Interdisciplinary Studies of Complex Systems
No. 16 (2020) 47–59
© П. Вірич, О. Надтока, П. Вірич, В. Мартинюк, Н. Куцевол
https://doi.org/10.31392/iscs.2020.16.047

Біохімічні та медичні дослідження бактерицидної активності гідрогелів з наночастинками срібла

Павло Вірич[1,2], *Оксана Надтока*[1,3], *Петро Вірич*[4], *Віктор Мартинюк*[1,5], *Наталія Куцевол*[1,6]

Анотація. Лікування ран передбачає створення умов для регенерації тканин та запобігання бактеріальному зараження. Як антибактеріальні засоби використовують антибіотики, бактеріостатичні органічні речовини, іони металів та їх оксиди. Ми використовували гідрогелі поліакриламіду (P) та кополімеру декстран-поліакриламіду (DP) з різним вмістом зшиваючого агента N, N'-метилен-біс-акриламіду — 0.2%, 0.4%, 0.6%. Синтез AgNP в матрицях полімерів проводили ультрафіолетовою лампою при 365 нм. Розміри AgNP визначали за плазмонним резонансом на оптичних спектрами в діапазоні 300-800 нм.

Аналіз оптичного поглинання AgNP в поліакриламідних та декстран-поліакриламідних гідрогелях із кількістю зшиваючого агента 0,2%, 0,4%, 0,6% показали, що умови утворення наночастинок срібла майже однакові, а їх діаметр знаходиться в межах 20-40 нм.

Дослідження антибактеріальної активності проводили дифузійним методом на агарі Мюллера-Хінтона з використанням диких штамів Staphylococcus aureus та Escherichia coli. Лікування ран проводили сумішшю диких штамів S. aureus and E. coli. Лікування ран проводили класичним методом стерильними марлевих пов'язок, порожніми гідрогелями та з наночастинками срібла. Виявлено високу чутливість диких штамів S. aureus та E. coli до дії гідрогелю, що містить 20% розчин хлоргексидину. Діаметр затримки росту знаходиться в межах 15 мм. Середній перелік використаних матеріалів і йвщу бактерицидну активність виявляють гідрогелі 0.4P та 0.4DP з AgNP. Їх ефективність вища на 45% для S. aureus і на 20% для E. coli порівняно з класичним антисептиком — хлоргексидином. Дослідження матеріалів in vivo, проведених на відкритих ранах із штучним бактеріальним зараженням, показали прискорення процесу загоєння при використанні гідрогелів 0.4P та 0.4DP з AgNP відносно класичного методу використання стерильних марлевих пов'язок. Застосування цих гідрогелів для лікування відкритих ран, заражених S. aureus та E. coli, допомагає при кожному процесі загоєння та підтримує антисептичні умови протягом певного часу.

Серед переліку перевірених гідрогелів, найбільш доцільним з метою лікування відкритих ран, використовувати поліакриламід та кополімер декстран-20 000 — поліакриламід кількістю зшиваючого агента 0,4% (m/m), які містять наночастинки срібла з середнім діаметром 20-40 нм. Це пов'язано з їх високою ефективністю відносно грам-позитивних та грам-негативних мікроорганізмів та підтримці бактерицидних і бактеріостатичних умов, оптимальних для загоєння відкритих ран.

Ключові слова: поліакриламід, гідрогель, наночастинки срібла, антибактеріальна активність, лікування ран

[1] Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна.
[2] sphaenodon@ukr.net, https://orcid.org/0000-0002-1463-1992
[3] oks nanadtoka@ukr.net, https://orcid.org/00 -0003-1868-3885
[4] ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України», Київ, Україна. annelida@ukr.net, https://orcid.org/0000-0001-6201-3892
[5] mavispublisher@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-5311-3565
[6] kutsevol@ukr.net, https://orcid.org/0000-0002-1468-4111

Biochemical and medical studies of bactericidal activity of hydrogels with silver nanoparticles

Pavlo Virych, Oksana Nadtoka, Petro Virych,
Viktor Martynyuk, Natalia Kutsevol

Abstract. Wound treatment involves creating conditions for tissue regeneration and prevention of bacterial contamination. As antibacterial agents use antibiotics, bacteriostatic organic substances, metal ions and their oxides. We used polyacrylamide(P) and copolymer dextran-polyacrylamide (DP) hydrogels with different content of cross-linking agent N,N'-methylen-bis-acrylamide 0.2%, 0.4%, 0.6%. AgNPs synthesis in polymers matrices activated by UV-lamp at 365 nm. The size of AgNP was evaluated by means of plasmon resonance light absorption in the range at 300-800 nm.

Analysis of the light absorption of AgNPs in polyacrylamide and dextane-polyacrylamid hydrogels with crosslinking agent 0.2%, 0.4%, 0.6% indicated that the conditions of silver nanoparticles formation are almost the same and their diameter is in the range of 20-40 nm.

