

ВЛИЯНИЕ ПОЛИГУАНИДИНА НА ПРОЦЕСС САМООРГАНИЗАЦИИ В ЦИСТЕИН-СЕРЕБРЯНОМ РАСТВОРЕ

А.Н. Адамян¹, А.К. Кучурова¹, А.И. Иванова¹, М.Д. Малышев¹,
В.А. Герасин², В.М. Червинец³, С.Д. Хижняк¹, П.М. Пахомов¹

¹Тверской государственный университет, Тверь

²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Москва

³Тверской государственный медицинский университет, Тверь

Выполнены реологические, структурные и антибактериальные исследования гидрогелей, получаемых на основе L-цистеина, ацетата серебра и полигексаметиленгуанидин гидрохлорида (ПГМГ-ГХ). Установлено, что водные растворы на основе L-цистеина и ацетата серебра хорошо смешиваются с водным раствором ПГМГ-ГХ, образуя прозрачные гидрогели. Предложена модель строения пространственной сетки геля. Показана высокая антимикробная активность гидрогеля по отношению к тест-культурам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: водные растворы L-цистеина, ацетата серебра, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, процессы самоорганизации, супрамолекулярный гидрогель, антибактериальная активность.

Проблема создания высокоэффективных дезинфицирующих средств на сегодняшний день является очень актуальной в связи со значительным ростом количества микробных (бактериальных, грибковых, вирусных и др.) инфекций. Кроме того, наблюдается тенденция проявления резистентности различных микроорганизмов к действию антибиотиков и дезинфицирующих средств [1]. Хорошо известно [2], что высокими бактерицидными свойствами обладает серебро. Серебро в медицине может использоваться в виде коллоидного раствора из нано- и микрочастиц металлического серебра [3,4] или серебряной воды, в которой серебро представлено в ионной форме (Ag⁺) [2]. Высокие бактерицидные свойства ионная форма серебра проявляет в низкоконцентрированных (~0.01%) водных растворах L-цистеина и солей серебра (нитрат-, нитрит- и ацетат серебра) – цистеин-серебряный раствор (ЦСР), и супрамолекулярных гидрогелях на основе ЦСР [5,6]. Гелеобразование в таких системах обычно происходит в две стадии. Первая стадия - получение ЦСР, вторая стадия – стадия гелеобразования путем введения в ЦСР соли-инициатора гелеобразования. В случае водных растворов L-цистеина и нитрита

серебра [7] гидрогели формируются в одну стадию, без добавления электролита в систему. При сливании водных растворов L-цистеина и соли серебра образуются супрамолекулы из молекул меркаптида серебра, а введение электролитов вызывает процесс гелеобразования в ЦСР [5].

ЦСР и гидрогели на его основе являются интересными системами для их использования в качестве бактерицидных препаратов (растворы, гели, мази спреи и др.) и приготовления бактерицидных материалов. Предварительные антимикробные испытания на волокнах и тканях, пропитанных ЦСР и гелями, показали высокие бактерицидные свойства материала [8,9].

С другой стороны, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГ-ГХ $(C_7H_{15}N_3)_n \cdot nHCl$) является катионным полиэлектролитом, обладающим уникальным сочетанием физико-химических и биоцидных свойств, позволяющий этому полимеру применяться в качестве дезинфицирующего средства. ПГМГ-ГХ хорошо растворяется в воде и широко применяется для изготовления различных бактерицидных препаратов, обладающих антибактериальными и дезинфицирующими свойствами, также обладает антимикозными и противовирусными свойствами [10-12].

Представляет интерес, совместимы ли ЦСР и водный раствор ПГМГ-ГХ, образуют ли они гидрогели и в какой степени гели проявляют антибактериальные свойства? Выяснение этих вопросов является целью настоящей работы.

Экспериментальная часть

В работе использованы следующие реактивы: ацетат серебра ($AgOOCCH_3$) 99%, («Lancaster»), L-цистеин 99% («Acros») и ПГМГ-ГХ $\square (C_7H_{16}N_3Cl)_n$, где $n=4-50$, молекулярный вес: 700-10000 а.е.м. Исследуемыми образцами являлись водные растворы $AgNO_3$ (№1), CH_3COOAg (№2), L-цистеин (№3), ЦСР (№4), ЦСР+ Na_2SO_4 (5), ЦСР+ $NaCl$ (6), ПГМГ-ГХ (№7), ЦСР + ПГМГ-ГХ (№8) (табл.1).

