

УДК 544.77

КРИКЛЯ С.О.¹, КОРОТИЧ О.І.¹, МАЛИШЕВА М.Л.², КОНОВАЛОВА В.В.³,
САМЧЕНКО Ю.М.¹

НАНОКОМПОЗИТНІ ГІДРОГЕЛІ НА ОСНОВІ АКРИЛАМІДУ З ІНКОРПОРОВАНИМ НАНОРОЗМІРНИМ СРІБЛОМ

Робота присвячена розробці методів синтезу та інкорпорування нанорозмірного срібла до складу (спів)полімерних гідрогелевих матриць на основі акриламідру, а також вивченню їх фізико-хімічних та біологічних властивостей. Було встановлено оптимальні умови синтезу водних дисперсій срібла та гідрогелевих наноконкомпозитів, а також продемонстровано можливість їх використання у медицині.

Ключові слова: нанорозмірне срібло, гідрогелі, наноконкомпозити, бактерициди, катетери.

Работа посвящена разработке методов синтеза и инкорпорирования наноразмерного серебра в состав (со)полимерных гидрогелевых матриц на основе акриламида, а также изучению их физико-химических и биологических свойств. Были установлены оптимальные условия синтеза водных дисперсий серебра и гидрогелевых наноконкомпозитов, а также продемонстрирована возможность их использования в медицине.

Ключевые слова: наноразмерное серебро, гидрогели, наноконкомпозиты, бактерициды, катетеры.

The paper is devoted to the development of methods of synthesis and incorporation of nanosized silver to the hydrogel matrices based on acrylamide and investigation of their physical, chemical and biological properties. Optimal conditions of colloid silver and hydrogel nanocomposites synthesis were found and the possibility of their use in medicine was demonstrated.

Keywords: nanosized silver, hydrogels, nanocomposites, bactericides, cateters.

Швидка поява та поширення стійких до антибіотиків мікроорганізмів ускладнило лікування мікробних інфекцій. Згідно статистичних даних кожного року в Сполучених Штатах Америки 50% госпіталізованих хворих страждають від нозокоміальних інфекцій, які викликані бактеріями стійкими до лікарських препаратів. Наприклад, метицилін-стійкий золотистий стафілокок (MRSA, грампозитивний) є основною причиною інфікування катеторів та інших виробів медичного призначення [1]. Все це обумовлює необхідність у створенні полімерів і, зокрема, гідрогелів з бактерицидними властивостями стосовно патогенних мікроорганізмів, які не чутливі до дії антибіотиків.

У світовій науковій літературі описані різні підходи для вирішення зазначеної проблеми. Зокрема, запропоновано застосування катіонних антимикробних пептидів в якості нового покоління антибіотиків, що пов'язано з їх широким спектром активності та здатності вбивати стійкі до антибіотиків патогени. Завдяки присутності позитивного заряду такі поліпептиди легко прикріплюються до клітинної мембрани, а наявність гідрофобних фрагментів призводить до руйнування та загибелі клітини. Однак, клінічне застосування катіонних поліпептидів вкрай обмежене через гемоліз, цитотоксичність, короткий період життя *in vivo*, а також високу вартість [1].

Схожий підхід було запропоновано в статті [2], яка описує синтез гідрогелю на основі сульфованих поліетіленгліколей і кватернізованих полікарбонатів, що містить катіонні та гідрофобні фрагменти. Однак, використання в якості вихідної сировини олігомерів змінного складу не дає відтворюваних результатів, а складність та багатостадійність синтезу (більше 7 стадій) ставить під сумнів їх практичне застосування.

Більш простим і практично здійсненним методом є отримання антибактеріальних гідрогелів на основі похідних хітозану, які описані в цілому ряді публікацій [3], а також володіють високою антибактеріальною активністю. Однак, чистота і молекулярна маса цього природного полімеру варіюється в широких межах залежно від його походження, що негативно позначається на відтворюваності отриманих результатів.

