

Оксана НАДТОКА¹, канд. хім. наук, ст. наук. співроб.
ORCID ID: 0000-0003-1868-3885
e-mail: nadтока_oksana@knu.ua

Павло ВІРИЧ¹, канд. біол. наук, ст. наук. співроб.
ORCID ID: 0000-0002-1463-1992
e-mail: sphaenodon@ukr.net

Наталія КУЦЕВОЛ¹, д-р хім. наук, ст. наук. співроб.
ORCID ID: 0000-0002-1468-4111
e-mail: kutsevol@ukr.net

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ГІДРОГЕЛІВ НА ОСНОВІ ПОЛІАКРИЛАМІДУ ТА ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНІДИНГІДРОХЛОРИДУ

Вступ. Дослідження присвячене розробці полімерних матеріалів біомедичного призначення, яким властиві антибактеріальні властивості.

Методи. Два гідрофільних синтетичних полімери – ковалентно зшитий поліакриламід та полігексаметиленгуанідингідрохлорид, – було синтезовано методами радикальної полімеризації та поліконденсації відповідно.

Результати. У результаті обмеженого набухання зшитий поліакриламід у водному розчині утворює гідрогелі з хорошими дифузійними і сорбційними властивостями, ступінь набухання становить 1370 %. Бактерицидні властивості ПГМГХ було оцінено шляхом визначення мінімальної інгібуючої концентрації щодо штамів бактерій *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Klebsiella quasipneumoniae* і показано високу активність полімеру у водному розчині за концентрацій менше 175 мкг/мл. У результаті сорбції ПГМГХ із розчинів різної концентрації на поверхню гідрогелю було отримано зразки із різним вмістом діючої речовини у зразку. Зразки ПАА-гідрогелів із ПГМГХ було протестовано диско-дифузійним методом щодо штамів указаних бактерій та було показано їхні антибактеріальні властивості.

Висновки. Таким чином, ПАА-гідрогелі з адсорбованим на їхній поверхні полігексаметиленгуанідингідрохлоридом, володіючи низькою токсичністю, біологічною деструкцією, неагресивністю до інших матеріалів та біологічних тканин, завдяки своїм антибактеріальним властивостям можуть бути використані як раневі пов'язки, що запобігають інфекційним захворюванням.

Ключові слова: гідрогелі, поліакриламід, полігексаметиленгуанідингідрохлорид, антибактеріальні властивості.

Вступ

Проблема боротьби з мікроорганізмами, що викликають інфекційні захворювання у людей та тварин, з біодеструкцією матеріалів та біообростанням обладнання є актуальною, незважаючи на значний вибір існуючих біоцидних препаратів. Більшість дезінфікуючих засобів містять токсичні речовини або

утворюють токсичні продукти деструкції. Токсичність та агресивність традиційних хлорвмісних препаратів, альдегідних та фенольних препаратів становить ризик для здоров'я людей та довкілля і є причиною необхідності розробки нових екологічно безпечних та малотоксичних засобів.

Останнім часом значну увагу приділяють дезінфікуючим засобам на основі полігуанідинів, що зумовлено їхньою біоцидною властивістю, стабільністю, низькою токсичністю. Антисептичні та дезінфікуючі засоби на основі гуанідинових сполук активні щодо грамнегативних та грампозитивних бактерій (Walczak, Richert, & Burkowska-But, 2014).

Відомі новітні стратегії дизайну біологічно активних матеріалів охоплюють значною мірою гідрогелі, пропонуючи різноманітні методи синтезу на основі полімерних сіток. Гідрогелі на основі поліакриламід (ПАА) завдяки своїм водоутримуючим властивостям, еластичності, атравматичності зарекомендували себе як високоефективні матеріали нової генерації для лікування ран (Nadtoka et al., 2019). Гідрогелі можуть містити розчини антисептиків, анальгетиків та знеболювальних, що дозволяє не тільки ізолювати рану від інфекції, а й проводити терапію ран різного генезу.

Проведене дослідження має на меті отримання та вивчення антибактеріальних властивостей гідрогелів на основі ПАА, що насичені дезінфікуючим засобом полігексаметиленгуанідингідрохлоридом (ПГМГХ), які можуть бути використані в медицині, у лікарняній практиці, у ветеринарії, у побуті тощо.

Методи

Для синтезу гідрогелю та бактерицидного полімеру використовували акриламід, N,N'-метилєн-біс-акриламід, церій(IV) амоній нітрат (ЦАН), гуанідин гідрохлорид, гексаметилендіамін (Sigma-Aldrich), дистильовану воду.