We investigated the antibacterial activity using a disc-diffusion method in Muller Hinton agar on wild strains Staphylococcus ureus and Escherichia coli. The infection of the open wounds in rat was provoked by mixture of E. coli and S. aureus. The treatment was carried out by classical method using covering with a sterile bandage, pure hydrogel and hydrogel with silver nanoparticles. We found a high sensitivity of wild strains of S. aureus and E. coli to the action of hydrogel containing 20% chlorhexidine solution. The diameter of the growth retardation was around 15 mm. Among materials, we used the 0.4P and 0.4DP hydrogels with AgNPs demonstrated the highest antibacterial activity. Their efficacy were higher 45% for S. aureus and 20% for E. coli compared to the classic antiseptic chlorhexidine.

The test of 0.4P and 0.4DP hydrogels in vivo that was conducted on open wounds upon experimental bacterial contamination showed an acceleration of healing process in relation to the classical method with using sterile gauze bandages. The use of these hydrogels for the treatment of open wounds infected by S. aureus and E. coli are helps to accelerate the healing process and maintains antiseptic conditions for some time.

The most appropriate for the treatment of open wounds are the polyacrylamid and the copolymer dextran- polyacrylamide with 0.4% (m/m) of cross-link agent containe silver nanoparticles with an average diameter 20-40 nm. Due to their high efficiency against gram-positive and gram-negative microorganisms, these hydrogels are optimal for open wounds treatment.

Keywords: polyacrylamide, hydrogel, argentum nanoparticles, antibacterial activity, test of wounds

Протягом останніх років значні зусилля спрямовані на розробку штучних біосумісних матеріалів. Основний вектор досліджень спрямований на створення матеріалів, що відповідають необхідним вимогам для імітації умов регенерації тканин та забезпечення стерильності. Перелік вимог задовольняють полімерні матеріали — гідрогелі, які складаються з поперечно зшитих хімічним чи фізичним способом ланцюгів [1, 2], а деякі з них виявляють власну бактерицидну активність [3]. Завдяки фізико-хімічним властивостям, низькій токсичності та здатності утримувати в структурі різні речовини, такі матеріали можна використовувати для лікуванні відкритих ран.

Відкриття та початок використання антибіотиків дозволив знизити рівень смертності від бактеріального зараження ран, але, разом з цим, з'явилися резистентні до дії антибіотиків штами [4], що спонукало до пошуку альтернативних антибактеріальних засобів. Одними з них виявилися

комбіновані гідрогелі [3]. Вони використовуються як альтернатива антибіотикам при зовнішньому застосуванні та здатні формувати антибактеріальні покриття. Активні компоненти представлені іонами важких металів, їх оксидів та екстрактами з живих організмів [3]. До принципових недоліків таких матеріалів відноситься цитотоксичність відносно еукаріотичних тканин, що обмежує сферу їх застосування.

Зважаючи на широке розповсюдження резистентних до антибіотиків штамів мікроорганізмів [4, 5, 6, 7], доцільно застосовувати як антимікробний агент речовини, до дії яких не розвиваються механізми захисту. Їх дія включає декілька мішеней, які досить консервативні, щоб швидко змінювати структуру, як наприклад, це відбувається з бета-лактамазами [8]. Важлива властивість таких сполук їх розчинність у воді. Проте, більшість оксидів металів, які придатні до застосування на живих тканинах, нерозчинні у воді, що знижує їх ефективність. Високу бактерицидну активність проявляють іони металів, серед яких, зокрема, такий бактерицидний агент, як іони арґентуму. Механізм дії Ag^+базується на взаємодіях із вільними гідроген сульфідними групами протеїнів мембрани бактеріальних клітин [3]. Але у вільному стані іони арґентуму при реакції з киснем утворюють оксид, який не виявляє помітної біологічної активності. Проблему вирішують формуванням наночастинок та їх стабілізацією різними агентами. У зв'язку з цим привертає увагу той факт, що саме структурна організація гідрогелю визначає розміри наночастинок та ефективно стабілізує їх [9].

Наночастинки срібла (AgNPs) проявляють високу бактерицидну активність. Відновлена форма срібла (Ag^0) наночастинки, не виявляє біологічної активності, але за присутності в середовищі кисню та протонів відбувається наступна реакція:

$$4Ag + O_2 = 2Ag_2O$$
$$2Ag_2O + 2H^+ = 4Ag^+ + 2H_2O$$

Саме вивільнені арґентум-іони викликають цитотоксичні ефекти [10]. Механізм дії базується на взаємодії із гідроген сульфідними групами протеїнів бактеріальних мембран, що призводить до порушення їх функції, нейтралізації трансмембранного іонного градієнту та некрозу клітини Важливо, що резистентність до дії Ag^+ розвивається повільно, порівняно з антибіотиками [11].

Насичення структури гідрогелю наночастинками срібла дозволяє надати матеріалу антибактеріальних властивостей, а високий вміст води та відсутні токсичні ефекти на оточуючі тканини сприяють більш швидкому загоєнню ран. Основу гідрогелю можуть формувати природні полімери, їх модифікації або синтетичні полімери. Серед природних, поширені альгінати та хітозан, а включення у структуру наночастинок срібла надає їм бактерицидних властивостей [12, 13]. До переваг таких матеріалів відносяться здатність до біодеградації, біологічна сумісність та низька алергенність, разом з тим час їх зберігання обмежений.