Перспективним також є введення до складу гідрогелів медичного призначення і виробів з них (дренажів, імплантів, протиопікових пов'язок, катеторів тощо) срібла, золота та міді, бактерицидні властивості яких давно відомі, особливо, коли вони перебувають в нанорозмірному стані. Незважаючи на те, що (спів)полімерні гідрогелі являють собою структури зі складною ієрархічною організацією і широким розподілом мікро- (менше 2 нм), мезо- (2-50 нм) і макропор (більше 50 нм) [4], були розроблені численні методи інкорпорації нанорозмірних частинок благородних металів до їх складу. Зокрема, було описано отримання нанокомпозитних гідрогелів на основі термочутливого співполімеру N-ізопропілакриламід та акрилоїл фенілаланіну з інкорпорованим нанорозмірним сріблом (5-10 нм) [5], а також взаємо-проникаючих сіток полівінілпіролідону, поліакриламід і нанорозмірного срібла з діаметром часток 3-5 нм [6]. Була продемонстрована висока бактерицидна активність отриманих нанокомпозитів щодо грам-позитивних і грам-негативних бактерій.

Антибактеріальні гідрогелеві нанокомпозити можуть застосовуватись для гідрофілізації полімерних медичних пристроїв (дренажів, катеторів тощо), що дозволяє досягати комбінованого ефекту – одночасного запобігання їх мікробному забрудненню та зменшення дискомфорту при застосуванні [7].

Одним із найпоширеніших наповнювачів, які володіють антибактеріальними властивостями, є срібло. Воно має відносну нетоксичність для клітин людини і в той же час антимікробні властивості по відношенню до широкого спектру бактеріальних штамів. Завдяки цьому срібло в різних формах (елементарне срібло, катіони срібла, наночастки срібла) широко застосовується для виготовлення побутових, промислових та медичних виробів.

Механізм антимікробної активності наночастинок срібла до кінця ще не встановлений, але на даний момент з цього приводу існує декілька гіпотез: (I) поступове вивільнення наночастками іонів срібла, які в свою чергу порушують синтез аденозинтрифосфату (АТФ) і реплікацію ДНК; (II) пряме пошкодження клітинних мембран наночастками срібла та (III) утворення активного кисню наночастками та катіонами срібла, який має бактерицидні властивості. В деяких дослідженнях стверджують, що антимікробна дія наночасток срібла аналогічна іонам срібла. Так, в огляді [8] розглянуто деякі аспекти дії срібла на бактерії, гриби та дріжджі, зокрема, особливу увагу приділено критичному аналізу методів синтезу нанокомпозитів із сріблом, включаючи їх переваги, недоліки і можливі шляхи поліпшення, а також можливість застосування отриманих нанокомпозитів для антибактеріальної та протигрибкової терапії.

Для отримання нанокомпозитів на основі полімерних матриць з інкорпорованими наночастками, зокрема нанорозмірним сріблом, можна використати *in situ* або *ex situ* метод. Кожний з цих методів має свої переваги та недоліки. Так метод *in situ* включає в себе насичення матриці катіонами срібла з подальшим їх відновленням. Цей метод має щонайменше дві головні переваги в порівнянні з методом *ex situ* – полімеризацією в присутності попередньо синтезованих наночастинок срібла. По-перше, полімерна матриця запобігає агрегації наночастинок срібла. По-друге, синтез наночастинок у поровому просторі полімерної матриці дозволяє отримати наночастки певного розміру з вузьким

розподілом за розміром, чітко визначеної форми та без використання стабілізаторів. Таким чином змінюючи архітектуру полімерної матриці (природу мономерів і зшиваючого агенту, їх кількість та співвідношення між ними) та умови синтезу можна контролювано отримувати наночастки срібла заданих розмірів. У свою чергу до переваг *ex situ* методу відноситься те, що вміст інкорпорованих наночастинок можна змінювати в широких межах, що не завжди вдається досягнути при використанні *in situ* методу. Більше того при його використанні не відбуваються зміни властивостей гідрогелевої матриці, які можуть бути викликані побічними реакціями між відновниками та бічними групами полімерних ланцюгів або внаслідок механічного руйнування полімерної сітки внаслідок перепаду тиску за рахунок утворення газоподібних продуктів.

Таким чином, дана робота присвячена розробці, порівнянню і вдосконаленню методів отримання нанорозмірного срібла та синтезу гідрогелевих нанокомпозитів на основі акриламідів методом *ex situ*. Крім того детально вивчені фізико-хімічні та біологічні властивості синтезованих гідрогелевих нанокомпозитів з інкорпорованим нанорозмірним сріблом.

