

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 577.1:543.422.27

DOI 10.26456/vtchem2021.4.15

СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ АМИНОКИСЛОТЫ L-ЦИСТЕИН, НИТРАТА СЕРЕБРА И ХИТОЗАНА

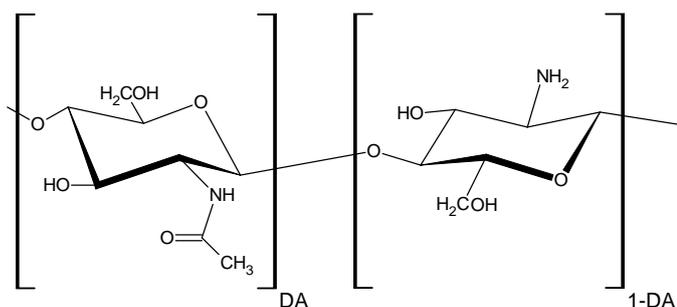
Г.Р. Зеников С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов

Тверской государственный университетг. Тверь

Получены гидрогели на основе L-цистеин-серебряного раствора (ЦСР), имеющего супрамолекулярную природу, и низкомолекулярного водорастворимого хитозана (ХЗ). С помощью физико-химических методов (вискозиметрия, УФ спектроскопия, динамическое светорассеяние, просвечивающая электронная микроскопия) исследованы прочностные и структурные характеристики гидрогелей различного композиционного состава: ЦСР/ХЗ и ЦСР/Na₂SO₄/ХЗ. Установлено, что под влиянием ХЗ изменяется электронная конфигурация супрамолекулярных кластерных цепочек ЦСР, состоящих из цвиттер-ионов меркаптида серебра, и размер формирующихся в растворе агрегатов. Обнаружено, что добавление сульфата натрия к ЦСР/ХЗ системе не способствует упрочнению гидрогелей, а наоборот делает их менее стабильными во времени.

Ключевые слова: *цистеин-серебряный раствор, водорастворимый хитозан, супрамолекулярный, антимикробная активность.*

Полимеры природного происхождения, например, полисахариды, такие как хитин, хитозан, альгинат, каррагенан – находят широкое применение в различных областях – фармакологии, пищевой промышленности и др. [1]. Хитозан получают из хитина путем деацетилирования в щелочной или кислой среде. Это линейный полимер, который состоит из двух структурных звеньев: D-глюкозамина и N-ацетил-D- глюкозамина, соединенных β (1→4) гликозидной связью. Главными характеристиками ХЗ являются степень ацетилирования (DA) – мольная доля ацетилированных звеньев в сополимере, и молекулярная масса. Молекула ХЗ содержит одну –NH₂ группу и две –ОН группы на каждый гликозидный остаток:



За счет способности связывать несколько органических соединений, физиологической активности в совокупности с нетоксичностью, биodeградируемостью, ХЗ оказался удобным материалом для широкого круга биомедицинских задач, включая адресную доставку лекарств, ранозаживление, тканевую инженерию и др. [2-4]. Кроме того, ХЗ обладает антимикробной, антиоксидантной активностью. Это сочетание свойств делает ХЗ идеальным кандидатом для получения на его основе различных материалов – микро- и наночастиц, пленок, мембран, волокон, гелей, композитных материалов [5] и др., обладающих усиленными биомедицинскими свойствами. Терапевтические препараты можно инкорпорировать в такие материалы для защиты биоактивного соединения от деградации, для контролируемого высвобождения лекарства, для улучшения адсорбции и терапевтического эффекта. Молекулярная самосборка, регулируемая слабыми нековалентными взаимодействиями, такими как водородные связи, взаимодействие ван-дер Ваальса и др. – способ получения наноматериалов на основе ХЗ (нановолокон и наногелей) [6]. Использование супрамолекулярных структур для разработки лекарственных композиций открывает новые возможности для получения медицинских препаратов широкого спектра действия. В качестве супрамолекулярной системы в данной работе был использован L-цистеин-серебряный раствор, синтезированный на основе аминокислоты L-цистеин и нитрата серебра (AgNO_3) [7]. В работе [8] авторами достаточно детально была исследована антимикробная активность различных композиций на основе ЦСР и ХЗ, однако получить гели на их основе не удалось. В этом исследовании на основе низкомолекулярного водорастворимого хитозана были получены гидрогели различного композиционного состава: ЦСР/ХЗ и ЦСР/ Na_2SO_4 /ХЗ, и исследованы их прочностные и структурные характеристики.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы реактивы: серебро азотнокислое (ч.д.а.), L-цистеин, 99 %, («Vecton», Россия); хитозан низкомолекулярный

($M=30$ кДа), водорастворимый, (ЗАО «Биопрогресс»), ТУ 9289-067-00472124-03, степень деацетилирования 87 %, сульфат натрия безводный (х.ч.). Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

Раствор водорастворимого низкомолекулярного ХЗ (0,05 вес/%) получали растворением определенной навески в воде.

