

## **БИООРГАНИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ХИМИЯ**

УДК 577.1:543.422.27

DOI 10.26456/vtchem2022.2.13

### **АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ НА ОСНОВЕ L- ЦИСТЕИНА, N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА И НИТРИТА СЕРЕБРА**

**Т.В. Потапенкова<sup>1</sup>, Д.В. Вишневецкий<sup>1</sup>, В.М. Червинец<sup>2</sup>,  
С.Д. Хижняк<sup>1</sup>, П.М. Пахомов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Тверской государственный университет, Тверь

<sup>2</sup>Тверской государственный медицинский университет, Тверь

Исследовано влияние водных цистеин-серебряных растворов (ЦСР) на основе L-цистеина (ЦИС), N-ацетил-L-цистеина (НАЦ) и нитрита серебра ( $\text{AgNO}_2$ ) на развитие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Показана антимикробная активность по отношению к исследуемым тест-культурам. Проведён сравнительный анализ антагонистической активности образцов ЦСР на основе разных аминокислот.

**Ключевые слова:** *L-цистеин, N-ацетил-L-цистеин, нитрит серебра, процессы самоорганизации, супрамолекулярный гидрогель, наночастицы серебра, антибактериальная активность*

Последнее десятилетие ознаменовалось появлением значительного количества антибиотикорезистентных микроорганизмов, поэтому поиск новых антимикробных агентов является актуальной задачей [1]. Среди металлов серебро обладает наиболее сильным бактерицидным действием и проявляет высокую активность как по отношению к аэробным и анаэробным микроорганизмам (в том числе и к разновидностям, устойчивым к антибиотикам), так и к некоторым вирусам и грибам. Кроме того, в последнее время повышенный интерес к серебру объясняется не только его мощными антибактериальными и противовирусными свойствами, но также его действием в организме как микроэлемента [2-4]. Особое внимание уделяется методам получения наночастиц серебра (НЧС), и, в частности, широкое распространение и применение получило коллоидное серебро.

Преимуществом водных растворов и гидрогелей на основе L-цистеина и его производных является природное происхождение исходных компонентов, что позволяет рассматривать объекты исследования, как биоактивные агенты с перспективой применения в области медицины. Так, авторами было обнаружено, что гидрогели на основе ЦСР - (ЦИС/ $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{AgNO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{COOAg}$ ) обладают достаточно сильным цитотоксическим действием по отношению к клеткам

карциномы молочной железы человека линии MCF-7 [5,6]. В то же время, гели демонстрировали отсутствие токсичности к нормальным клеткам человека эмбриональным фибробластам линии Wi-38 и, более того, клетки под влиянием гелей активно делились и росли.

Также, не менее важным является вопрос о бактерицидных свойствах ЦСР и гидрогелей на его основе. Ионная форма серебра проявляет высокие антибактериальные свойства в низкоконтрированных (~0.01%) водных растворах L-цистеина и солей серебра (нитрат ( $\text{NO}_3^-$ ) и ацетат ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) серебра), а также гидрогелях на основе ЦСР [7-9]. В списке солей серебра особое место занимает  $\text{AgNO}_2$ . Гидрогели на основе ЦИС/ $\text{AgNO}_2$  способны к формированию НЧС [5,6,10]. Гидрогели образуются без добавления инициатора (низкомолекулярные анионы), что позволяет синтезировать их в одну стадию. Изменение состава ЦСР, а именно замена ЦИС на НАЦ, позволило более детально изучить процессы самоорганизации. На примере НАЦ удалось установить, что химическая природа аминокислоты и соли серебра влияют на процесс гелеобразования и образование НЧС [11,12]. Исследования в данной области продолжаются.

Целью данной работы является изучение антибактериальной активности гидрогелей и ЦСР на основе ЦИС, НАЦ и  $\text{AgNO}_2$  по отношению к тест-культурам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

### **Экспериментальная часть**

В настоящей работе были использованы реактивы: серебро азотистокислое >99% («Lancaster»), L-цистеин >99% («Acros»), N-ацетил-L-цистеин >98,5% («Acros»). Все растворы готовили на бидистиллированной воде. Растворимость нитрита серебра в воде при 25°C в 550 раз меньше, чем нитрата серебра, и составляет 0.0266 М [13].