Експериментальна частина

Реактиви. Акриламід, АА (Merck, 99.9%); N,N'-метиленбісакриламід, МБА (Merck, 98%); амоній персульфат, ПСА (Sigma, 98 %); N,N,N'N'-тетраметилетилендіамін, ТМЕД (Merck, 99%); полівінілпіролідон, ПВП (40000 Да, Fluka); AgNO₃ (Сакський завод хімреактивів); NaBH₄ (Sigma) використовували без попереднього очищення.

Синтез водних дисперсій срібла. Водні дисперсії срібла були отримані з використанням полівінілпіролідону в якості стабілізатора за наступною методикою: до охолодженого на льодяній бані розчину боргідриду натрію при інтенсивному перемішуванні повільно додавали по краплях (1 крапля в 2-3 секунди) суміш розчинів нітрату срібла та полівінілпіролідону із співвідношенням Ag⁺ до стабілізатора 1:5. Після завершення цього процесу перемішування припиняли і нагрівали отриману дисперсію до 82.5°C. Водну дисперсію срібла зберігали закритою у темному місці.

Синтез гідрогелів. Полімерні гідрогелі були синтезовані на основі акриламідів. Просторове зшивання полімерних ланцюгів здійснювали МБА. Окисно-відновна система, яка складалась із ПСА та ТМЕД була використана для ініціювання радикальної полімеризації. Перед додаванням окисно-відновної системи через реакційну суміш (водний розчин мономерів і зшиваючого агенту) барботували аргон. Після додавання ініціюючої суміші композицію перемішували та заливали між скляними плоско-паралельними шаблонами розділеними спейсерами (1 мм), і витримували протягом 1-3 годин для завершення полімеризації. Потім зразки діставали з шаблонів і промивали дистильованою водою при кімнатній температурі від непрореагованих залишків реакційної суміші. Воду міняли 1-3 рази на день, процес відмивання гідрогелів контролювали УФ-спектрометром «Specord M40». Відмиті гідрогелеві пластини розрізали шаблоном на зразки діаметром 10 мм і висушували до постійної маси при 25°C. Паралельно контроль ступеня відмивання гідрогелевих матриць від непрореагованих домішок мономерів здійснювали з використанням рідинного хроматографа фірми «Waters», оснащеного діодно-матричним спектрофотометричним детектором та колонкою з Nucleosil C18 (25 см x 4 мм) – за методикою, детально описаною в [9]. У якості елюенту використовували суміш метанолу з водою при їх співвідношенні 1:9. Швидкість введення розчинника складала 1 мл/хв, температура 20 °С. Час виходу піка мономерного акриламідів складав 2,35 хв. Результати проведених спектрофотометричних та хроматографічних досліджень добре узгоджуються між собою та свідчать, що оптимальним є чотириденне відмивання зі зміною води через кожні 12 год та при співвідношенні маси гелю до маси води у співвідношенні 1:10. Вказаний режим екстракції дозволяє зменшувати вміст акриламідів до концентрацій, менших від 1 мкг/г, тобто до меж, що не перевищують санітарні вимоги.

Склад полімерної матриці визначався складом гелеутворюючої суміші і при виконанні описаних у даній роботі експериментів був наступний: масова частка АА - 15%, масова частка МБА – 0.23%.

Синтез гідрогелів з інкорпорованим сріблом. Синтез гідрогелевих нанокompatитів був аналогічний синтезу гідрогелів. Водну дисперсію срібла різної концентрації (від 100 до 1000 мкг/мл) вводили до складу реакційної суміші перед додаванням окисно-відновної системи, після чого проводили полімеризацію.

Набухання. Рівноважний ступінь набухання гідрогелів вивчали ваговим методом у воді. Для цього ксерогелі заливали надлишком дисперсійного середовища і ставили в термостат «ТС-1/80 СПН» при заданій температурі. Через 24 год зразки діставали, фільтрувальним папером видаляли надлишок рідини з поверхні та зважували з точністю до 0.0001 г на вазі «Axis».