Для изучения гелеобразующей способности хитозана в различных композициях: ЦСР/ХЗ и ЦСР/ Na_2SO_4 /ХЗ – использовали ЦСР, полученный по методике [7], с молярным соотношением исходных компонентов $\text{Ag}^+/\text{Cys} = 1,25$. Исходная концентрация раствора электролита (Na_2SO_4) составляла 0,02 М. Композиционный состав гелеобразующих образцов представлен в таблице.

При получении ЦСР/ХЗ образцов хитозан добавляли в ЦСР, полученную смесь энергично встряхивали. В некоторых случаях наблюдалось формирование гидрогелей *in-situ*. Трехкомпонентную композицию ЦСР/ Na_2SO_4 /ХЗ получали путем последовательного добавления к ЦСР расчетного количества электролита, а затем ХЗ. После введения каждого компонента образец энергично перемешивали. Хранили образцы в защищенном от света месте.

Таблица.

Композиционный состав гидрогелей на основе ЦСР и ХЗ
и прочностные характеристики

№ образца	Состав образца	Прочность геля на следующий день после приготовления, балл
1.	1 мл ЦСР + 0,015 мл ХЗ	5
2.	1 мл ЦСР + 0,015 мл Na_2SO_4 + 0,015 мл ХЗ	4
3.	1 мл ЦСР + 0,020 мл ХЗ	5
4.	1 мл ЦСР + 0,020 мл ХЗ + 0,020 мл Na_2SO_4	5
5.	1 мл ЦСР + 0,025 мл ХЗ	5
6.	1 мл ЦСР + 0,025 мл ХЗ + 0,025 мл Na_2SO_4	4

Прочность гидрогелей оценивали по характеру деформации столбика геля в пробирке при переворачивании её на 90° (как показано на рис. 1). Соответствующая шкала деформации геля приведена в работе [7].

Вязкость образцов определяли на вибрационном вискозиметре «SV-10» фирмы «A&D», Япония, в поликарбонатных кюветах объемом 10 мл. Измерения вязкости происходят в режиме вибрации двух тонких сенсорных пластин, покрытых золотом, с частотой 30 Гц и постоянной амплитудой около 1 мм.

Электронные спектры исследуемых образцов регистрировали на спектрометре “Evolution Array” фирмы “Thermo Scientific”, США, в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 мм.

Исследование образцов методом динамического светорассеяния (ДСР) проводили на анализаторе Zetasizer “Nano ZS” фирмы “Malvern” с He-Ne-лазером (633 нм) мощностью 4 мВт при 25°C в конфигурации обратного рассеяния (173°). Образцы предварительно разбавляли в три раза. Распределения частиц по размерам рассчитывали по формуле Стокса–Эйнштейна:

$$D = kT/6\pi\eta R,$$

где k – константа Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость среды, R – радиус рассеивающих частиц.

Микрофотографии образцов были получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа «LEO 912 AB OMEGA» фирмы “Carl Zeiss”, ФРГ, в Центре коллективного пользования Московского госуниверситета им. М.В. Ломоносова. Образцы были предварительно нанесены на полимерную подложку из формвара.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментально было обнаружено, что низкомолекулярный водорастворимый ХЗ образует с ЦСР прозрачные, устойчивые во времени гидрогели различного состава: ЦСР/ХЗ и ЦСР/ Na_2SO_4 /ХЗ. Композиционный состав гелеобразующих образцов и визуальная оценка их прочности представлены в таблице. На рис. 1 на примере образца № 4 (ЦСР/ Na_2SO_4 /ХЗ) показан способ оценки характера деформации гидрогеля при переворачивании флакона на 90° .



