutuse määramisel. Külghajuvus on seotud rakkude granulaarsusega (Park *et al.*, 2017) ja on näidatud, et nanoosakeste seondumisel bakterirakkudega suurenes ka külghajuvus (Kubo *et al.*, 2018, Vihodceva *et al.*, 2021).

Uuringu läbiviimiseks kasvati pärmirakud eksponentsiaalse kasvufaasini, pesti kaks korda DI vees ning rakususpensiooni tihedus reguleeriti OD_{600nm} väärtuseni 1.2. 250 µL CSnAg proovi (1 ja 4 mg Ag/L) segati kokku koos 250 µL pärmisuspensiooniga ning inkubeeriti 1 tund 30°C juures. Peale ekspositsiooni lisati rakkudele 0.5 µL 5 mM fluorestseeruvat DNA-värvi MycoLigth Green JJ98 (AAT Bioquest) ja inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril pimedas. Seejärel analüüsiti rakususpensiooni läbivoolutsütomeetriga BD Accuri 6 plus (Biosciences, USA), kogudes 20000 'sündmust' iga analüüsitava proovi kohta. Külghajuvuse (SSC) muutuse alusel määrati uuritavate nanokomposiitide seondumist rakkudega (võrreldi kontroll- ja eksponeeritud kultuuri külghajuvust).

3.4.2. Laser-skaneeriv konfokaalmikroskoopia

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide ja rakkude vaheliste interaktsioonide visualiseerimiseks kasutati laser-skaneerivat konfokaalmikroskoopi Zeiss LSM800, mis võimaldab visualiseerida metallilisi nanoosakesi reflekteeruva valguse režiimis (Kasemets *et al.*, 2019).

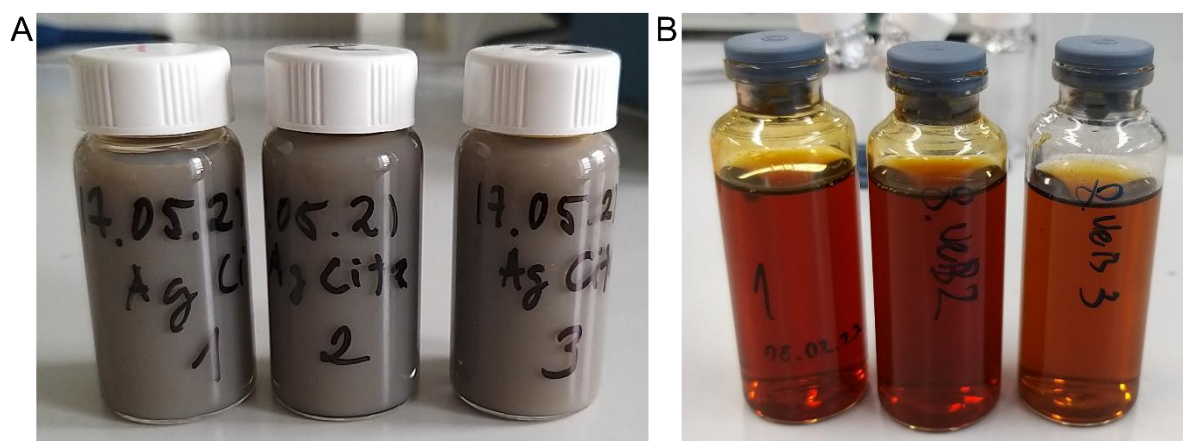
Uuringu läbiviimiseks kasvati pärmirakud eksponentsiaalse kasvufaasini, pesti kaks korda DI vees ning rakususpensiooni tihedus reguleeriti OD_{600nm} väärtuseni 2.0. Saadud rakususpensiooni tsentrifuugiti 1 minut 10 000 rpm, eemaldati supernatant ja lisati sademele 300 µL (1000-korda lahjendatud) fluorestseeruvat rakumembraanivärvi CellBrite Fix555 (Bioutium) ning inkubeeriti pimedas 15 minutit toatemperatuuril. Peale inkubeerimist pesti rakke kaks korda deioniseeritud

veega (10 000 rpm 1 min) ja reguleeriti OD_{600nm} 1.2-ni. Seejärel inkubeeriti pärmirakke 1 tund toatemperatuuril (i) hõbeda-kitosaani nanokomposiitidega (2 mg Ag/L) ning (ii) madala molekulmassiga kitosaaniga (3 ja 6 mg/L). Peale ekspositsiooni, tsestrifuugiti rakke 800 rpm, 2 minutit, et vabaneda rakkudega mitte-seondunud nanoosakestest ning fikseeriti 4% paraformaldehüüdiga (PFA). Peale fikseerimist rakud pesti 3 korda PBS ja MQ-ga ja segati Mowioliga (Sigma-Aldrich). Alusklaasile lisati 10 µL rakkude suspensiooni ja asetati peale katteklaas.

Proove visualiseeriti laser-skaneeriva mikroskoobiga Zeiss LSM800, kasutades 20x ja 100x objektive, lainepikkusel 561/550–700 nm CellBrite Fix 555 fluorestsentsvärvi tuvastamiseks ja 640 nm juures nanokomposiitide visualiseerimiseks. Pilditötluseks kasutati tarkvara Zen 2.6 (Zeiss).

4. Tulemused ja diskussioon

Käesolevas magistritöös sünteesiti hõbeda-kitosaani nanokomposiidid (NK), kasutades kahte erinevat hõbeioonide redutseerimise meetodit trinaatriumtsitraadiga (CSnAg-TSC) või naatriumboorhüdriidiga (CSnAg-NaBH₄) ning kasutati hõbeda-kitosaani erinevat massisuhet 1:0,3 (CSnAg_0.3), 1:1 (CSnAg_1) ja 1:3 (CSnAg_3) (Joonis 9). Lisaks sünteesiti ka hõbeda nanoosakesed (TSC süntees), mis ei olnud stabiliseeritud kitosaaniga (AgNPs-Cit). NaBH₄ sünteesi korral ilma kitosaanita NK ei sünteesitud kuna sellised osakesed osutusid eelnevate katsete põhjal ebastabiilseteks. Kõikide nanokomposiitide sünteesil kasutati madala molekulmassiga kitosaani. Sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiite (i) iseloomustati füüsikalise-keemiliselt, (ii) määrati nende mürgisust pärmseentele *Candida albicans* ATCC 10231 ja *C. glabrata* ATCC 90030 ning seondumist rakkudega, kasutades läbivoolutsütomeetriat ja laser-skaneerivat konfokaalmikroskoopi.



Joonis 9. Trinaatriumtsitraadiga (A) ja naatriumboorhüdriidiga (B) sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiidid. Nanokomposiitides oli erinev hõbeda ja kitosaani massisuhe (Ag:CS) – 1:0.3 (CSnAg_0.3), 1:1 (CSnAg_1) ja 1:3 (CSnAg_3). Hõbeda sisaldus oli kõikides nanokomposiitides 100 mg/L.

4.1. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide füüsikalise-keemilised omadused

Hõbeda-kitosaani nanokomposiite iseloomustati, määrates NK hüdrodünaamiline suurus, pinnalaeng (ζ -potentsiaal), UV-Vis neeldumisspekter ja lahustuvus.

4.1.1. Hüdrodünaamiline suurus ja pinnalaeng

Kõikide CSnAg-TSC hüdrodünaamiline suurus (d_H) oli 102–120 nm ja CSnAg-NaBH₄_0.3, CSnAg-NaBH₄_1 ja CSnAg-NaBH₄_3 d_H oli vastavalt 160, 383 ja 36.7 nm (Tabel 2). Ag-kitosaani nanokomposiitide stabiilsuse katsed, kus NK inkubeeriti 24 tundi 30°C juures (10 mg Ag/L) näitasid, et kõikide CSnAg-TSC hüdrodünaamiline suurus peaaegu ei muutunud, kuid CSnAg-NaBH₄_0.3 ja

CSnAg-NaBH₄_1 d_H vähenes 1.5–1.8 korda, samas kui CSnAg-NaBH₄_3 suurenes jällegi ~2.5 korda (Tabel 2).

Kõikide Ag-kitosaani nanokomposiitide ζ -potentsiaal oli positiivne, mis võib olla tingitud kitosaani mõjust nanokomposiitidele (Ke *et al.*, 2021), kuna ilma kitosaanita AgNPs-Cit olid negatiivselt laetud (ζ -potentsiaal -44 mV). Kõikide CSnAg-TSC ζ -potentsiaal oli +21 mV kuni +24 mV ja CSnAg-NaBH₄ korral +30 mV kuni +38 mV (Tabel 2). Kirjanduse andmeil on nanoosakesed, mille ζ -potentsiaali absoluutväärtus on suurem või väiksem kui 30 mV suspensioonis stabiilsed (Bhattacharjee, 2016). Mida suurem on antud väärtus, seda suurem on osakeste vaheline elektrostaatiline tõukumine ja mida madalam, seda rohkem võivad osakesed üksteisele ligi tõmbuda ja flokuleeruda (Mirda *et al.*, 2021). Samas, kuigi 24 t möödudes vähenes nii CSnAg-TSC ja CSnAg-NaBH₄ ζ -potentsiaal vähemalt kaks korda, ei suurenenud nende hüdrodünaamiline suurus (välja arvatud CSnAg-NaBH₄_3) (Tabel 2).

Tabel 2. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (CSnAg) keskmine hüdrodünaamiline suurus (d_H) ja pinnalaeng (ζ -potentsiaal) deioniseeritud vees (10 mg Ag/L) pärast 0 ja 24-tunnist inkubeerimist 30°C juures. Sulgudes on polüdisperssuse indeks (PDI). Nanokomposiitides oli erinev hõbeda (Ag) ja kitosaani (CS) massisuhe (Ag:CS): 1:0,3 (CSnAg_0.3), 1:1 (CSnAg_1) ja 1:3 (CSnAg_3). Hüdrodünaamilise suuruse ja ζ -potentsiaali andmed on kolme mõõtmise keskmised tulemused \pm standardhälve.

