



УДК 541.18.045

© 2009

В. В. Коновалова, Ю. М. Самченко, Г. А. Побігай,
Т. П. Полторацька, А. Ф. Бурбан, З. Р. Ульберг

Антимікробні мембрани на основі гідрогелевих нанореакторів

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Т. Картелем)

Розроблено метод формування наночастинок срібла в гідрогелевих нанореакторах на основі зшитих акрилових мономерів. Показано, що отримані композитні матеріали забезпечують рівномірне та пролонговане вивільнення срібла протягом тривалого проміжку часу. Досліджено антибактеріальні властивості зразків залежно від концентрації інкорпорованого срібла. Отримані гідрогелеві мембрани виявляють значну пригнічувальну дію стосовно широкого спектра мікроорганізмів, починаючи з концентрації срібла 0,01%.

Розробка та дослідження матеріалів, мембран та покриттів, що контактують з біологічними тканинами або середовищами, є надзвичайно перспективним науковим напрямом [1–3]. Увага дослідників спрямована на надання їх поверхні особливих властивостей: біосумісність, бактерицидність тощо [2–4]. Останнім часом полімерні гідрогелі знаходять широке застосування як ранозагоювальні покриття, носії для біологічно активних речовин з адресним та керованим їх вивільненням, а також як матеріали для виготовлення ендопротезів. Причиною такого різноманітного використання гідрогелів є їх унікальна пориста структура, що забезпечує набухання гідрогелів у воді та високу проникність для низько- й високомолекулярних сполук. Загальною вимогою до таких мультифункціональних систем є їх антибактеріальна активність до широкого спектра мікроорганізмів, без вивільнення будь-яких токсичних біоцидних речовин.

Антибактеріальні властивості срібла відомі давно. В багатьох роботах показано [5–7], що срібло має інгібуючу дію щодо широкого спектра бактерій та ефективно використовується для антибактеріальної терапії при опіках, загостренні хронічного остеомієліту, інфекціях сечовидільної системи тощо. Встановлено, що ключовою стадією в механізмі бактерицидної дії срібла є зв'язування Ag^+ з тіольними групами білкових молекул, що відповідають за електронний транспорт в клітині, тим самим викликаючи їх інактивацію. Використання срібла як бактерицидного агента у вигляді наночастинок привертає все більшу увагу дослідників [6, 7]. Крім того, що наночастинок срібла мають високу антимікробну активність, за

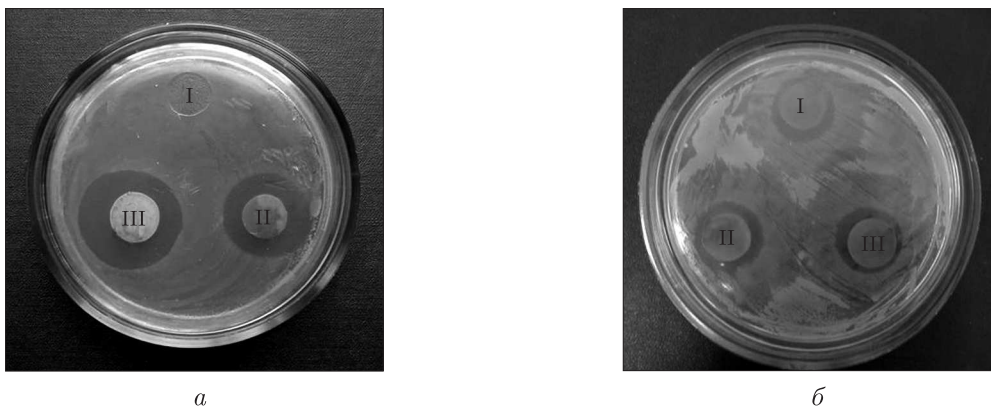


Рис. 1. Тест на зони інгібування щодо *Escherichia coli* (а: I – контроль; II – $C_{Ag} = 0,1\%$; III – $C_{Ag} = 1\%$) та *Pseudomonas aeruginosa* (б: I – $C_{Ag} = 0,01\%$; II – $C_{Ag} = 0,025\%$; III – $C_{Ag} = 0,05\%$)

рахунок надзвичайно розвиненої поверхні та металічного стану, їх антибактеріальна дія набагато триваліша у порівнянні зі сріблом в іонізованій формі.

