

УДК 577.1:543.422.27

## ПРОЦЕССЫ САМООРГАНИЗАЦИИ И ГЕЛЕОБРАЗОВАНИЯ В ЦИСТЕИН-СЕРЕБРЯНОМ РАСТВОРЕ С УЧАСТИЕМ ХИТОЗАНА И ЭЛЕКТРОЛИТА

© 2024 г. Г. Р. Зеников<sup>1</sup>\*, С. Д. Хижняк<sup>1</sup>, А. И. Иванова<sup>1</sup>, П. М. Пахомов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
“Тверской Государственный Университет”, ул. Желябова, 33, Тверь, 170100 Россия

\*e-mail: zenikov.german@mail.ru

Поступила в редакцию 01.11.2023 г.

После доработки 08.12.2023 г.

Принята к публикации 08.12.2023 г.

В работе с помощью методов УФ-спектроскопии, динамического светорассеяния, рН-метрии, вискозиметрических испытаний, сканирующей электронной микроскопии изучены процессы самосборки и гелеобразования в низкоконтентированных водных растворах на основе аминокислоты L-цистеин и нитрата серебра, так называемого цистеин-серебряного раствора, низкомолекулярного водорастворимого хитозана (ХЗ) и инициатора гелеобразования  $\text{CuSO}_4$ . Установлено, что процесс гелеобразования в цистеин-серебряном растворе – гель-прекурсор – под влиянием ХЗ и сульфата меди протекает в узком концентрационном диапазоне:  $C_{\text{ХЗ}} = 0.0100\text{--}0.0150$  мг/мл,  $C_{\text{CuSO}_4} = 0.4\text{--}0.6$  мМ, при этом  $C_{\text{L-Cys}} = 3.00$  мМ,  $C_{\text{AgNO}_3} = 3.75$  мМ, молярное соотношение  $\text{Ag}^+/\text{Cys}$  равняется 1.27. Гидрогели различного композиционного состава: ЦСР-ХЗ, ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$ , ЦСР- $\text{CuSO}_4$  – не обладают высокой механической прочностью, однако устойчивы во времени. Структурные элементы ЦСР – кластерные цепочки цвиттер-ионов меркаптида серебра – имеют положительный заряд, поэтому образование полиэлектролитных комплексов в ЦСР-ХЗ и ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогелях не происходит, так как рН цистеин-серебряного раствора – 2.6. Введение в ЦСР-ХЗ образцы сульфата меди способствует формированию более прочного гидрогеля за счет ассоциации кластеров меркаптида серебра и молекул ХЗ с сульфат-анионом и координации ионов  $\text{Cu(II)}$  с депротонированными карбоксильными группами различных кластеров.

**Ключевые слова:** цистеин-серебряный раствор (ЦСР), водорастворимый хитозан, антимикробная активность, супрамолекулярная химия, гидрогели

**DOI:** 10.31857/S0023291224030021, **EDN:** BMNLHW

### ВВЕДЕНИЕ

Супрамолекулярная химия является быстро развивающимся направлением в науке. При этом особый интерес ученых привлекают супрамолекулярные гидрогели, структурными единицами которых являются низкомолекулярные вещества (аминокислоты, пептиды и др. – супрамономеры), поскольку гелеобразование в таких системах является результатом молекулярной самосборки, регулируемой слабыми нековалентными взаимодействиями, такими как водородные связи, металл-лиганд координация, гидрофобные, металлофильные, электростатические взаимодействия, взаимодействия Ван-дер-Ваальса и др. [1–4]. Супрамономеры в результате самосборки выстраиваются в волокна, которые из-за взаимного зацепления при определенной концентрации способны образовывать

пространственную 3D-сетку, иммобилизующую молекулы растворителя. Такие материалы интересны не только процессами самосборки, ведущими к формированию гель-сетки, но и с точки зрения практического применения. Например, возможно конструировать стимул-чувствительные супрамолекулярные гели, проявляющие свойства биосовместимости и биodeградации [5–7]. Использование супрамолекулярных структур открывает новые возможности в получении наноматериалов в комбинации с хитозаном [8, 9].

