

ГИДРОГЕЛЬ НА ОСНОВЕ L-ЦИСТЕИНА И НИТРАТА СЕРЕБРА КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

В.М. Спиридонова, В.С. Савельева, М.М. Овчинников, С.Д. Хижняк, П.М. Пахомов

Получен новый низкоконцентрированный тиксотропный гидрогель на основе водных растворов цистеина и нитрата серебра. Исследовано влияние различных электролитов на свойства и структуру гидрогеля. Проведено сравнение антибактериальных свойств самого гидрогеля и его компонентов на широко распространенную патогенную микрофлору. Исследована совместимость получаемого гидрогеля с рядом антибиотиков.

ВВЕДЕНИЕ

Традиционно противомикробные свойства серебра объясняются способностью его ионов блокировать SH-группы ферментов бактерий. В микробах ионы серебра подавляют усвоение фосфатов, угнетают функции ДНК, повреждают клеточные мембраны и ингибируют трансмембранный транспорт органических и неорганических веществ, инактивируют ферменты. Морфологические изменения в бактериальных клетках подтверждены результатами электронной микроскопии [1]. Как показывают исследования, эффект уничтожения бактерий препаратами серебра в 1750 раз сильнее действия карболовой кислоты. Ионы серебра препятствуют также размножению болезнетворных бактерий, вирусов, грибов.

Цистеин же является одной из важнейших аминокислот, входит в состав почти всех аминокислотных белков и занимает центральное место в обмене серосодержащих соединений, он выполняет защитную функцию, связывает ионы токсичных тяжелых металлов, соединения мышьяка и цианиды.

В связи с этим, впервые синтезированный в 2001 г. низкоконцентрированный тиксотропный гидрогель [2] на основе водных растворов аминокислоты L-цистеина и нитрата серебра может служить антисептической матрицей для создания новых лекарственных препаратов. При изучении этой системы было установлено [3], что процесс образования гидрогеля в данной системе протекает самопроизвольно, а сам гидрогель обладает тиксотропными свойствами. В связи с этим, использование данного низкоконцентрированного (содержание растворенных веществ менее 3мМ) гидрогеля открывает широкие возможности для включения в его пространственную сетку различных биологически активных веществ, тем самым, для создания новых лекарственных препаратов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для исследования были использованы следующие реактивы: L-цистеин 99,99 % («Acros»), серебро азотнокислое 99,9 % («Acros»), сульфат, вольфрамат, молибдат и сульфит натрия х.ч., а также хлорид аммония х.ч., которые отличаются зарядами и размерами аниона. Гидрогели для исследований готовились по методике, предложенной в [3; 4].

Регистрацию ИК спектров осуществляли с помощью Фурье-ИК спектрометра «Equinox 55» фирмы Брукер, для этого синтезированный гидрогель, замораживали при -18 °С, затем размораживали в темноте, выпавший осадок отфильтровывали, высушивали, готовили таблетку с KBr и регистрировали спектр.

УФ — спектры гидрогелей, полученных добавлением различных инициаторов, регистрировали на спектрометре «Specord M-40» фирмы Carl Zeiss. Исследуемые растворы и гидрогели помещали в кюветную камеру спектрометра и с помощью программы SOFT-SPECTRA устанавливали временной интервал измерения (равный 5 мин), диапазон длин волн (от 250 до 430 нм) и записывали УФ спектры. При записи использовали кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 0,2 мм и 1 см.

Микрофотографии гидрогелей получали с помощью метода ПЭМ в Центре коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова, на электронном микроскопе «LEO 912 AB OMEGA» (Carl Zeiss, Германия). Гидрогель наносился на стандартную медную сетку с полимерной подложкой из формвара (поливинилформаль) толщиной около 100 нанометров, высушивался и помещался в электронный микроскоп.