Сучасні дослідження тривимірних гідрогелевих структур наводять на думку, що вільні проміжки між зшитими ланцюгами гідрогелів можуть використовуватись як нанореактори для формування наночастинок різної природи [8]. Так, у наших попередніх дослідженнях [9–11] було схарактеризовано розмір порових нанокомірок у гідрогелях методами диференційної сканувальної калориметрії, сорбції парів води, електронної мікроскопії та за допомогою комп'ютерного моделювання. Було показано, що превалюючий розмір комірок в гідрогелях акрилового ряду становить 10–30 нм і на їх основі можна отримати нанореактори, що дають змогу синтезувати у поровому просторі наночастинок благородних металів, магнетиту, силікатів, гідроксіапатиту тощо.

Авторами даного повідомлення було розроблено гідрогелеві нанореактори на основі зшитих кополімерів акрилового ряду, що містять наночастинок срібла, та досліджено їх антибактеріальні властивості.

Гідрогелеві матриці отримували шляхом радикальної блок-полімерізації мономерів у водному середовищі при кімнатній температурі. Ініціювання полімерізації здійснювалось за допомогою окисно-відновної системи пересульфат калію – піросульфід натрію. Формування нанорозмірних частинок срібла у порах гідрогелевих матриць здійснювали шляхом набухання їх у водному розчині нітрату срібла з подальшою обробкою розчином тартрату натрію у лужному середовищі. Концентрація нітрату срібла при цьому варіювалась у діапазоні від 0,01 до 2,5%.

Вивільнення срібла з гідрогелевих нанореакторів досліджувалось за допомогою атомно-абсорбційного спектрофотометра С-115-М1 з електротермічним атомізатором “Графіт-2”.

Мікроорганізми вирощували на повноцінному живильному середовищі Nutrient Agar No1 (Fluka). Чашки Петі засівали культурою мікроорганізмів у кількості 10^6 колонієутворювальних одиниць (КУО). Тестовий зразок діаметром 15 мм поміщали на інокульоване середовище та інкубували при $30\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 24 год. Зону інгібування оцінювали з точністю до 0,5 мм.

Було досліджено пригнічувальну дію гідрогелевих мембран з інкорпорованими наночастинками срібла стосовно грампозитивних (*Staphylococcus aureus* ССМ 209, *Bacillus subtilis*

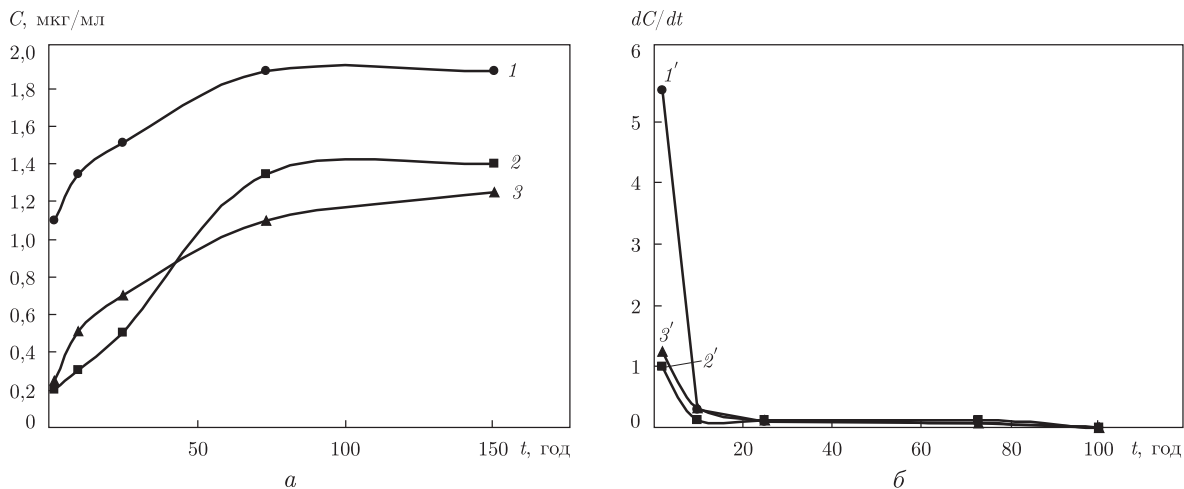


Рис. 2. Кінетика вивільнення срібла із гідрогелевих нанореакторів з концентрацією 1% на основі акриламід у акрилонітрилу ($C_{AA}: C_{AN} = 1 : 1$) (крива 1, 1') та гідрогелів з додатковим вмістом акрилової кислоти в кількості 10% (2, 2') та 25% (3, 3')

ССМ 104) та грамнегативних (*Escherichia coli* BE, *Pseudomonas aeruginosa* ССМ 1961) бактерій з Української та Чеської (ССМ) колекції мікроорганізмів.

