

В.Б. НЕЙМАШ,¹ Г.Д. КУПЯНСЬКИЙ,¹ І.В. ОЛЬХОВИК,¹ В.І. СТЬОПКІН,¹
В.Ю. ПОВАРЧУК,¹ П.М. ЛИТВИНЧУК,¹ І.С. РОГУЦЬКИЙ,¹ Ю.О. ФУРМАНОВ,²
С.М. ТИТАРЕНКО³

¹ Інститут фізики НАН України

(Просп. Науки, 46, Київ 03650; e-mail: neimash@gmail.com)

² Центр інноваційних медичних технологій НАН України

(Вознесенський узвіз, 22, Київ)

³ Інститут хірургії і трансплантології імені А.А. Шалімова АМН України

(Вул. Героїв Севастополя, 30, Київ)

ФОРМУВАННЯ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА У ГІДРОГЕЛІ ПВС-ПЕГ ПІД ДІЄЮ ОПРОМІНЕННЯ ЕЛЕКТРОНАМИ

УДК 539

Методами оптичної спектроскопії та растрової електронної мікроскопії досліджено формування наночастинок срібла в процесі радіаційної зшивки електронним опроміненням гідрогелю на основі системи полівинилового спирту – поліетиленгліколю. Показано формування наночастинок розміром 40–70 нм та їх згупчення масштабу сотень нанометрів. Загальна концентрація і розмір наночастинок корелюють з концентрацією іонного срібла у вихідному гелі та з дозою електронного опромінення. Утворення наночастинок інтерпретовано як результат радіаційно-хімічного відновлення срібла в умовах розчину, просторово обмеженого комітками 3-d мікроструктури зшитого гідрогелю. Отриманий радіаційно-зшитий гідрогель демонструє антисептичний дію на 7 із 8 випробуваних видів мікроорганізмів вже при концентраціях атомів срібла $(1-3) \cdot 10^{-5}$, що принаймні на порядок менше аналогічно діючих концентрацій іонного та колоїдного срібла.

Ключові слова: наносрібло, гідрогель, електронне опромінення, антисептик.

1. Вступ

Радіаційно-зшиті полімерні гідрогелі на основі системи полівинилового спирту (ПВС) – поліетиленгліколю (ПЕГ) відносяться до класу “м’якої речовини”. Вони мають консистенцію пружного желе, можуть містити до ~95% води. Структурно являють собою 3-вимірну сітку з ланцюгових макромолекул полімерів, пов’язаних між собою радикальними зв’язками (зшивками). Розмір коміток такої сітки становить порядок 0,1–1,0 мкм. Радикали для зшивки утворюються в результаті радіолізу води високоенергетичним випромінюванням, зокрема релятивістськими електронами [1]. Комітки сітки заповнені водою, молекули якої утримуються в ній полярною взаємодією з неоднорідностями еле-

ктричного поля полімерних ланцюгів. Такі матеріали все ширше застосовуються у медицині в ролі перев’язувальних матеріалів при лікуванні відкритих ран та опіків [2]. Вони стерильні, не липнуть до рани і підтримують в ній вологе середовище, що сприяє пришвидшенню процесів загоєння, можуть містити в собі лікувальні засоби. Однак існує проблема надання бактерицидних властивостей медичним пов’язкам із радіаційно-зшитих полімерних гідрогелів. Вона зумовлена тим, що іонізуюча радіація, яка використовується для зшивки, деструктивно впливає на більшість фармакологічних засобів, розміщених в гідрогелі. Наприклад, антибіотики після опромінення втрачають свою біологічну активність більше ніж на половину.