Для приготовления образцов гидрогелей на основе L-цистеина и ацетата серебра использовали водные растворы исходных компонентов с концентрацией 0.01 М. ЦСР в объеме 2 мл получали по следующей схеме: 0.6 мл раствора L-цистеина приливали к 0.65 мл воды, смесь перемешивали, затем добавляли 0.75 мл раствора ацетата серебра. В результате получали бледно-желтый опалесцирующий раствор, который при стоянии в течение ~6-12 ч при комнатной температуре, в темноте, становился прозрачным с желтоватым оттенком. Это первая стадия - стадия созревания ЦСР [4]. Для получения гидрогеля в ЦСР добавляли раствор соли-инициатора гелеобразования \square хлорида или сульфата натрия, а также раствор ПГМГ-ГХ. Концентрацию инициатора в

образцах варьировали в интервале 0.050–0.375 мМ, при этом время формирования геля и его прочность зависели от типа электролита, его концентрации и температуры. Для приготовления гидрогеля с ПГМГ-ГХ растворы готовили с начальной концентрацией 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 и 2.0%, при этом объем полимера варьировался от 0.01 до 0.05 мл. Конечная концентрация ПГМГ-ГХ в ЦСР изменялась от 0.001 до 0.1%. Все растворы готовили на дистиллированной воде при температуре 25 °С. В результате получали гидрогели и наблюдали за ними в течение 15 дней.

Прочность гелей оценивали по пятибалльной шкале [5], а вязкость образцов измеряли на вибрационном вискозиметре SV-10 (фирма A&D Company, Япония), в котором вибрация сенсорных пластин осуществлялась с частотой 30 Гц и постоянной амплитудой около 1 мм. Измерение прочности гелей и вязкости растворов и гелей проводили при температуре 25 °С. Электронные спектры исследуемых образцов регистрировали на УФ спектрофотометре “Evolution Array” (фирма "Thermo Scientific") в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 мм. Исследование морфологии образцов выполнено на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) JEOL JSM-6610LV (Япония).

Антибактериальная активность материала определялась методом диффузии в агар на газоне тест культур: *Bacillus subtilis* 6633 – сенная палочка – сапрофитный микроб, является крупной бактериальной клеткой, которая положительно окрашивается по Грамму, растет и размножается в присутствии кислорода. *Staphylococcus aureus* P209 ATCC 25923 (золотистый стафилококк) – условно-патогенная бактерия, обитающая на различных объектах окружающей среды и в локусах человеческого организма. Микробы колонизируют кожный покров и слизистую оболочку внутренних органов. *E. coli* ATCC 25922 – кишечная палочка является представителем нормального бактериального состава (микрофлоры) человеческого желудочно-кишечного тракта, изменение количества кишечной палочки в сторону увеличения или уменьшения по сравнению с нормой расценивается как дисбактериоз первой степени. *Shigella sonnei* III №1908 – грамотрицательные, факультативно анаэробные, неподвижные, неспороносные бактерии, возбудитель дизентерийного шигеллёза. *Salmonella typhimurium* 5715 является грамотрицательной, палочковидной бактерией со жгутиками, с помощью которых этот микроорганизм передвигается. Названная бактерия - основная причина пищевого отравления (сальмонеллеза) у людей. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – грамотрицательная подвижная (монотрих) палочковидная бактерия. Обитает в воде и почве, условно патогенна для человека, возбудитель нозокомиальных инфекций у человека. *Candida albicans* ATCC 885-653 – диплоидный грибок (молочница) (форма

дрожжеподобных грибов), способных к спариванию, но не в форме мейоза, возбудитель оппортунистических инфекций человека. Исследуемые образцы помещали микропипеткой объемом 20 мкл на засеянную тестовой культурой микроорганизмов поверхность оптимальной питательной среды и культивировали при 37 °С в течение суток. Антибактериальную активность материала выражали в мм диаметра задержки роста.

Результаты и их обсуждение

Первоочередной задачей проведенных исследований являлось выяснение вопроса о совместимости ЦСР с водным раствором ПГМГ-ГХ. Оказалось, что ЦСР и водный раствор ПГМГ-ГХ хорошо совмещаются друг с другом, образуя прозрачный раствор. Важно также отметить, что при введении в ЦСР водного раствора ПГМГ-ГХ при определенном соотношении концентраций исходных растворов (табл. 1) могут формироваться достаточно прочные гидрогели (рис. 1).