Хитозан является линейным полисахаридом, имеющим в своем строении два структурных звена: D-глюкозамин и N-ацетил-D-глюкозамин, которые соединены  $\beta$  (1→4) гликозидной связью. Получение хитозана основано на деацетилировании хитина (химический аналог хитозана) в щелочной

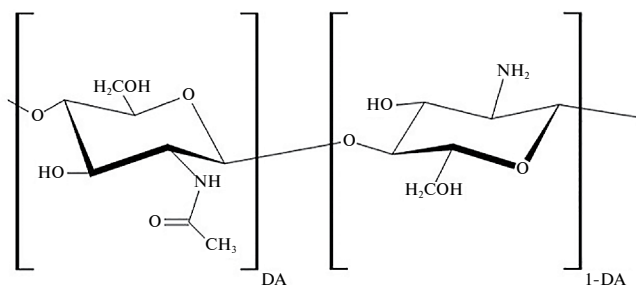


Рис. 1. Структурная формула хитозана.

или кислой среде. Молекула ХЗ содержит одну  $-\text{NH}_2$  группу и две  $-\text{OH}$  группы на каждый гликозидный остаток (рис. 1).

Хитозан относится к перспективным природным полимерам, который проявляет антимикробную и антиоксидантную активность, свойства биодegradации, биосовместимости и мукоадгезивности [10]. Положительный заряд молекул данного биополимера способствует тому, что он может взаимодействовать с отрицательно заряженными функциональными группами белков, анионными полисахаридами и нуклеиновыми кислотами. При взаимодействии хитозана с ДНК в клетках патогенных микроорганизмов предотвращается синтез их молекул РНК. Кроме этого, хитозан может проявлять и анестезирующие свойства. В области воспаления обычно образуется избыток катионов водорода, обуславливающих боль. Хитозан за счет аминогрупп способен связывать протоны и тем самым оказывать обезболивающее действие [11, 12]. В настоящий момент ХЗ применяется при разработке различных лекарственных форм. Например, композиция на основе хитозана, фосфата кальция  $\beta$ -гидроксипатита ( $\beta$ -ТСР) и гидроксиапатита используется для регенерации клеток тканей человека [13]. Нанесение ХЗ на поверхность титановых костных имплантов придает им большую коррозионную устойчивость и улучшает остеоинтеграцию — процесс вживления титанового импланта в костную ткань [14], а гидрогели на основе модифицированного хитозана, например, N,N,N-триметилхитозана или N-сукцинилхитозана, применяются для заживления ран [15]. Следует отметить, что хитозан является pH-чувствительным полимером, изменяющим свою конформацию в зависимости от pH среды [16], что позволяет использовать его в качестве носителя для точечной адресной доставки лекарственных средств, например, к раковым клеткам, имеющим низкий pH [17]. Получение наночастиц хитозана и его производных с инкапсулированным внутри лекарственным веществом открывает новые возможности применения в медицине благодаря их способности проникать внутрь клетки [18]. Кроме того, хитозан

может выступать в качестве стабилизатора наночастиц серебра [19]. Таким образом, добавление ХЗ в различные системы позволяет расширить область применения композиций на его основе в биомедицине.

В данной работе исследуется влияние хитозана на процесс гелеобразования в низкоконцентрированном цистеин-серебряном растворе, имеющем супрамолекулярную природу. ЦСР — гель-прекурсор — получают путем смешения водных растворов аминокислоты L-цистеин и нитрата серебра при условии избытка ионов серебра, молярное соотношение  $\text{Ag}^+/\text{Cys}$  равняется 1.27, концентрация исходных компонентов составляет  $C_{\text{L-Cys}} = 3.00 \text{ mM}$ ,  $C_{\text{AgNO}_3} = 3.75 \text{ mM}$  [20]. ЦСР относится к анион-чувствительным системам, гелеобразование в которых инициируется введением электролитов с различными анионами:  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{WO}_4^{2-}$ ,  $\text{MoO}_4^{2-}$  [21]. Природа аниона (сульфаты, хлориды и др.) влияет на структурно-механические свойства (вязкость, устойчивость во времени) гидрогелей [22].

