

УДК 544.773.432

**СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЙ ГИДРОГЕЛЬ
НА ОСНОВЕ L-ЦИСТЕИНА И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА****О.А. Баранова, С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов***Тверской государственной университет*

E-mail: oroschina@mail.ru

Статья поступила 10 июля 2013 г.

Синтезирован супрамолекулярный гидрогель на основе L-цистеина и нитрата серебра с введенными в него наночастицами серебра (НЧС), которые стабилизированы L-цистеином. Исследованы стадии синтеза, строение и свойства новой системы.

Ключевые слова: супрамолекулярный гидрогель, наночастицы серебра, L-цистеин.

ВВЕДЕНИЕ

Спектр применения НЧС достаточно широк: электроника, фотография, химический катализ, различные физико-химические методы исследования (метод поверхностно усиленной рамановской спектроскопии), многие отрасли медицины и фармацевтики [1, 2]. Антибактериальные свойства ионов и наночастиц металлического серебра доказаны многочисленными исследованиями и не вызывают сомнений. Серебро в ионной и металлической формах широко применяется в медицинской практике [3—5]. Одной из основных трудностей использования НЧС как антибактериального агента является их нестабильность и склонность к агрегации.

Целью настоящей работы являлся синтез супрамолекулярного гидрогеля на основе L-цистеина и ионов серебра, который сам по себе обладает высокими антибактериальными свойствами [6], и введение в его состав НЧС, стабилизированных биосовместимым соединением. Высокая антибактериальная активность золя серебра, полученного восстановлением иона серебра цистеином, была отмечена авторами работы [7], хотя способности к гелеобразованию данного золя описано не было. В нашей работе важно было сохранить форму геля и избежать сильной агрегации НЧС. Для стабилизации НЧС был использован L-цистеин. Это позволило избежать введения в систему дополнительных веществ и, кроме того, использование цистеина оправдано его свойствами. Цистеин является одной из важных протеиногенных аминокислот с ярко выраженным биологически активным действием; его биосовместимость подтверждается использованием препарата L-цистеина в качестве биологически активной добавки. Таким образом, комплексное действие ионов и наночастиц серебра в составе гидрогеля с L-цистеином имеет перспективу использования геля для медицинских целей. В настоящее время препараты серебра применяют в медицине чаще всего в виде истинных или коллоидных растворов. При этом необходимость использования консистентных препаратов (таких как гели, мази) приводит к необходимости введения не всегда безопасных полимерных загущающих добавок. Полученная нами система формирует гель в присутствии низких концентраций (около 0,002 М) электролитов (например, сульфат натрия). Данная работа посвящена изучению стадий синтеза, строения и свойств новой системы с привлечением методов электронной спектроскопии, про-

свечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), динамического светорассеяния (ДСР) и микробиологических исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы следующие реактивы: серебро азотнокислое 99,8 % (Merck), L-цистеин 99,5 % (Fluka), сульфат натрия (ХЧ), борогидрид натрия 99,9 % (Sigma Aldrich). Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

Синтез НЧС проводили известным способом из раствора нитрата серебра с использованием борогидрида натрия в качестве восстановителя. Для стабилизации НЧС был применен L-цистеин аналогично методике, предложенной в [8]. Модификация указанной методики связана исключительно с изменением концентрации реагентов, порядка и способа их смешения. К 0,3 см³ свежеприготовленного раствора нитрата серебра (0,03 М) приливали 21,5 см³ бидистиллированной воды и 2,5 см³ раствора борогидрида натрия (0,4 %). Реакцию вели при постоянном перемешивании до прекращения выделения большого количества пузырьков водорода. После этого к водному раствору НЧС красновато-коричневого цвета добавляли 0,5 см³ раствора L-цистеина (0,03 М) для стабилизации НЧС. Полученный раствор наночастиц использовали для дальнейших исследований без дополнительной очистки.

Первой стадией синтеза гидрогеля на основе L-цистеина и серебра, согласно [6], является получение созревшего цистеин-серебряного раствора (ЦСР). ЦСР готовили по методике, предложенной в работе [8]. Концентрация нитрата серебра в ЦСР составила 0,003 М, мольное соотношение ионов серебра и цистеина — 1,25, созревание ЦСР проходило в течение 5 суток.