Проведені дослідження продемонстрували, що розроблені методики інкорпорування колоїдного срібла до гідрогелевих матриць мають високий ступінь конверсії та забезпечують у подальшому його адресне поступове вивільнення протягом значного проміжку часу. Кінетику вивільнення срібла з гідрогелевих мембран на основі кополімерів акриламід, акрилонітрилу та акрилової кислоти наведено на рис. 2, а. Отримані залежності мають вигляд кривих насичення, за їх аналізом можна зробити висновок, що для неіоногенного гідрогелю на основі акриламід та акрилонітрилу характерне більш інтенсивне виділення срібла на початковому етапі (крива 1), ніж для іоногенних гідрогелів (криві 2 й 3). Таке уповільнення дифузії іонів срібла у міру зростання вмісту в гідрогелях ланок акрилової кислоти можна пояснити його взаємодіями з активними карбоксильними групами.

Як видно з рис. 2, б, початкова швидкість вивільнення срібла найвища для неіоногенного гідрогелю та становить 5,5 мкг/год, проте вже протягом доби вона знижується до 0,33 мкг/год. Таке вивільнення не можна назвати пролонгованим, оскільки основна маса срібла вивільняється вже після 2 год дифузії. Початкова швидкість вивільнення срібла для іоногенних гідрогелів набагато менша і становить в середньому 1,0–1,2 мкг/год. Найбільш стабільною є швидкість вивільнення срібла для зразків з додатковим вмістом акрилової кислоти в кількості 10% (крива 2'). Для таких зразків швидкість вивільнення на десяту годину дифузії становила близько 0,13 мкг/год і не змінювалась впродовж наступних 60 год.

Проведені мікробіологічні дослідження засвідчили, що гідрогелеві мембрани з інкорпорованими наночастинками срібла виявляють високу бактерицидну активність стосовно широкого кола мікроорганізмів. Антимікробну дію препаратів оцінювали за утворенням зони просвітлення (інгібування росту) на чашках з твердим поживним середовищем. Як видно з рис. 3, діаметр зони інгібування тим більший, чим більша концентрація срібла в досліджуваному зразку.

Вже починаючи з концентрації 0,01%, зона інгібування становить 1–2 мм як для *E. coli*, так і для *S. aureus*. Зона інгібування росту бактерій утворюється в результаті дифузії бак-

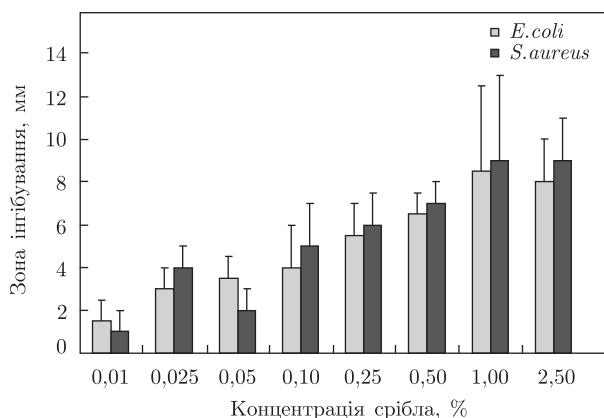


Рис. 3. Залежність впливу концентрації колоїдного срібла в зразку на діаметр зони інгібування *S. aureus* та *E. coli*

терцидного агента в середовище твердого агару. Отже, можна стверджувати, що навіть при такій концентрації антибактеріального агента, тестові зразки будуть мати не тільки поверхневу бактерицидну активність, а й забезпечувати мінімальну інгібуючу концентрацію біля (навкруги) зони контакту. При концентрації срібла в зразку 0,025% зона інгібування збільшується на 1–2 мм, але подальше збільшення концентрації до 0,05% не призводить до значного розширення зони дифузії, а в деяких випадках навіть зменшує зону інгібування.

Така тенденція спостерігається і для зразків з більшим вмістом бактерицидного агента. Так, при концентрації колоїдного срібла 0,1% відзначено значне пригнічення обох досліджених штамів, при цьому зона інгібування становить 4–7 мм. При збільшенні вмісту антибактеріального агента з 0,1 до 0,5% зона інгібування збільшується не істотно, помітне її розширення (у 1,6–1,7 рази) спостерігається при досягненні вмісту срібла 1%. При подальшому збільшенні концентрації срібла в гідрогелі розширення зони просвітлення не відзначається. Очевидно, це пов'язано з розмірами наночастинок, що утворюються в нанореакторі. При малих концентраціях срібла в гідрогелі його іони рівномірно розподіляються в проміжках між зшитими ланцюгами і при відновленні утворюють найбільш дрібні наночастинки. При збільшенні концентрації срібла в гідрогелевій матриці, його частинки можуть агрегувати і утворювати більші конгломерати: чим більший діаметр утворених частинок, тим менша їх сумарна поверхнева площа. Отже, при збільшенні вмісту срібла в нанореакторі питома площа поверхні наночастинок зменшується або залишається незмінною, а відповідно, і кількість вивільнених іонів у примембранному шарі не збільшується.