Экспериментальными и расчетными методами было установлено [21, 23], что ЦСР состоит из положительно заряженных кластеров меркаптида серебра, которые имеют структуру «ядро-оболочка». При этом внутренняя структура кластеров стабилизируется за счет сильно взаимодействующих атомов серы и серебра, а на поверхности сосредоточены функциональные группы  $\text{NH}_3^+$  и  $\text{COO}^-$ , малая часть SAg-групп присутствует на поверхности супрамономеров MC [21, 23]. Межмолекулярные взаимодействия между функциональными группами ( $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COO}^-$ ) цвиттер-ионов меркаптида серебра разных кластеров способствует формированию фрагментов пространственной сетки [21].

Введение в цистеин-серебряный раствор хитозана представляет практический интерес, поскольку расширяется область потенциального применения ЦСР гидрогелей, а с научной точки зрения интересным является изучение процессов самосборки в системе на основе низкомолекулярных соединений под влиянием положительно заряженных макромолекул полисахарида. В работе [24] детально исследованы антибактериальные свойства ЦСР-ХЗ композиций с различным содержанием исходных компонентов и установлена их эффективность в подавлении роста тестовых культур. Синтезировать ЦСР-ХЗ и ЦСР-ХЗ- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  гидрогели удалось только при использовании низкомолекулярного водорастворимого полисахарида ( $M = 30 \text{ кДа}$ ) и электролита с сульфат-анионом, с хлорид-анионом в ЦСР-ХЗ системах происходила коагуляция [25]. Однако возник новый вопрос: каково влияние катиона электролита на структурно-механические свойства ЦСР-ХЗ- $\text{SO}_4^{2-}$  гидрогелей. В данной работе в качестве инициатора гелеобразования использовали сульфат меди, поскольку ионы  $\text{Cu(II)}$ , обладая

комплексобразующими свойствами, способствуют синтезу наиболее прочных гелей на основе ЦСР не только с сульфат- [26], но и хлорид-анионами [27]. Таким образом, целью работы является изучение процессов самосборки и гелеобразования в цистеин-серебряном растворе — гель-прекурсор — под влиянием поликатиона хитозана и сульфата меди.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы реактивы: серебро азотнокислородное (ч.д.а.); L-цистеин, 99%, (Acros); хитозан низкомолекулярный ( $M = 30$  кДа), водорастворимый (ЗАО «Биопрогресс»), ТУ 9289-067-00472124-03, степень деацетилирования 87%; сульфат меди безводный (х.ч.). Все растворы были приготовлены с использованием бидистиллированной воды.

Для изучения влияния ХЗ на строение и свойства гидрогелей, полученных на основе ЦСР, была синтезирована серия образцов различного композиционного состава: ЦСР-ХЗ, ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$ , ЦСР- $\text{CuSO}_4$ . Концентрация раствора хитозана равнялась 0.5 мг/мл, а его pH — 4.34. Цистеин-серебряный раствор, в котором концентрация исходных компонентов составляет  $C_{\text{L-Cys}} = 3.00$  мМ,  $C_{\text{AgNO}_3} = 3.75$  мМ, синтезировали по методике [21, 22], молярное соотношение  $\text{Ag}^+/\text{Cys}$  равнялось 1.27. В предварительных опытах было установлено, что наиболее прочный ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гель образуется при условии, что ХЗ и электролит добавляют в равных объемах — 1 : 1. Концентрация хитозана в образцах, исследованных в работе, изменялась в пределах от 0.0075 мг/мл до 0.0175 мг/мл, концентрация  $\text{CuSO}_4$  — 0.3–0.7 мМ. При синтезе ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогелей в ЦСР сначала добавляли определенный объем раствора ХЗ, а затем раствор электролита, после добавления каждого компонента образец энергично перемешивали встряхиванием. Следует заметить, что последовательность введения хитозана и электролита в ЦСР имеет большое значение, изменение этой последовательности приводит к понижению механической прочности гидрогелей. Образцы хранили в недоступном для света месте.

Динамическую вязкость гидрогелей измеряли с помощью вибрационного вискозиметра SV-10 фирмы «A&D» (Япония), в поликарбонатных кюветах объемом 10 мл. В процессе измерения вязкости две покрытые золотом сенсорные пластины, погруженные в образец, осциллируют с частотой 30 Гц и амплитудой в 1 мм. Длительность каждого эксперимента составляет 30 мин, температура измерения — 25°C. Схема эксперимента по измерению вязкости следующая: сначала измеряли вязкость свежеприготовленных образцов — через 30 мин после синтеза, а затем измерение вязкости тех же образцов проводили через 3, 6 и 10 дней

(разное время хранения). Образцы между измерениями хранились в герметично упакованных кюветах без доступа света.