ЦСР готовили путем смешения исходных водных растворов L-цистеина или N-ацетил-L-цистеина и нитрита серебра с исходными концентрациями 0.01 М при молярных соотношениях аминокислота/ $\text{AgNO}_2$  1.0/1.0 и 1.00/1.25. В результате, в случае использования ЦИС, получали бледно-желтый опалесцирующий раствор, который при стоянии в течение ~24 ч при комнатной температуре, в темноте, формирует прозрачные гидрогели жёлто-бурых оттенков различной интенсивности. В случае с НАЦ получали прозрачные бесцветные растворы ЦСР, не способные к гелеобразованию (табл.1). В опытах использовали только свежеприготовленные растворы исходных компонентов.

Таблица 1. Исследуемые образцы

Номер образца	Образец геля/ЦСП
№1	ЦИС/AgNO <sub>2</sub> (1.0/1.0)
№2	ЦИС /AgNO <sub>2</sub> (1.00/1.25)
№3	НАЦ/AgNO <sub>2</sub> (1.0/1.0)
№4	НАЦ/AgNO <sub>2</sub> (1.00/1.25)
№5	ЦИС
№6	НАЦ
№7	AgNO <sub>2</sub>

Конечные концентрации дисперсной фазы в растворах составляли 3 мМ для аминокислот,  $3 \cdot 10^{-3}$  М и  $3,75 \cdot 10^{-3}$  М для AgNO<sub>2</sub>.

Антибактериальная активность полученных систем 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 желудочнокишечного 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). Исследуемые образцы помещали микропипеткой объемом 20 мкл на засеянную тестовой культурой микроорганизмов поверхность оптимальной питательной среды и культивировали при 37<sup>0</sup>С в течение суток. Антибактериальную активность материала выражали в мм диаметра задержки роста.

### Результаты и их обсуждение

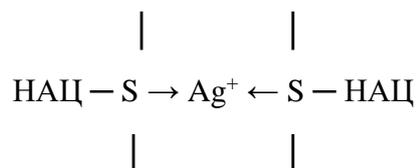
В данной работе были проведены испытания образцов на антимикробную активность. По окончании инкубации была проведена визуальная оценка результатов серии опытов. Исследования показали (табл. 2), что чувствительность различных патогенных организмов к ЦИС/AgNO<sub>2</sub> и НАЦ/AgNO<sub>2</sub> неодинакова, однако обе системы показали положительный эффект. Установлено, что образцы №1, №2, №3, №4 и №7 способны к выраженному проявлению антимикробных свойств. Образцы под номерами №5 и №6 показали нулевую активность по отношению ко всем патогенным микроорганизмам.

Водный раствор AgNO<sub>2</sub> оказал наибольшее влияние, подавляя распространение всех тест-культур. Системы на основе НАЦ/AgNO<sub>2</sub> также демонстрируют высокую степень подавления. Немногоим уступают в антибактериальной активности системы на основе ЦИС/AgNO<sub>2</sub>. Водные растворы чистых аминокислот, как и ожидалось, не оказали бактерицидного влияния на ростовые свойства изученных культур микроорганизмов в границах поставленного опыта.

Таблица 2. Антагонистическая активность исследуемых образцов по отношению к тест-культурам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов

Исследуемые образцы	Зоны подавления роста тест-культур в мм.						
	B.su btilis 6633	S.aureus ATCC 25923	E.coli ATCC 25922	Sh.so nnei III №19 08	Salmo nella typhim urium 5715	P.aerugi nosa ATCC 27853	C.albican s ATCC 885-653
№1	8	7	6	10	7	6	0
№2	8	8	7	10	7	8	0
№3	11	12	11	13	8	12	14
№4	13	15	12	14	10	12	18
№5	0	0	0	0	0	0	0
№6	0	0	0	0	0	0	0
№7	14	15	11	15	19	13	21

Установлено, что строение исходной аминокислоты, а именно её качественный и количественный состав, существенно влияет на процессы самоорганизации, происходящие в водных растворах. В связи с невозможностью формирования НЧС в ЦСР на основе НАЦ/AgNO<sub>2</sub> [11,12] серебро в этой системе находится, вероятно, преимущественно в ионной форме:



Как следствие, ввиду содержания большего количества ионов серебра, водный раствор чистого  $\text{AgNO}_2$  показал похожие результаты. Антимикробные свойства растворов  $\text{AgNO}_2$  и  $\text{AgNO}_3$  определяются биологической активностью ионов серебра, образующихся при диссоциации соединений серебра в воде [14,15]. Действие на клетки патогенных микроорганизмов заключается в том, что ионы серебра поглощаются клеточной оболочкой бактерии, в результате чего происходит нарушение её функций, в результате чего клетка гибнет. Ионы серебра способны блокировать сульфгидрильные группы ферментных систем микроорганизмов, что приводит к угнетению роста и их размножения [16,17].