Синтез гідрогелю проводили методом радикальної полімеризації акриламід за наявності зшивного агента N,N'-метилєн-біс-акриламід, узятого в концентрації 0,4 % від маси акриламід. Як ініціатор було використано окисно-відновну систему Ce(IV)/HNO₃. Гідрогель було очищено шляхом витримування в дистильованій воді для видалення залишків реагентів. Дистильовану воду тричі на добу змінювали протягом кількох діб.

Синтез бактерицидного полімеру полігексаметиленгуанідингідрохлориду було здійснено методом поліконденсації гуанідин гідрохлориду та гексаметилендіаміну, узятих в еквімолярних кількостях у розплаві із поступовим збільшенням температури реакційної суміші від 120 до 180 °C. Полімер було очищено методом кількарязового переосадження з лужного середовища.

Проведено визначення мінімальної інгібуючої концентарції (МІК). Антибактеріальну активність ПГМГХ перевіряли щодо штамів *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 277253) і *Klebsiella quasipneumoniae* (ATCC 700603). Дослідження проведено на рідкому середовищі Мюллера–Хінтона такого складу (г/л): гідролізат казеїну – 17,5, пептон ферментативний – 2, крохмаль – 1,5, рН 7,3.

Маточний розчин ПГМГХ готували на основі 0,9 % NaCl. Аліквоту додавали до середовища інкубації бактерій і методом двократних розведень готували лійку концентрацій у діапазоні 2,81–0,011 мг/мл. 1 мл бактеріальної суспензії ($0,5 \times 10^6$ КУО) з відповідною концентрацією ПГМГХ інкубували за 37 °C протягом 24 год. МІК вважали концентрацію з візуально відсутніми ростом відповідного штаму бактерій. Повторюваність дослідів була трикратною.

Досліджено антибактеріальні властивості гідрогелів з ПГМГХ *in vitro*. Зразки гідрогелів інкубували протягом 24 год у розчинах ПГМГХ 0,1, 0,3, 0,5, 0,75 та 1 мг/мл. Антибактеріальну активність гідрогелів перевіряли дискодифузійним методом щодо штамів *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 277253) і *Klebsiella quasipneumoniae* (ATCC 700603). Дослідження проводили на агарі Мюллера–Хінтона такого складу: агар-агар мікробіологічний – 17, гідролізат казеїну – 17,5, пептон ферментативний – 2, крохмаль – 1,5, pH 7,3. Фрагменти гідрогелів діаметром близько 5 мм і висотою 1-2 мм розміщували на агар із відповідним штамом бактерій. Чашки Петрі інкубували за 37 °C протягом 24 год. Діаметр зони затримки росту навколо гідрогелів вимірювали штангенциркулем Міол 15-240. Дослідження повторювали тричі.

Результати

Було отримано полімерні матеріали, формули яких представлено на рис. 1. У результаті обмеженого набухання зшитий ПАА представляє собою гідрогель, який володіє хорошими дифузійними та сорбційними властивостями, ступінь набухання становить 1370 % (Nadtoka, Virych, & Kutsevol, 2021). У водному розчині ПГМГХ гідрогель здатний сорбувати на своїй поверхні бактерицидний полімер і утворювати матеріал з пролонгованими антибактеріальними властивостями, який може використовуватись як покриття для ран.

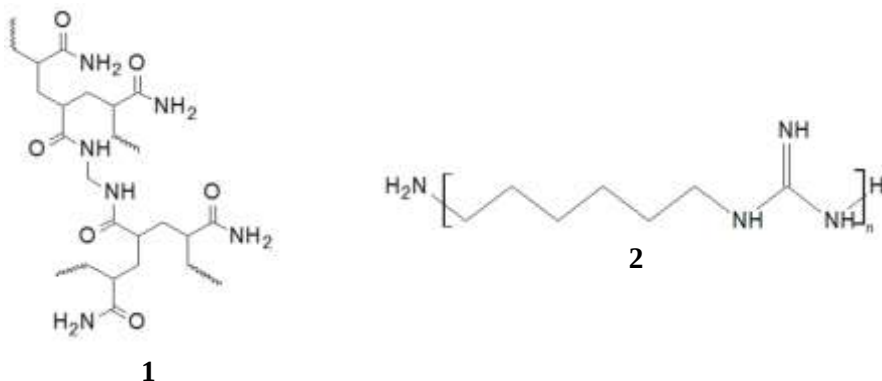


Рис. 1. Структурні формули полімерів:
1 – ковалентно зшитий ПАА, 2 – ПГМГХ

На першому етапі було протестовано розчин ПГМГХ щодо дії на штам поширених хвороботворних бактерій та визначено його мінімальну інгібуючу

концентрацію (МІК). МІК водного розчину полімеру ПГМГХ для *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli* – 88 мкг/мл, для *K. quasipneumoniae* – 175 мкг/мл, для *P. aeruginosa* – 175 мкг/мл, – що вказує на високу бактерицидну активність полімеру порівняно з іншими бактерицидними агентами на основі альдегідів або хлоровмісних речовин (Салманов, 2017, с. 92–125). Розчин ПГМГХ з концентраціями вище 0,5 мг/мл осаджувалися у середовищі Мюллера–Хінтона, що є проявом його флокулятивних властивостей (Нижник та ін, 2004, с. 16–25).