Спектральные измерения гидрогелей в УФ- и видимом диапазонах проведены на спектрометре «Evolution Array» фирмы «Thermo Scientific» (США) в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 и 2 мм.

Исследования методом динамического светорассеяния (ДСР) выполнены на анализаторе размера частиц Zetasizer «Nano ZS» фирмы «Malvern» с He-Ne-лазером (633 нм) мощностью 4 мВт при 25°C в конфигурации обратного рассеяния (173°). Для этого эксперимента были синтезированы модельные образцы, содержание в которых исходных компонентов в 4 раза ниже, чем в гелеобразующих системах.

Размер частиц в образцах рассчитывался по формуле Стокса—Эйнштейна:

$$D = kT / 6\pi\eta R,$$

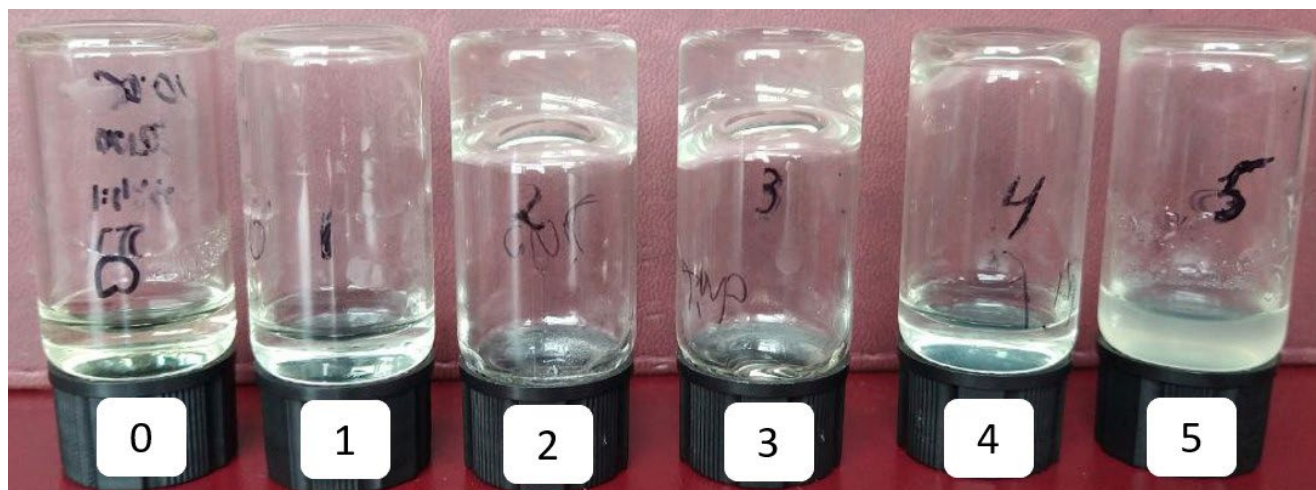
где  $k$  — константа Больцмана,  $T$  — абсолютная температура,  $\eta$  — вязкость среды,  $R$  — радиус рассеивающих частиц. Индекс полидисперсности (Pi) в измерениях всех образцов находился в диапазоне от 0.399 до 0.601. Измерение электрокинетического потенциала ( $\zeta$ -потенциала) частиц в различных образцах на основе ЦСР осуществляли методом электрофоретического светорассеяния на этом же приборе.

Величину pH цистеин-серебряного раствора и гидрогелей на его основе измеряли с помощью pH-метра «SevenMult», «Mettler Toledo», с использованием универсального электрода InLab415.