Ефективним антисептичним засобом, який вочевидь має бути мало чутливим до радіації, є наночастинки металевого срібла [3]. Наносрібло реагує з клітинною мембраною збудників інфекційних захворювань, що являє собою структуру з особливих білків (пептидогліканів), блокуючи їх властивість

© В.Б. НЕЙМАШ, Г.Д. КУПЯНСЬКИЙ,
І.В. ОЛЬХОВИК, В.І. СТЬОПКІН,
В.Ю. ПОВАРЧУК, П.М. ЛИТВИНЧУК,
І.С. РОГУЦЬКИЙ, Ю.О. ФУРМАНОВ,
С.М. ТИТАРЕНКО, 2019

передавати кисень всередину клітини бактерії. Це і призводить до загибелі мікроорганізму. При цьому дія срібла специфічна не по ДНК інфекції (як у антибіотика), а по клітинній структурі. Це пов'язано з тим, що клітини вищих організмів мають мембрани зовсім іншого типу (що не містять пептидогліканів). Тому частинки наносрібла не діють на клітини таких організмів, в тому числі і людини [4–6].

Нещодавно було показано, що можливе формування наночастинок срібла безпосередньо в об'ємі полімерного гідрогелю на основі поліакрилу в результаті радіаційно-хімічної реакції відновлення іонного срібла з використанням гамма-опромінення [7]. Метою даної роботи є дослідити можливості формування наночастинок срібла в об'ємі більш біологічно сумісного гідрогелю на основі системи ПВС–ПЕГ під час його зшивки електронним опроміненням, а також оцінити їх антисептичну здатність відносно найбільш актуальних у медицині мікроорганізмів.

2. Експеримент

Досліджено процес формування наночастинок срібла у гідрогелі ПВС–ПЕГ, властивості якого детально описані в [1]. Для його виготовлення використано водний розчин полівинилового спирту марки ПВС-11/2 та поліетиленглюколу марки ПЕГ-6000. В ролі розчинника полімерів використано набір розчинів нітрату срібла AgNO_3 у дистильованій воді з концентраціями (С): 0; 10; 20; 30; 60; 120; 240 мг/л (тобто 0,001–0,024%). Досліджувані зразки являли собою герметичні поліетиленові пакети розміром 4×6 см, які містили по 5 см^3 гідрогелю з певною концентрацією AgNO_3 . При розміщенні на горизонтальній поверхні рідкий гель в них утворює однорідний шар товщиною приблизно 0,2 см. Виготовлено і досліджено по 5 таких зразків гідрогелю на кожну концентрацію AgNO_3 . Радіаційна зшивка гідрогелю здійснювалася електронами з енергією 4 МеВ в діапазоні доз 25–140 кГр при кімнатній температурі. Джерело радіації – лінійний прискорювач електронів “Електроніка”. В результаті зшивки гідрогель зразків переходив із рідкого стану у стан еластичного гумо-подібного желе, здатного пружно розтягуватися до розриву приблизно вдвоє. Виготовлені таким чином пластини радіаційно-зшитого гі-

дрогелю з різним вмістом AgNO_3 були використані для вимірювання спектрів оптичного поглинання в діапазоні 200–600 нм (спектрометр SHIMAZDU UV-2450), для вивчення морфології поверхні зневоднених гідрогелів методом растрової електронної мікроскопії РЕМ (мікроскоп JSM-35) та для аналізу бактерицидної активності гідрогелю стосовно 8 видів бактерій по затримці зони росту.

3. Результати та їх обговорення

Виявилось, що присутність AgNO_3 у зазначених концентраціях не впливає помітним чином на спектр гідрогелю до опромінення електронами. А от після опромінення дозами, необхідними для радіаційної зшивки гідрогелю, в його спектрі з'являється широка смуга з максимумом в області 400 нм. За всіма ознаками ця смуга відповідає плазмонному поглинанню в металевих наночастинках [8]. Її амплітуда та розташування максимуму корелюють з концентрацією AgNO_3 у вихідному гелі. Це проілюстровано на рис. 1, де наведено спектри поглинання світла зразків гідрогелю з різним вмістом AgNO_3 при однаковій дозі опромінення (D).