Синтез гидрогеля с включенными в его структуру НЧС осуществляли путем их внесения в ЦСР и дальнейшем иницировании гелеобразования сульфатом натрия. Раствор НЧС был внесен в ЦСР в соотношении 1:9 по объему. Непосредственно после соединения ЦСР с раствором НЧС раствор представлял собой вязкую коричневую жидкость. Сульфат натрия вводили в виде водного раствора (0,02 М) в количестве 0,2 см³ на 2 см³ ЦСР с НЧС.

Электронные спектры образцов НЧС в УФ и видимой области записывали на спектрофотометре Evolution Array (Thermo Scientific, США) в кварцевых кюветах толщиной 1 мм, электронные спектры ЦСР — в кварцевых кюветах толщиной 1 см.

Анализ морфологии ЦСР и гелей осуществляли в Центре коллективного пользования "Просвечивающая электронная микроскопия" МГУ, используя электронный микроскоп Leo 912 AB OMEGA (Carl Zeiss, Германия), позволяющий одновременно получать и электронограммы образцов. ЦСР и гели наносили на стандартную медную сетку с полимерной подложкой из поливинилформала толщиной около 100 нм, сушили и помещали в микроскоп.

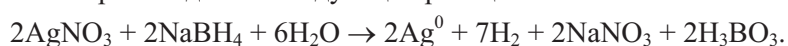
Измерение интенсивности ДСР выполнено на анализаторе Zetasizer ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) с He—Ne лазером ($\lambda = 633$ нм) мощностью 4 мВт. Все измерения осуществляли при 25 °С.

Определение чувствительности микроорганизмов к испытуемым образцам определяли методом диффузии в агаре на среде Muller-Hinton 2 в соответствии с методиками, рекомендованными NCCLS (Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard — Seventh Edition. Document M2-A7, M100-S11, 2010—2011). Для исследований были выбраны следующие штаммы тест-культур: *Bacillus subtilis* 6633, *Staphylococcus aureus* P209 ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Антибактериальную активность образца выражали в миллиметрах диаметра задержки роста.

Все образцы хранили при комнатной температуре в защищенном от света месте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образование НЧС в растворе нитрата серебра при использовании борогидрида натрия в качестве восстановителя происходит по следующей реакции:



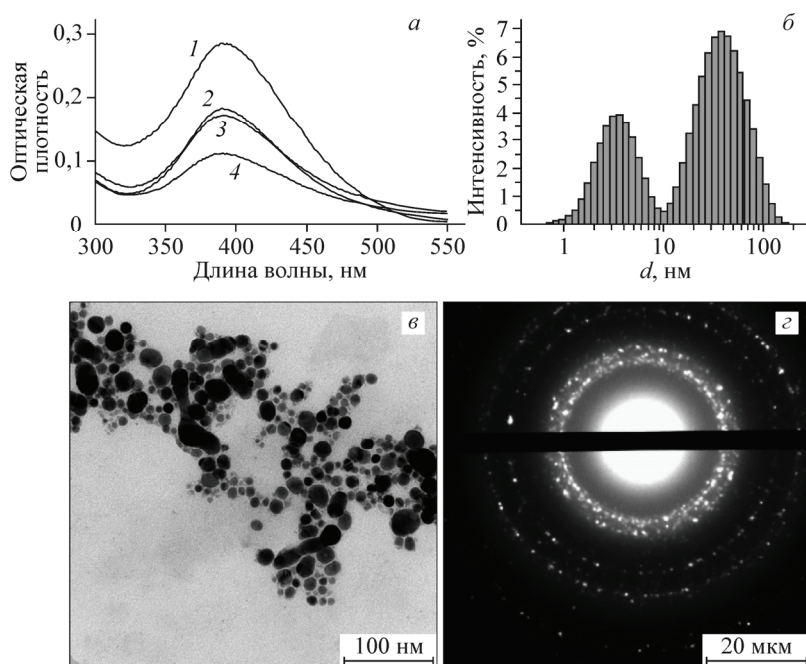


Рис. 1. Электронные спектры поглощения растворов НЧС в зависимости от времени хранения: свежий раствор (1), через 1 сут. (2), через 3 сут. (3), через 1 месяц (4) (а); распределение НЧС по размерам, полученное методом ДСР через 14 сут. хранения раствора (б); микрофотография (в) и электронограмма (г) НЧС, полученные с помощью метода ПЭМ (срок хранения раствора НЧС 5 сут.)