Морфологию образцов исследовали на сканирующем электронном микроскопе «JEOL JSM 6610LV» в режиме вторичных электронов с использованием углеродного проводящего скотча; на поверхности исследуемых образцов создавали проводящий слой Pt толщиной 20 нм; ускоряющее напряжение составляло 15 кВ при давлении  $10^{-4}$  Па. С помощью аналитической приставки «Oxford INCA» Energy 350 проведен рентгеновский энергодисперсионный микроанализ образцов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 показаны фотографии ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогелей с различным содержанием ХЗ и электролита через 5 дней после синтеза, из которых видно, что гель-структуру, не разрушающуюся при переворачивании флакона, в этот момент имеют образцы 2 и 3. В образце 5 наблюдаются признаки коагуляции (мутность). С помощью такой визуальной оценки установлено, что существует определенный, довольно узкий, концентрационный



**Рис. 2.** Фото ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогелей через 5 дней после синтеза. Содержание ХЗ и  $\text{CuSO}_4$  в образцах (V мл/1 мл ЦСР): 0 – ЦСР (контроль); 1 –  $C_{\text{ХЗ}} = 0.0075$  мг/мл,  $C_{\text{CuSO}_4} = 0,3$  мМ; 2 –  $C_{\text{ХЗ}} = 0.0100$  мг/мл,  $C_{\text{CuSO}_4} = 0,4$  мМ; 3 –  $C_{\text{ХЗ}} = 0.0125$  мг/мл,  $C_{\text{CuSO}_4} = 0,5$  мМ; 4 –  $C_{\text{ХЗ}} = 0.0150$  мг/мл,  $C_{\text{CuSO}_4} = 0,6$  мМ; 5 –  $C_{\text{ХЗ}} = 0.0175$  мг/мл,  $C_{\text{CuSO}_4} = 0,7$  мМ. ХЗ и электролит в образцы добавляли в равных объемах – 1:1.

диапазон ХЗ и электролита, в котором происходит образование устойчивых во времени гидрогелей.

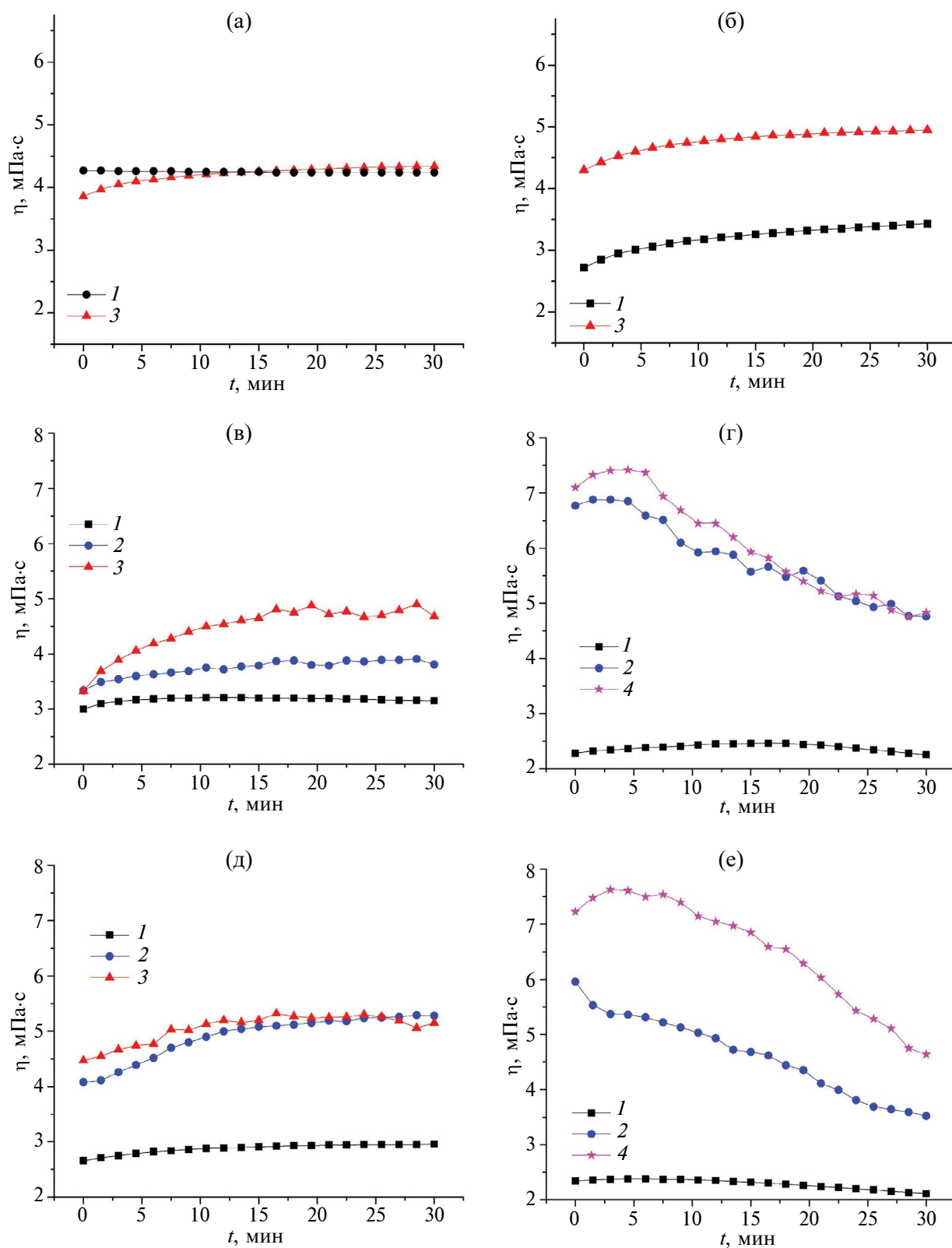
Установлено, что рН гидрогелей с концентрацией  $C_{\text{ХЗ}} = 0.0100$ – $0.0150$  мг/мл,  $C_{\text{CuSO}_4} = 0.4$ – $0.6$  мМ, изменяется в диапазоне 2.67–2.71 для ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  образцов и 2.62–2.67 для ЦСР- $\text{CuSO}_4$  систем, рН ЦСР – 2.60. Как мы видим, при добавлении в ЦСР хитозана и электролита сильного изменения значений кислотности не происходит, и повышение рН в ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  системах по сравнению с ЦСР- $\text{CuSO}_4$  образцами связано, скорее всего, с протонированием аминогрупп хитозана. Поскольку структурные элементы ЦСР – кластерные цепочки цвиттер-ионов меркаптида серебра – имеют положительный заряд, образование полиэлектролитных комплексов с молекулами полисахарида в ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  и ЦСР-ХЗ гидрогелях не происходит.