Зазначена смуга плазмонного поглинання з'являється лише після опромінення і лише у зразках, що містять AgNO_3 . Вочевидь вона зумовлена плазмонами в наночастинках срібла, що виникають в результаті індукованого радіацією відновлення металевого срібла. Тоді механізм утворення наночастинок срібла можна представити у такому вигляді. При розчиненні AgNO_3 у воді утворюються іони Ag^+ та NO_3^- . В звичайних умовах електростатичне відштовхування не дає змоги іонізованим атомам срібла наблизитись один до одного і преципітувати у скупчення. Під час же опромінення розчину високоенергетичними електронами відбувається його іонізація з утворенням великої кількості вільних електронів. Частина з них захоплюють позитивні іони Ag^+ переходячи у нейтральний стан Ag^0 . Електростатичне відштовхування між атомами срібла зникає і вони збираються у скупчення, які врешті і формують наночастинки металевого срібла. Така модель пояснює кореляцію вихідної концентрації AgNO_3 не тільки з амплітудою положення плазмонного поглинання, а й з положенням її максимуму, яке залежить від розміру наночастинок [8]. Табл. 1 ілюструє вплив вихідної концентрації AgNO_3 на положення максимуму плазмон-

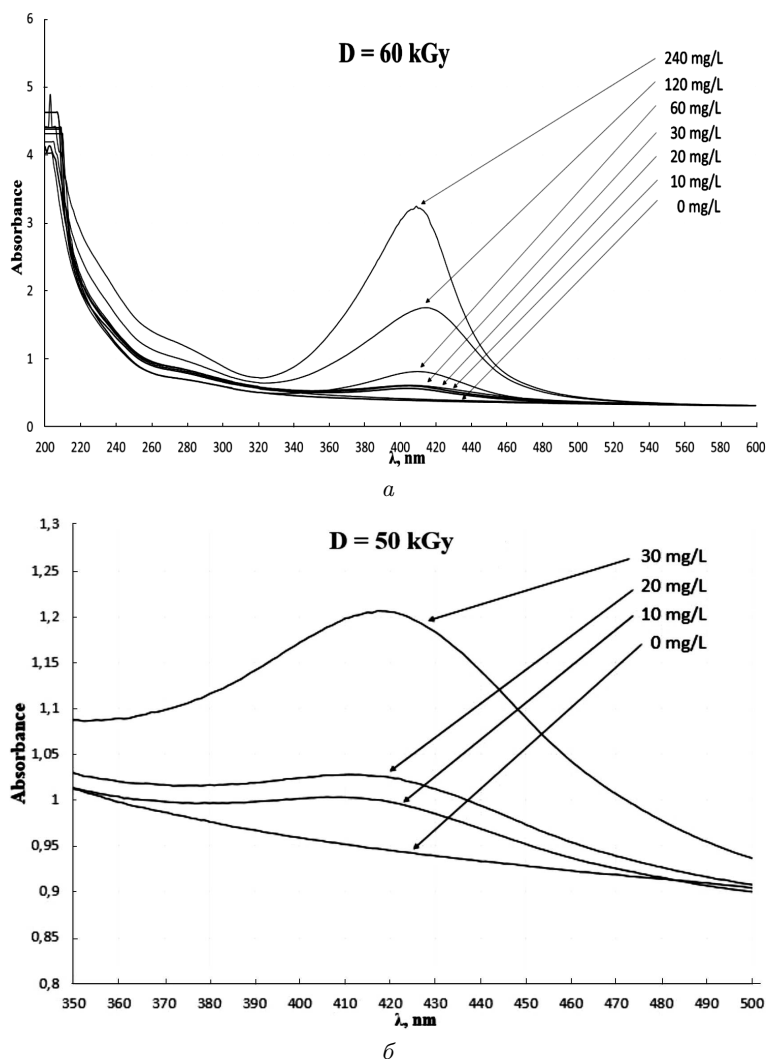


Рис. 1. Спектри оптичного поглинання гідрогелю з різним вмістом AgNO₃ після опромінення електронами: а – загальний вигляд спектрів; б – ділянка плазмонного поглинання для зразків з найменшими концентраціями AgNO₃ (у збільшеному масштабі)