Сорбований на поверхню гідрогелю ПГМГХ проявляє антибактеріальну активність у міру наявності вологого середовища і створює довкола зразків прозорий ареал, у якому не виявлено колоній бактерій, як видно на рис. 2. Цей ареал має відносно невелике збільшення зі зростанням концентрації розчину бактерицидного полімеру, у який було занурено гідрогель, і становить від 5 до 7 мм. Це може бути пов'язано з великою молекулярною масою антибактеріального полімеру, його обмеженою дифузією з гідрогелів та флокулятивними властивостями. Проте не виявлено росту бактерій під зразками і в безпосередній близькості до них, що є позитивним результатом та вказує на перспективність використання гідрогелевих матеріалів антибактеріального призначення широкого спектра дії.

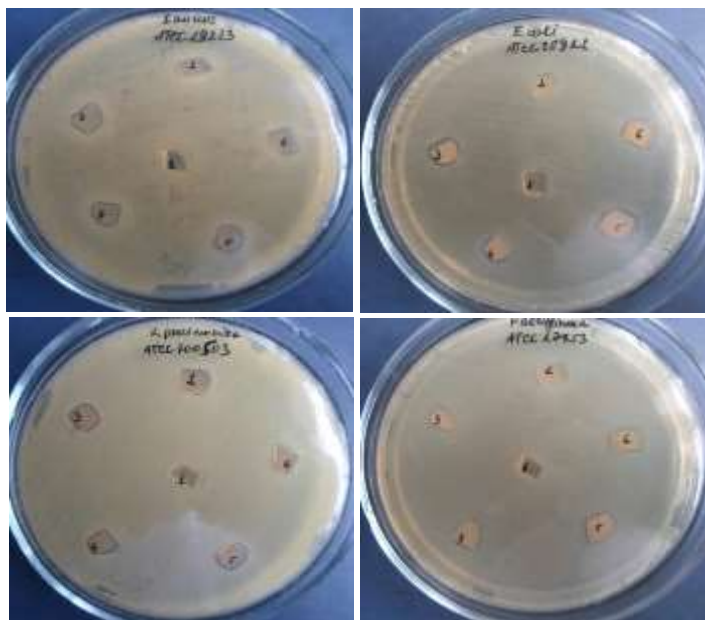


Рис. 2. Інгібування *S. aureus*, *E. coli*, *K. quasipneumoniae* та *P. aeruginosa* гідрогелями з ПГМГХ.

Концентрації ПГМГХ: 1 – 0 мг/мл; 2 – 0,1 мг/мл; 3 – 0,3 мг/мл; 4 – 0,5 мг/мл; 5 – 0,75 мг/мл; 6 – 1 мг/мл

Дискусія і висновки

За допомогою класичних методів радикальної полімеризації та поліконденсації було отримано гідрофільні полімери – зшитий поліакриламід та полігексаметиленгуанідин гідрохлорид. У результаті їх комбінації було отримано зразки та досліджено бактерицидні властивості на їхній поверхні. Було показано високу антибактеріальну ефективність водних розчинів ПГМГХ та поверхневого шару гідрогелю з адсорбованим ПГМГХ щодо штамів бактерій *S. aureus*, *E. coli*, *K. quasipneumoniae* та *P. aeruginosa*. Отримані зшиті гідрогелі є перспективними матеріалами для створення раневих пов'язок і можуть бути використані в медицині, у лікарняній практиці, у ветеринарії, у побуті тощо.

Внесок авторів: Оксана Надтока – концептуалізація, написання – оригінальна чернетка, редагування; Вірич Павло – валідація даних, написання – оригінальна чернетка, формальний аналіз; Наталія Куцевол – написання – перегляд і редагування.