Рис. 1. Фотография ЦСР/Na₂SO₄/ХЗ гидрогеля, образец № 4

Кроме визуальной оценки прочности была измерена вязкость гелей в разные моменты времени – через 30 мин после смешения компонентов и затем через 6 дней. На рис. 2 представлены кривые изменения относительной вязкости (η) различных образцах (№ 1-6) в зависимости от времени. Кривая 1 на рис. 2а характеризует изменение вязкости свежеприготовленного гелеобразующего ЦСР/ХЗ образца с минимальным содержанием ХЗ (№ 1). Незначительный рост вязкости свидетельствует о протекании процесса структурирования в образце через 30 мин после смешения компонентов, происходящем в режиме вибрации сенсорных пластин. Кривая 2 (рис. 2а) демонстрирует увеличение вязкости образца через 6 дней, что подтверждает формирование гель-сетки. Добавление электролита в качестве гелеобразующего агента к системе привело к незначительному увеличению значения вязкости свежеприготовленного ЦСР/Na₂SO₄/ХЗ образца № 2 (кривая 1 рис. 2б), при этом тенденция роста относительной вязкости в процессе измерения сохраняется. Однако через 6 дней мы наблюдаем уменьшение значения η , что свидетельствует о разрушении гель-структуры образца. Аналогичное поведение отмечено и для образцов № 4 и 6. Экспериментальным путем было установлено, что для формирования гидрогелей более предпочтительно объемное соотношение хитозана и электролита (ХЗ:Na₂SO₄) равное 1:1. Увеличение содержания ХЗ в двухкомпонентной композиции ЦСР/ХЗ (образец № 3) привело к росту вязкости свежеприготовленного образца ~1.5 раза, при этом в процессе измерения значение вязкости незначительно уменьшилось (кривая 1, рис. 2в). При повторном измерении образца через 6 дней отмечено снижение η в начальный момент (по сравнению со свежеприготовленным образцом) и незначительный рост вязкости в процессе измерения (кривая 2, рис. 2в). Можно предположить, что в процессе вибрации изменяется расстояние между фрагментами гель-сетки, увеличивается плотность зацеплений, и, как следствие, наблюдается рост вязкости. Добавление электролита в образец с таким составом (№ 4) не привело к упрочнению образца, и как уже было отмечено выше, по своим характеристикам он близок к образцу №2.