ної смуги λ і на переважний (домінантний) розмір d наночастинок відповідно емпіричному виразу:

$$d = (24 + 100(\lambda_{\max} - 385))^{0,5} + 4,9$$

з роботи [9] для частинок срібла, завислих у воді. Видно, що з ростом концентрації AgNO₃ відбувається суттєве збільшення розміру наночастинок.

На рис. 2 показано, як змінюється оптичний спектр гідрогелю зі збільшенням дози електронного опромінення з однаковим вихідним вмістом

AgNO₃ 20 мг/л. Чітко видно зростання амплітуди та зсув положення піка полоси плазмонного поглинання. У табл. 2 наведено значення довжини хвилі λ на піку полоси та відповідні оцінки домінантного розміру наночастинок при збільшенні дози від 25 до 60 кГр.

З рис. 2 та табл. 2 видно, що при даній концентрації AgNO₃ збільшення дози опромінення веде до збільшення кількості та розмірів наночастинок Ag. Це може означати, що при дозах оптимального для даного гідрогелю зшивання (30–40 кГр)

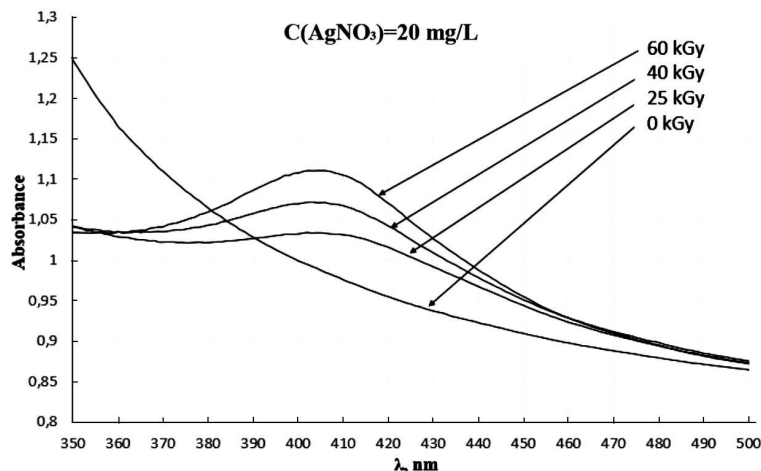


Рис. 2. Зміна спектра оптичної щільності гідрогелю залежно від дози опромінення в діапазоні 0–60 кГр

значна частина срібла ще залишається у іонному стані. З іншого боку, треба враховувати, що коефіцієнт заломлення світла у радіаційно-зшитому гідрогелі може бути іншим, ніж у чистій воді і може зростати зі збільшенням дози опромінювання. Згідно з [10] це може вплинути на залежність положення максимуму плазмонної смуги від розміру наночастинок в бік завищення їх реальних значень.

Електронно-мікроскопічні (РЕМ) дослідження безпосередньо радіаційно-зшитих гідрогелів

Таблиця 1. Вплив вихідної концентрації AgNO_3 на положення максимуму плазмонної смуги λ і на переважний розмір d наночастинок

Концентрація AgNO_3 , мг/л	λ , нм	Розмір наночастинок, нм
10	406	51
20	411	56
30	417	62

Таблиця 2. Вплив дози опромінення на положення максимуму плазмонної смуги λ і на переважний розмір d наночастинок

Доза опромінення, кГр	λ , нм	Розмір наночастинок, нм
25	402	46
40	403	48
60	405	50