Серед гідрогелів на базі синтетичних полімерів найчастіше використовують поліакриалмід, поліакрилову кислоту, поліетиленгліколь, полівініловий спирт, полівінілпіролідон та ін. [3]. До переваг таких матеріалів відносять можливість контролювати загальну структуру і розміри пор, зав-

дяки зміні кількості введеного зшиваючого агента та концентації мономеру в процесі синтезу. Особливої уваги заслуговує поліакриламід, який імітує пептидну структуру і сприяє регенерації шкіри. Надання гідрогелям на його основі бактерицидних властивостей, попереджає бактеріальному зараженню пошкоджених тканин, що знижує ризик розвитку запалення та виразок.

Мета дослідження полягала у порівнянні бактерицидної активності гідрогелів різної структури на основі поліакриламіду та кополімеру декстран–поліакриламід із наночастинками срібла, які синтезовано *in situ* в гідрогелевих матеріалах.

Матеріали та методи

Отримання гідрогелів

Два типи хімічно зшитих гідрогелів на основі поліакриламіду (P) та прищепленого кополімеру декстран-поліакриламід (DP) отримано методом радикальної полімеризації та кополімеризації з використанням амоній церій нітрату як ініціатора та N,N'-метилен-біс-акриламіду як зшиваючого агента [14]. Для синтезу гідрогелів використовували акриламід (Sigma Aldrich) та декстран із Mw=20 000 г/моль (Fluka). Розміри пор контролювали шляхом використання різної кількості зшиваючого агента в реакційній суміші: 0,2%, 0,4%, 0,6%. Після синтезу зразки гідрогелів промивали в дистильованій воді (48 год) для видалення низькомолекулярних продуктів реакції та залишків мономеру. Висушені при кімнатній температурі зразки поміщали у 0,1 М розчин $AgNO_3$на 7 діб для насичення та досягнення рівноваги у гідрогелі. У насичених йонами арґентуму гідрогелях проводили фотохімічний синтез наночастинок срібла з використанням ультрафіолетового випромінювання (УФ лампа, 365 нм, 36 Вт) [15]. Перелік використаних полімерів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1. Використані у дослідженнях зразки полімерів

Полімер	**Кількість зшиваючого агента (m/m)**		
	0,2%	***0,4%***	***0,6%***
Поліакриламід (P)	0,2P	0,4P	0,6P
Декстран–поліакриламід (DP)	0,2DP	0,4DP	0,6DP

Наночастинки срібла мають унікальні оптичні, електричні та теплові властивості. Вони ефективно поглинають та розсіюють світло, а максимуми поглинання сильно залежать від їх розмірів. Це пов'язано з синхронними коливаннями електронів провідності металу на поверхні наночастинки при їх збудженні певними довжинами хвиль. Явище носить назву плазмонного резонансу. Завдяки таким властивостям, за характеристиками спектру поглинання можливо оцінити розміри AgNPs. Максимум плазмонних коливань знаходиться в межах 390-490 нм і характеризує розміри в діапазоні 8-100 нм. Зі збільшенням розмірів відбувається зсув максимуму поглинання у довгохвильову область спектру [16, 17]. Тому, для оцінки розмірів отриманих AgNPs проводили запис оптичного поглинання отриманих наночастинок срібла у полімерних матрицях у діапазоні 300-800 нм.

Мікробіологічні дослідження

Для перевірки матеріалу на здатність інгібувати ріст бактеріальних культур, використали дикі штами *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus,* елективно отриманих на середовищах Ендо та жовтково-сольовому агарі.

Середовище Ендо диференціює ентеробактерій по здатності ферментувати лактозу. Склад (г/л): агар — 26,5, вітамінний препарат «ЕКД» — 1,22, лужний фуксин — 0,23, лактоза — 10,7, динатрію фосфат — 0,48, сульфіт натрію — 0,83, натрій двовуглекислий — 0,03, pH = 7,3.

Жовтково-сольовий агар — тверде поживне середовище для диференційованого вирощування стафілококів з 10% хлориду натрію. Присутність яєчного жовтка дозволяє виявити фермент лецитиназу (лецитовітелазу), яку продукують піогенні стафілококи. Склад: м'ясо-пептонний агар (МПА) — 70-75% (v/v), хлорид натрію — 10% (v/m), жовткова емульсія в 0,9% NaCl– 15-20 % (v/v), pH=7,3. Для підтвердження колоній *S. aureus* використовували метод Гінса-Буррі виявлення капсули.

Оцінку чутливості вибраних штамів мікроорганізмів проводили дискодифузійним методом на твердому середовищі згідно наказу №167 МОЗ від 5.04.2007 методичні вказівки «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». Для досліджень використовували агар Мюллера-Хінтона №2 наступного складу (г/л): гідролізат казеїну — 17,5, гідролізат серця — 2, крохмаль водорозчинний (ЧДА) — 1,5, агар-агар мікробіологічний — 17, pH=7,3.