Таблица 1.

Образцы исследования и их концентрации

№	Исследуемый образец	Концентрация
1	AgNO ₃	0.375%
2	CH ₃ COOAg	0.375%
3	L-цистеин	0.3%
4	ЦСР	C(L-cys) = 0.3%, C(CH ₃ COOAg) = 0.375%
5	ЦСР+Na ₂ SO ₄	C(Na ₂ SO ₄)= 0.001%
6	ЦСР+NaCl	C(NaCl)= 0.001%
7	ПГМГ-ГХ	0.005%
8	ЦСР + ПГМГ-ГХ	C _{ПГМГ-ГХ} = 0.005%

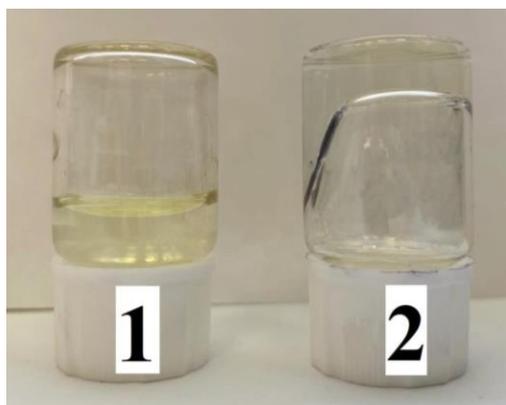


Рис. 1. Фотографии свежеприготовленных водных растворов ЦСР + ПГМГ-ГХ (C_{ПГМГ-ГХ} = 0.0125%) сразу после смешивания (1) и через 20 мин (2)

Ранее, чтобы происходил процесс гелеобразования, в ЦСР вводили электролит-инициатор [6]. Однако в растворе ЦСР с ПГМГ-ГХ происходит гелеобразование без присутствия электролита. Наиболее устойчивые во времени и прочные гидрогели были получены добавлением 0.5% ПГМГ-ГХ объемом 0.025мл. Конечная концентрация ПГМГ-ГХ в ЦСР равна 0.0125%, в остальных случаях гелеобразование не наблюдалось в связи с недостатком олигомера концентрацией 0.001% - 0,01%, или гелеобразование происходило, однако такие гидрогели разрушались, и выпадал осадок за счет избытка олигомера концентрацией ПГМГ-ГХ 0,02% - 0.1 %.

Вязкость образцов измеряли спустя 30 мин после приготовления растворов. Выяснилось, что растворы при различной концентрации ПГМГ-ГХ имеют и разную вязкость (рис. 2).

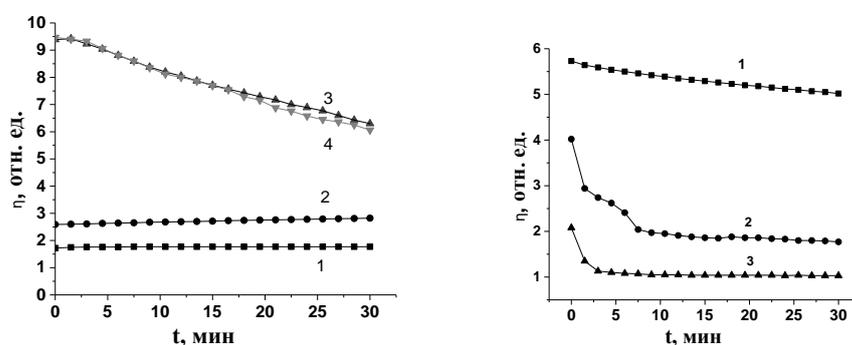


Рис. 2. Изменение вязкости водных растворов ЦСР + ПГМГ-ГХ во времени при их различной концентрации (1 – исходный ЦСР, 2 – 0.5, 3 – 1.0 и 4 – 1.5% ПГМГ-ГХ) через 30 мин (а) и через 5 суток после приготовления (б)