Исследования на антимикробные свойства гидрогеля проводили в соответствии со статьей Госфармакопеи XI издания «Методы микробиологического контроля лекарственных средств» (ГФХI, вып.2, с.187) и

ГИДРОГЕЛЬ НА ОСНОВЕ L-ЦИСТЕИНА И НИТРАТА СЕРЕБРА КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

ИЗМЕНЕНИЯ №2 к аналогичной статье от 14.08.2001г. Для этого использовали тест-микроорганизмы: *Bacillus cereus* ATCC 10702 (NCTC 8035); *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Salmonella abony* ГИСК 103/39; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Для проведения посевов использовали следующие питательные среды: №1 (5% мясопептонный агар), №2 (агар Сабуро), №3 (сахарный бульон), №8 (питательный бульон).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методы ИК и УФ – спектроскопии. Проведенные ранее исследования показывают, что образование гидрогеля происходит в две стадии [4]. На первой стадии, после сливания водных растворов цистеина и нитрата серебра, получается мутный раствор, который через 4ч стояния в темноте, становится прозрачным, приобретая желтоватую окраску. Особенностью второй стадии является введение в водный цистеин-серебряный раствор инициатора гелеобразования. В качестве инициатора могут выступать анионы различных электролитов: сульфатов, сульфитов, молибдатов, вольфраматов, а также хлоридов. Нами был проведен ряд исследований, позволяющих подтвердить различное влияние этих анионов на структуру и свойства образующихся гидрогелей. Так, ранее полученные данные показывают, что влияние аниона на структуру геля проявляется в ИК спектрах вещества, из которого строится пространственная сетка геля, полученного с добавлением сульфат– аниона [3]. Поэтому данный подход был применен и для ряда других инициаторов.

Интересные данные были получены при исследовании включения аниона в структуру геля. На рисунке 1 представлены ИК спектры вещества, из которого строится пространственная сетка геля, полученного с добавлением сульфит–аниона. Можно наблюдать, что при внедрении аниона происходит сильное увеличение интенсивности поглощения в спектральном диапазоне от 1030 до 1130 см^{-1} , что связано с образованием алкилсульфоокси группировок. Это может быть связано с тем, что при растворении соли происходит образование сульфит-аниона, в котором атом серы имеет неподеленную электронную пару, за счет чего данный анион способен образовывать донорно-акцепторную связь с атомами серебра в олигомерных цепочках, в результате чего наблюдается образование гидрогеля. При старении же образца наблюдается почти

полное исчезновение полосы поглощения с максимумом на частоте 1047 см^{-1} , связанное с разрушением S=O группировок, вследствие этого происходит разрушение данной системы.

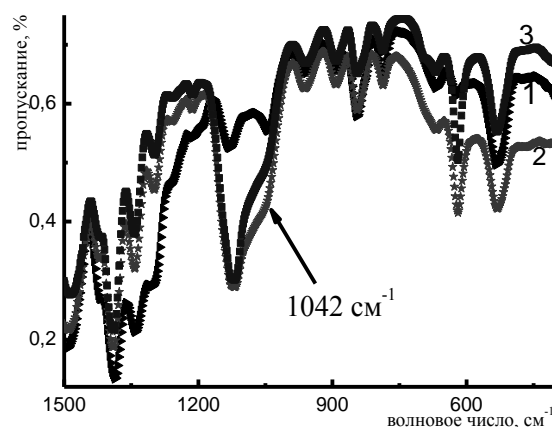


Рисунок 1. ИК спектры высушенного L-цистеин-серебряного раствора (1) и гелей, полученных добавлением Na_2SO_3 (2) и Na_2SO_3 после старения (3)

Таким образом, исследования показывают, что образование пространственной сетки геля происходит в результате включения в ее структуру аниона. Также необходимо отметить, что изменения в спектрах поглощения происходят в разных частотных диапазонах, что подтверждает различный характер иницилирующего агента.