Тестові зразки гідрогелю мали однакові розміри діаметром 5 мм, аналогічно стандартним дискам з антибіотиками. Зважаючи на широке поширення антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів, як контроль використано антибіотики широкого спектру дії — цефазолін та цефтриаксон, а також варіанти гідрогелю 0,2P, 0,4P,0,6P насичені 20%-м розчином хлоргексидину. Насичення сухого полімеру відбувалося протягом 48 год у 20% розчині хлоргексидину. Після цього проводили тестування аналогічно зразків з AgNPs.

Вимірювання зони затримки росту здійснювали через добу за допомогою цифрового штангенциркуля Miol 15-240.

Статистичну обробку даних проводили згідно загальних статистичних алгоритмів з використанням тесту перевірки на нормальність Шапіро-Вілка ($p>0,05$), однофакторного аналізу ANOVA тесту Шеффе ($p<0,05$). Повторність досліду чотирикратна.

Дослідження in vivo

У дослідження було використано білих безпородних щурів чоловічої статі, що перебували в стандартних умовах утримання віварію ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України». Всі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та законом України «Про захист тварин від жорсткого поводження». Ділянку шкіри між лопатками очищали від шерсті та хірургічно видаляли область шкіри діаметром 7 мм. Попередньо тварин вводили в наркоз етаміналом натрію.

Контамінацію рани проводили ватним тампоном сумішшю бактерій *S. aureus* та *E. coli* з концентрацією клітин 10^5 у 1 мл. Через 10 хв після

зараження, рану накривали досліджуваним матеріалом та закріплювали його. У якості контролю використовували стерильні марлеві пов'язки. Пов'язки перебували на тварині 48 год. Огляд проводили через 3 та 5 діб після операції. На першому огляді (72 год) проводили бактеріальний посів з рани на елективні середовища Ендо та жовтково-сольовий агар на присутність відповідних штамів бактерій. Повторність досліду трикратна.

Результати та обговорення

Завдяки фізико-хімічним властивостям та високому вмісту води, що наближається до такого у живих тканинах, гідрогелі мають високу біосумісність. Контроль пористості структури, складу полімерних компонентів та здатність сорбувати і утримувати різні хімічні сполуки, розширює межу застосування таких матеріалів для імітації різних тканин та лікування патологічних станів [18, 19, 20]. Лікування ран передбачає використання засобів спрямованих на попередження їх бактеріальної контамінації, створення умов регенерації тканин, серед яких достатня вологість, доступ кисню та поживних речовин [2].

Характеристика AgNPs

Згідно отриманих спектрів поглинання наночастинок срібла у полімерних матрицях, наведених у таблиці 1, не виявлено суттєвих відмінностей розмірів AgNPs (рис. 1). Положення максимуму плазмонного резонансу вказує на розподіл розмірів наночастинок срібла в межах 20-40 нм. Виходячи з цього, антибактеріальні ефекти визначатимуться в основному швидкістю дифузії AgNPs з гідрогелю та досягнення бактерицидних концентрацій Ag^+ в оточуючому середовищі. Отже, основні терапевтичні ефекти, зумовлені AgNPs визначатимуться швидкістю їх дифузії з полімерної матриці та генерацією Ag^+.

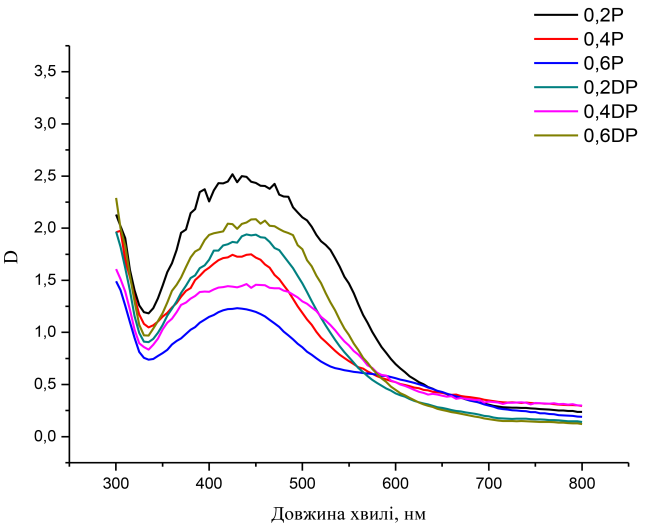


Рис. 1. Спектри поглинання наночастинок срібла, отриманих у полімерних матрицях 0,2P, 0,4P, 0,6P, 0,2DP, 0,4DP, 0,6DP

Мікробіологічні дослідження

Порівняння чутливості культур *S. aureus* та *E. coli* до застосування різних гідрогелів з наночастинками срібла проводили відносно класичного антисептика –хлоргексидину. В медицині застосовують 20% розчин хлоргексидину для знезараження поверхонь, гнійних ран та профілактики бактеріальної контамінації відкритих пошкоджень тканин.