Для приготовления гидрогеля брали 0.025 мл водного раствора ПГМГ-ГХ с концентрацией 0.5% (рис. 2а, кривая 2), однако даже при такой концентрации через 30 мин вязкость изменялась всего на 1 единицу по сравнению со значением вязкости исходного ЦСР (рис. 2а, кривая 1). При последующем повышении концентрации ПГМГ-ГХ в два раза (1.0%) вязкость резко возрастала в 4 раза (рис. 2, кривая 3). Наблюдаемый эффект свидетельствует о быстром формировании геля при добавлении 1.0% ПГМГ-ГХ. Однако дальнейшее увеличение концентрации ПГМГ-ГХ до 1.5% в растворе не давало еще большего прироста вязкости (рис. 2а, кривая 4). Измерение вязкости тех же образцов через 5 суток показало, что для образца с концентрацией 0.5% ПГМГ-ГХ в процессе хранения вязкость заметно увеличилась (рис. 2б, кривая 2), что свидетельствует о формировании геля. Наоборот, для образцов с концентрацией 1.0 - 1.5% (рис. 2б, кривые 3 и 4) в процессе их хранения и реологических испытаний вязкость существенно

снизилась, что свидетельствует о разрушении геля. Следовательно, можно заключить, что оптимальной концентрацией ПГМГ-ГХ для формирования гидрогеля является 0.5 - 1.0%.

Рассмотрение электронных спектров растворов показало, что существенные изменения в спектрах наблюдаются уже при добавлении в ЦСР небольшой концентрации ПГМГ-ГХ (рис. 3).

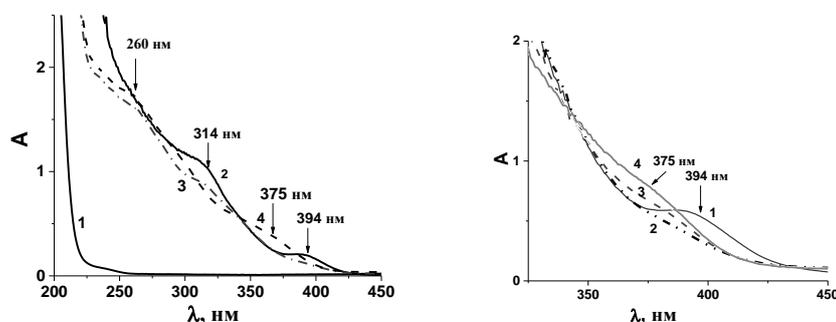


Рис. 3. а) Изменение электронных спектров растворов и гелей в зависимости от концентрации ПГМГ-ГХ (образцы исследованы через 3 дня после приготовления): 1 - исходный раствор ПГМГ-ГХ, 2 – ЦСР + ПГМГ-ГХ ($C_{\text{ПГМГ-ГХ}} = 0.1\%$, $V_{\text{ПГМГ-ГХ}} = 0.025$ мл на 1 мл ЦСР), 3 - ЦСР + ПГМГ-ГХ ($C_{\text{ПГМГ-ГХ}} = 0.1\%$, $V_{\text{ПГМГ-ГХ}} = 0.0375$ мл на 1 мл ЦСР), 4 - ЦСР + ПГМГ-ГХ ($C_{\text{ПГМГ-ГХ}} = 0.1\%$, $V_{\text{ПГМГ-ГХ}} = 0.05$ мл на 1 мл ЦСР). б) Изменение электронных спектров растворов и гелей в зависимости от времени после приготовления: 1 - ЦСР + ПГМГ-ГХ сразу после смешивания, 2 - через 5 мин, 3 - через 10 мин ($C_{\text{ПГМГ-ГХ}} = 0.1\%$, $V_{\text{ПГМГ-ГХ}} = 0.05$ мл на 1 мл ЦСР)

Так, при введении в ЦСР 0.1% (0.0375 мл) ПГМГ-ГХ полосы поглощения 314 и 394 нм (рис. 3а, спектр 2 и 3) исчезают, а уже при 0.1% (0.05 мл) появляются новые полосы поглощения ~260 и 375 нм (рис. 3а, спектр 4). При этом в самом растворе ПГМГ-ГХ (рис. 3а, спектр 1) полосы поглощения отсутствуют. Кинетические исследования изменения характера полос поглощения в растворе ЦСР + ПГМГ-ГХ сразу после смешивания показали (рис. 3б), что уже через 10 мин после смешивания происходит исчезновение полос поглощения 314 и 394 нм и появление новых полос 260 и 375 нм. Аналогичный эффект дает инициирование процесса гелеобразования путем добавления в ЦСР хлорида натрия [6]. Вероятно, введение ПГМГ-ГХ, также, как и NaCl, в ЦСР ведет к существенному изменению электронной структуры супрамолекулярных цепей из молекул меркаптида серебра [1], отвечающих за формирование пространственной сетки геля, в следствие присутствия в этих растворах хлорид-иона.