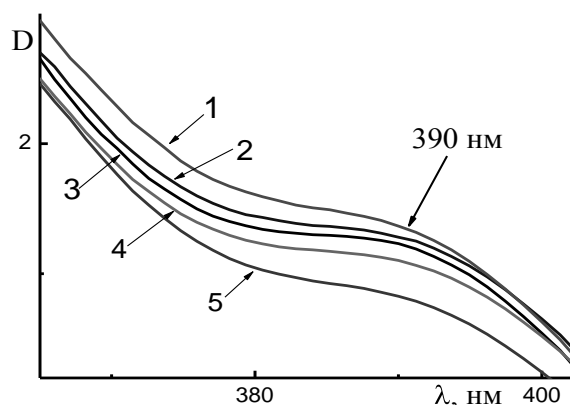
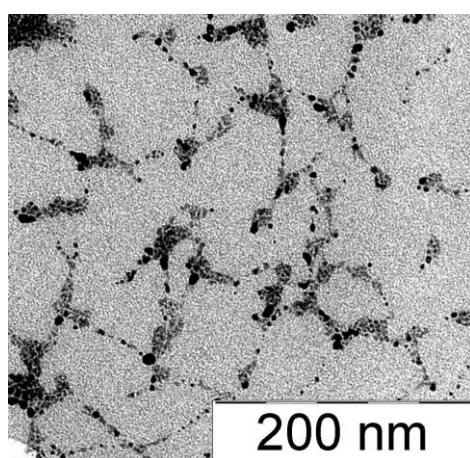


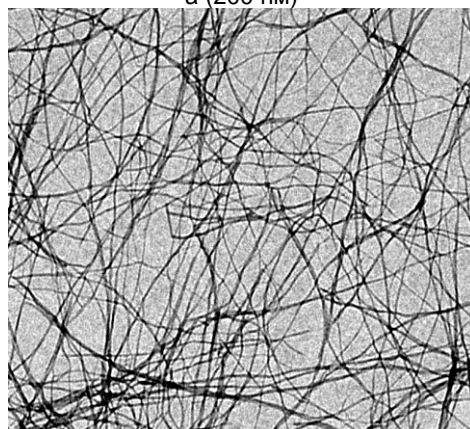
Рисунок 2. УФ- спектры созревшего цистеин-серебряного раствора (1), гелей, полученных добавлением инициаторов Na_2WO_4 (2), Na_2MoO_4 (3), Na_2SO_4 (4), Na_2SO_3 (5)

Данные метода ИК спектроскопии хорошо коррелируют с результатами, полученными методом УФ спектроскопии. На рисунке 2 представлены УФ спектры «созревшего» цистеин-серебряного раствора и гидрогелей, полученных с добавлением различных инициа-

торов. Анализ УФ спектров показывает, что интенсивность полосы поглощения с максимумом 390 нм, которая соответствует образованию олигомерных цепочек из меркаптида серебра [3], претерпевает изменения в зависимости от используемого инициатора. Снижение интенсивности данной полосы можно объяснить тем, что при добавлении электролита часть олигомерных цепочек, образовавшихся на стадии созревания раствора, разрушается с последующей перестройкой в пространственную сетку геля. Необходимо отметить, что чем меньше радиус гидратированного иона, тем сильнее он снижает интенсивность исследуемой полосы.



а (200 нм)



б (1 мкм)

Рисунок 3. Электронные микрофотографии гелей полученных добавлением различных инициаторов: хлорида аммония (а), сульфата натрия (б)

Наглядным подтверждением различного характера образующейся геле-сетки являются данные, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии. На рисунке 3 представлены микрофотографии гелей, полученных с добавлением различных инициаторов гелеобразования. Отчетливо видно,

как сильно отличаются друг от друга пространственные сетки гелей.

Таким образом, на данном этапе исследован достаточно устойчивый гидрогель, отличающийся по своей структуре и свойствам в зависимости от свойств аниона, инициировавшего его образование. Проведенные исследования показали, что при введении сульфат-аниона образующаяся гелевая сетка представляет собой многократно переплетенные «нити» олигомерных цепочек, в результате чего достигается наибольшая прочность получаемого гидрогеля (рисунок 3,б).

Следующим этапом работы стало изучение антибактериальных свойств гидрогеля на широко распространенную патогенную микрофлору (таблицы 1, 2).

Таблица 1

Микробиологическая активность L-цистеин-серебряного раствора

Тест-культуры	Разведения исследуемого образца					
	1:1 0	1:20	1:50	1:100	1:200	1:500
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	+	+
<i>Salmonella abony</i>	-	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» –отмечен рост бактерий в питательной среде; «-» –отмечено отсутствие роста бактерий в питательной среде.

В результате данных испытаний, было установлено, что L-цистеин-серебряный раствор обладает антимикробным действием в отношении эшерихии, псевдомонады, чувствительными в разведении 1:10, *Salmonella abony* чувствительна до разведения 1:20. К большим разведениям все тест-культуры были резистентны.