Nanokomposiidid	Hüdrodünaamiline suurus (nm)		ζ -potentsiaal (mV)	
	0 t	24 t	0 t	24 t
AgNPs-Cit	46.8 \pm 0.9 (0.39)	47.8 \pm 0.2 (0.33)	-44.0 \pm 4.7	-45.5 \pm 4.0
CSnAg-TSC_0.3	120 \pm 5.2 (0.18)	104 \pm 6.2 (0.26)	+21.3 \pm 1.9	+10.6 \pm 3.2
CSnAg-TSC_1	116 \pm 3.5 (0.21)	103 \pm 19 (0.30)	+23.1 \pm 2.0	+11.4 \pm 3.3
CsnAg-TSC_3	102 \pm 3.2 (0.25)	111 \pm 11 (0.28)	+24.0 \pm 1.7	+10.0 \pm 1.9
CSnAg-NaBH ₄ _0.3	160 \pm 9.2 (0.22)	102 \pm 4.7 (0.31)	+30.9 \pm 2.9	+6.17 \pm 1.0
CSnAg-NaBH ₄ _1	383 \pm 26 (0.56)	206 \pm 13 (0.53)	+38.0 \pm 3.6	+12.0 \pm 0.6
CSnAg-NaBH ₄ _3	36.7 \pm 2.2 (0.86)	93.3 \pm 17 (0.54)	+36.8 \pm 2.5	+12.8 \pm 2.2

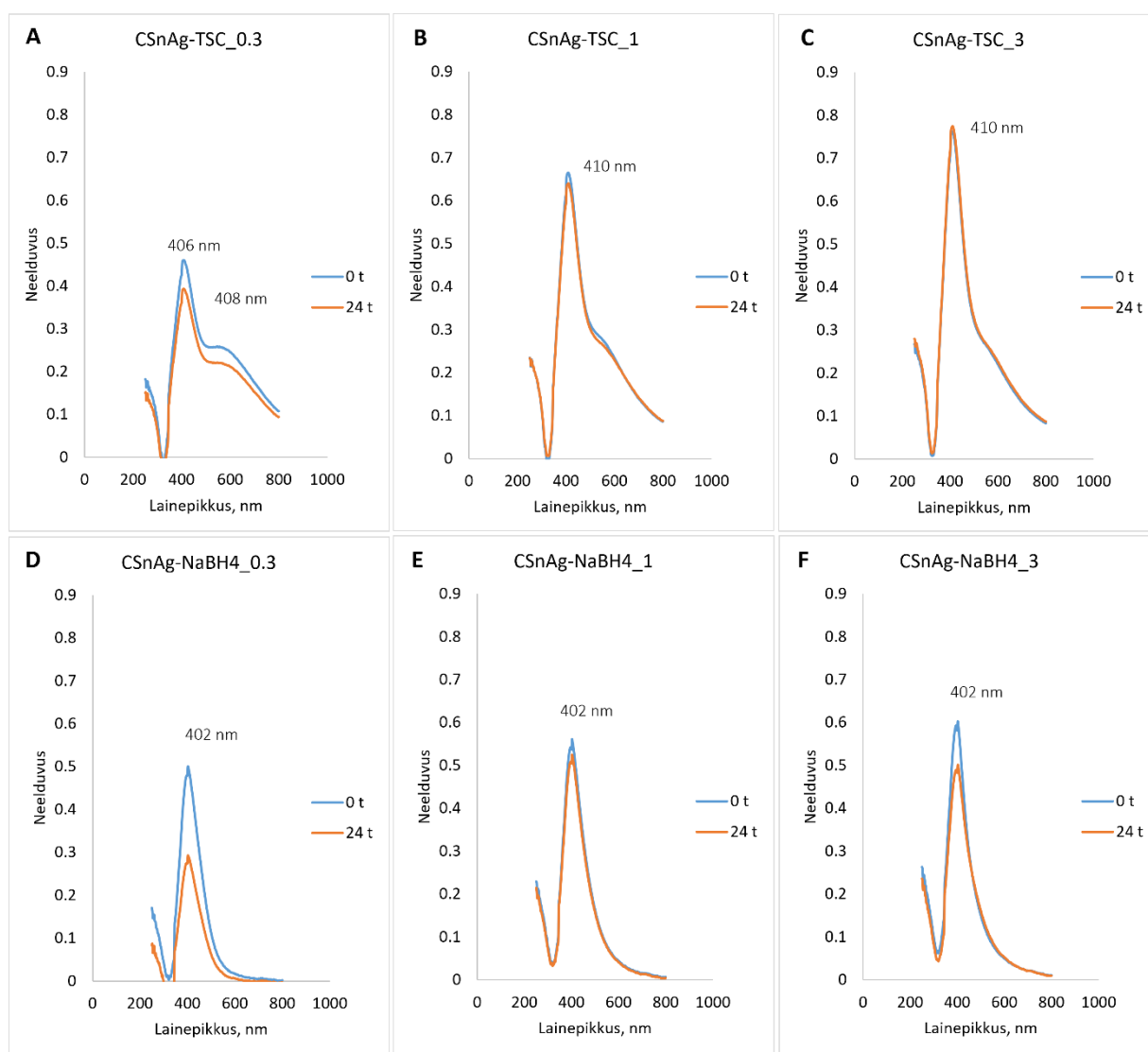
Kõikide sünteetitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide polüdisperssuse indeks (PDI) oli väiksem kui 0.7, ainult CSnAg-NaBH₄_3 PDI oli ~0.9. Kirjanduse andmeil on nanoosakesed, mille PDI väärtus on suurem kui 0.7 laia suurusjaotuvusega, samas kui PDI on väiksem kui 0.3 siis osutab see väärtus homogeensele osakeste populatsioonile (Mirda *et al.*, 2021). Kõikide CSnAg-TSC PDI väärtused olid vahemikus 0.18–0.25 ja 24 tunnilisel inkubatsioonil 30°C juures oluliselt ei muutnud. Samas kui CSnAg-NaBH₄ osakeste PDI väärtused olid vahemikus 0.22–0.86 ja 24 tunni inkubatsiooni järgselt 0.31–0.54, viidates et nendel nanokomposiitidel oli laiem suurusjaotuvus.

4.1.2. Ultravioletne-nähtav spektroskoopia

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide UV-Vis neeldumisspektrit määrati 0 ja 24 tunnil pärast inkubeerimist 30°C juures. NK kontsentratsioon oli 10 mg Ag/L. UV-Vis spektroskoopia tulemused näitasid, et NaBH₄- ja TSC-ga sünteetitud NK maksimaalne neeldumine toimus ~410 nm ja 402 nm lainepikkuse juures (Joonis 10), mis on iseloomulik neeldumispõlvkond hõbeda nanoosakestele (Honary *et al.*, 2011). Trinaatriumtsitraadiga sünteetitud, aga ilma kitosaanita NO (AgNPs-Cit) maksimaalne neeldumine oli ka 410 nm juures (Lisa 2). Seega, UV-Vis tulemused näitasid, et CSnAg-

NaBH₄ olid väiksema suurusega kui CSnAg-TSC kuna hõbeda nanoosakeste neeldumismaksimumid nihkuvad nanoosakeste suuruse suurenedes pikemate lainepikkuste suunas (Agnihotry *et al.*, 2014). Hõbeda nanoosakeste neeldumisspektri (SPR) kuju sõltub nanoosakeste kujust, suuruselt ja suurusjaotusest. Mie teooria kohaselt on sfäärilise kujuga nanoosakestel üks neeldumisspektri piik, samas kui asümmeetriliste ja erineva kujuga nanoosakeste neeldumiskiigis on üks või mitu õlga (Dara *et al.*, 2020).

24 tunni inkubatsiooni katse näitas, et sünteesitud CSnAg olid suhteliselt stabiilsed, kuid CSnAg-TSC_0.3, CSnAg-NaBH₄_0.3 ja CSnAg-NaBH₄_3 absorptsioonipiigi intensiivsus vähenes vastavalt 1.7 ja 1.2 korda (Joonis 10).



Joonis 10. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (CSnAg) neeldumisspektrid lainepikkustel 250-800 nm. CSnAg olid sünteesitud kas trinaatriumtsitraadiga (CSnAg-TSC) (A-C) või naatriumboorhüdriidiga (CSnAg-NaBH₄) (D-F). Mõõtmised viidi läbi CSnAg kontsentratsioonil 10 mg Ag/L peale lahuste valmistamist (0 t) ja 24 tunni pärast (24 t) peale inkubeerimist 30°C juures.

4.1.3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide lahustumine

Lahustuvuse tulemused näitasid, et NK lahustuvus (hõbeda ionide vabanemine) sõltus kontsentratsioonist (Tabel 3), olles rohkem lahustuvad väiksemal kontsentratsioonil (1 mg Ag/L). Kuid CSnAg-NaBH₄_3 oli lahustuvus nii 1 mg Ag/L kui ka 10 mg Ag/L juures sarnane (Tabel 3).

NK lahustuvus sõltus ka kitosaani sisaldusest: suurema kitosaani sisaldusega nanokomposiidid olid vähem lahustuvad võrreldes madalama kitosaani sisaldusega NK-ga. Näiteks kontsentratsioonil 1 mg Ag/L oli CSnAg-TSC_0.3 võrreldes CSnAg-TSC_3 ligikaudu kaks korda ning CSnAg-NaBH₄_0.3 ligikaudu kuus korda lahustuvum kui CSnAg-NaBH₄_3. Andmed näitasid ka, et lahustuvus ei sõltunud nanokomposiitide sünteesist (suurusest).

Tabel 3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide 24-tunni lahustuvus (%) deioniseeritud vees 30°C juures erinevatel kontsentratsioonidel – 1 mg Ag/L ja 10 mg Ag/L. AgNPs-Cit – tsitraadiga stabiliseeritud hõbeda nanoosakesed.

CSnAg	Sünteesi meetod (TSC)		Sünteesi meetod (NaBH ₄)	
	1 mg Ag/L	10 mg Ag/L	1 mg Ag/L	10 mg Ag/L
CSnAg_0.3	4.30	0.58	4.20	2.50
CSnAg_1	2.50	0.49	3.30	0.79
CSnAg_3	2.10	0.53	0.65	0.64
AgNPs-Cit	0	0.25	Ei analüüsitud	Ei analüüsitud

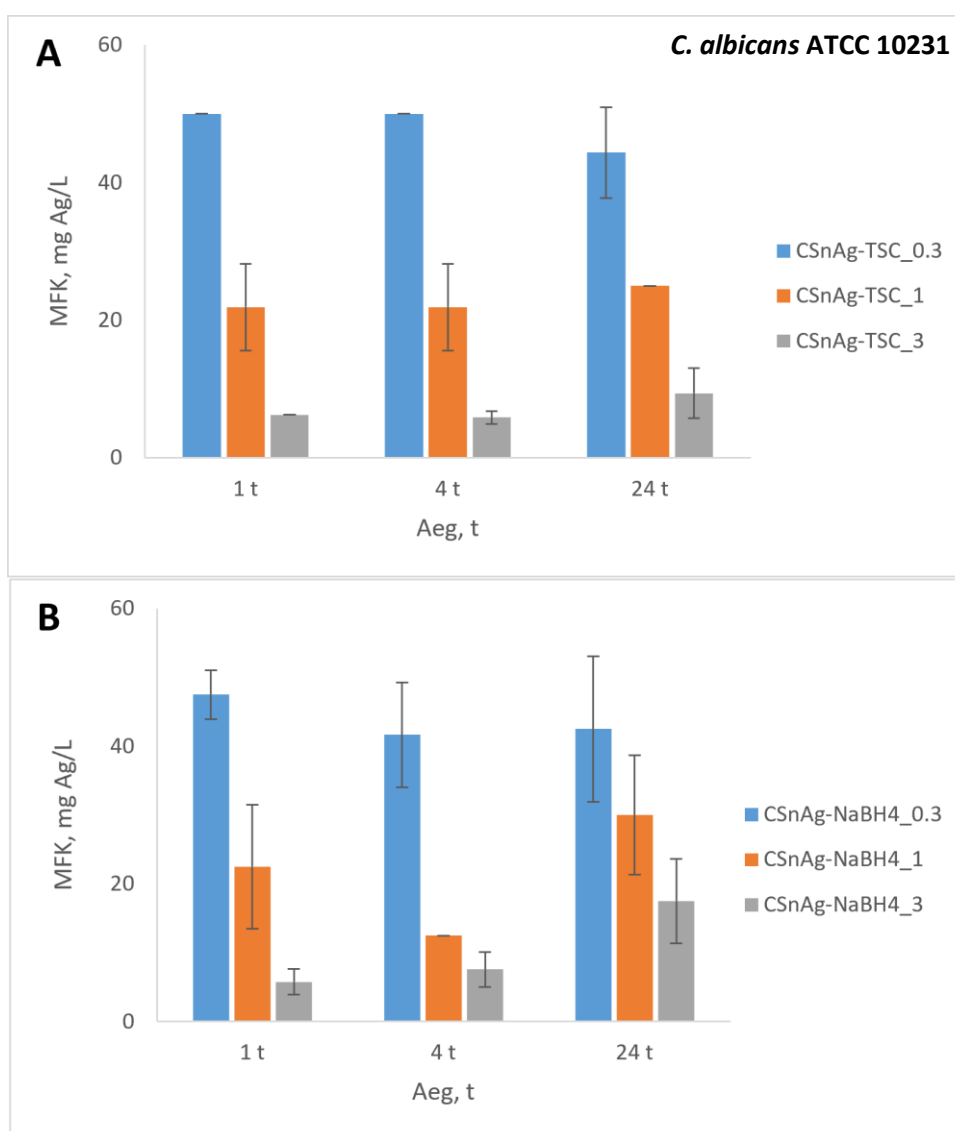
4.2. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide, kitosaani, hõbenitraadi ja amfoteritsiin B toksilisus