Согласно [9], при внесении в раствор коллоидного серебра L-цистеина его тиольные группы взаимодействуют с поверхностными атомами металлического серебра. Таким образом, слой цистеина, связанного с НЧС, препятствует их слипанию и полной агрегации с выпадением осадка. L-цистеин, связанный с НЧС, посредством свободных карбоксильных и аминогрупп через образование водородных связей способствует организации НЧС в агрегаты большего или меньшего размера, седиментационно-устойчивые во времени. Подобная агрегация носит обратимый характер; при нагревании до 90 °С и последующем охлаждении агрегаты НЧС разделяются на отдельные частицы.

На рис. 1 представлены электронные спектры поглощения водных коллоидных растворов НЧС, распределение НЧС по размерам, полученное методом ДСР, микрофотография и электронограмма образца НЧС.

На рис. 1, а представлены электронные спектры поглощения НЧС, стабилизированных L-цистеином, в зависимости времени хранения. Полоса поглощения на 390 нм предопределена явлением поверхностного плазмонного резонанса, свойственного металлическим наночастицам. Ее интенсивность уменьшается с течением времени, что, скорее всего, свидетельствует об уменьшении числа коллоидных частиц. Заметного уширения полосы плазмонного резонанса, описанного в [9], установлено не было, что может свидетельствовать об отсутствии сильных агрегационных процессов при проведении синтеза НЧС по модифицированной нами методике.

На микрофотографии (см. рис. 1, в), сделанной после хранения раствора НЧС в течение 5 сут., видны отдельные НЧС с широким полидисперсным распределением. Дифракционные кольца и рефлексы на электронограмме (см. рис. 1, г) соответствуют дифракционной картине металлического серебра.

С помощью метода ДСР было определено распределение НЧС по размерам (см. рис. 1, б). Распределение бимодальное с высокой полидисперсностью, средние гидродинамические диаметры частиц во фракциях составили около 45 и 4 нм. Данное распределение было получено

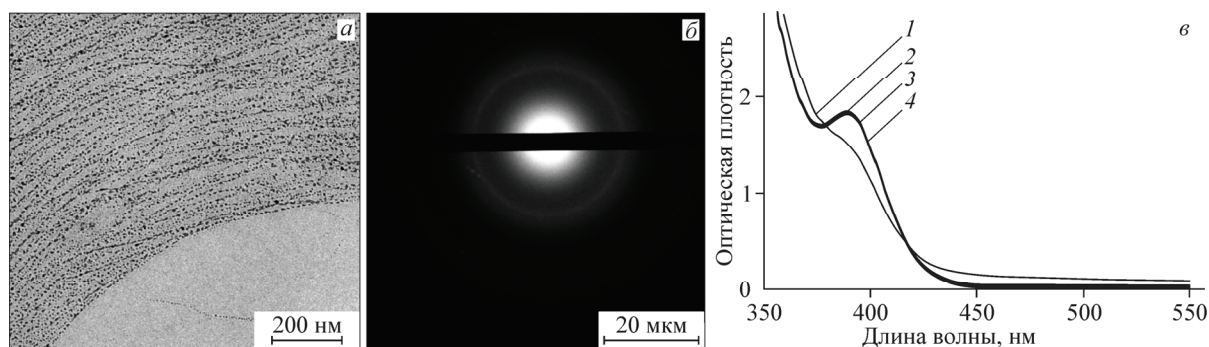


Рис. 2. Микрофотография (а) и электронограмма (б), полученные методом ПЭМ (срок хранения ЦСР 5 сут.), и электронные спектры поглощения (в) ЦСР в зависимости от времени хранения: свежий раствор (1), через 1, 7 и 14 дней хранения соответственно (2, 3, 4)

после 14 сут. хранения раствора НЧС, но стоит отметить, что сколько-нибудь значимого изменения данного распределения в течение времени от синтеза до 1 месяца хранения не наблюдалось.