У зв'язку з широким поширенням резистентних до антибіотиків штамів мікроорганізмів, використано стандартні диски з цефтриаксоном та цефазоліном. Результати досліджень чутливості *S. aureus* до дії хлоргексиину у гідрогелі 0,2P та наночастинок срібла у матеріалах 0,2P і 0,2DP наведено на рис. 1.

Використані дикі штами мікроорганізмів *S. aureus* та *E. coli* не резистентні до дії цефазоліну та цефтриаксону. Виявлено високу чутливість *S. aureus* до 20% хлоргексидину в 0,2P з діаметром затримки росту в межах 15 мм (рис. 1А). Відносно цього показника на 32% вищу ефективність зареєстровано при застосуванні 0,2P з AgNPs та на 45% при 0,2DP (рис. 2А).

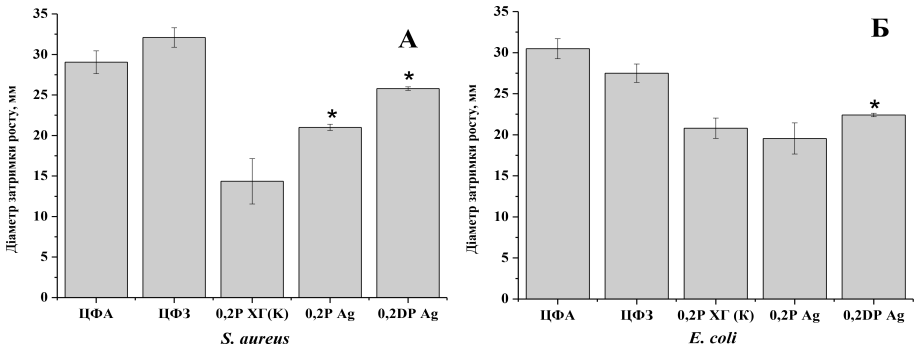


Рис. 2. Діаметр затримки росту культури *S. aureus* (А) та *E. coli* (Б) при застосуванні поліакриламіду (0,2P+Ag), кополімеру декстран-поліакриламід (0,2DP+Ag), з кількістю зшиваючого агента 0,2% (m/m), що містили наночастинки срібла. Порівняння відносно 20% розчину хлоргексидину у поліакриламідному гідрогелі (0,2P ХГ) (*p<0,05). Цефтриаксон (ЦФА) і цефазолін (ЦФЗ) — контроль антибіотикорезистентності штаму; (n=4).

Застосування гідрогелю 0,2P, насиченого 20% розчином хлоргексидину, відносно *E. coli* забезпечує затримку росту діаметром 18-20 мм (рис. 2Б). Відносно цих показників, не виявлено статистично достовірної різниці в ефективності застосування 0,2P з AgNPs, але гідрогель 0,2DP сприяє статистично достовірному збільшенню діаметру затримки росту на 10% (рис. 2Б).

Збільшення кількості зшиваючого агента до 0,4% не впливає на ефективність бактерицидної дії хлоргексидину відносно *S. aureus* (рис. 3А). Виявлено збільшення діаметру затримки росту на 47% при застосуванні гідрогелю 0,4P з AgNPs і на 45% — 0,4DP. Бактерицидна активність відносно *S. aureus* гідрогелів 0,4P та 0,4DP з AgNPs не відрізняється. Показник затримки росту культури *E. coli* при використанні гідрогелю 0,4P, насиченого 20% хлоргексидином, знаходиться в межах 18-19 мм (рис. 2Б). Відносно цього показника, статистично достовірне збільшення на 19% та 21% виявлено при використанні 0,4P і 0,4DP з AgNPs відповідно. Ефективність застосування цих типів гідрогелю відносно *E. coli* не відрізняється (рис. 3Б).

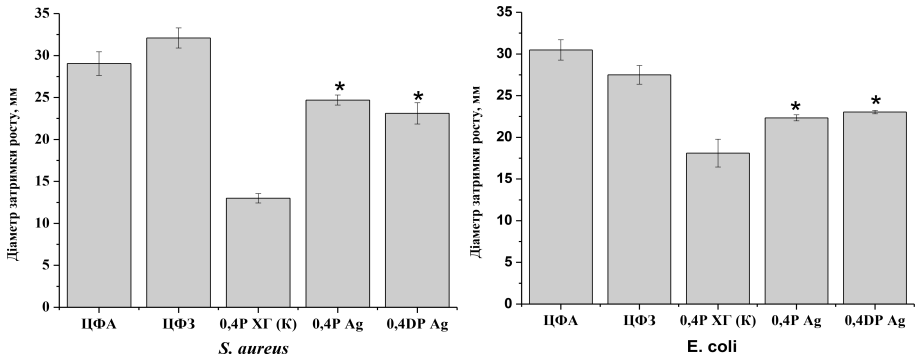


Рис. 3. Діаметр затримки росту культури *S. aureus* (А)та *E. coli* (Б) при застосуванні поліакриламіду (0,4P+Ag), кополімеру декстран-поліакриламід (0,4DP+Ag), з кількістю зшиваючого агента 0,2% (m/m), що містили наночастинки срібла. Порівняння відносно 20% розчину хлоргексидину у поліакриламідному гідрогелі (0,4P ХГ) (*p<0,05). Цефтриаксон (ЦФА) і цефазолін (ЦФЗ) — контроль антибіотикорезистентності штаму; (n=4).