Sünteesitud hõbeda-kitosaani nanokomposiitide mürgisust määrati kahele pärmseenele *C. albicans* ATCC 10231 ja *C. glabrata* ATCC 90030. Lisaks nanokomposiitidele määrati ka madala molekulmassiga kitosaani, hõbenitraadi ja juba meditsiinis kasutatava seenevastase ravimi amfoteritsiin B (positiivne kontroll) mürgisust uuritavatele pärmseentele. Antud pärmseened valiti töösse kuna on enim levinud haiglainfektsioonide põhjustajaid (Preeti *et al.*, 2002). Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide ja uuritavate ainete mürgisust määrati elulevuse testiga deioniseeritud vees (Spot test) (Suppi *et al.*, 2015).

4.2.1. *Candida albicans*

Analüüsitud nanokomposiitide mürgisus pärmile *C. albicans* sõltus eelkõige kitosaani sisaldusest nanokomposiitides (Joonis 11). Kõige efektiivsemad olid nanokomposiidid hõbeda ja kitosaani massisuhtega 1:3.

TSC ja NaBH₄-ga sünteesitud osakeste mürgisuses ei olnud suuri erinevusi (Joonis 11), kuigi UV-Vis analüüs näitas, et NaBH₄ sünteesitud osakesed olid väiksemad ning kirjanduse andmeil on väiksemad osakesed biotsiidsema toimega (Ivask *et al.*, 2014; Kasemets *et al.*, 2019). Kõige nõrgemat biotsiidset toimet DI vees täheldati AgNPs-Cit (24-t MFK >80 mg Ag/L) ja CSnAg-TSC_0.3, mille 1-, 4- ja 24-t MFK olid vastavalt 50.0, 50.0 ja 44.4 mg Ag/L (Lisa 1).



Joonis 11. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (CSnAg) minimaalne fungitsiidne kontsentratsioon (MFK) pärmseentele *C. albicans* ATCC 10231 deioniseeritud vees 30°C juures 1, 4 ja 24 tunni jooksul. CSnAg-TSC – trinaatriuutsitraadiga sünteesitud nanokomposiidid (A), CSnAg-NaBH₄ – naatriumboorhüdriidiga sünteesitud nanokomposiidid (B). Nanokomposiitides oli erinev hõbeda ja kitosaani massisuhe (Ag:CS) – 1:0.3 (CSnAg_0.3), 1:1 (CSnAg_1) ja 1:3 (CSnAg_3).

Kõige tugevam toksiline toime CSnAg-TSC osakestel peale 1 tunni ekspositsiooni oli kõige suurema kitosaani sisaldusega CSnAg_3 (MFK 6.25 mg Ag/L), võrreldes CSnAg_0.3 ja CSnAg_1-ga (MFK 50.0 ja

21.9 mg Ag/L, vastavalt) (Lisa 1). Peale 4-tunnist inkubeerimist jäi CSnAg-TSC_0.3 ja CSnAg-TSC_1 MFK samaks, vastavalt 50 ja 21.9 mg Ag/L, kuid CSnAg-TSC_3 puhul vähenes (MFK 5.86 mg Ag/L) . Samuti väärrib märkimist, CSnAg-TSC_0.3 mürgisus 24 tunni jooksul suurenes (Joonis 11A), kuid CSnAg-TSC_1 ja CSnAg-TSC_3 mürgisus vähenes: vastavalt 21.9, 21.9, 25.0 mg Ag/L ja 6.3, 5.9, 9.4 mg Ag/L (Joonis 11; Lisa 1), kuid need erinevused ei olnud statistiliselt olulised.

Naatrimboorhüdriidiga sünteesitud nanokomposiitide mürgisuse testimisel täheldati sama trendi, mis trinaatriumtsitraadiga sünteesitud nanokomposiitide puhul. Kõige nõrgemat biotsiidset toimet DI vees täheldati CSnAg-NaBH₄_0.3, kõige tugev toksiline toime oli kõige suurema kitosaanisaldusega CSnAg-NaBH₄_3 (Joonis 11B), mille 1-, 4- ja 24-t MFK olid vastavalt 5.8, 7.6 ja 17.5 mg Ag/L (Lisa 1). Peale 4-tunnist inkubeerimist oli CSnAg- NaBH₄_0.3 ja CSnAg- NaBH₄_1 MFK mõnevõrra väiksem kui peale 1-tunni ekspositsiooni, kuid CSnAg-NaBH₄_3 puhul jäi MFK väärtus samaks. Samas täheldati, et peale 24 tunni ekspositsiooni CSnAg-NaBH₄_1 ja CSnAg_NaBH₄_3 toksilisus isegi vähenes (Joonis 11B).

Samuti analüüsiti kontrollina hõbenitraati (AgNO₃), amfoteritsiin B (AmpB) ja madala molekulmassiga kitosaani mürgisust. AgNO₃ 1, 4 ja 24 tunni kõik MFK väärtused olid 1 mg Ag/L ja see ei muutunud ajas. See MFK väärtus oli kooskõlas ka varasemate andmetega (Suppi *et al.*, 2015). Amfoteritsiin B mürgisus aga ajas vähenes (1-, 4- ja 24-h MFK väärtused olid vastavalt 18.8, 20.8, 29.2 mg/L) (Lisa 1). Ka kirjanduses on näidatud, et amfoteritsiin B toksilisus (MFK) *C. albicans*'le oli >10 mg/mL (Pereira *et al.*, 2022). Kitosaani toksilisuse uuring näitas, et 1-, 4- ja 24-t MFK väärtused olid vastavalt 14.6, 12.5 ja 25 mg/L (Lisa 1).

Meie uuringus nii TSC- kui ka NaBH₄-ga sünteesitud nanokomposiitide mürgisus pärmsenele *C. albicans* ATCC 10231 sõltus eelkõige kitosaani sisaldusest nanokomposiitides (Joonis 11). Kirjanduse andmeil on näidatud, et kitosaan võib vähendada pärmsene *C. albicans* metaboolset aktiivsust ja elulevust (Al Zahrani *et al.*, 2022; Seyfarth *et al.*, 2008). Mõned uuringud on näidanud, et kitosaani polükatioonne iseloom on seenevastase toime kõige olulisem mehhanism, kuna katioonsed rühmad seonduvad pärmsente rakuseina anioonsete komponentidega ja destabiliseerivad membraani (Yilmaz Atay, 2020; Ke *et al.*, 2021).

On teada, et veekeskkonnas toimub AgNPs oksüdatiivne lahustumine, mis viib toksiliste hõbeda ionide vabanemiseni (Peretyazhko *et al.*, 2014). Arvatakse, et AgNPs antimikroobne toime tuleneb suuresti lahustunud Ag⁺ ionidest ja AgNPs toimivad ainult „reservuaarina“ ja vabastavad anioone tänu nende oksüdatiivsele lahustumisele (Pareek *et al.*, 2018). Kuid antud töös uuritavate nanokomposiitidest vabanenud hõbeda ionide hulk vastavatel MFK väärtustel olid oluliselt väiksemad kui AgNO₃ MFK väärtused (1, 4 ja 24 tunni MFK-d olid kõik 1 mg Ag/L).

Samuti väärrib märkimist, et TSC ja NaBH₄ sünteesiga saadud NK mürgisus oluliselt ei erinenud, kuigi UV-Vis analüüs näitas, et CSnAg-NaBH₄ osakesed olid väiksema suurusega kui CSnAg-TSC. Huvitav on märkida, et kirjanduse andmeil AgNPs toksilisus suureneb osakeste suuruse vähenemisega (Ivask *et al.*, 2014; Kasemets *et al.*, 2019; Pareek *et al.*, 2018), kuid on ka eksperimentaalseid andmeid, mis näitavad, et väiksemad nanoosakesed olid kas vähem toksilised või toksilisus ei sõltunud osakese suurusest (Szerencsés *et al.*, 2020).

Samuti on näidatud, et kokkupuuteaeg mõjutab nanoosakeste mürgisust pärmsentele (Kasemets *et al.*, 2019). Saadud tulemused aga näitasid, et 1 ja 24 tunni MFK väärtused olid peaaegu sarnased, mis võib tuleneda asjaolust, et kitosaani kui AgNPs stabiliseeriva polümeeri kasutamine muudab

need osakesed kiiretoimelisemaks. Samas muutus 24-tunni inkubatsioonil deioniseeritud vees nii CSnAg-TSC kui ka CSnAg-NaBH₄ pinnalaeng (vähenes vastavalt 2.4 ja 3.2 korda), mis võib ka olla põhjuseks, et NK mürgisus enam ajas ei suurenenud vaid pigem isegi vähenes.

Sellised tulemused võivad olla tingitud ka nanokomposiitide ebastabiilsusest ja nende võimest agregeeruda ja osaliselt kaotada oma mürgised omadusi (Pereira *et al.*, 2022). Agregatsiooni (osakeste suurenemist) aga UV-Vis analüüsiga ei näidanud (Joonis 10). Samuti võib eeldada, et keskkonna tingimused mõjutavad osakeste dispersiooni ja nanoosakeste aglomeratsiooni olekut, mis omakorda mõjutab nende osakeste suurust, mõjutades seeläbi toksilisust (Gatoo *et al.*, 2014).