Электронные спектры поглощения ЦСР также имеют максимум поглощения при $\lambda = 390$ нм (рис. 2, в), который принято связывать либо с наличием сильной координационной связи между атомами серебра и серы тиольной группы L-цистеина [6], либо с образованием связи М—М (в нашем случае Ag—Ag) [10]. Эти связи позволяют формировать в водной среде супрамолекулярные цепочки, состоящие из звеньев (Ag—L-Cys), которые при изменении ионной силы раствора путем введения электролитов организуются в стабильную и прочную сетку геля [6]. На рис. 2 представлены микрофотография, электронограмма и электронные спектры ЦСР.

На микроснимке ЦСР наблюдаются зачатки сетки геля и отсутствуют непрозрачные металлические НЧС (см. рис. 2, а), так же как и рефлексы металлического серебра на электронограмме (см. рис. 2, б). Интенсивность УФ полосы поглощения с максимумом на 390 нм после достижения постоянной величины за первые сутки практически не изменяется в течение последующих 14 сут. наблюдения (см. рис. 2, в).

На рис. 3 представлены микрофотографии и электронограммы двух супрамолекулярных гидрогелей: с включенными в гелевую сетку НЧС (в, з) и без них (а, б). Гели были синтезированы непосредственно перед их нанесением на подложку и микроскопированием.

Данные рис. 3 дают представление о морфологии каркаса геля и распределении НЧС внутри самого геля. Из рис. 3, а видно, что высушенный образец геля состоит из переплетающихся нитей, которые, согласно нашей гипотезе о строении супрамолекулярного гидрогеля на основе L-цистеина и серебра [6], состоят из линейных ассоциатов состава (Ag—L-Cys). Цепочки скрепляются анионами инициатора гелеобразования: в данном случае сульфат-ионами. Взаимодействие как между звеньями (Ag—L-Cys), так и между цепочками ассоциатов носит слабый межмолекулярный характер. Гелеобразование происходит за счет слабого кулоновского взаимодействия между противоположно заряженными атомами серебра и анионами инициатора гелеобразования.

На рис. 3, в представлена микрофотография гидрогеля с введенными в него НЧС. НЧС присутствуют во всем объеме гидрогеля либо в виде отдельных частиц, либо в виде их некрупных агломератов. НЧС меньшего размера (вероятно, из фракции с меньшим гидродинамическим диаметром частиц) закреплены на цепочках, образующих гелевую сетку. Также к гелевому каркасу прикреплены и отдельные частицы размером около 40—50 нм. Более крупные образования, такие как агломерированные НЧС, находятся в дисперсионной среде. На электронограмме высушенного образца геля (см. рис. 3, з) четко прослеживаются рефлексы, характерные для кристаллического серебра, в то время как в геле без НЧС таких рефлексов нет (см. рис. 3, б). Прочность геля с введенными НЧС сопоставима с прочностью геля без них. При перево-