Розрахунок рівноважного ступеню набухання Q (г/г) гідрогелів проводили за формулою:

$$Q = \frac{m - m_0}{m_0}$$

де m_0 – маса ксерогелю (г); m – маса набухлого зразку (г).

Дзета-потенціометрія. Вимірювання дзета-потенціалу та розміру часток проводився на пристрої «Zetasizer Nano» (Malvern) при 25°C.

Мікроскопічні дослідження. Форму і розмір часток синтезованого срібла досліджували на просвічуючому електронному мікроскопі (ПЕМ-125К, Selmi). Зріз ксерогелів з інкорпорованим сріблом робили за допомогою мікротому (Ultratome 8800, LTB Bromma).

Мікробіологічні дослідження. Мікроорганізми вирощували на повноцінному живильному середовищі Nutrient Agar No1 (Fluka). Чашки Петрі засівали культурою мікроорганізмів у кількості 10^8 колоніє-утворювальних одиниць (КУО). Тестовий зразок діаметром 15 мм поміщали в інокульоване середовище та інкубували при 30°C протягом 24 годин. Зону інгібування оцінювали з точністю до 0.5 мм.

Результати та обговорення

Для отримання нанокompatитів з інкорпорованим сріблом методом *ex situ* були отримані водні дисперсії срібла стабілізовані ПВП. Методом динамічного світлорозсіювання було показано, що середній гідродинамічний діаметр частинок зменшується із збільшенням концентрації нітрату срібла, що в свою чергу пов'язане із збільшенням концентрації електролітів під час синтезу (Рис. 1).

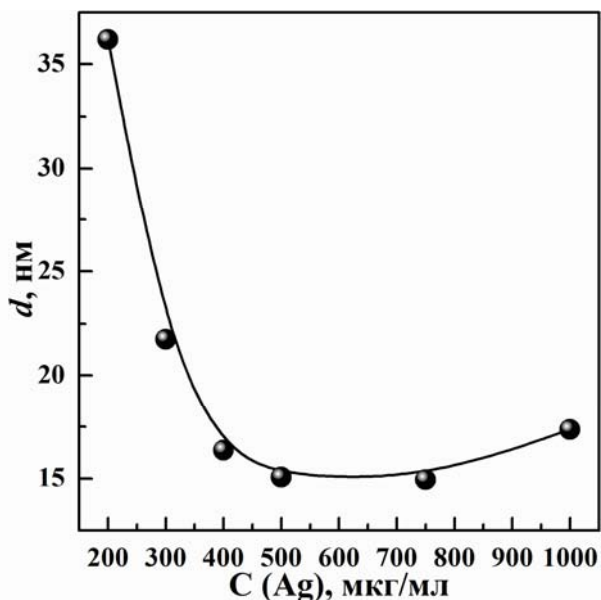


Рис. 1. Залежність середнього діаметру (d) від концентрації водної дисперсії срібла стабілізованої ПВП.

На рис. 2а наведено мікрофотографію наночастинок срібла концентрацією 200 мкг/мл, з якої видно, що всі частинки срібла є нанорозмірними із середнім діаметром 22 нм. Розміри наночастинок, отримані методом динамічного світлорозсіювання і електронної мікроскопії добре узгоджуються між собою.