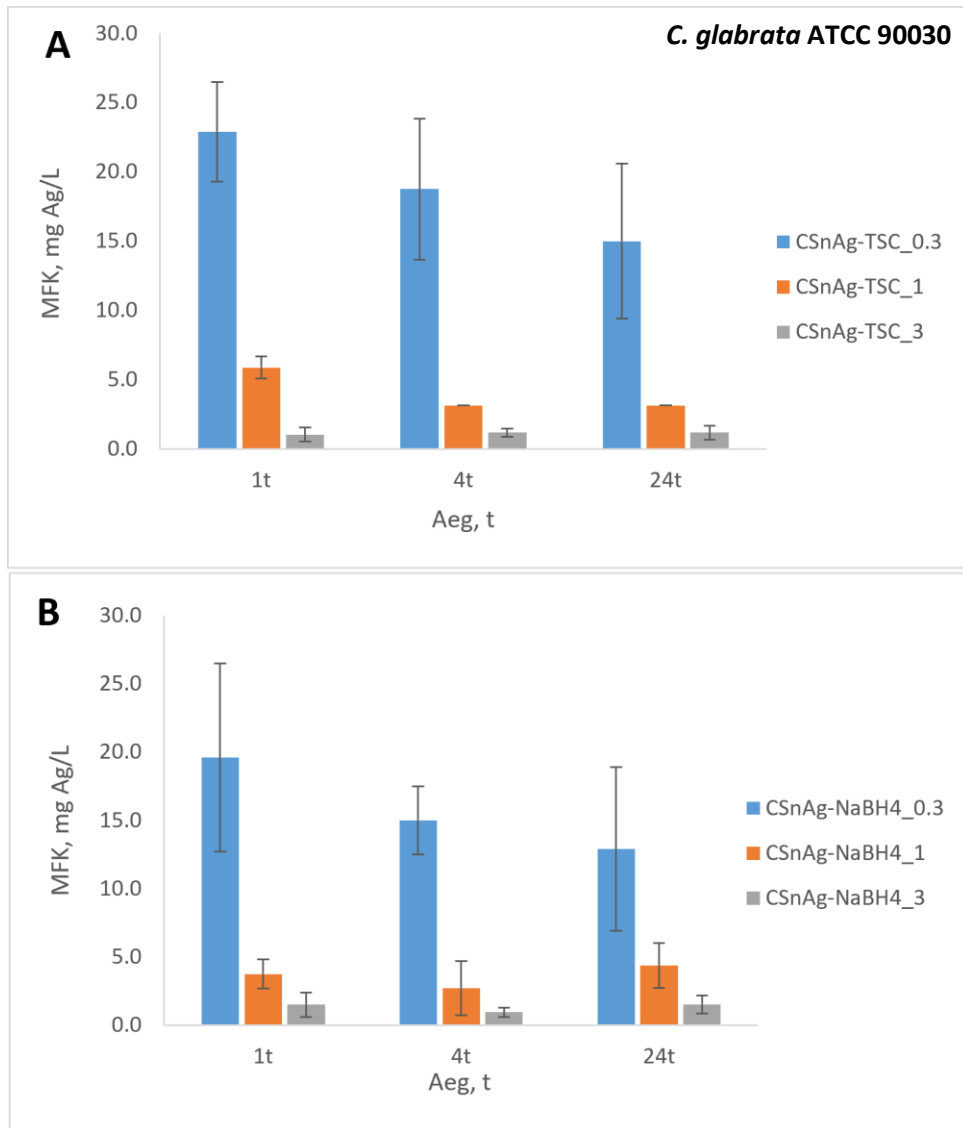
4.2.2. *Candida glabrata*

Tulemused näitasid, et CSnAg-TSC_0.3, CSnAg-TSC_1 ja CSnAg_3 olid vastavalt 2.1, 3.9 ja 6 korda mürgisemad pärmseenele *C. glabrata* võrreldes *C. albicans*'ga (Joonis 12; Lisa 1).

Nagu pärmseenel *C. albicans*, täheldati ka *C. glabrata* puhul, et NK mürgisus sõltus kitosaani sisaldusest (Joonis 12). CSnAg-TSC_3 oli ligikaudu 22 korda toksilisem kui CSnAg-TSC_0.3 ja 5 korda toksilisem kui CSnAg-TSC_1 pärast ühetunnist ekspositsiooni. Nagu pärmseene *C. albicans* puhul olid ka AgNPs-Cit (kitosaanita stabiliseerimata osakesed) kõige vähem mürgisemad pärmseenele *C. glabrata* (1-, 4- ja 24-t MFK >80, 80, 40 mg Ag/L) (Lisa 1). CSnAg-NaBH₄ osakesed olid peale 1 tunni ekspositsiooni mõnevõrra mürgisemad võrreldes CSnAg-TSC osakestega, kuid peale 4- ja 24 tundi statistilist erinevust MFK väärtuste vahel enam ei olnud. CSnAg_0.3 nanokomposiitide määrgisus aga ajas suurenes.

Analüüsiti ka kontrollina hõbenitraadi (AgNO₃), amfoteritsiin B (AmpB) ja madala molekulmassiga kitosaani mürgisust. Hõbenitraadi 1-, 4 ja 24-t MFK väärtused olid kõik 0.8 mg Ag/L (Lisa 1). Amfoteritsiin B 1- 4- ja 24-tunni MFK väärtused olid vastavalt >100, >100 ja 18.8 mg/L, seega oli amfoteritsiin B võrreldes *C. albicans*'ga peale 1 ja 4 tunni ekspositsiooni oluliselt vähem mürgisem. Kitosaani 1-, 4- ja 24-t MFK väärtused olid vastavalt >100, >100 ja 4.95 mg/L (Lisa 1) ja seega nagu amfoteritsiin B mürgisus, nii ka kitosaani mürgisus suurenes ekspositsiooni ajaga. Need tulemused olid kooskõlas uuringuga, kus *C. glabrata* oli resistentsem madala molekulmassiga kitosaani suhtes võrreldes pärmseenega *C. albicans* (Alburquenque *et al.*, 2010). Meie tulemused näitasid, et kuigi kitosaan oli just rohkem toksiline *C. albicans*'le, siis hõbeda-kitosaani nanokomposiidid oli just toksilisemad pärmseenele *C. glabrata*.

Need erinevused nanokomposiitide mürgisuses kahe pärmseeneleliigi vahel võib-olla tingitud erinevusest nende rakuseina ehituses, eelkõige kitiini, glükaani ja rasvhapete sisalduse poolest (Gouyau *et al.*, 2021; Garcia *et al.*, 2018). On teada, et *C. glabrata* on tegelikult palju sarnasem pagaripärmiga *Saccharomyces cerevisiae* kui *C. albicans*'ga (Brunke & Hube, 2013).



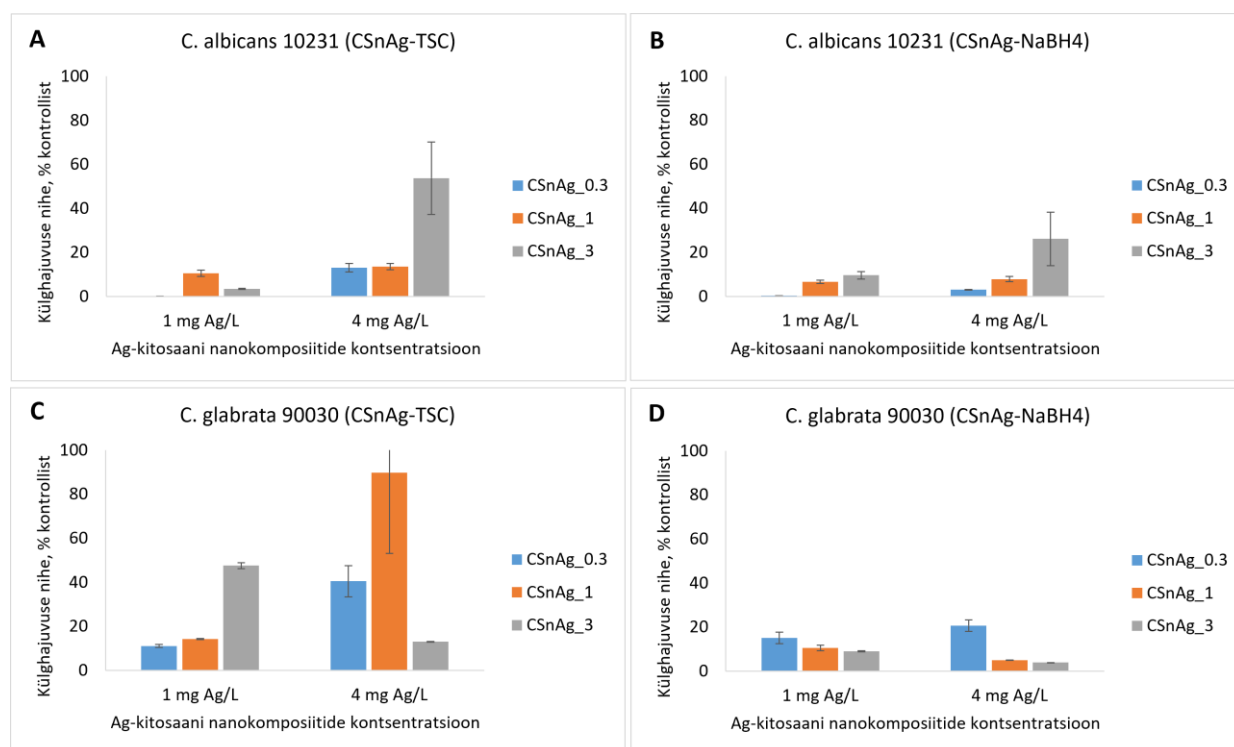
Joonis 12. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide (CSnAg) minimaalne fungitsiidne kontsentratsioon (MFK) pärmseenele *C. glabrata* ATCC 90030 deioniseeritud vees 30°C juures 1, 4 ja 24 tunni ekspositsioonil. CSnAg-TSC – trinaatriiitsitraadiga sünteesitud nanokomposiidid (A), Ag-NaBH₄ – naatriumboorhüdriidiga sünteesitud nanokomposiidid (B). Nanokomposiitides oli erinev hõbeda ja kitosaani massisuhe (Ag:CS) – 1:0.3 (CSnAg_0.3), 1:1 (CSnAg_1) ja 1:3 (CSnAg_3).

4.3. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide ja rakkude vahelised interaktsioonid

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide interaktsioone pämirakkudega uuriti läbivoolutsütomeetria ja laser-skaneeriva konfokaalmikroskoobiga (CLSM).

4.3.1. Lävivoolutsütomeetria

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide seondumist rakkudega määrati läbivoolutsütomeetriga, analüüsides muutusi külghajumises, mis sõltub rakkude intratsellulaarse tihedusest ja granulaarsusest (Park *et al.*, 2017). Mitmed uuringud on näidanud, et kui nanoosakesed seonduvad rakkudega, suureneb külghajumise signaal (Kubo *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2019; Vihodceva *et al.*, 2021).



Joonis 13. Nanokomposiitide ja pärmseente *Candida albicans* (A-B) ja *Candida glabrata* (C-D) vaheliste interaktsioonide uuring läbivoolutsütomeetria meetodil. CSnAg-TSC – trinaatriiitsitraadiga sünteesitud nanokomposiidid (A, C), CSnAg-NaBH₄ – naatriumboorhüdriidiga sünteesitud nanokomposiidid (B, D). Nanokomposiitides oli erinev hõbeda ja kitosaani massisuhe (Ag:CS) – 1:0,3 (CSnAg_0.3), 1:1 (CSnAg_1) ja 1:3 (CSnAg_3). Lävivoolutsütomeetria katses uuritud nanokomposiitide kontsentratsioonid olid 1 mg Ag/L ja 4 mg Ag/L.