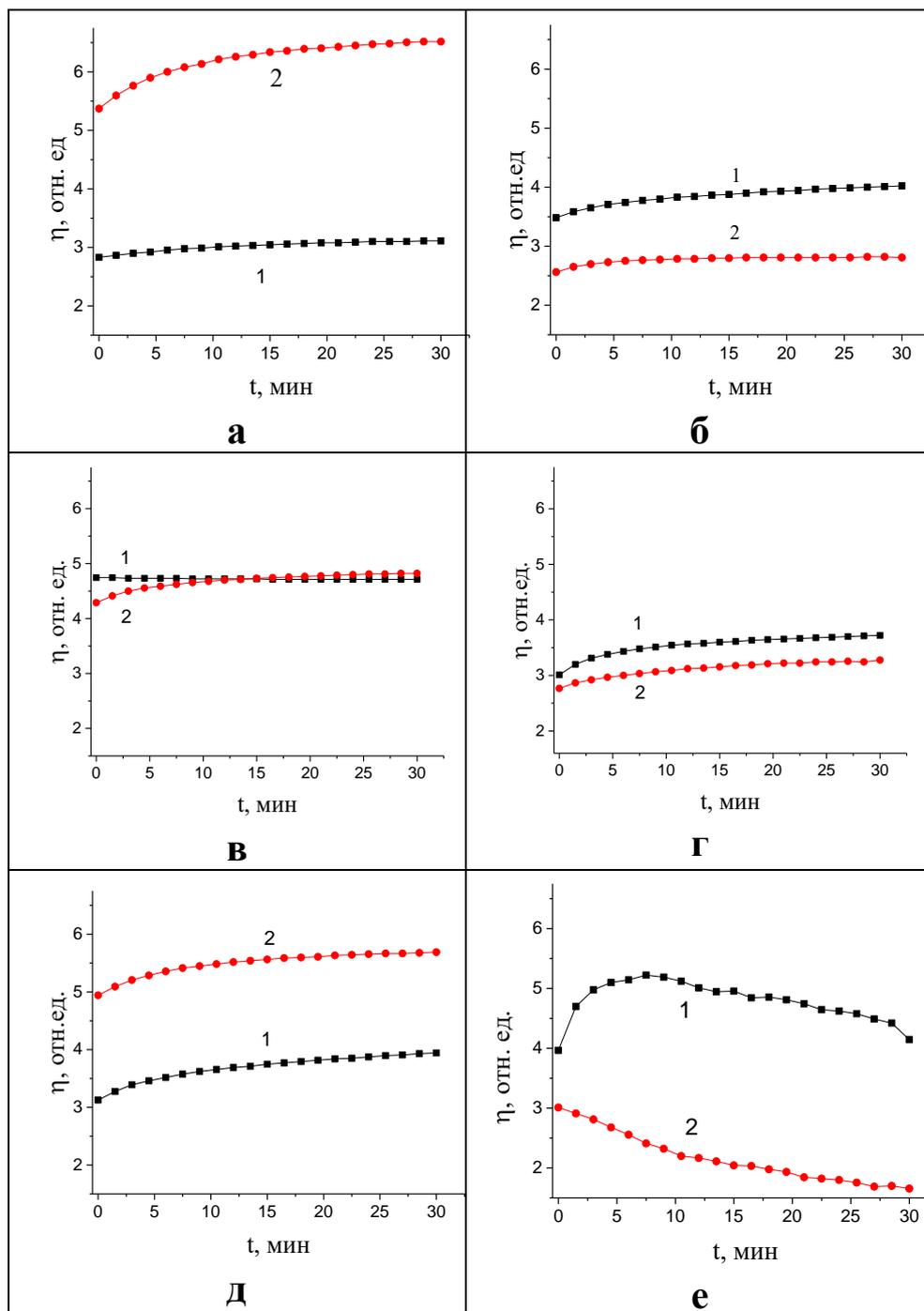


Рис. 2. Зависимость относительной вязкости ЦСР/ХЗ (а, в, д) и ЦСР/Na₂SO₄/ХЗ (б, г, е) гидрогелей от времени: 1 – 30 мин после смешения компонентов, 2 – через 6 дней. Состав образцов: а, б, в, г, д, е – № 1-6, соответственно, (табл.)

Дальнейший рост содержания ХЗ в двухкомпонентной композиции (образец № 5) привел к уменьшению вязкости свежеприготовленного образца (кривая 1, рис. 2д), но, в тоже время, к заметному увеличению η через 6 дней. Однако из рис. 2е становится ясно, что добавление электролита в образец № 5 не позволило повысить стабильность образца во времени.

Таким образом, на основе вискозиметрических данных можно сделать вывод, что гелеобразование в ЦСР/ХЗ системах наблюдается в достаточно узком диапазоне концентраций хитозана, более того, не существует прямой зависимости между содержанием ХЗ и прочностью ЦСР/ХЗ гидрогелей. Согласно данным этих измерений двухкомпонентные гелеобразующие системы более стабильны во времени по сравнению с композициями, в которые добавляли электролит. Следует также отметить тиксотропию – способность восстанавливать структуру после механического разрушения – всех гелеобразующих композиций, указанных в таблице.

Изучение кинетики гелеобразования в ЦСР/ХЗ системах с помощью УФ спектроскопии показало, что под влиянием хитозана в образце ЦСР происходит уменьшение поглощения в области ~ 312 и ~ 395 нм (рис. 3). Для большей наглядности на вставке рис. 3 демонстрируются изменения в электронном спектре ЦСР в области полосы поглощения ~ 395 нм, которую ассоциируют обычно с полосой плазмонного резонанса наночастиц серебра (НЧС) [9]. Применительно к нашей системе наблюдаемое в течение 90 мин уменьшение поглощения в этих диапазонах может свидетельствовать об изменении концентрации супрамолекулярных кластеров, состоящих из молекул меркаптида серебра. Полоса поглощения с максимумом ~ 312 нм согласно нашим предположениям – это полоса переноса заряда между атомами серы и серебра – связана с образованием супрамолекулярных структур из молекул меркаптида серебра с участием избыточных ионов серебра [10], при этом связи Ag-S в молекулах меркаптида серебра соответствует полоса поглощения с максимумом ~ 395 - 398 нм [9-11]. Такого рода изменения в электронном спектре образца могут быть результатом взаимодействия, имеющего электростатическую природу, между цвиттер-ионами меркаптида серебра (МС), образующих супрамолекулярные кластерные цепочки в ЦСР, со структурными единицами ХЗ с образованием взаимопроникающей сетки. Возможна и частичная диссоциации цепочек ЦСР за счет формирования водородных связей между протонированными аминогруппами ХЗ и депротонированными карбоксильными группами молекул МС.