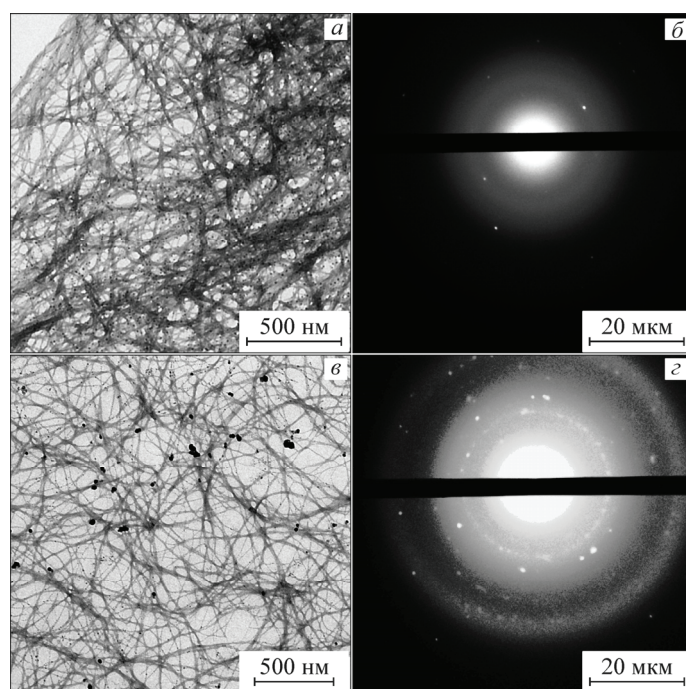


Рис. 3. Микрофотография (а) и электронограмма (б) гидрогеля без введения НЧС, микрофотография (в) и электронограмма (г) гидрогеля с введенными НЧС, полученные методом ПЭМ

рачивании пробирки столбик геля не деформируется, в то время как ЦСР представляет собой вязкую жидкость. При хранении гидрогеля при комнатной температуре в защищенном от света месте его прочностные свойства не меняются, гель визуально гомогенен, прозрачен и имеет желтовато-коричневую окраску в течение 14 сут. наблюдения. Это свидетельствует о том, что НЧС в геле агрегативно (за счет четкой локализации частиц в каркасе геля) и седиментационно (за счет прочности геля) устойчивы.

Были проведены исследования антибактериальных свойств составляющих гидрогеля и гелеобразующей системы до введения инициатора гелеобразования (сам гель испытан не был из-за сложности реализации единообразия используемой методики антибактериальных исследований для работы с жидкостями и твердообразным объектом). Для тестирования были выбраны: ЦСР (с соотношением Ag/Cys 1,25 и исходной концентрацией серебра 0,004 М), раствор НЧС (с исходной концентрацией серебра 0,0004 М) и ЦСР с введенными НЧС (система, способная образовывать гель, раствор НЧС введен в ЦСР в количестве 10 % от объема ЦСР). В качестве контрольного образца использовали раствор нитрата серебра с концентрацией 0,004 М.

Результаты тестирования составляющих гидрогеля и гелеобразующей системы на антибактериальную активность

Образец	Зона подавления роста тест-культур, мм		
	<i>B. subtilis</i> 6633	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
ЦСР	8	7	8
НЧС	0	10	0
ЦСР+НЧС	8	9	8
Контроль	10	10	10

Результаты тестирования приведены в таблице.

Хотя антибактериальная активность контрольного образца (раствора нитрата серебра) практически во всех случаях выше активности остальных исследуемых образцов, его использование часто ограничивается доказанным токсическим действием ионов серебра на клетки организма [11]. Более высокая активность раствора нитрата серебра объясняется лучшей диффузией ионов серебра в агар по сравнению с НЧС и супрамолекулярными агрегатами в ЦСР. При этом важно отметить,