Lävivoolutsütomeetria uuringu tulemused näitasid (Joonis 13), et CSnAg-TSC osakesed seonduvad nii *C. albicans*'i kui ka *C. glabrata* rakkudega (Joonis 13A, C) ja see seondumine sõltus nii NK kontsentratsioonist kui ka kitosaani sisaldusest nanokomposiitides. Näiteks põhjustas CSnAg-TSC_3 kontsentratsioonil 4 mg Ag/L külghajuvuse suurenemist võrreldes kontrolliga ~40% (Joonis 13A). Samuti on näha tendents, et mida suurem on kitosaani sisaldus, seda suurem on külghajuvuse muutus, mis viitab nanokomposiitide ja pärmseente vahelistele interaktsioonidele (seondumist rakuseinale). Võrreldes *C. albicans* 'ga põhjustas CSnAg-TSC veelgi suuremat muutust külghajuvuses pärmseene *C. glabrata* korral ja seda juba ka kontsentratsioonil 1 mg Ag/L (Joonis 13C). Samas CSnAg_TSC_3 kontsentratsioonil 4 mg/L külghajuvuse muutus vähenes (Joonis 13C). Erinevalt CSnAg-TSC osakestes, CSnAg-NaBH₄ osakestele eksponeeritud rakkude analüüsil nii märgatavat muutust külghajuvuses ei täheldatud, jäädes nii *C. albicans*'i kui ka *C. glabrata* korral alla 20% (Joonis 13B, D), mis võiks viidata, et CSnAg-NaBH₄ osakesed seonduvad uuritavate pärmseentega vähem. Selline tulemus võib olla näiteks tingitud asjaolust, et kõigi kolme nanokomposiidi ζ-potentsiaal vähenes 24

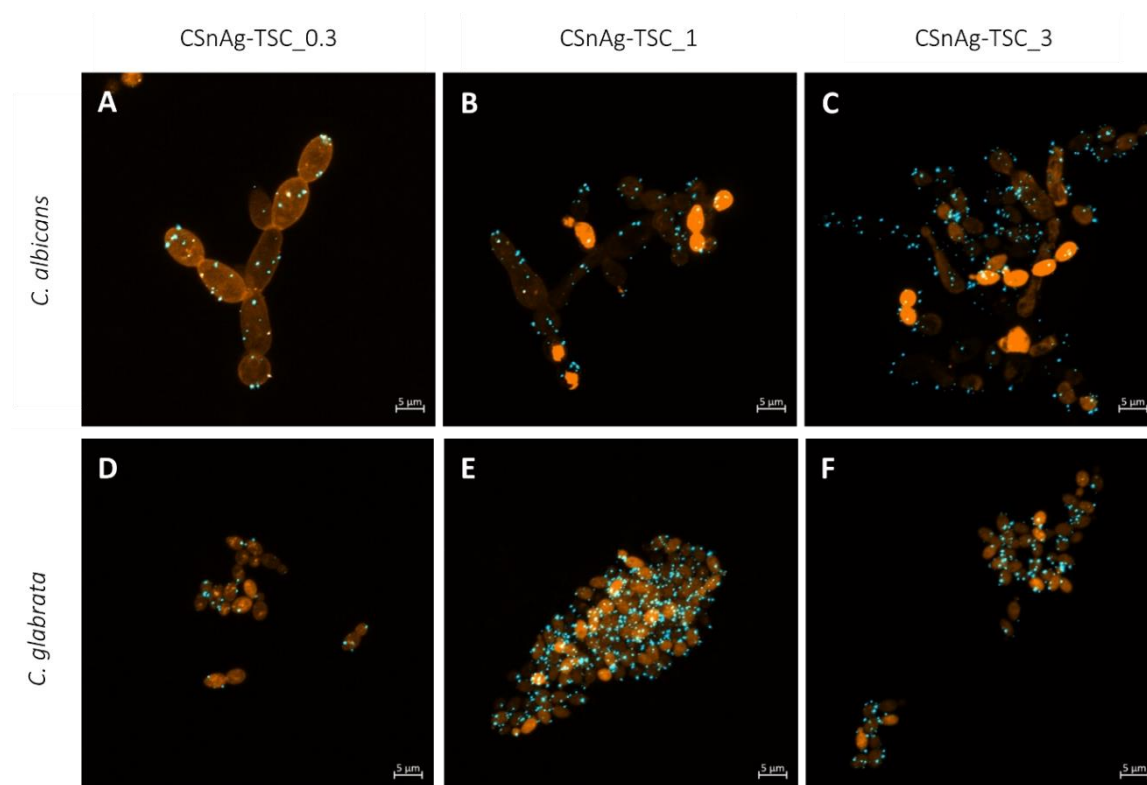
tunni jooksul, mis võis mõjutada nanokomposiitide võimet rakkudega seonduda. Samuti UV-Vis analüüs näitas, et CSnAg-NaBH₄ olid väiksema suurusega kui CSnAg-TSC ja sega võisid põhjustada väiksemat külghajuvuse muutust.

4.3.2. Laser-skaneeriv konfokaalmikroskoopia

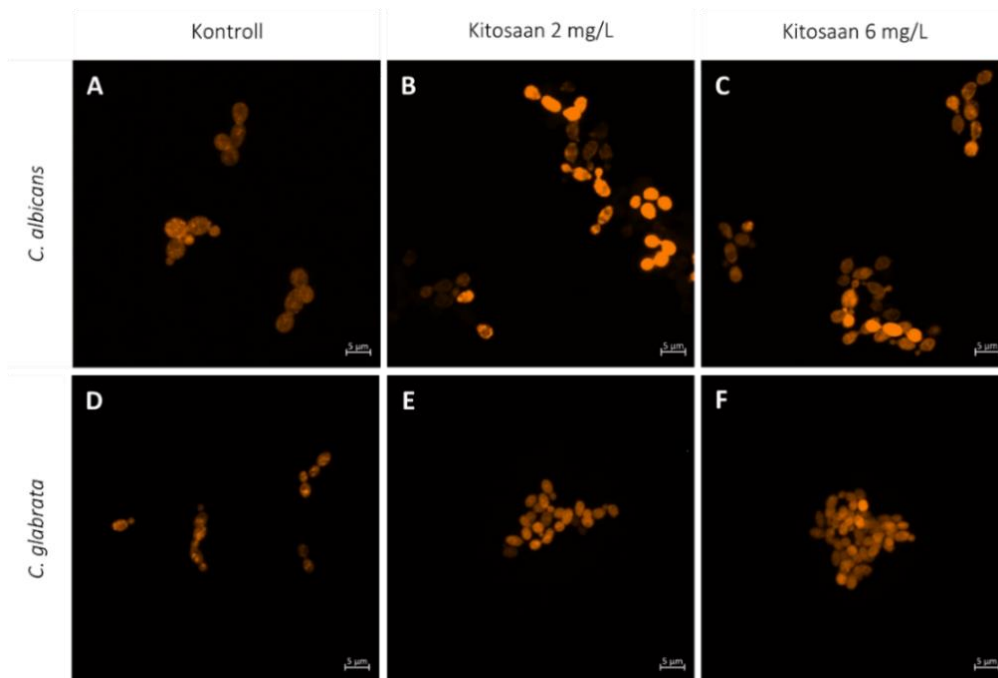
Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide interaktsioone pärmirakkudega uuriti laser-skaneeriva konfokaalmikroskoobiga (CLSM), kasutades reflekteeruva valguse režiimi nanokomposiitide visualiseerimiseks (Kasemets *et al.*, 2019).

CLSM analüüs näitas, et CSnAg-TCS osakesed kinnitusid nii *C. albicans* kui ka *C. glabrata* rakkudele (Joonis 14A-F). Kusjuures kitosaani sisalduse suurenemine nanokomposiitides (nAgCS_1 ja nAgCS_3) põhjustas *C. albicans* puhul iseloomulike pseudohüüfide teket. *C. albicans* hüfaalse vormi teke toimub sageli vastusena erinevatele signaalidele, nagu temperatuur (37°C), seerumi olemasolu, füsioloogiline CO₂ kontsentratsioon, neutraalne või aluseline pH, toitainete piiratus ja aminohapete olemasolu (Galocha *et al.*, 2019).

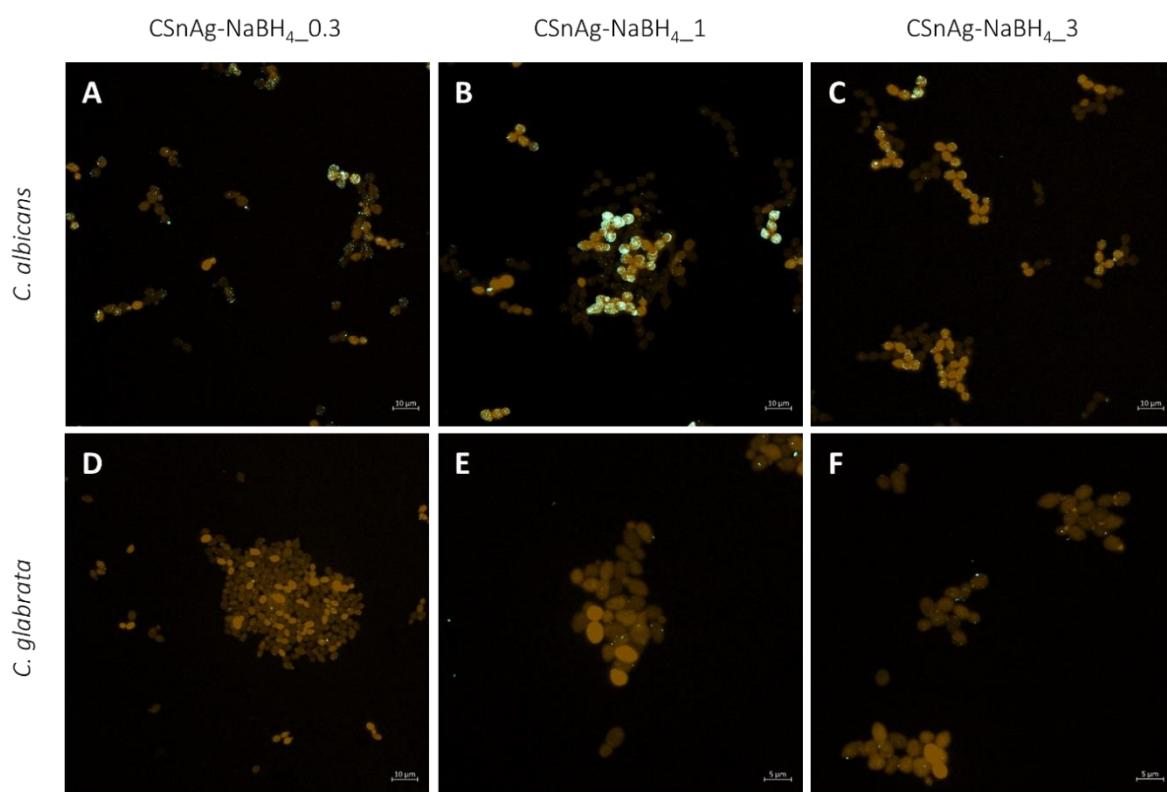
Kirjanduse andmeil *C. glabrata* ei moodustada hüife ega pseudohüife (Galocha *et al.*, 2019). Samas põhjustasid CSnAg-TSC_1 ja CSnAg-TSC_3 *C. glabrata* rakukogumeid (Joonis 14E, F), mida ei esinenud kontrollkultuuris (Joonis 16D). Samas ei esinenud märgatavaid rakukogumeid ka pärmseene *C. albicans* ekspositsioonil nanokomposiitidele.