ускладнено неможливістю досягнення потрібного вакууму у мікроскопі через інтенсивне випаровування води, з якої в основному складається гідрогель. Однак принципову інформацію про наявність і розміри металевих частинок у гідрогелі за допомогою РЕМ можна отримати і на зневоднених тривалою сушкою його зразках. При цьому об'єм зразків зменшується майже на порядок, концентрація Ag -частинок зростає і частина з них коагулюють у скупчення. Однак це не завадило виявити присутність в такому “сушеному” гідрогелі металевих частинок розміром 40–70 нм та їх дифузних скупчень масштабу сотень нанометрів. Для проведення досліджень в РЕМ на поверхню матеріалу наносили тонкий (30–50 нм) шар вуглецю, оскільки висушені зразки мають низьку електропровідність і заряджаються при опроміненні електронним зондом.

На рис. 3 наведено РЕМ-зображення поверхні опроміненого зразка гідрогелю в режимі повільних вторинних електронів. Розмір найменших плям становить 40–45 нм, а великі масштабу 100–300 нм виглядають як скупчення менших. Відповідність цих плям скупченням металевого срібла перевірялась додатковими дослідженнями в режимі “сору” (склад). В цьому разі сигнал, що фіксується мікроскопом, формується за рахунок швидких зворотно відбитих електронів, кількість яких переважно визначається середнім атомним номером об'єкта і слабо пов'язана із топографією поверхні. В проведених дослідженнях наночастинок

ми срібла вважали саме такі, що давали помітний сигнал в режимі "comp".

На рис. 4 наведені електронно-мікроскопічні зображення однієї ділянки гідрогелю, отримані в режимах повільних вторинних електронів (а) та зворотно відбитих електронів (б).

На зображенні в повільних електронах окрім яскравих плям від срібних наночастинок спостерігаються і інші деталі поверхні зразка, тоді як на зображенні в зворотно відбитих електронах в основному видно лише наночастинки срібла та їх скупчення розмірами 50–150 нм.

Необхідно зважати на те, що під час опромінення одночасно з відновленням срібла і формування його наночастинок відбувається процес радіаційної зшивки полімерів, в результаті якого виникає 3-d сітка із полімерних макромолекул. Розмір комірки такої сітки має масштаб порядку сотень нанометрів. Тому така наноструктуризація гідрогелю може становити певну перешкоду дрейфу наночастинок срібла і їх коагуляції у крупніші скупчення та перетворенню в звичайне колоїдне срібло. Можливо саме це є причиною відносно малої зміни домінуючого розміру наночастинок при збільшенні в рази концентрації AgNO_3 та дози опромінення. Важливо зазначити, що в розглянутих діапазонах концентрацій срібла та доз електронного опромінювання базовий радіаційно-зшитий гідрогель зберігає фізико-хімічні властивості, необхідні для медичного застосування [1].

Для оцінки бактерицидних властивостей отриманих зразків радіаційно-зшитого гідрогелю з наночастинами срібла вимірювалася ширина зони затримки росту 8 видів мікроорганізмів довкола зразків зшитого гідрогелю з 8 різними концентраціями срібла. В чашках Петрі з поживним середовищем Mueller Hinton II Agar виробництва фірми Liofilchem (Італія) висівалися 8 видів мікроорганізмів лабораторних штамів. Використовували бактеріальну суспензію в концентрації 0,5 Мак Фарланда для бактерій та 2 Мак Фарланда для грибів. Вимірювали мутність за допомогою приладу Densimat виробництва фірми bioMerieux (Франція). На засіяну поверхню клали стерильні зразки досліджуваного гідрогелю у формі квадратів 10×10 мм і товщиною 3 мм з різним вмістом срібла. Використано 8 дискретних значень концентрації AgNO_3 (від 0 до 240 мг/л) у вихідному гідрогелі. Через 24 години перебування в термоста-