Не виявлено зміни чутливості *S. aureus* до застосування гідрогелю 0,6P з 20% хлоргексидином відносно аналогічних показників для гідрогелів 0,2P та 0,4P (рис. 4А). Статистично достовірне зростання показника на 36% та 44% виявлено при використанні 0,6P і 0,6DP з AgNPs відповідно. Отримані значення не відрізняються від аналогічних показників при використанні зразків гідрогелю з кількістю зшиваючого агента 0,4%.

Отримані результати бактерицидної активності матеріалів, які містили наночастинки срібла, вказують на їх ефективність відносно грам-позитивних (*S. aureus*) та грам-негативних (*E. coli*) мікроорганізмів. Серед переліку досліджених матеріалів, найвищу ефективність виявлено для гідрогелів 0,4P та 0,4DP. Причому ефективність дії на золотистий стафілокок значно вища відносно стандартної речовини — хлоргексидину, та наближається до такої використаних антибіотиків широкого спектру — цефтриаксону та цефазоліну. Отримана різниця ефективності застосування матеріалів із наночастинками срібла відносно грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів, можливо, пов'язана з особливостями структури клітинної стінки, яка містить додаткову мембрану та тонкий шар пептидоглікану (Li, та ін. 2018). Матеріали з кількістю зшиваючого агенту 0,2% мають найнижчу бактерицидну активність відносно *S. aureus* та *E. coli*. Середній ступінь зшивки (0,4%) сприяє росту ефективності, що можливо пов'язано зі зменшенням середніх розмірів утворених наночастинок срібла (Nadtoka, Kutsevol та Naumenko, та ін. 2019). Подальший ріст щільності матеріалу (0,6%) не змінює бактерицидної активності. Варто відмітити збереження балансу між розмірами AgNPs та швидкістю їх дифузії з матеріалу. При збільшенні щільності матеріалу відбувається зниження швидкості виходу наночастинок та Ag^+ з матеріалу. Отже, серед переліку досліджених матеріалів з наночастинками срібла оптимальними за цими параметрами виявились гідрогелі 0,4P та 0,4DP.

Використання гідрогелю 0,6P з 20% хлоргексидином сприяє затримці росту *E. coli* на площі діаметром 18-20 мм (рис. 4Б). Відносно цього показника виявлено збільшення діаметра на 15% при застосуванні 0,6P з AgNPs

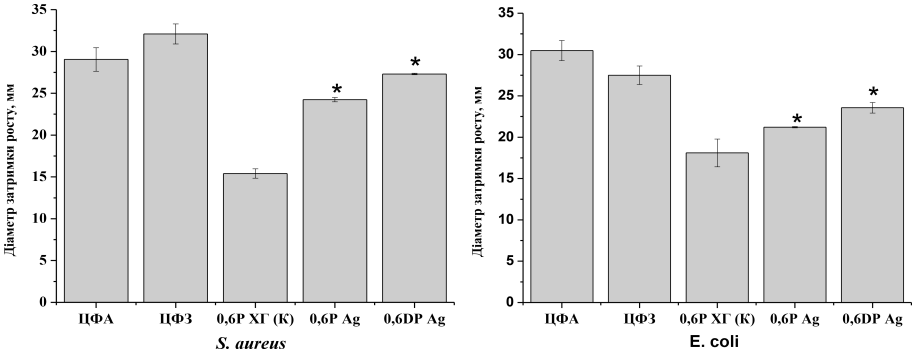


Рис. 4. Діаметр затримки росту культури *S. aureus* (А)та *E. coli* (Б) при застосуванні поліакриламіду (0,6P+Ag), кополімеру декстран-поліакриламід (0,6DP+Ag), з кількістю зшиваючого агента 0,2% (m/m), що містили наночастинки срібла. Порівняння відносно 20% розчину хлоргексидину у поліакриламідному гідрогелі (0,6P ХГ) (*p<0,05).Цефтриаксон (ЦФА) і цефазолін (ЦФЗ) — контроль антибіотикорезистентності штаму; (n=4).

та на 23% для 0,6DP. Статистично достовірної різниці між показниками не виявлено, хоча зберігається тенденція до росту бактерицидної активності при застосуванні гідрогелю 0,6DP з AgNPs.

Таким чином, варіанти гідрогелю 0,4P та 0,4DP з AgNPs володіють вищою ефективністю відносно інших зразків та класичного антисептичного засобу — хлоргексидину.

Дослідження in vivo

Згідно результатів впливу на дикі штами *S. aureus* та *E. coli*, ми використали у дослідженнях *in vivo* гідрогелі 0,4P та 0,4DP з наночастинками срібла. Контролем виступали стерильні малеві пов'язки та гідрогелі 0,4P, 0,4DP без AgNPs.

Враховуючи ідентичні початкові умови, за винятком тварин, рани яких не піддавалися бактеріальному зараженню, через 3 доби виявлено відмінності процесу загоєння.