Joonis 14. Laser-skaneeriva konfokaalmikroskoobi pildid pärmseentest *Candida albicans* (A-C) ja *Candida glabrata* (D-F) peale 1 tunni ekspositsiooni 30°C juures trinaatriumtsitraadiga (TSC) sünteetitud nanokomposiitidele deioniseeritud vees (CSnAg-TSC, 2 mg Ag/L). Rakud värviti fluorestseeruva membraani värviga CellBrite Fix555 – oranž värv; nanokomposiite visualiseeriti reflekteeruva valgusega – sinine värv. Hõbeda ja kitosaani massisuhe oli 1:0.3 (A, D), 1:1 (B, E), 1:3 (C, F). Skaala piltidel on 5 μm.



Joonis 15. Laser-skaneeriva konfokaalmikroskoobi pildid pärmseentest *Candida albicans* (A-C) ja *Candida glabrata* (D-F) peale 1 tunni inkubatsiooni 30°C juures; eksponeerimata rakud (A, D) ja peale ekspositsiooni madala molekulmassiga kitosaanile 2 mg/L ja 6 mg/L (B-C,E-F). Rakud värviti fluorestseeruva membraani värviga CellBrite Fix555 – oranž; nanokomposiite visualiseeriti reflekteeruva valgusega — sinine. Skaala piltidel on 5 μm.



Joonis 16. Laser-skaneeriva konfokaalmikroskoobi pildid pärmseentest *Candida albicans* (A-C) ja *Candida glabrata* (D-F) peale 1 tunni ekspositsiooni 30°C juures naatriumboorhüdriidiga (NaBH₄) sünteetitud nanokomposiitidele deioniseeritud vees. Rakud värviti fluorestseeruva membraani värviga CellBrite Fix555 – oranž värv; nanokomposiite visualiseeriti reflekteeruva valgusega — sinine värv. Hõbeda ja kitosaani massisuhe oli 1:0.3 (A, D), 1:1 (B, E), 1:3 (C, F). Skaala piltidel 5 ja 10 μm.

Lisaks nanokomposiitidele uuriti ka madala molekulmassiga kitosaani toimet pärmseentele *C. albicans* ja *C. glabrata*, et välja selgitada, kas kitosaan võib ka ise põhjustada rakukogumike teket. Tulemused näitasid, et kitosaan põhjustas *C. glabrata* rakukogumike teket (Joonis 15 E-F).

CLSM analüüs näitas, et ka CSnAg-NaBH₄ nanokomposiidid seonduvad uuritavate pärmseentega (Joonis 16), samas ei olnud piltidel osakesed nii selgelt eristatavad ja *C. glabrata* puhul oli osakesi ka vähem (Joonis 16 D-F). Samuti näitas analüüs, et ka AgNPs-Cit osakesed ei seonduvad uuritavate pärmseentega (Lisa 3).

CLSM tulemused kinnitasid läbivoolutsütomeetria tulemusi, mis näitasid CSnAg-TSC suuremat seondumist võrreldes CSnAg-NaBH₄ osakestega (Joonis 13). Ühe põhjusena võib välja tuua, et CSnAg-NaBH₄ osakesed oli UV-Vis analüüsi alusel väiksemad kui CSnAg-TSC ja võivad põhjustada väiksemat külghajuvuse muutust ja samas ka CLSM mikroskoobis reflekteeriva valguse režiimis on paremini visualiseeritavad pigem suuremad metallilised nanoosakesed. Kirjanduse andmeil on näidatud, et just positiivselt laetud nanoosakesed seonduvad eelkõige mikroobirakkudega (Kasemets *et al.*, 2019), mille pind on laetud negatiivselt. Antud uuringu tulemused näitasid samuti, et hõbeda-kitosaani nanokomposiidid (ζ -potentsiaal oli positiivne) seonduvad uuritavate pärmseentega.

Kokkuvõte

Mikroobide ravimiresistentsuse ja raskesti ravitavate haiglainfektsioonide suurenemise tõttu uuritakse kogu maailmas antimikroobsete nanoosakeste võimalikku kasutamist biomeditsiinis, näiteks haavaravis või pinnakatetes.

Käesolevas magistritöös sünteesiti kuus hõbeda-kitosaani nanokomposiiti (CSnAg), kasutades kahte erinevat sünteesi meetodit: hõbenitraadi (AgNO_3) redutseerimist trinaatriumtsitraadiga (CSnAg-TSC) või naatriumboorhüdriidiga (CSnAg-NaBH₄). Sünteesitud osakestel oli erinev hõbeda-kitosaani massisuhe: 1:0.3 (CSnAg_0.3), 1:1 (CSnAg_1) ja 1:3 (CSnAg_3). Nanokomposiitide UV-Vis analüüs näitas, et CSnAg-NaBH₄ osakesed olid väiksema suurusega kui CSnAg-TSC. Kõikide sünteesitud nanokomposiitide pinnalaeng (ζ -potentsiaal) oli positiivne.

Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide mürgisust testiti kahele patogeensele pärmseenele *C. albicans* ATCC 10231 ja *C. glabrata* ATCC 90030 elulevuse testis (Spot test), määraes minimaalset fungitsiidset kontsentratsiooni (MFK). Antud liigid valiti uuringusse, kuna need on enim levinud seeninfektsioone põhjustavad pärmseened. Lisaks uuriti ka hõbenitraadi, madala molekulmassiga kitosaani ja seenevastase ravimi amfoteritsiin B mürgisust. Peamised tulemused olid:

1. Kitosaan osakeste stabiliseerijana mõjutas uuritavate nanokomposiitide toksilisust. Nanokomposiidid mille koostises oli hõbeda ja kitosaani massisuhe 1:3, olid kõige mürgisemad mõlemale uuritavale pärmseenele. CSnAg-TSC_3 ja CSnAg-NaBH₄_3 24-t MFK väärtused pärmseentele *C. albicans* ja *C. glabrata* olid vastavalt 9.38 ja 1.17 mg Ag/L ning 17.5 ja 1.51 mg Ag/L. Amfoteritsiin B 24-t MFK väärtus *C. albicans* ja *C. glabrata* jaoks oli 25.0 ja 4.95 mg/L. Seega olid CSnAg_3 osakesed kas samatoksilised või isegi toksilisemad uuritavatele pärmseentele.
2. CSnAg-TSC_3 kui ka CSnAg-NaBH₄_3 olid ligikaudu 8 ja 11 korda toksilisemad pärmseenele *C. glabrata* võrreldes *C. albicans*'ga.
3. Kahe erineva sünteesimeetodiga (ja suurusega) saadud nanokomposiitide mürgisuses pärmseentele *C. albicans* ja *C. glabrata* erinevust ei olnud, seega ei sõltunud uuritavate nanokomposiitide mürgisus osakeste suurusest.
4. Konfokaalmikroskoobi analüüs näitas, et hõbeda-kitosaani nanokomposiidid kinnitusid *C. albicans* ja *C. glabrata* rakupinnale, kusjuures läbivoolutsütomeetria analüüs näitas CSnAg-TSC osakeste suuremat seondumist *C. glabrata* rakkudega.

Toksilisuse ja osakeste-rakkude interaktsioonide analüüsi põhjal võib oletada, et hõbedal ja kitosaanil on sünergiline toime nii *C. albicans*'i kui *C. glabrata* puhul.

Summary

Due to increased drug resistance, several species of fungi have developed that can cause severe infections and long-term illness and increased mortality in humans. Therefore, antimicrobial nanoparticles are being explored worldwide as an alternative to antibiotics and for medical device coatings.

In this thesis, silver-chitosan nanocomposites (CSnAg) were synthesized using two different methods: reduction of silver nitrate (AgNO_3) with trisodium citrate (TSC) and sodium borohydride (NaBH_4) and different weight ratios of silver-chitosan 1:0.3 (CSnAg_0.3), 1:1 (CSnAg_1) and 1:3 (CSnAg_3). The main results were:

1. Chitosan as a particle stabilizer affects the toxicity of nanocomposites. Nanocomposites containing a 1:3 weight ratio of silver to chitosan were the most toxic to both yeasts tested. 24-h MFK of CSnAg-TSC_3 for *C. albicans* and *C. glabrata* was 9.38 and 1.17 mg Ag/L, respectively, and 24-h MFK of CSnAg- NaBH_4 was 17.5 and 1.51 mg Ag/L, respectively. In comparison, the 24-h MFK values for amphotericin B for *C. albicans* and *C. glabrata* were 25 and 4.95 mg / L, respectively.
2. There was no difference in the toxicity of the nanocomposites obtained by two different synthetic methods (and sizes) to *C. albicans* and *C. glabrata*, so the antifungal activity of the synthesized NK did not depend on the particle size.
3. Both CSnAg-TSC_3 and CSnAg- NaBH_4 _3 were approximately 8- and 11-fold more toxic to *C. glabrata*, respectively, than to *C. albicans*.
4. Silver-chitosan nanocomposites bound (attached to the cell surface) in both yeasts studied, whereas flow cytometry analysis with CSnAg-TSC particles showed greater binding to *C. glabrata* cells.

Analysis of toxicity and particle-cell interactions suggests that silver and chitosan have a synergistic effect with both *C. albicans* and *C. glabrata*.

Tänuavaldused

Töö autor soovib tänada oma juhendajat Dr. Kaja Kasemetsa ning KBFI Keskkonnatoksikoloogia laborit igakülgse abi eest laboris. Eraldi soovin tänada veel Maarja Otsust, kes abistas ja juhendas mind läbivoolutsütomeetri ja laser-skaneeriva konfokaalmikroskoobi kasutamisel.

Töö on teostatud Eesti Teadusagentuuri projekti PRG749 raames.