Микроснимки СЭМ характеризуют морфологию полученных гидрогелей на основе ЦСР с использованием водных растворов NaCl и

ПГМГ-ГХ. Оказалось, что строение исследуемых гидрогелей существенно различается (рис. 4): гидрогель с ПГМГ-ГХ имеет более рыхлую структуру по сравнению с гидрогелем, полученным с использованием хлорида натрия. В следствие этого гели с хлоридом натрия более прочные и более устойчивы во времени, по сравнению с гидрогелями на основе ПГМГ-ГХ.

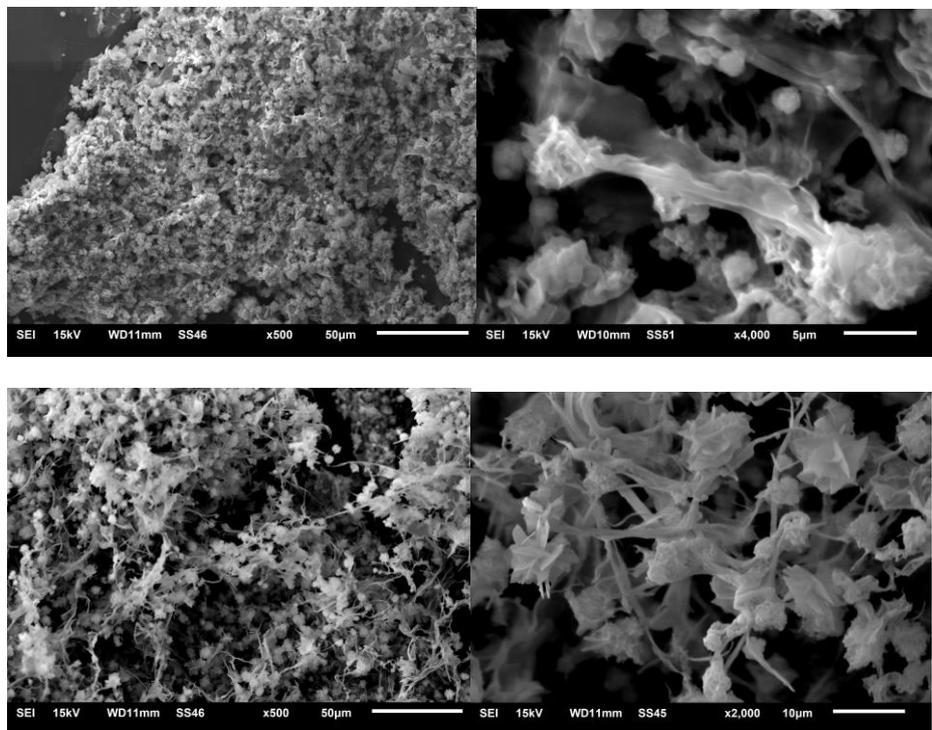


Рис. 4. Микроснимки СЭМ гидрогеля на основе ЦСР с хлоридом натрия (а,б) и на основе ЦСР с ПГМГ-ГХ (в,г)) при различном увеличении ($C_{\text{ПГМГ-ГХ}} = 0,1\%$, $V_{\text{ПГМГ-ГХ}} = 0,05$ мл на 1 мл ЦСР, $C_{\text{NaCl}} = 0,5$ мМ)

На основе полученных результатов предложена молекулярная модель строения пространственной сетки гидрогеля ЦСР + ПГМГ-ГХ (рис. 5). Согласно этой модели, при смешивании ЦСР с водным раствором ПГМГ-ГХ молекулы меркаптида серебра (цвиттер-ионы) или цепочки из молекул меркаптида серебра являются своеобразными линкерами, которые связывают макромолекулы ПГМГ-ГХ в пространственную супрамолекулярную сетку. В результате раствор переходит в состояние геля. Наличие длинных линкеров из молекул меркаптида серебра, по сравнению с NaCl, может быть причиной формирования более редкой пространственной сетки и, как следствие, более рыхлой структуры ксерогеля (рис. 4).