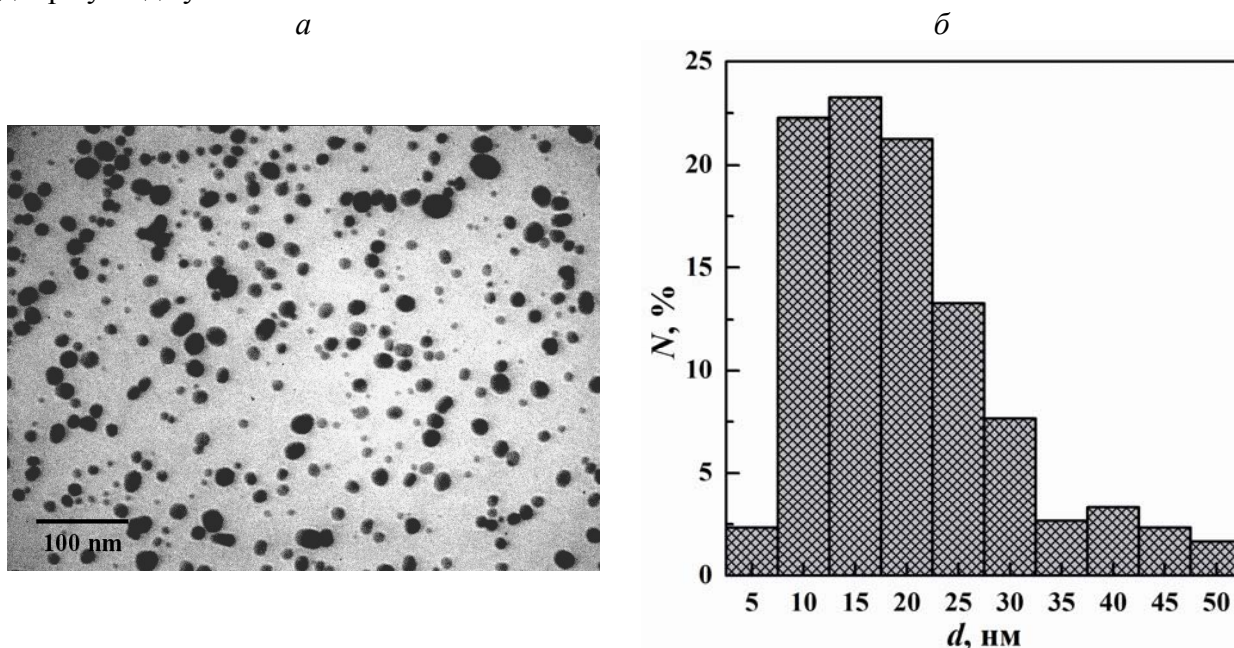


Рис. 2. Мікрофотографія (ПЕМ) та розподіл за діаметром наночастинок срібла концентрацією 200 мкг/мл стабілізованих ПВП.

Дзета-потенціал (ДП) визначає заряд дифузного шару і є чудовою характеристикою інтенсивності електрокінетичних явищ. Знак і значення ДП широко використовуються для характеристики електричних властивостей поверхні при розгляді адсорбції, адгезії, агрегативної стійкості дисперсних систем, структуроутворенні в матеріалах та інших процесів, де існують електрокінетичні явища. Вимірювання ДП для водних дисперсій срібла показали, що для них характерний невеликий від'ємний заряд (Рис. 3), який можна

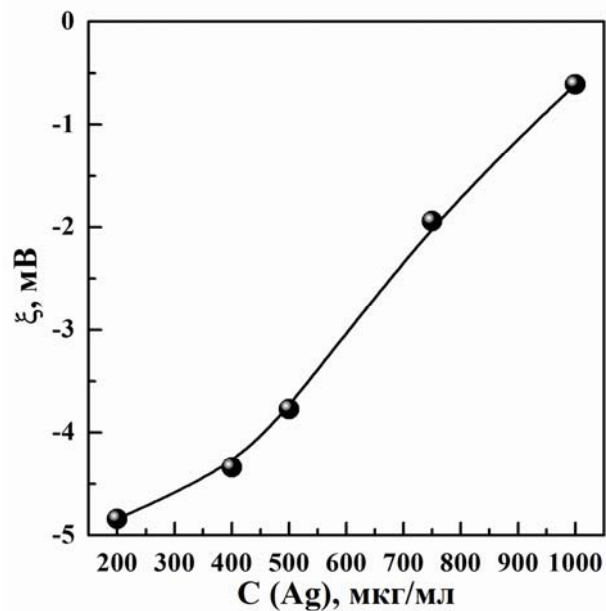


Рис. 3. Залежність ζ -потенціалу від концентрації водної дисперсії срібла, стабілізованої ПВП.

Проведені електронно-мікроскопічні дослідження показали, що проведення гелеутворення у присутності водних дисперсій срібла не впливає на розмір часток.

Антибактеріальні властивості синтезованих нанокompatитів були досліджені за допомогою тесту на зони інгібування щодо грам-негативних і грам-позитивних бактерій (*E.Coli*, *S.Aureus*). Більшість композитів проявили свою бактерицидну активність для обох штамів, але найбільшу активність мають композити, які були отримані шляхом насичення матриці у розчині нітрату срібла з фінальною масовою часткою срібла у зразках 0.5% і 1.05% стосовно *S.Aureus*.