Kasutatud kirjandus

1. Abdullah, M. (2021) 5 Most Common Hospital Acquired Infections (HAIs). *Invos.* (Külastamise kuupäev 13.03.2022). <https://inivos.com/blog/5-most-common-hospital-acquired-infections-hais/>
2. Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4(8), 3974–3983. <https://doi.org/10.1039/c3ra44507k>
3. Ahmed, S., & Ikram, S. (2016). Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. *Achievements in the Life Sciences*, 10(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.04.001>
4. Akmaz, S., Dilaver Adgüzel, E., Yasar, M., & Erguven, O. (2013). The effect of ag content of the chitosan-silver nanoparticle composite material on the structure and antibacterial activity. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2013, 12–18. <https://doi.org/10.1155/2013/690918>
5. Alberto Cortés, J., & Fernanda Corrales, I. (2019). Invasive Candidiasis: Epidemiology and Risk Factors. In *Fungal Infection*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81813>
6. Alburquenque, C., Bucarey, S. A., Neira-Carrillo, A., Urza, B., Hermosilla, G., & Tapia, C. v. (2010). Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp. *Medical Mycology*, 48(8), 1018–1023. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.486412>
7. Bamal, D.; Singh, A.; Chaudhary, G.; Kumar, M.; Singh, M.; Rani, N.; Mundlia, P.; Sehrawat, A.R. Silver Nanoparticles Biosynthesis, Characterization, Antimicrobial Activities, Applications, Cytotoxicity and Safety Issues: An Updated Review. *Nanomaterials* 2021, 11, 2086. <https://doi.org/10.3390/nano11082086>
8. Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? In *Journal of Controlled Release* (Vol. 235, pp. 337–351). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
9. Bibire, T., Yilmaz, O., Ghiciuc, C. M., Bibire, N., & Dănilă, R. (2022). Biopolymers for Surgical Applications. In *Coatings* (Vol. 12, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/coatings12020211>
10. Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 3(4), 57. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>
11. Brunke, S., & Hube, B. (2013). Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cellular microbiology*, 15(5), 701–708. <https://doi.org/10.1111/cmi.12091>
12. CDC. (2020). Hospitalized Patients and Fungal Infections. (Külastamise kuupäev 13.05.2022). <https://www.cdc.gov/fungal/infections/hospitalized.html>
13. Costa-de-oliveira, S., & Rodrigues, A. G. (2020). *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: The triad yeast-host-antifungal. In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020154>
14. Dara, P. K., Mahadevan, R., Digita, P. A., Visnuvinayagam, S., Kumar, L. R. G., Mathew, S., Ravishankar, C. N., & Anandan, R. (2020). Synthesis and biochemical characterization of silver nanoparticles grafted chitosan (Chi-Ag-NPs): in vitro studies on antioxidant and

- antibacterial applications. *SN Applied Sciences*, 2(4). <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2261-y>
15. de Groot, P. W., Kraneveld, E. A., Yin, Q. Y., Dekker, H. L., Gross, U., Crielaard, W., de Koster, C. G., Bader, O., Klis, F. M., & Weig, M. (2008). The cell wall of the human pathogen *Candida glabrata*: differential incorporation of novel adhesin-like wall proteins. *Eukaryotic cell*, 7(11), 1951–1964. <https://doi.org/10.1128/EC.00284-08>
 16. Desai, R., Mankad, V., Gupta, S. K., & Jha, P. K. (2012). Size distribution of silver nanoparticles: UV-visible spectroscopic assessment. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 4(1), 30–34. <https://doi.org/10.1166/nnl.2012.1278>
 17. European Centre for Disease Prevention and Control. (2019). Healthcare-associated infections: surgical site infections. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC. (Külastamise kuupäev 12.04.2022). https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2017-SSI.pdf
 18. Galocha, M., Pais, P., Cavalheiro, M., Pereira, D., Viana, R., & Teixeira, M. C. (2019). Divergent approaches to virulence in *C. Albicans* and *C. Glabrata*: Two sides of the same coin. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9). <https://doi.org/10.3390/ijms20092345>
 19. Garcia, L. G. S., Guedes, G. M. de M., da Silva, M. L. Q., Castelo-Branco, D. S. C. M., Sidrim, J. J. C., Cordeiro, R. de A., Rocha, M. F. G., Vieira, R. S., & Brilhante, R. S. N. (2018). Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. *Carbohydrate Polymers*, 195, 662–669. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.091>
 20. Gatoo, M. A., Naseem, S., Arfat, M. Y., Mahmood Dar, A., Qasim, K., & Zubair, S. (2014). Physicochemical properties of nanomaterials: Implication in associated toxic manifestations. In *BioMed Research International* (Vol. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/498420>
 21. Gouyau, J., Duval, R. E., Boudier, A., & Lamouroux, E. (2021). Investigation of Nanoparticle Metallic Core Antibacterial Activity: Gold and Silver Nanoparticles against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1905. <https://doi.org/10.3390/ijms22041905>
 22. Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 20, Issue 6, pp. 5–10). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12539>
 23. Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. de, Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W. J., & Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 30, Issue 10, pp. 499–511). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.06.004>
 24. Honary, S., Ghajar, K., Khazaeli, P., & Shalchian, P. (2011). Preparation, Characterization and Antibacterial Properties of Silver-Chitosan Nanocomposites Using Different Molecular Weight Grades of Chitosan. In *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* (Vol. 10, Issue 1). DOI: 10.4314/tjpr.v10i1.66543
 25. Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Vija, H., Käkinen, A., Titma, T., Heinlaan, M., Visnapuu, M., Koller, D., Kisand, V., & Kahru, A. (2014). Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PloS one*, 9(7), e102108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102108>

26. Jeong, Y., Lim, D. W., & Choi, J. (2014). Assessment of size-dependent antimicrobial and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/763807>
27. Kamikawa, Y., Hirabayashi, D., Nagayama, T., Fujisaki, J., Hamada, T., Sakamoto, R., Kamikawa, Y., & Sugihara, K. (2014). In vitro antifungal activity against oral *Candida* species using a denture base coated with silver nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2014(April). <https://doi.org/10.1155/2014/780410>
28. Kasemets K., Käosaar S., Vija H., Fascio U., Mantecca P. Toxicity of differently sized and charged silver nanoparticles to yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741: A nano-biointeraction perspective. *Nanotoxicology*. 2019;13:1041–1059. doi: 10.1080/17435390.2019.1621401.
29. Ke, C. L., Deng, F. S., Chuang, C. Y., & Lin, C. H. (2021). Antimicrobial actions and applications of Chitosan. *Polymers*, 13(6), 904. <https://doi.org/10.3390/polym13060904>
30. Khan, H. A., Baig, F. K., & Mehboob, R. (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. In *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (Vol. 7, Issue 5, pp. 478–482). Hainan Medical University. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>
31. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 12, Issue 7, pp. 908–931). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
32. Khodashenas, B., & Ghorbani, H. R. (2019). Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 12, Issue 8, pp. 1823–1838). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.12.014>
33. Krcmery, V., & Barnes, A. J. (2002). Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: Pathogenicity and antifungal resistance. In *Journal of Hospital Infection* (Vol. 50, Issue 4, pp. 243–260). <https://doi.org/10.1053/jhin.2001.1151>
34. Kubo A.L., Capjak I., Vinković Vrček I., Bondarenko O.M., Kurvet I., Vija H., Ivask A., Kasemets K., Kahru A. Antimicrobial potency of differently coated 10 and 50 nm silver nanoparticles against clinically relevant bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Colloids Surf. B*. 2018;170:401–410. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.06.027.
35. Kulatunga, D. C. M., Dananjaya, S. H. S., Godahewa, G. I., Lee, J., & de Zoysa, M. (2017). Chitosan silver nanocomposite (CAGNC) as an antifungal agent against *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 55(2), 213–222. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw053>
36. le Ouay, B., & Stellacci, F. (2015). Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. In *Nano Today* (Vol. 10, Issue 3, pp. 339–354). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.04.002>
37. Li, B., Pan, L., Zhang, H., Xie, L., Wang, X., Shou, J., Qi, Y., & Yan, X. (2021). Recent Developments on Using Nanomaterials to Combat *Candida albicans*. *Frontiers in Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.813973>
38. Ma, Z., Garrido-Maestu, A., & Jeong, K. C. (2017). Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 176, pp. 257–265). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.082>
39. Mayer, L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity. *Virulence*, 4(2), 119–128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>

40. Medici, S., Peana, M., Nurchi, V. M., & Zoroddu, M. A. (2019). Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. In *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 62, Issue 13, pp. 5923–5943). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01439>
41. Minic, I., Pejic, A., (2018) *Candida Glabrata- Pathogenesis and Therapy*. *Ann Clin Med Microbiol* 3(2): 1021.
42. Mirda, E., Idroes, R., Khairan, K., Tallei, T. E., Ramli, M., Earlia, N., Maulana, A., Idroes, G. M., Muslem, M., & Jalil, Z. (2021). Synthesis of silver nanoparticles–chitosan composite particles spheres and their antimicrobial activities. *Polymers*, 13(22). <https://doi.org/10.3390/polym13223990>
43. Monegro, A. F., Muppidi, V., & Regunath, H. (2021). Hospital Acquired Infections. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. (Külastamise kuupäev 13.03.2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441857/>
44. Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
45. Nilsen-Nygaard, J., Strand, S. P., Vårum, K. M., Draget, K. I., & Nordgård, C. T. (2015). Chitosan: Gels and interfacial properties. In *Polymers* (Vol. 7, Issue 3, pp. 552–579). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym7030552>
46. Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
47. Pareek, V., Gupta, R., & Panwar, J. (2018). Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 90, pp. 739–749). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.093>
48. Park, J., Ha, M. K., Yang, N., & Yoon, T. H. (2017). Flow Cytometry-Based Quantification of Cellular Au Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 89(4), 2449–2456. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04418>
49. Peña, A., Sánchez, N. S., & Calahorra, M. (2013). Effects of chitosan on candida albicans: Conditions for its antifungal activity. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/527549>
50. Pereira, D., Carreira, T. S., Alves, N., Sousa, Â., & Valente, J. F. A. (2022). Metallic Structures: Effective Agents to Fight Pathogenic Microorganisms. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23031165>
51. Peretyazhko, T. S., Zhang, Q., & Colvin, V. L. (2014). Size-controlled dissolution of silver nanoparticles at neutral and acidic pH conditions: Kinetics and size changes. *Environmental Science and Technology*, 48(20), 11954–11961. <https://doi.org/10.1021/es5023202>
52. Peretyazhko, T. S., Zhang, Q., & Colvin, V. L. (2014). Size-controlled dissolution of silver nanoparticles at neutral and acidic pH conditions: Kinetics and size changes. *Environmental Science and Technology*, 48(20), 11954–11961. <https://doi.org/10.1021/es5023202>
53. Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., & Alastruey-Izquierdo, A. (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. In *The Lancet Infectious Diseases* (Vol. 17, Issue 12, pp. e383–e392). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30316-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30316-X)