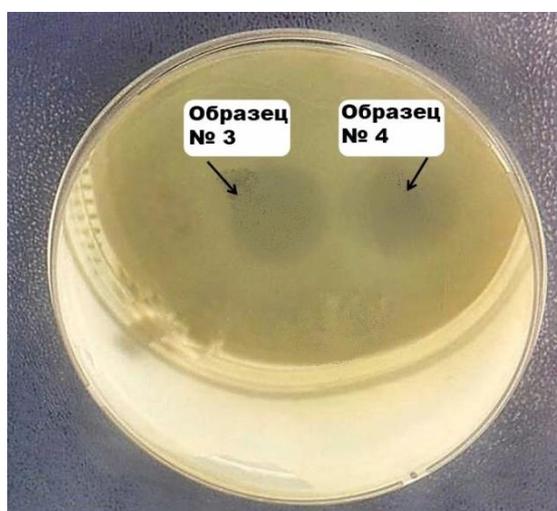


Рис. 1. Зоны задержки роста опытных образцов на газоне *P.aeruginosa* ATCC 27853

В растворах ЦИС/ $\text{AgNO}_2$  значительная часть серебра способна к формированию стабилизированных НЧС [6, 10]. Вследствие большой удельной площади поверхности НЧС в растворах, они способны убивать высокопрочные патогены при низких концентрациях [18]. Способность наносеребра предотвращать распространение инфекции объясняется высвобождением ионов серебра ( $\text{Ag}^+$ ) в виду частичного окисления НЧС. В виду того, что окисление – это не единовременный процесс, наносеребро можно считать бактерицидным материалом пролонгированного действия. Таким образом, в системах ЦИС/ $\text{AgNO}_2$  влияние на патогенные микроорганизмы НЧС и ионы серебра оказывают совместно. Стоит отметить, что *S.albicans* ATCC 885-653 оказался

устойчив к влиянию образцов №1 и №2. Вероятно, это связано с недостаточной концентрацией ионов серебра для подавления данного вида гриба. В то же время образцы №3 и №4 на основе НАЦ и раствор AgNO<sub>2</sub> показали высокую активность против распространения *S.albicans* ATCC 885-653.

Было установлено, что серебро в ионной форме и в форме НЧС оказывает угнетающее действие на все изученные бактерии при небольших концентрациях. Для изученных форм штаммов бактерий и грибов не наблюдается заметных различий в действии между ионной формой серебра и НЧС. Водные растворы ЦИС и НАЦ не оказали положительного эффекта в виду отсутствия серебра.

ЦСП и гидрогели на основе ЦИС/AgNO<sub>2</sub> и НАЦ/AgNO<sub>2</sub> можно считать перспективными системами для их использования в качестве бактерицидных препаратов (растворы, гели, мази спреи и др.) и приготовления бактерицидных материалов. В частности, тиксотропные биоактивные гидрогели на основе ЦИС/AgNO<sub>2</sub>, которые могут применяться как антибактериальные агенты, а также как системы, обладающие противораковой активностью.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-73-00134 на оборудовании Центра коллективного пользования Тверского государственного университета.

#### Список литературы:

1. Захарова О.И., Лискова Е.А., Михалева Т.В., Блохин А.А. // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2018, Т. 64(3) С. 13-21. <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2018.64.3.13-21>
2. Alexander JW. // Surg Infect (Larchmt) V. 10. P. 289–292. [10.1089/sur.2008.9941](https://doi.org/10.1089/sur.2008.9941). Crossref. PubMed.
3. Morones-Ramirez J.R., Winkler J.A., Spina C.S., Collins J.J. // Sci. Transl. Med. 2013. V. 5. P. 1–11. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006276.
4. Herisse M., Duverger Y., Martin-Verstraete I. et al. // Mol. Microbiol. 2017. V. 105. P.115–126. DOI: 10.1111/mmi.13687.
5. Vishnevetskii D.V., Mekhtiev A.R., Perevozova T.V., Ivanova A.I., Averkin D.V., Khizhnyak S.D., Pakhomov P.M. // Soft Matter, 2022, V. 18, P. 3031 – 3040, DOI 10.1039/D2SM00042C
6. 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.
7. Пахомов П.М., Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Комаров П.В. Монография. Супрамолекулярные гели. Тверь: Тверской государственный университет. 2011. 269 с.
8. Адамян А.Н., Аверкин Д.В., Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Пахомов П.М. // Вестник ТвГУ. Серия «Химия». 2016. № 2. С. 89–97.
9. Пахомов П.М., Овчинников М.М., Хижняк С.Д., Рощина О.А., Комаров П.В. // Высокомолек. соед. 2011, серия А, 53, P. 1574-1581