Кроме визуальной оценки прочности гидрогелей путем переворачивания флакона, были проведены вискозиметрические испытания, которые позволили получить количественную оценку механической прочности (структурированности) образцов. Для вискозиметрических исследований были выбраны образцы 2 и 3, как наиболее устойчивые во времени. Динамическая вязкость ЦСР гидрогелей была измерена в разные моменты времени: через 30 мин после синтеза (свежеприготовленные образцы), а затем через 3, 6 и 10 дней, в зависимости от типа образца. На рис. 3а и 3б представлены зависимости динамической вязкости от времени хранения для ЦСР-ХЗ образцов с разной концентрацией ХЗ [25]. Как мы видим из рисунка, значение вязкости гидрогелей с концентрацией ХЗ ( $C_{\text{ХЗ}} = 0.0100$  мг/мл) мало зависит от времени

хранения с момента синтеза (рис. 3а). Увеличение  $C_{\text{ХЗ}}$  до 0.0125 мг/мл приводит к снижению вязкости свежеприготовленного образца (рис. 3б, кривая 1) по сравнению с соответствующим образцом 0.0100 мг/мл на рис. 3а (кривая 1) и возрастанию вязкости через 6 дней, значение которой становится сопоставимо со значением вязкости образца с меньшим содержанием ХЗ. Следует отметить, что величина динамической вязкости ЦСР ~ 3.0 мПа·с.

Теперь рассмотрим, как изменяется вязкость ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогелей (образцов 2 и 3) в зависимости от времени (рис. 3в, 3г). Следует напомнить, что при синтезе этих образцов растворы ХЗ и  $\text{CuSO}_4$  добавляли в ЦСР в равных объемах – 1:1. Значение динамической вязкости образца 2 в процессе 30-минутного измерения в режиме осцилляций сенсорных пластин вибровискозиметра мало изменяется в свежеприготовленном образце и после хранения в течение 3 дней (рис. 3в, кривые 1 и 2). Незначительный рост  $\eta$  образца 2 в процессе измерения наблюдается через 6 дней (рис. 3в, кривая 3), что свидетельствует о структурировании образца, возрастании числа межмолекулярных контактов между фрагментами гелевой сетки в результате изменения расстояний между ними из-за осцилляции сенсорных пластин. Если анализировать значение вязкости в начальный момент измерения ( $t = 0$  мин), то можно отметить лишь незначительное увеличение  $\eta$  ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогеля в зависимости от времени хранения.