Зони інгібування щодо культури *P. aeruginosa* для зразків, що містять 0,01 (I), 0,025 (II) й 0,05% (III) срібла зображено на рис. 1, б. Зони інгібування росту є темними зонами навкруги зразків. З рисунку добре видно, що кожен зразок має первинну й вторинну зони інгібування. В первинній зоні, що становить до 3 мм, досягається концентрація срібла, яка забезпечує повну загибель бактерій (бактерицидну дію). У той самий час вторинна зона може сягати до 15 мм і забезпечувати часткове інгібування росту мікроорганізмів (бактеріостатичну дію).

Таким чином, проведені *in vitro* та *in vivo* дослідження продемонстрували, що гідрогелеві нанореактори на основі зшитих акрилових мономерів можна використовувати для формування та стабілізації нанорозмірних частинок колоїдного срібла. Показано, що отримані композитні матеріали забезпечують рівномірне та пролонговане вивільнення срібла протя-

гом тривалого проміжку часу (більше одного тижня) та виявляють значну пригнічувальну дію стосовно широкого спектра мікроорганізмів, починаючи з концентрації срібла 0,01%. Результати засвідчують високу перспективність синтезованих гідрогелевих матеріалів при їх використанні як різноманітні мембрани біомедичного призначення та антимікробні аплікатори для потреб стоматології, хірургії, комбустіології тощо.

1. Jeong B., Lee K., Gutowska A., An Y. Thermogelling biodegradable copolymer aqueous solutions for injectable protein delivery and tissue engineering // *Biomacromolecules*. – 2002. – **3**. – P. 865–868.
2. Jong S., Smedt S., Demeester J., Nostrum C. Biodegradable hydrogels based on stereocomplex formation between lactic acid oligomers grafted to dextran // *J. Control. Release*. – 2001. – **72**. – P. 47–56.
3. Hayama M., Yamamoto K., Kohori F., Sakai K. How polysulfone dialysis membranes containing polyvinylpyrrolidone achieve excellent biocompatibility? // *J. Membrane Sc.* – 2004. – **234**. – P. 41–49.
4. Mi F., Wu Yu., Shyu Sh. et al. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release // *Ibid.* – 2003. – **212**. – P. 237–254.
5. Feng Q. L., Wu J., Chen G. Q. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *E. coli* and *S. aureus* // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2000. – **52**. – P. 662.
6. Roldán M. V., Frattini A., Sanctis O. et al. Characterization and applications of Ag nanoparticles in waveguides // *Appl. Surface Sci.* – 2007. – **254**. – P. 281–285.
7. Kim J. S. Antimicrobial effects of silver nanoparticles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2007. – **5**. – P. 95–101.
8. Mohan Y., Lee K., Premkumar T., Geckeler K. Hydrogel networks as nanoreactors // *Polymer*. – 2007. – **48**. – P. 158–164.
9. Самченко Ю. М., Пасмурцева Н. А., Ульберг З. Р. Диффузия лекарственных препаратов из гидрогелевых нанореакторов // *Доп. НАН України*. – 2007. – № 6. – С. 143–148.
10. Кондратенко П. О., Самченко Ю. М., Пасмурцева Н. О., Ульберг З. Р. Моделивання пористої структури сітчастих полімерів // *Полімер. журн.* – 2007. – **29**, № 3. – С. 222–228.
11. Самченко Ю. М., Атаманенко И. Д., Полторацкая Т. П., Ульберг З. Р. Состояние воды в мелкодисперсных гидрогелях на основе акриламида и акриловой кислоты // *Коллоид. журн.* – 2006. – **68**, № 5. – С. 670–673.

Національний університет “Киево-Могилянська академія”
Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 26.02.2009

V. V. Konovalova, Yu. M. Samchenko, G. A. Pobigay, T. P. Poltoratska,
A. F. Burban, Z. R. Ulberg

Antibacterial membranes based on hydrogel nanoreactors

A method of silver nanoparticle formation in hydrogel nanoreactors based on grafted acrylic monomers has been developed. Resulting composite materials are shown to facilitate highly uniform release rates of silver for long periods of time. Antibacterial properties of samples with various concentrations of incorporated silver are researched. Silver-doped hydrogel membranes are shown to subdue numerous types of microorganisms starting with silver concentrations as low as 0.01%.