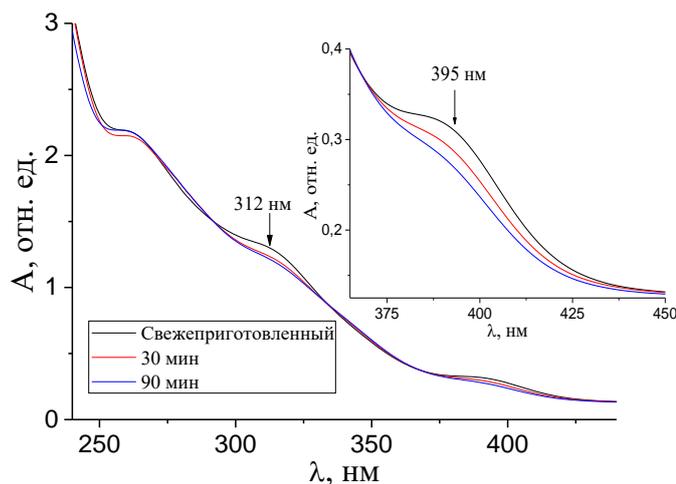


Рис. 3. Электронные спектры ЦСР/ХЗ образца в зависимости от времени: 2, 30, 90 мин после смешения компонентов (спектры расположены сверху вниз)

Это предположение подтверждается данными ДСР измерений. На рис. 4 представлены распределения частиц по размерам в образцах хитозана, ЦСР и композиции на их основе. Раствор ХЗ характеризуется бимодальным распределением частиц с размерами 90 и 400 нм, в растворе ЦСР наблюдается широкое распределение частиц с максимумом ~180 нм. В композиции ЦСР/ХЗ сохраняется бимодальное распределение частиц, характерное для хитозана, однако происходит увеличение размеров агрегатов до 100 и 650 нм. Это как раз подтверждает частичную фрагментацию супрамолекулярных цепочек ЦСР. Можно предположить, что структурные фрагменты супрамолекулярных цепочек ЦСР ассоциируются за счет межмолекулярных связей электростатической природы с молекулами хитозана, вследствие чего мы наблюдаем увеличение размера частиц (рис. 4).

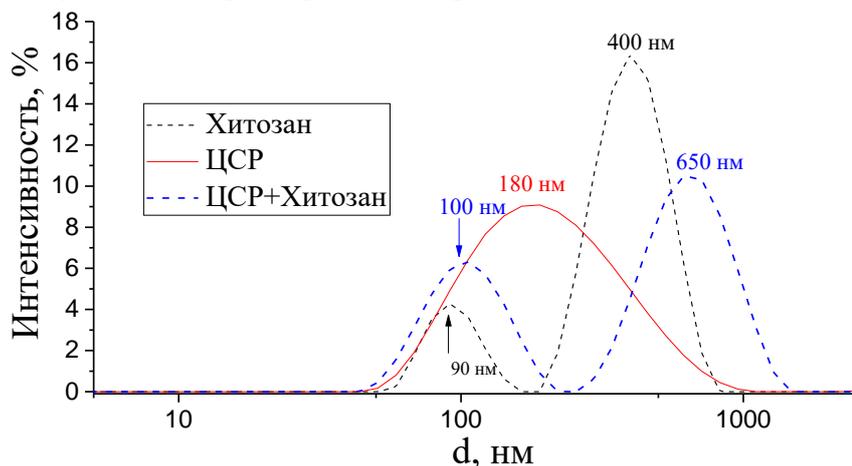


Рис. 4. Распределение частиц по размерам в образцах ХЗ, ЦСР, ЦСР/ХЗ

Если принять во внимание данные ПЭМ (рис. 5), то при внимательном изучении и сравнении изображений ЦСР и ЦСР/ХЗ (рис. 5, а и б) можно заметить, что в образце ЦСР с хитозаном кластерные цепочки становятся более плотными, ориентированными, выпрямленными, но в тоже время отдельные структурные элементы – кластеры уменьшаются в размере