Список використаних джерел

Нижник, Т.Ю., Баранова, А.И., Рокицька, О.В., & Нижник, В.В. (2004). Комплексоутворення іонів міді з полігексаметиленгуанідиним у водному середовищі. *Журнал Хроматографічного товариства*. IV(2), 16–25. <https://doi.org/10.15407/zht>

Салманов, А.Г. (2017). Резистентність до антибіотиків та біоцидів. *International Journal of Antibiotics and Probiotics*, 1(2), 92–125. <https://doi.org/10.31405/ijap.1-2.17.07>

Nadtoka, O., Kutsevol, N., Linnik, O., & Nikiforov M. (2019). Nanocomposite Hydrogels Containing Silver Nanoparticles as Materials for Wound Dressings. *Springer Proceedings in Physics*, 222, 375–387. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17755-3_24

Nadtoka, O., Virych, P., & Kutsevol, N. (2021). Synthesis and absorption properties of hybrid polyacrylamide hydrogels. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 719(1), 84–93. <https://doi.org/10.1080/15421406.2020.1862464>

Walczak, M., Richert, A., & Burkowska-But, A. (2014). The effect of polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG) derivatives introduced into polylactide (PLA) on the activity of bacterial enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(11), 1719–1724. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1505-5>

References

Nadtoka, O., Kutsevol, N., Linnik, O., & Nikiforov M. (2019). Nanocomposite Hydrogels Containing Silver Nanoparticles as Materials for Wound Dressings. *Springer Proceedings in Physics*, 222, 375–387. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17755-3_24

Nadtoka, O., Virych, P., & Kutsevol, N. (2021). Synthesis and absorption properties of hybrid polyacrylamide hydrogels. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 719(1), 84–93. <https://doi.org/10.1080/15421406.2020.1862464>

Nizhnik, T.Yu., Baranova, A.I., Rokitska, O.V., Nizhnik, V.V. (2004). Complex formation of copper ions with polyhexamethyleneguanidine in an aqueous environment. *Zurnal Hromatograficnogo tovaristva Journal of the Chromatographic Society*, IV(2), 2, 16–25 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/zht>

Salmanov, A.G. (2017). Resistance to antibiotics and biocides. *International Journal of Antibiotics and Probiotics*, 1(2), 92–125 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.31405/ijap.1-2.17.07>

Walczak, M., Richert, A., & Burkowska-But, A. (2014). The effect of polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG) derivatives introduced into polylactide (PLA) on the activity of bacterial enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(11), 1719–1724. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1505-5>

Отримано редакцією збірника / Received: 04.07.24

Прорецензовано / Revised: 18.07.24

Схвалено до друку / Accepted: 30.09.24

Oksana NADTOKA¹, PhD (Chem.), Senior Researcher
ORCID ID: 0000-0003-1868-3885
e-mail: nadtoka_oksana@knu.ua

Pavlo VIRYCH¹, PhD (Biol.), Senior Researcher
ORCID ID: 0000-0002-1463-1992
e-mail: sphaenodon@ukr.net

Nataliya KUTSEVOL¹, DSc (Chem.), Senior Researcher
ORCID ID: 0000-0002-1468-4111
e-mail: kutsevol@ukr.net

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF HYDROGELS BASED ON POLYACRYLAMIDE AND POLYHEXAMETHYLENEGUANIDINE HYDROCHLORIDE

Introduction. *The research is devoted to developing biomedical polymer materials that have antibacterial properties.*

Methods. *Two hydrophilic synthetic polymers – covalently cross-linked polyacrylamide and poly hexamethylene guanidine hydrochloride – were synthesized by radical polymerization and polycondensation, respectively.*

Results. *As a result of limited swelling, cross-linked polyacrylamide in aqueous solution forms hydrogels with good diffusion and sorption properties, the degree of swelling is 1370 %. The bactericidal properties of PGMHC were evaluated by determining the minimum inhibitory concentration of strains Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Klebsiella quasipneumoniae bacteria and showed the high activity of the polymer in aqueous solution at concentrations less than 175 µg/ml. As a result of the sorption of PGMHC from solutions of different concentrations onto the surface of the hydrogel, samples with different contents of the active substance in the sample were obtained. Samples of PAA hydrogels from PGMHC were tested by the disk diffusion method against the strains of the specified bacteria, and their antibacterial properties were shown.*

Conclusions. *Thus, PAA hydrogels with poly hexamethylene guanidine hydrochloride adsorbed on their surface, possessing low toxicity, biological destruction, and non-aggressiveness to other materials and biological tissues, due to their antibacterial properties can be used as wound dressings that prevent infectious diseases.*

Key words: *hydrogels, polyacrylamide, polyhexamethyleneguanidine hydrochloride, antibacterial properties.*

Автори О. Надтока та П. Вірич заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Член редакційної колегії Н. Куцевол заявляє про відсутність конфлікту інтересів та невтручання в процес оцінювання цієї статті відповідно до міжнародних стандартів публікаційної етики. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors O. Nadtoka and P. Virych declare no conflicts of interest. The member of the Editorial board N. Kutsevol declares no conflict of interest and has not interfered in the evaluation process of this article, in accordance with international publication ethics standards. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.