54. Polinarski, M. A., Beal, A. L. B., Silva, F. E. B., Bernardi-Wenzel, J., Burin, G. R. M., de Muniz, G. I. B., & Alves, H. J. (2021). New Perspectives of Using Chitosan, Silver, and Chitosan–Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacteria. In *Particle and Particle Systems Characterization* (Vol. 38, Issue 4). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/ppsc.202100009>
55. Preeti N. Malani, Shelly A. McNeil, Suzanne F. Bradley, Carol A. Kauffman, *Candida albicans* Sternal Wound Infections: A Chronic and Recurrent Complication of Median Sternotomy, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 35, Issue 11, 1 December 2002, Pages 1316–1320, <https://doi.org/10.1086/344192>
56. Pu, Y., Liu, A., Zheng, Y., & Ye, B. (2014). In vitro damage of *Candida albicans* biofilms by chitosan. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(3), 929–934. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1839>
57. Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide Clean Care is Safer Care. (2011). (Külüstamise kuupäev 13.05.2022). https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80135/9789241501507_eng.pdf
58. Rodrigues, C. F., Rodrigues, M. E., Silva, S., & Henriques, M. (2017). *Candida glabrata* biofilms: How far have we come? *Journal of Fungi*, 3(1). <https://doi.org/10.3390/jof3010011>
59. Sampaio, P., & Pais, C. (2014). Epidemiology of Invasive Candidiasis and Challenges for the Mycology Laboratory: Specificities of *Candida glabrata*. In *Current Clinical Microbiology Reports* (Vol. 1, Issues 1–2). Springer. <https://doi.org/10.1007/s40588-014-0002-y>
60. Savage, D. T., Hilt, J. Z., & Dziubla, T. D. (2019). In Vitro Methods for Assessing Nanoparticle Toxicity. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8916-4_1
61. Seyfarth, F., Schliemann, S., Elsner, P., & Hipler, U. C. (2008). Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-d-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *International Journal of Pharmaceutics*, 353(1–2), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.029>
62. Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 36, Issue 2, pp. 288–305). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>
63. Szerencsés, B., Igaz, N., Tóbiás, Á., Prucsi, Z., Rónavári, A., Bélteky, P., Madarász, D., Papp, C., Makra, I., Vágvölgyi, C., Kónya, Z., Pfeiffer, I., & Kiricsi, M. (2020). Size-dependent activity of silver nanoparticles on the morphological switch and biofilm formation of opportunistic pathogenic yeasts. *BMC Microbiology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01858-9>
64. Szymańska, E., & Winnicka, K. (2015). Stability of chitosan-a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine drugs*, 13(4), 1819–1846. <https://doi.org/10.3390/md13041819>
65. Stensberg, M. C., Wei, Q., Mclamore, E. S., Porterfield, D. M., Wei, A., & Sepúlveda, M. S. (2011). Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.78>
66. Suppi, S., Kasemets, K., Ivask, A., Künnis-Beres, K., Sihtmäe, M., Kurvet, I., Aruoja, V., & Kahru, A. (2015). A novel method for comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae. *Journal of Hazardous Materials*, 286, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.027>

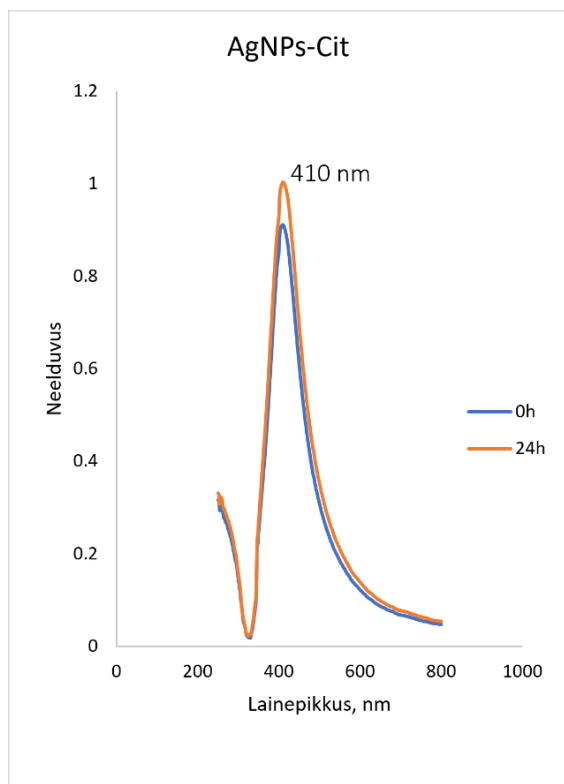
67. Wang, L. S., Wang, C. Y., Yang, C. H., Hsieh, C. L., Chen, S. Y., Shen, C. Y., Wang, J. J., & Huang, K. S. (2015). Synthesis and anti-fungal effect of silver nanoparticles–chitosan composite particles. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 2685–2696. <https://doi.org/10.2147/IJN.S77410>
68. Vazquez-Munoz, R., Lopez, F. D., & Lopez-Ribot, J. L. (2020). Silver Nanoantibiotics Display Strong Antifungal Activity Against the Emergent Multidrug-Resistant Yeast *Candida auris* Under Both Planktonic and Biofilm Growing Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01673>
69. Wei, D., Sun, W., Qian, W., Ye, Y., & Ma, X. (2009). The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research*, 344(17), 2375–2382. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.09.001>
70. Verma, P., & Maheshwari, S. K. (2019). Applications of Silver nanoparticles in diverse sectors. In *Int. J. Nano Dimens* (Vol. 10, Issue 1). DOI:10.22034/ijnd.2018.87646.1609
71. Vihodceva, S., Šutka, A., Sihtmäe, M., Rosenberg, M., Otsus, M., Kurvet, I., Smits, K., Bikse, L., Kahru, A., & Kasemets, K. (2021). Antibacterial Activity of Positively and Negatively Charged Hematite (α -Fe₂O₃) Nanoparticles to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio fischeri*. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 11(3), 652. <https://doi.org/10.3390/nano11030652>
72. Vimbela, G. v., Ngo, S. M., Frazee, C., Yang, L., & Stout, D. A. (2017). Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 3941–3965. <https://doi.org/10.2147/IJN.S134526>
73. Wu, Y., Ali, M. R. K., Dansby, K., & El-Sayed, M. A. (2019). Improving the Flow Cytometry-based Detection of the Cellular Uptake of Gold Nanoparticles. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02248>
74. Xu, L., Wang, Y. Y., Huang, J., Chen, C. Y., Wang, Z. X., & Xie, H. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. In *Theranostics* (Vol. 10, Issue 20, pp. 8996–9031). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/thno.45413>
75. Yerragopu, P. S., Hiregoudar, S., Nidoni, U., Ramappa, K. T., Sreenivas, A. G., & Doddagoudar, S. R. (2020). Chemical Synthesis of Silver Nanoparticles Using Tri-sodium Citrate, Stability Study and Their Characterization. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, March, 37–50. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2020/v21i330159>
76. Yilmaz Atay, H. (2020). Antibacterial activity of chitosan-based systems. In *Functional Chitosan: Drug Delivery and Biomedical Applications* (pp. 457–489). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0263-7_15
77. Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>

Lisad

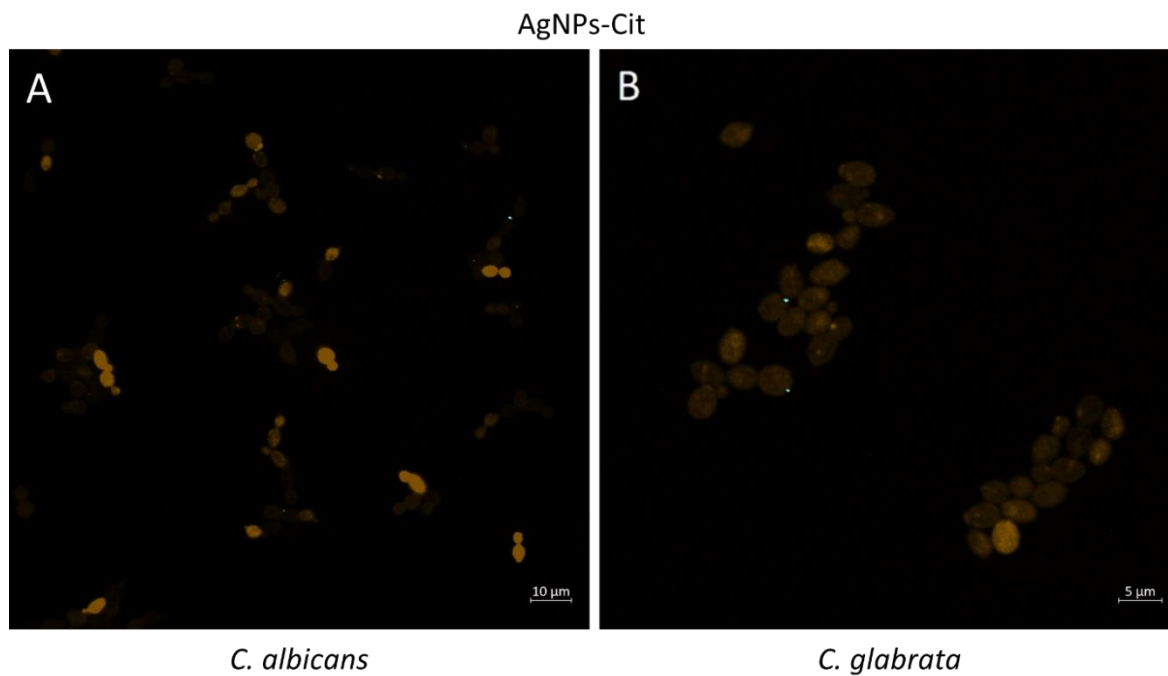
Lisa 1. Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide, mis olid sünteesitud trinaatriumtsitraadiga (CSnAg-TSC) või naatriumboorhüdriidiga (CSnAg-NaBH₄), madala molekulmassiga (LM) kitosaani, hõbenitraadi ja amfoteritsiin B minimaalsed fungitsiidsed kontsentratsioonid (MFK) pärmseentele *Candida albicans* ATCC 10231 ja *Candida glabrata* ATCC 90030 pärast 1-, 4-ja 24-tunnist kokkupuudet deioniseeritud vees (Spot test) temperatuuril 30°C. Kõik katsed viidi läbi kahe või kolme kordusega.

Pärmseen	MFK, mg (Ag)/L	1 t		4 t		24 t	
		TSC	NaBH ₄	TSC	NaBH ₄	TSC	NaBH ₄
<i>C. albicans</i>	CSnAg-cit	>80	-	>80	-	>80	-
	CSnAg_0.3	50.0	47.5	50.0	41.7	44.4	42.5
	CSnAg_1	21.9	22.5	21.9	12.5	25.0	30.0
	CSnAg_3	6.25	5.8	5.86	7.6	9.38	17.5
	AgNO ₃	1.0		1.0		1.0	
	Kitosaan LM	14.6		12.5		25	
	Amfoteritsiin B	18.8		20.8		29.2	
<i>C. glabrata</i>	CSnAg-cit	>80	-	80	-	40.0	-
	CSnAg_0.3	22.9	19.6	18.8	15.0	15.0	12.9
	CSnAg_1	5.86	3.75	3.13	2.71	3.13	4.38
	CSnAg_3	1.04	1.43	1.17	0.82	1.17	1.51
	AgNO ₃	0.80		0.80		0.80	
	Kitosaan LM	>100		>100		4.95	
	Amfoteritsiin B	>100		100		18.8	

Lisa 2. Hõbeda nanoosakeste (AgNPs-Cit) neeldumisspektrid peale lahuse valmistamist (10 mg Ag/L) ja seismist 30°C juures 24 tundi.



Lisa 3. Laser-skaneeriva konfokaalmikroskoobi pildid pärmseentest *Candida albicans* (A) ja *Candida glabrata* (B) peale 1 tunni ekspositsiooni 30°C juures hõbeda nanoosakestele (AgNPs-Cit) deioniseeritud vees. Rakud värviti fluorestseeruva membraani värviga CellBrite Fix555 – oranž värv; nanokomposiite visualiseeriti reflekteeruva valgusega — sinine värv. Skaala pildidel on 5 ja 10 µm.



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina, Jekaterina Ovtšinnikova (*autori nimi*)

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Hõbeda-kitosaani nanokomposiitide toksilisus pärmseentele *Candida albicans* ja *Candida glabrata*,
(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on Dr. Kaja Kasemets,
(*juhendaja nimi*)

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna
Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas
Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse
seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

26.05.2022 (kuupäev)

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsevale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtjaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtjaja jooksul ei kehti.