У тварин без зараження з відкритою раною, лікування яких передбачало використання класичного марлевого матеріалу, на 3 добу не виявлено ознак запалення та контамінації, розмір рани зменшився на чверть. Через 5 діб пошкодження зменшилося вдвічі (рис. 5). Бактеріальний посів на 72 год виявив 52 колонії *Staphylococcus sp.* (найбільш ймовірно *S. epidermisis*) при відсутності *S. aureus* та *E.coli.*

У щурів з відкритими ранами, штучним зараженням та застосуванням класичного методу лікування, на третю добу не виявлено зміни розмірів пошкодження. Посіви на елективні середовища не виявили присутності *E.coli,* але зареєстровано понад 200 колоній *Staphylococcus sp* та *S. aureus.* Через 5 діб розмір рани зменшився вдвічі.

Використання 0,4P та 0,4DP без лікарських засобів при лікуванні відкритої, штучно інфікованої рани, сприяє початку її загоєння на 3 добу з відсутніми візуальними ознаками запалення та збереженням початкових розмірів. Мікробіологічні дослідження виявили 80 колоній *Staphylococcus*

sp, 3 *S. aureus* та 2 лактозопозитивні колонії. Через 5 діб розміри рани зменшилися вдвічі.

Застосування 0,4DP з наночастинками срібла на третю добу сприяє зменшенню розмірів рани у 2 рази від початкового без ознак запалення. Через 5 діб розміри рани зменшилися у 3 рази (рис. 5). На місці локалізації матеріалу присутні залишки арґентум оксиду у вигляді чорних або коричневих плям. Мікробіологічні дослідження через 72 год виявили близько 40 колоній *Staphylococcus sp.* та відсутність лактозопозитивних бактерій. Схожі результати отримано при застосуванні 0,4P з наночастинками срібла.



Рис. 5. Процес загоєння штучно інфікованої рани у щурів за умови її лікування марлевим матеріалом (контроль), гідрогелем (0,4DP) та гідрогелем з наночастинками срібла (0,4DP+AgNPs)

Отже, гідрогелі 0,4P та 0,4DP з AgNPs перешкоджають розвитку патогенної мікрофлори у відкритих ранах та сприяють швидкому їх загоєнню. Насамперед це визначається високим вмістом води у матеріалі, його щільністю, що не дозволяє проникати мікроорганізмам. Додаткова бактерицидна активність, яка забезпечується присутністю наночастинок срібла, підтримує стерильні умови.

Дослідження матеріалів в умовах *in vivo*, проведених на відкритих ранах із штучною бактеріальною контамінацією, виявили прискорення процесу загоєння при використанні поліакриламідного гідрогелю з AgNPs. Хоча відсутні ознаки значного бактеріального зараження у контрольних тварин, у них виявлена присутність патогенних представників мікрофлори (*S. aureus*) на третю добу, які викликають запалення, розвиток гнійних виразок та сепсис. Присутність інших видів роду *Staphylococcus*, найімовірніше *S. epidermisis*, пов'язано з їх конститутивною присутністю як нормальної мікрофлори поверхні шкіри [21]. Зазвичай він не викликає запальних процесів та сепсису, що характерно *S. aureus*. Відсутність антибактеріальних агентів не дозволяє дослідженим матеріалам 0,4P та 0,4DP підтримувати низьку кількість бактерій у рані. Через 72 год виявлено значну присутність у рані представників роду *Staphylococcus*, в тому числі *S. aureus* та лактозопозитивні колоній групи ентеробактерій. Джерелом останніх слугує підстилка тварин, яка контактувала з раною. Застосування 0,4P та 0,4DP з AgNPs дозволяє знизити наслідки штучного зараження рани, на що вка-

зує зменшення кількості бактерій на поверхні рани, відсутність *S. aureus* та ентеробактерій, в тому числі *E. coli*. Враховуючи виявлену кількість колоній різних видів бактерій у відкритих ранах, при лікуванні яких застосовували класичні методи і гідрогелі без AgNPs, ми припускаємо, що підтримка бактерицидних та бактеріостатичних умов у рані забезпечується завдяки присутності іонів срібла, які дифундували в рану з гідрогелю (0,4P, 0,4DP+AgNPs).

Висновки

Аналіз спектрів поглинання AgNPs у гідрогелях поліакриламід та декстан-поліакриламід з кількістю зшиваючого агента 0,2, 0,4, 0,6 %, свідчить про те, що умови формування в них наночастинок срібла майже однакові і їх діаметр знаходиться в межах 20-40 нм. Гідрогелі 0,4P та 0,4DP з AgNPs виявляють вищу бактерицидну активність відносно *S. aureus* та *E.coli* порівняно з іншими зразками гідрогелю та класичним антисептиком — хлоргексидином. Використання цих гідрогелів для лікування відкритих ран, які заражені *S. aureus* та *E. coli*, дозволяє прискорити процес загоєння та підтримує антисептичні умови протягом певного часу.