В свою очередь, гидрогель, на основе предложенных веществ обладает антимикробным действием в отношении грамположительных стафилококков, бацилл и грамотрицательных эшерихий в разведении 1:10, *Pseudomonas aeruginosa* до разведения 1:20, в других разведениях тест-культуры проявили резистентность. Исключение составила *Salmonella abony*, которая показала чувствительность до разведения 1:100.

ГИДРОГЕЛЬ НА ОСНОВЕ L-ЦИСТЕИНА И НИТРАТА СЕРЕБРА КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Таблица 2

Микробиологическая активность гидрогеля

Тест-культуры	Разведения исследуемого образца					
	1:10	1:20	1:50	1:100	1:200	1:500
Bacillus cereus	-	+	+	+	+	+
Bacillus subtilis	-	+	+	+	+	+
Escherichia coli	-	+	+	+	+	+
Salmonella abony	-	-	-	-	+	+
Pseudomonas aeruginosa	-	-	+	+	+	+
Staphylococcus aureus	-	+	+	+	+	+

Примечание: «+» –отмечен рост бактерий в питательной среде; «-» –отмечено отсутствие роста бактерий в питательной среде.

Для получения новых лекарственных препаратов стало интересным проследить совместим ли данный гель с различными антибиотиками. В результате проведенного эксперимента, было установлено, что в зависимости от строения и свойств антибиотика структурирование системы происходит при различных концентрация вводимого компонента. В результате была замечена интересная особенность системы, заключающаяся в том, что некоторые антибиотики способны сами, без участия электролита вызывать процесс гелеобразования, что открывает перспективы, позволяющие создавать гидрогель без добавления электролита, тем самым, исключая целую стадию в процессе приготовления биологически активной матрицы.

Необходимо отметить, что в настоящее время ведется работа по изучению влияния поливинилпирролидона, липосом, нитромексидола, заменителей крови, поливинилового спирта (ПВС) на структуру и свойства исследуемого гидрогеля так как, например, ПВС хорошо сочетается с аминокислотами, при этом улучшая доставку веществ к сердцу и скелетной мускулатуре, тем самым минимизируя отторжение имплантированных материалов [5;6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного эксперимента становится очевидным, что в отдельности каждый компонент исследуемой системы обладает значительно меньшими антибактериальными свойствами, чем гель на основе предложенных веществ. Это можно объяснить тем, что гидрогель представляет собой самоорганизованную супрамолекулярную сетку, которая затрудняет или полностью блокирует транспорт биоферментов к бактериям, в результате чего прекращается их жизнедеятельность.

Скептически следует относиться и к тому, что данная система в большом разведении (200 и более раз) не оказывает противомикробного действия, так как возможно, это связано с изначально малым (менее 0,1%) количеством исходных компонентов в исследуемых растворах и гидрогеле.

Выражаем благодарность за помощь в проведении исследования антибактериальной активности гидрогеля зав. кафедрой микробиологии и вирусологии ТГМА В.М. Червинцу.

Выражаем благодарность за помощь в проведении просвечивающей электронной микроскопии Абрамчуку С.С.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта УМНИК№ 6050р/8448 и АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы на 2009-2010гг» №2.1.1./6867.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jong-Seok Kim. // Ind. Eng. Chem. 2007. V. 14. № 4. P 718.
2. Пахомов П.М., Овчинников М.М., Хижняк С.Д., и др. // Коллоидный журн. 2004. Т. 66, № 73. С.73.
3. Егорова Е.В., Спиридонова В.М., Савельева В.С., и др. // Физико-химия полимеров. Тверь, 2008. Вып. 14. С. 195.
4. Овчинников М.М., Хижняк С.Д., Пахомов П.М. // Физико-химия полимеров. Тверь, 2008. Вып. 14. С. 186.
5. Chum-Nam Lok, Chi-Ming Ho, Rong Chen // J. Biol Inorg Chem. 2007. V.12. P. 527.
6. Ratner B.D., Leber E.R., Colleen M.B. // J. Polymer Preprints. 2003. V. 44. P. 626.