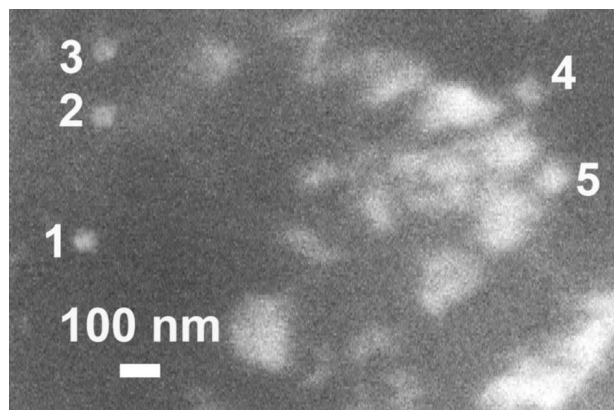


Рис. 3. Поверхня зразка з вихідним вмістом AgNO_3 30 мг/л, опроміненого дозою 50 кГр. Цифрами позначено наночастинки срібла характерного розміру: 1–3 – 40–45 нм, 4 – 55 нм, 5 – 70 нм

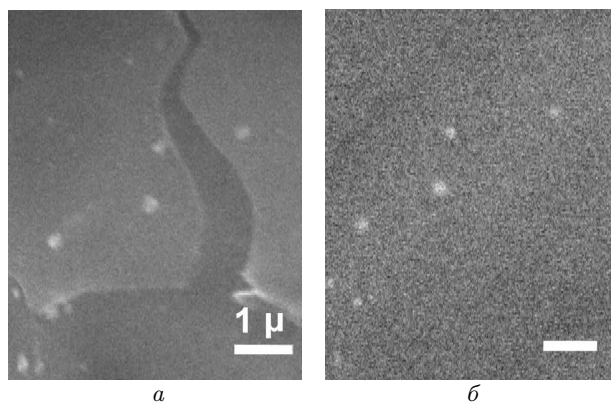


Рис. 4. Електронно-мікроскопічні зображення поверхні висушеного гідрогелю, отримані в режимах повільних вторинних електронів (а) та зворотно відбитих електронів (б)

Таблиця 3. Результати бактеріологічного аналізу

М/О	Концентрація AgNO_3 , мг/л							
	0	10	20	30	50	60	120	240
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	10	12	15	17	20
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0	10	10	10	10	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	14	15	17	20	20	20	20
<i>E.coli</i>	0	0	10	15	15	15	15	15
<i>St. aureus</i>	0	0	0	15	20	20	20	20
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0	0	25	25	25
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	10	10	10	10	10

ті при 37 °С вимірювали ширину зони затримки росту мікроорганізмів довкола зразків гідрогелю. Види застосованих мікроорганізмів та значення концентрації AgNO_3 у вихідних зразках вказані у табл. 3 (лівий стовпчик та верхній рядок відповідно). Там же на перехрестях відповідних значень концентрації AgNO_3 та назв мікроорганізмів приведені результати вимірювань ширини (в мм) зони затримки росту. Доза електронного опромінення 60 кГр – однакова для всіх зразків.

Видно появу і зростання зони затримки росту бактерій з ростом концентрації срібла у 7 із 8 видів мікроорганізмів. Для більшості він проявляється вже при концентраціях 10–30 мг/л, тобто $(1-3) \times 10^{-5}$ або 0,001–0,003 вагових відсотків, що значно менше діючих концентрацій іонного та колоїдного срібла [11, 12]. Це свідчить про бактерицидну дію срібла саме у стані наночастинок.

4. Висновки

Показано можливість формування наночастинок срібла в біосумісному гідрогелі на основі системи ПВС–ПЕГ в процесі його радіаційної зшивки високоенергетичними електронами.

Двома незалежними методами визначено вплив вихідної концентрації іонного срібла та дози електронної радіації на домінуючий розмір наночастинок у радіаційно-зшитому гідрогелі.

Показано, що бактерицидна ефективність радіаційно-зшитого гідрогелю ПВС–ПЕГ зі сріблом визначається наночастинами срібла.