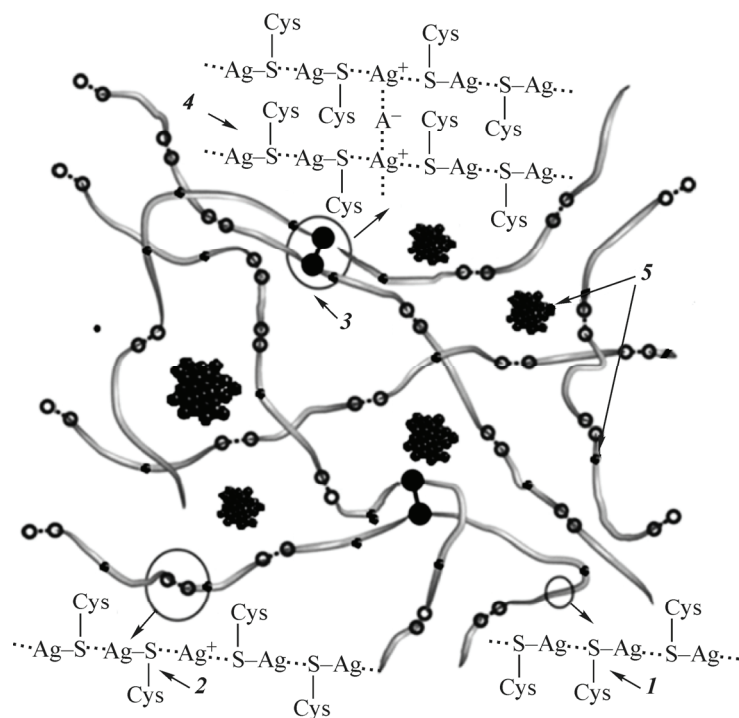


Рис. 4. Схема формирования супрамолекулярного гидрогеля на основе L-цистеина и серебра с включенными в его структуру НЧС: олигомерные цепочки (1), катионные связки (2), точки роста (3), анионные связки (4), наночастицы серебра и их агрегаты (5)

что раствор НЧС с концентрацией серебра на порядок ниже, чем в контроле и ЦСР, дает одинаковую с ним активность в отношении *Staphylococcus aureus*. Антибактериальная активность гелеобразующей системы (ЦСР+НЧС) немного выше в отношении *S. aureus*, чем активность ЦСР без НЧС, что объясняется высокой активностью НЧС против этого штамма. Таким образом, представленные данные подтверждают, что введение НЧС не меняет или повышает антибактериальную активность гидрогеля на основе L-цистеина и серебра.

На рис. 4 представлена предполагаемая на основе полученных данных схема строения супрамолекулярного гидрогеля с введенными в него НЧС.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований осуществлен синтез супрамолекулярного гидрогеля на основе L-цистеина и нитрата серебра с включенными в него НЧС. Устойчивость полученной системы в процессе хранения высока. Гидрогель обладает выраженными антибактериальными свойствами. В синтезе использованы только биосовместимые, обладающие антибактериальной активностью компоненты.

Авторы выражают благодарность С.С. Абрамчуку за любезно предоставленные микрофотографии ЦСР и гелей и В.М. Червинцу за помощь в тестировании образцов на антибактериальную активность.

Работа выполнена в рамках проекта German-Russian Interdisciplinary Science Center (GRISC) № С-2011b-5 и финансирована министерством иностранных дел Германии через Германскую службу академических обменов DAAD, а также программы УМНИК, государственный контракт № 6050р/8448 от 30.04.2008.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Iliescu T., Baia M., Maniu D.* // *Roman. Rep. Phys.* – 2008. – N 3. – P. 829 – 855.
2. *Varsha T., Mini Namdeo, Murali Mohan Y., Bajpai S.K., Bajpai M.* // *J. Macromol. Sci. A.* – 2007. – N 45. – P. 107 – 119.
3. *Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., Yacaman M.J.* // *Nanotechnology.* – 2005. – N 16. – P. 2346 – 2353.
4. *Jong-Seok Kim* // *Ind. Eng. Chem.* – 2007. – **13**, N 4. – P. 718 – 722.
5. *Lee D., Cohen R.E., Rubner M.F.* // *Langmuir.* – 2005. – **21**, N 21. – P. 9651 – 9659.
6. *Пахомов П.М., Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Комаров П.В.* Супрамолекулярные гели. – Тверь: Тверской гос. ун-т, 2011.
7. *Mainak Roy, Poulomi Mukherjee, Balaji P. Mandal, Rajendra K. Sharma, Avesh K. Tyagi, Sharad P. Kale* // *RSC Advances.* – 2012. – N 2. – P. 6496 – 6503.
8. *Пахомов П.М., Овчинников М.М., Хижняк С.Д., Лавриенко М.В., Nierling W., Lechner M.D.* // *Коллоид. журн.* – 2004. – **66**, № 1. – С. 73.
9. *Saikat Mandal, Anand Gole, Neeta Lala, Rajesh Gonnade, Vivek Ganvir, Murali Sastry* // *Langmuir.* – 2001. – **17**, N 20. – P. 6262 – 6268.
10. *Brinas R.P., Hu M., Qian L., Lyman E.S., Hainfeld J.* // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2008. – **130**, N 3. – P. 975 – 982.
11. *Asharani P.V., Wu Y.L., Gong Zh., Valiyaveetil S.* // *Nanotechnology.* – 2008. – N 19. – P. 281.