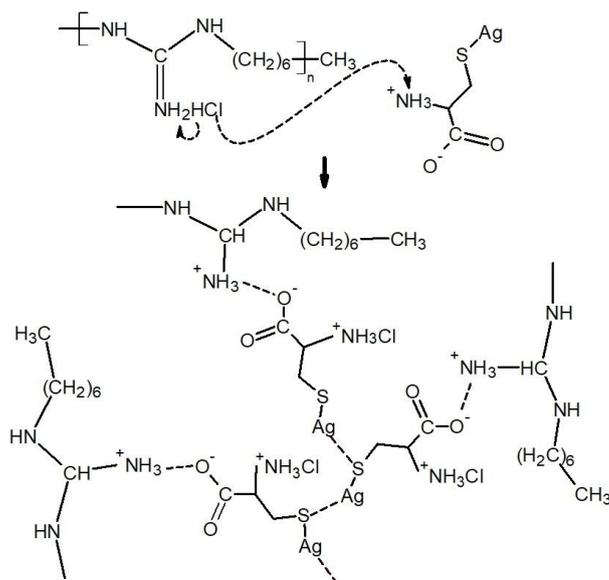


Рис. 5. Модель строения пространственной сетки гидрогеля ЦСР + ПГМГ-ГХ

Помимо структурных исследований гидрогелей, важной задачей являлось исследование их антибактериальных свойств (табл. 2).

Таблица 2

Антагонистическая активность исследуемых образцов по отношению к тест-культурам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов

Образцы	Зоны подавления роста тест-культур в мм.						
	B.subtilis 6633	S.aureus ATCC 25923	E.coli ATCC 25922	Salmonella typhimurium 5715	Sh.sonnei III №1908	P.aerugi- nosa ATCC 27853	C.albicans ATCC 885-653
№ 1	15	15	15	15	15	15	10
№ 2	16	15	12	16	15	16	12
№ 3	0	0	0	0	0	0	0
№ 4	7	0	7	5	0	10	7
№ 5	7	0	8	9	7	5	11
№ 6	0	0	9	5	0	7	7
№ 7	9	8	0	0	0	0	17
№ 8	7	8	7	5	4	7	15

В результате проведенных исследований установлено, что наиболее высокими антимикробными свойствами по отношению ко всем штаммам бактерий и грибов обладают образцы №1 и №2 (водные растворы солей серебра), однако эти растворы проявляют и высокую токсичность по отношению к живым организмам. Наоборот, водный раствор L-цистеина (образец №3) из-за отсутствия серебра не обладает антимикробными свойствами. Неплохими антимикробными свойствами обладают растворы и гели, содержащие серебро в ионной форме (№4-6) за исключением штаммов S.aureus ATCC 25923 и Sh.sonnei III №1908,

против которых не имеет антимикробной активности раствор ЦСР (№4), ЦСР+Na₂SO₄ (№5) не обладает антимикробными свойствами по отношению к *S.aureus* ATCC 25923, а ЦСР+NaCl (№6) не активен против двух штаммов - *S.aureus* ATCC 25923 и *Sh.sonnei* III №1908. Водный раствор ПГМГ-ГХ (№7) также имеет неплохие антимикробные свойства за исключением четырех штаммов (*E.coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* 5715, *Sh.sonnei* III №1908, *P.aeruginosa* ATCC 27853). Только гидрогель с ПГМГ-ГХ имеет противомикробные и противогрибковые свойства по отношению ко всем штаммам бактерий.

Таким образом, путем смешения водных растворов ЦСР и ПГМГ-ГХ получается гидрогель и достигается синергический эффект в повышении антимикробных свойств по отношению к исследуемым штаммам бактерий и грибов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №20-33-90096), в рамках Государственного задания ИНХС РАН на оборудовании Центра коллективного пользования Тверского государственного университета.