Отже, серед переліку перевірених гідрогелів, найбільш доцільно з метою лікування відкритих ран, використовувати поліакриламід та кополімер декстран-поліакриламід з кількістю зшиваючого агента 0,4% (m/m), які містять наночастинки срібла з середнім діаметром 20-40 нм, що пов'язано з їх високою ефективністю відносно грам-позитивних та грам-негативних мікроорганізмів, підтримці бактерицидних і бактеріостатичних умов, оптимальних для загоєння відкритих ран.

Подяки

Висловлюємо вдячність завідувачу відділу біофізики ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України» Карасю А.Ф. за допомогу у проведенні досліджень *in vivo* та надане необхідне обладнання.

Література

1) Zheng, Y., et al. 2017. Injectable Hydrogel-Microsphere Construct with Sequential Degradation for Locally Synergistic Chemotherapy. *ACS applied materials & interfaces* 4, 9 : 3487–3496. http://doi.org/10.1021/acsami.6b15245
2) Zhou, H., et al. 2017. The progress and challenges for dermal regeneration in tissue engineering. *Journal of biomedical materials research. Part A* 105, 4 : 1208-1218. https://doi.org/10.1002/jbm.a.35996
3) Li, S., et al. 2018. Antibacterial Hydrogels. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wu?rttemberg, Germany)* 5, 5 : 1700527. https://doi.org/10.1002/advs.201700527
4) Boehle, K.E., et al. 2017. Utilizing Paper-Based Devices for Antimicrobial-Resistant Bacteria Detection. *Angewandte Chemie (International ed. in*

English) 56, 24 : 6886–6890. https://doi.org/10.1002/anie.201702776

5) Zipperer, A., et al. 2016. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* 7613, 535 : 511–516. https://doi.org/10.1038/nature18634
6) Molton, J.S., P.A. Tambyah, B.S. Ang, M.L. Ling, and D.A. Fisher. 2013. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 9, 56 : 310–1318. https://doi.org/10.1093/cid/cit020
7) van Hoek, A.H., D. Mevius, B. Guerra, P. Mullany, A.P. Roberts, and H.J. Aarts. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology* 2 : 203. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203
8) Naas, T., et al. 2017. Beta-lactamase database (BLDB) — structure and function. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 32, 1 : 917–919. https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235
9) Liao, C., Y. Li, and S.C. Tjong. 2019. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *International journal of molecular sciences* 20, 2 : 449. https://doi.org/10.3390/ijms20020449
10) Xiu, Z.-M., J. Ma, and P.J.J. bAlvarez. 2011. Differential Effect of Common Ligands and Molecular Oxygen on Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles versus Silver Ions. *Environmental Science & Technology* 45 : 9003–9008. https://doi.org/10.1021/es201918f
11) Knetsch, M.L.W., and L.H. Koole. 2011. New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers.* 3, 1 : 340–366. https://doi.org/10.3390/polym3010340
12) Stojkovska, J., D. Kostić, Ž. Jovanović, M. Vukašinović-Sekulić, V. Mišković-Stanković, and B. Obradović. 2014. A comprehensive approach to in vitro functional evaluation of Ag/alginate nanocomposite hydrogels. *Carbohydrate Polymers* 111 : 305–314. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.063
13) Tang, H., A. Lu, L. Li, W. Zhou, Z. Xie, and L. Zhang. 2013. Highly antibacterial materials constructed from silver molybdate nanoparticles immobilized in chitin matrix. *Chemical Engineering Journal* 234 : 124–131. https://doi.org/10.2147/IJN.S154748
14) Nadtoka, O., N. Kutsevol, V. Krysa, and B. Krysa. 2018. Hybrid polyacryamide hydrogels: Synthesis, properties and prospects of application. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 672, 1 : 1–10.
15) Nadtoka, O., N. Kutsevol, A. Naumenko, and P. Virych. 2019. Photochemical synthesis and characterization of hydrogel-silver nanoparticle composites. *Research on Chemical Intermediates*, 1–12.
16) Deen, G.R., and V. Chua. 2015. Synthesis and Properties of New "Stimuli" Responsive Nanocomposite Hydrogels Containing Silver Nanoparticles. *Gels* 1, 1 : 117–134.
17) Bulavin, L., N. Kutsevol, V. Chumachenko, D. Soloviov, A. Kuklin, and A. Marynin. 2016. SAXS Combined with UV-vis Spectroscopy and QELS:

Accurate Characterization of Silver Sols Synthesized in Polymer Matrices. *Matrices. Nanoscale research letters* 11, 1 : 35.

18) Naahidi, S., et al. 2017. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology advances* 35, 5 : 530–544. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.006

19) Annabi, N., et al. 2017. Engineering a sprayable and elastic hydrogel adhesive with antimicrobial properties for wound healing. *Biomaterials* 139 : 229–243. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.05.011

20) Li, T., et al. 2019. Silk fibroin/carboxymethyl chitosan hydrogel with tunable biomechanical properties has application potential as cartilage scaffold. *International journal of biological macromolecules* 137 : 382–391. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.245

21) Dréno, B., et al. 2016. Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV* 30, 12 : 2038–2047. https://doi.org/10.1111/jdv.13965