1. В.В. Неймаш, Г.Д. Купянський, І.В. Ольховик, В.Ю. Поварчук, І.С. Рогучький. Фізичні властивості радіаційно-зшитих гідрогелів полівінілового спирту–поліетиленгліколю в контексті застосування в медичних пов'язках. *УФЖ* **62**, № 5, 400 (2017).
2. E. Caló, V.V. Khutoryanskiy. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur. Polymer J.* **65**, 252 (2015).
3. S. Prabhu, E.K. Poulouse. Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications and toxicity effects. *Int. Nano Lett.* **2**, 1 (2012).
4. L. Braydich-Stolle, S. Hussain, J. Schlager. Cytotoxicity of nanoparticles of silver in mammalian cells. *Toxicol. Sci.* **2**, 412 (2005).
5. I. Soni, B. Salopek-Bondi. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interf. Sci.* **27**, 70 (2004).
6. K. Woraz. Antimicrobial property of silver. *Toxicol.* **12**, 89 (2001).

7. B. Boonkaew, P.M. Barber, S. Rengpipat, P. Supaphol, M. Kempf, J. He, V.T. John, L. Cuttle. Development and characterization of a novel, antimicrobial, sterile hydrogel for burn wounds: Single-step production with gamma irradiation creates silver nanoparticles and radical polymerization. *J. Pharm. Sci.* **103**, 3244 (2014).
8. М.Л. Дмитрук, С.З. Малинич. Поверхневі плазмонні резонанси та їх прояв у оптичних властивостях наноструктур благородних металів. *УФЖ. Огляди* **9**, № 1, 3 (2014).
9. S.Z. Malynych. Estimation of size and concentration of silver nanoparticles in aqueous suspensions from extinction spectra. *J. Nano-Electron. Phys.* **2**, No. 4, 5 (2010).
10. A.D. McFarland, R.P. Van Duyne. Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity. *Nano Lett.* **3**, No. 8, 1057 (2003).
11. Л.Д. Кістерська, О.Б. Логінова, В.В. Садохін, В.П. Садохін. Інноваційна технологія виробництва біосумісних нанодезинфектантів нового покоління. *Вісник НАН України* **1**, 39 (2015).
12. Shahid Ullah Khan, Tawfik A Saleh, Abdul Wahab, Muhammad Hafeez Ullah Khan, Dilfaraz Khan, Wasim Ullah Khan, Abdur Rahim, Sajid Kamal, Farman Ullah Khan, Shah Fahad. Nanosilver: New ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. *Int. J. Nanomed.* **13**, 733 (2018).

Одержано 02.10.18

V.V. Neimash, H.D. Kupianskyi, I.V. Olkhovik,
V.I. Styopkin, P.M. Lytvynchuk, V. Yu. Povarchuk,
I.S. Roguts'kyi, Yu.A. Furmanov, S.M. Titarenko

FORMATION OF SILVER NANOPARTICLES IN PVA-PEG HYDROGEL UNDER ELECTRON IRRADIATION

S u m m a r y

The formation of silver nanoparticles in a hydrogel on the basis of polyvinyl alcohol and polyethylene glycol at its crosslinking under the electron irradiation has been studied using the optical spectroscopy and scanning electron microscopy methods. The growth of nanoparticles 40–70 nm in size and their clustering into aggregates about a few hundred nanometers in diameter are demonstrated. The total concentration of nanoparticles and their size correlate with the concentration of ionic silver in the initial solution and the electron irradiation dose. The formation of nanoparticles is interpreted as a result of the radiation-induced chemical reduction of silver in the solution that is spatially confined in the cells of a 3D microstructure in the crosslinked hydrogel. The radiation-crosslinked hydrogel demonstrates an antiseptic effect for 7 of 8 tested microorganisms at silver concentrations of 0.001–0.003 wt.%, which is at least an order of magnitude lower than effective concentrations of ionic and colloidal silvers.