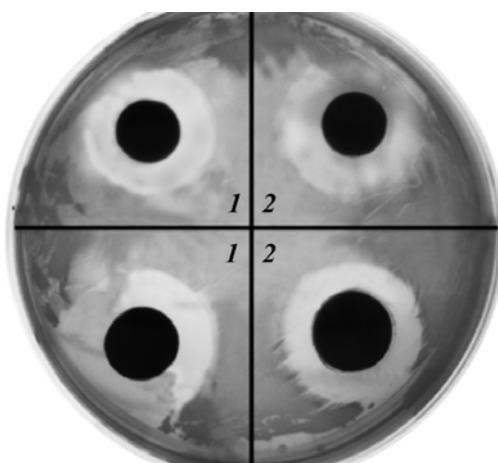


Рис. 4. Тест на зони інгібування для *S. Aureus*, 10^8 колоніє-утворювальних одиниць; 1 – масова частка срібла 0.5%; 2 – масова частка срібла 1.05%.

Висновки

Були розроблені методи синтезу нанорозмірних часток срібла розміром близько 20 нм в широкому діапазоні концентрацій. Отримані наночастки охарактеризовано методами електронної мікроскопії та з використанням дзета-потенціометрії. Розроблено методи гомогенного інкорпорування наночасток срібла до складу біосумісних гідрогелевих матриць із збереженням їх агрегативної стійкості та охарактеризовано їх антимікробну активність стосовно грам-позитивних та грам-негативних бактерій.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Shao Qiong Liu, Chuan Yang, Yuan Huang, Xin Ding, Yan Li, Wei Min Fan, James L. Hedrick, and Yi-Yan Yang.** Antimicrobial and antifouling hydrogels formed in situ from polycarbonate and poly(ethylene glycol) via michael addition. // *Advanced Materials*. – 2012. – V. 24. – P. 6484-6489.
2. **Xin Ding, Chuan Yang, Tze Peng Lim, Li Yang Hsu, Amanda C. Engler, James L. Hedrick, Yi-Yan Yang.** Antibacterial and antifouling catheter coatings using surface grafted PEG-b-cationic polycarbonate diblock copolymers. // *Biomaterials*. – 2012. – V. 33. – P. 6593-6603.
3. **Patcharee Ngamviriyavong, Anak Thananuson, Porntipa Pankongadisak.** Antibacterial hydrogels from chitosan derivatives. // *Journal of Metals, Materials and Minerals*. – 2010. – V. 20, – P. 113-117.
4. **F. Svec.** Preparation and HPLC applications of rigid macroporous organic polymer monoliths. // *Journal of Separation Science*. – 2004. V. 27. – P. 747–766.
5. **Yonghyun Kim, V. Ramesh Babu, Daniel T. Thangadurai.** Synthesis, characterization, and antibacterial applications of novel copolymeric silver nanocomposite hydrogels. // *Bulletin of the Korean Chemical Society*. – 2011. – V. 32. – P. 553-558.
6. **P.S.K. Murthy, Y. Murali Mohan, K. Varaprasad, B. Sreedhar, K. Mohana Raju.** First successful design of semi-IPN hydrogel–silver nanocomposites: a facile approach for antibacterial application. // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2008. – V. 318. – P. 217–224.
7. **Beata Butruk, Maciej Trzaskowski, Tomasz Ciach.** Fabrication of biocompatible hydrogel coatings for implantable medical devices using Fenton-type reaction. // *Materials Science and Engineering C*. – 2012. – V. 32. – P. 1601–1609.
8. **Panagiotis Dallas, Virender K. Sharma, Radek Zboril.** Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: classification, synthetic paths, applications, and perspectives. // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2011. – V. 166. – P. 119–135.
9. **M.Gertsyuk, Y.Samchenko.** Separation of nonreacted acrylamide from polyacrylamide gel for endoprothesing. // *Ars Separatoria Acta*. – 2007. – № 5. – P. 99-102.

1. Інститут біологічної хімії імені Ф.Д. Овчаренка НАН України, м. Київ,
2. Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ
3. Національний Університет «Києво-Могилянська Академія», м. Київ

Надійшло до редакції
12.12.2013