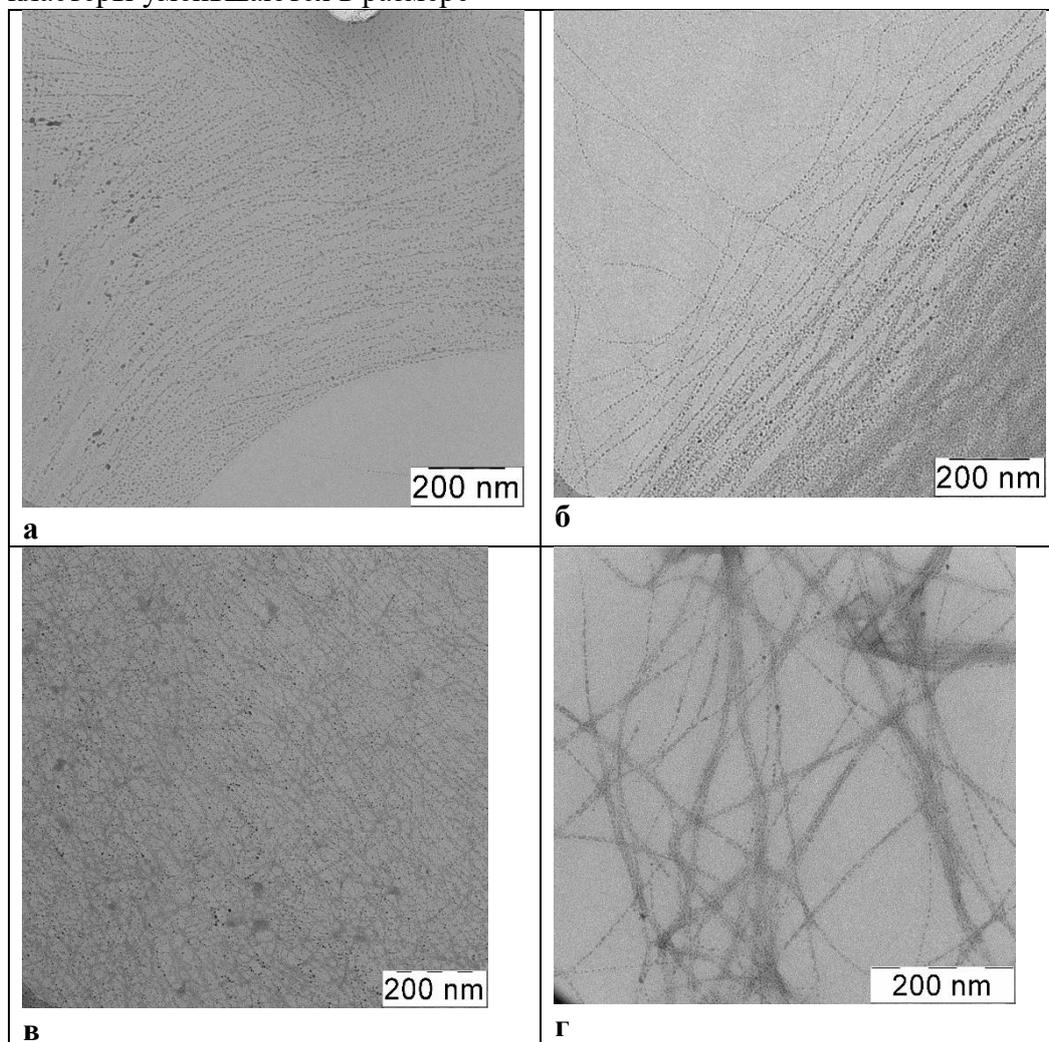


Рис. 5. ПЭМ изображения образцов ЦСР (а), ЦСР/ХЗ (б), ЦСР/Na₂SO₄/ХЗ (в), ЦСР/Na₂SO₄ (г)

В ЦСР/Na₂SO₄/ХЗ образце (рис. 5в) наблюдаем диссоциацию цепочек ЦСР, образование тонких, коротких фрагментов, что, как было указано выше, не способствует формированию прочных и стабильных во времени гелей. На этом фоне морфология образца ЦСР/Na₂SO₄ (рис. 5г) резко отличается структурированностью, образованием сетки зацеплений между отдельными волокнами, что, видимо, определяет стабильность гелей во времени.