Список литературы

1. Шкарин В.В., Ковалишена О.В. Монография. Новые инфекции: систематизация, проблемы, перспективы. Нижний Новгород: Нижегородская государственная медицинская академия. 2012. 510 с.
2. Блажитко Е.М., Бурмистров В.А., Колесников А.П., Михайлов Ю.И., Родионов П.П. Серебро в медицине. Новосибирск: Наука-Центр. 2004. 254 с.
3. Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. // Успехи химии. 2008. Т. 77(3). С. 242—269.
4. Егорова Е.М., Кубатиев А.А., Швец В.И. Монография. Биологические эффекты наночастиц металлов. Москва: Наука. 2014. 350 с.
5. Пахомов П.М., Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Комаров П.В. Монография. Супрамолекулярные гели. Тверь: Тверской государственный университет. 2011. 269 с.
6. Адамян А.Н., Аверкин Д.В., Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Пахомов П.М. // Вестник ТвГУ. Серия «Химия». 2016. № 2. С. 89–97.
7. Vishnevetskii D.V., Mekhtiev A.R., Perevozova T.V., Averkin D.V., Ivanova A.I., Khizhnyak S.D., Pakhomov P.M. // *Soft matter*. 2020. №42. P. 9669–9673.
8. Baranova O.A., Kuz' min N.I., Samsonova T.I., Rebetskaya I.S., Petrova O.P., Pakhomov P.M., Khizhnyak S.D., Komarov P.V., Ovchinnikov M.M. // *Fibre Chemistry*. 2011. V. 43, N 1, P.90–103.
9. Баранова О.А., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. // Известия вузов. Технология легкой промышленности. 2014. №1. С.37–39.
10. Walczak M., Richert A., Burkowska-But. A. // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2014. V. 41. №11. P. 1719—1724.
11. Zhongxin Zhou, Dafu Wei, Yong Guan, Anna Zheng, Jian-Jiang Zhong. // *Materials Science and Engineering: C*. 2011. V. 31. P. 1836–1843.

12. Воинцева И.И., Гембицкий П.А. Полигуанидины. Монография. Дезинфекционные средства и полифункциональные добавки в композиционные материалы. Москва: ЛКМ-пресс. 2009. 304 с.

Об авторах:

АДАМЯН Анна Нориковна – аспирантка кафедры физической химии ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», e-mail: annadamyani@rambler.ru

КУЧУРОВА Алена Константиновна - студентка кафедры физической химии ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», e-mail: ku4urowa.alena@yandex.ru

ИВАНОВА Александра Ивановна – ассистент кафедры прикладной физики, ведущий инженер кафедры прикладной физики ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», e-mail: alex.ivanova33@yandex.ru

МАЛЬШЕВ Максим Дмитриевич - аспирант кафедры физической химии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», e-mail: bggf@bk.ru

ХИЖНЯК Светлана Дмитриевна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией спектроскопии ЦКП Тверского государственного университета, e-mail: sveta_khizhnyak@mail.ru

ГЕРАСИН Виктор Анатольевич - кандидат химических наук, доцент кафедры химической технологии полимерных композиционных лакокрасочных материалов и покрытий Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева, e-mail: gerasin@ips.ac.ru

ЧЕРВИНЕЦ Вячеслав Михайлович – профессор, доктор медицинских наук, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии Тверского государственного медицинского университета, e-mail: chervinets@mail.ru

ПАХОМОВ Павел Михайлович – доктор химических наук, профессор, зав. кафедрой физической химии Тверского государственного университета, e-mail: pavel.pakhomov@mail.ru

INFLUENCE OF POLIGUANIDINE ON THE SELF-ORGANIZATION PROCESS IN CYSTEINE-SILVER SOLUTION

A.N. Adamyan¹, A.K. Kuchurova¹, A.I. Ivanova¹, M.D. Malyshev¹, V.A. Gerasin², B.M. Chervinets³, S.D. Khizhnyak¹, P.M. Pakhomov¹

¹Tver State University, Tver

²D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

³Tver State Medical University, Tver

Rheological, structural, and antibacterial studies of hydrogels based on L-cysteine, silver acetate, and polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG-GC) have been carried out. It was found that aqueous solutions based on L-cysteine and silver acetate mix well with an aqueous solution of PHMG-GC, forming transparent hydrogels. A model of the structure of the spatial grid of the gel is proposed. High antimicrobial activity of the hydrogel was shown in relation to test cultures of pathogenic and opportunistic microorganisms.

Keywords: *aqueous solutions of L-cysteine, silver acetate, polyhexamethylene guanidine hydrochloride, self-assembly processes, supramolecular hydrogel, antibacterial activity*