- [Pakhomov P.M., Ovchinnikov M. M., Khizhnyak S. D., Roshchina O. A., Komarov P. V. // Polym. Sci. Ser. A, 2011, V. 53, P. 820]
10. Потапенкова Т.В, Хижняк С.Д., Вишневецкий Д.В., Пахомов П.М., Процессы гелеобразования в водных растворах L-цистеина и нитрита серебра // Вестник ТвГУ. Серия "Химия", 2020. № 4 (42). С. 45–53.
  11. Потапенкова Т.В., Вишневецкий Д.В., Иванова А.И., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. // Вестник ТвГУ, Серия "Химия", 2021. № 2 (44), С. 56–68,
  12. Хижняк С.Д., Овчинников М.М., Пахомов П.М. // Журнал структурной химии. 2014. Т.55. №1. С.173–177
  13. Никольский Б.П. Справочник химика // 2-е изд., испр. М.-Л.: Химия, 1966. Т 1.С. 1072
  14. Белеванцев В.И., Бондарчук. И. В. Институт неорганической химии СО РАН. Очерк свойств серебра и его соединений. Применение препаратов серебра в медицине. Новосибирск, 1994. 89-95.
  15. Краткая медицинская энциклопедия : [В 2 т.] / Гл. ред. В.И. Покровский. 3-е изд., испр. и доп. М: АО "КРОН-пресс", 1994
  16. Lansdown A.B. // Current Problems in Dermatology. 2006. V. 33. P.17–34.
  17. Иванов В.Н., Ларионов Г.М., Кулиш Н.И., Лутцева М.А. и др. // Серебро в медицине, биологии и технике. Сиб.отд. РАМН. - 1995. №4 С. 53-62.
  18. Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., Yacaman M.J. // Nanotechnology 2005. V. 16(10). P. 2346–2353. doi: 10.1088/0957-4484/16/10/059

*Об авторах:*

ПОТАПЕНКОВА Татьяна Викторовна – аспирант, кафедра физической химии, Тверской государственный университет, г. Тверь. e-mail: [tanya.perevozova05@yandex.ru](mailto:tanya.perevozova05@yandex.ru)

ВИШНЕВЕЦКИЙ Дмитрий Викторович – кандидат химических наук, доцент кафедры физической химии, Тверской государственный университет, г. Тверь. e-mail: [rickashet@yandex.ru](mailto:rickashet@yandex.ru)

ХИЖНЯК Светлана Дмитриевна, кандидат химических наук, зав.лаборатории спектроскопии, кафедра физической химии, Тверской государственный университет, г. Тверь. e-mail: [sveta\\_khizhnyak@mail.ru](mailto:sveta_khizhnyak@mail.ru)

ЧЕРВИНЕЦ Вячеслав Михайлович – доктор медицинских наук, зав. кафедры микробиологии и вирусологии, профессор, Тверской государственный медицинский университет, г. Тверь. e-mail: [chervinets@mail.ru](mailto:chervinets@mail.ru)

ПАХОМОВ Павел Михайлович – доктор химических наук, профессор, зав.кафедры физической химии Тверской государственный университет, г. Тверь. e-mail: [pavel.pakhomov@mail.ru](mailto:pavel.pakhomov@mail.ru)

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AQUEOUS SOLUTIONS BASED ON L-CYSTEINE, N-ACETYLCYSTEINE AND SILVER NITRITE**

**T.V. Potapenkova<sup>1</sup>, D.V. Vishnevetsky<sup>1</sup>, V.M. Chervinets<sup>2</sup>,  
S.D. Khizhnyak<sup>1</sup>, P.M. Pakhomov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Tver State University, Tver

<sup>2</sup>Tver State Medical University, Tver

The effect of aqueous cysteine-silver solutions (CSS) based on L-cysteine (CYS), N-acetyl-L-cysteine (NAC) and silver nitrite (AgNO<sub>2</sub>) on the development of pathogenic and opportunistic microorganisms was studied. Shown antimicrobial activity in relation to the researched test cultures. A comparative analysis of the antagonistic activity of CSS samples based on different amino acids was carried out.

**Keywords:** *L-cysteine, N-acetyl-L-cysteine, silver nitrite, self-organization processes, supramolecular hydrogel, silver nanoparticles, antibacterial activity*