Таким образом, в работе удалось получить гидрогели различного композиционного состава на основе супрамолекулярной L-цистеин-нитрат серебра системы и природного полимера хитозана, обладающие различной прочностью и стабильностью во времени. Подобные системы можно рассматривать не только как перспективную матрицу для разработки материалов биомедицинского назначения, но и как объект для изучения механизма гелеобразования и формирования взаимопроникающих гель-сеток.

Авторы выражают благодарность Абрамчуку А.С. за проведение электронно-микроскопических исследований.

Данная работа выполнена на оборудовании лаборатории спектроскопии ЦКП ТвГУ.

Список литературы

1. Peers S., Montembault F., Ladavière C // J. of Controlled Release, Elsevier, 2020, 326, pp.150-163. 10.1016/j.jconrel.2020.06.012. hal-02900370
2. Fahim I.S., Mamdouh W., Hanadi G., Salem H.G. // J. of Materials Science Research, V 4, N 4. 2015 doi:10.5539/jmsr.v4n4p1 URL: <http://dx.doi.org/10.5539/jmsr.v4n4p1>
3. Rodriguez-Rodriguez R., Espinosa-Andrewsb H., Cristina Velasquillo-Martinezc C., Garcia-Carvajala Z.Y. // Intern. J. of polymeric materials and polymeric biomaterials, 2020, V 69, N 1, P. 1–20. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1581780>
4. Hamed H., Moradi S., Hudson S.M., Tonelli A.E. // Carbohydrate Polymers, 2018, N 199. P. 445–460.
5. Correlo V.M., Pinho E.D., Pashkuleva I., Bhattacharya M., Neves N.M., Reis R.L. // Macromol. Biosci. 2007, N 7, P. 354–363.
6. Laza J.M., Álvarez-Bautista A. // Current Pharmaceutical Design, 2016, N 22, P. 999 DOI: [10.2174/1381612822666160216152008](https://doi.org/10.2174/1381612822666160216152008)
7. Khizhnyak S., Komarov P., Ovchinnikov M., Zherenkova L., Pakhomov P. // Soft Matter, 2017, V 30, N 13, P. 5168-5184 DOI:10.1039/C7SM00772H.
8. Овчинников М.М., Червинец В.М., Червинец Ю.В., Михайлова Е.С., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. // Вестник ТвГУ, Серия: Химия, 2016, №1. С. 140-151.
9. Mandal S., Gole A., Lala N., Gonnade R., Ganvir V., Sastry M. // Langmuir, 2001, V 17, N 20, P. 6262-6268.
10. Randazzo R., Di Mauro A., D'Urso A., Messina G.C., Compagnini G., Villari V. and etc // J. Phys. Chem. B, 2015, V 119, P. 4898-4904. doi:10.1021/acs.jpcc.5b00847
11. Баранова О.А., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. // Ж. структурной химии, 2014, Т 55, №1. С. 166-172.
12. Баранова О.А., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. // Ж. структурной химии, 2016, Т 57, № 6, С. 1242-1248 DOI: 10.15372/JSC20160621

Об авторах:

ЗЕНИКОВ Герман Романович – студент III курса химико-технологического факультета Тверского государственного университета, e-mail: zenikov1@gmail.com

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

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

SUPRAMOLECULAR HYDROGELS BASED ON AMINO ACID L-CYSTEINE, SILVER NITRATE AND CHITOSAN

G.R. Zenikov, S.D. Khizhnyak, P.M. Pakhomov

Tver state university, Tver

Novel hydrogels based on L-cysteine-silver solution, (CSS), having supramolecular nature, and low molecular weight water soluble chitosan (CS) are obtained. Hardness and structural properties of the hydrogels of various composition (CSS/CS and CSS/Na₂SO₄/CS) are studied by physicochemical techniques (viscometry, UV spectroscopy, dynamic light scattering, transition electron microscopy). It is established that electron configuration of supramolecular cluster chains in CSS, consisting of silver mercaptide zwitterions, and size of aggregates forming in the system, are changed slightly under the influence of CS. It is found out also that an addition of sodium sulphate into CSS/CS systems doesn't increase hydrogel hardness, but otherwise decrease their stability over time.

Keywords: *L-cysteine-silver solution, water soluble chitosan, supramolecular, antibacterial activity.*