При увеличении концентрации ХЗ и  $\text{CuSO}_4$  в гидрогеле (образец 3) характер зависимости вязкости от времени изменяется (рис. 3г). Наблюдается заметный рост вязкости ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогеля в начальный момент измерения ( $t = 0$  мин)



**Рис. 3.** Зависимость динамической вязкости от времени хранения для гидрогелей а, б – ЦСР-ХЗ [25]; в, г – ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$ ; д, е – ЦСР- $\text{CuSO}_4$ . Концентрация ХЗ и  $\text{CuSO}_4$  в образцах: а, в, д –  $C_{\text{ХЗ}} = 0.0100$  мг/мл,  $C_{\text{CuSO}_4} = 0.4$  мМ; б, г, е –  $C_{\text{ХЗ}} = 0.0125$  мг/мл,  $C_{\text{CuSO}_4} = 0.5$  мМ. 1 – через 30 мин после синтеза, 2 – через 3 дня после синтеза, 3 – через 6 дней после синтеза, 4 – через 10 дней после синтеза.

через 3 дня после синтеза (рис. 3г, кривая 2), что особенно очевидно при сравнении с  $\eta$  образца 2 (рис. 3в, кривая 2). Кроме того, вязкость образца 3 через 3 и 10 дней хранения в процессе измерения понижается, предположительно в результате частичной деструкции гель-сетки, однако разрушения 3D-сетки до уровня свежеприготовленного образца или ЦСР ( $\eta = 3.0$  мПа·с) не происходит.

Для выяснения роли ХЗ в структурировании ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогелей были исследованы образцы, содержащие ЦСР и сульфат меди (рис. 3д и 3е). Обнаружено сходство в характере концентрационной зависимости вязкости от времени для ЦСР- $\text{CuSO}_4$  и ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогелей, следовательно, именно присутствие в образце сульфата меди (инициатора гелеобразования) определяет характер структурированности гидрогелей. Таким образом, роль катиона электролита в процессе гелеобразования в ЦСР-системах становится очевидной благодаря вискозиметрическим испытаниям. Установлено, что вязкость ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогелей выше вязкости ЦСР-ХЗ- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  образцов в одном и том же концентрационном диапазоне [25], вероятнее всего, благодаря комплексобразующей способности ионов  $\text{Cu(II)}$  [26, 27]. Ионы меди, координируясь с депротонированными карбоксильными группами цвиттер-ионов различных кластеров, создают дополнительные точки зацепления между супрамолекулярными цепочками, что приводит к формированию более развитой гель-сетки, кроме того, не исключается возможность комплексообразования ионов  $\text{Cu(II)}$  с молекулами ХЗ [28, 29].

Следует отметить, что концентрационная зависимость вязкости от времени хранения имеет куполообразный характер как для ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$ , ЦСР- $\text{CuSO}_4$ , так и ЦСР-ХЗ- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  гидрогелей [25]. Можно предположить, что промежуточные значения концентраций ХЗ и электролита в ЦСР-ХЗ- $\text{SO}_4^{2-}$  гидрогелях позволят реализовать оптимальный баланс межмолекулярных взаимодействий электростатической природы, что приведет к формированию наиболее устойчивой гель-структуры, что требует дополнительных исследований.

Влияние ХЗ на процессы самосборки в цистеин-серебряном растворе анализировали с помощью метода УФ-спектроскопии, исследуя образцы различного композиционного состава (рис. 4).

В электронных спектрах ЦСР, ЦСР-ХЗ, ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  и ЦСР- $\text{CuSO}_4$  образцов (рис. 4а) наблюдаются две полосы поглощения с максимумами  $\sim 316$  и  $\sim 390$  нм, в области которых обнаружены различия. Согласно нашим исследованиям [21, 23, 30], природа полос поглощения связана с формированием кластерных цепочек, состоящих из молекул меркаптида серебра. Полосы поглощения с максимумами  $\sim 316$  и  $390$  нм можно отнести

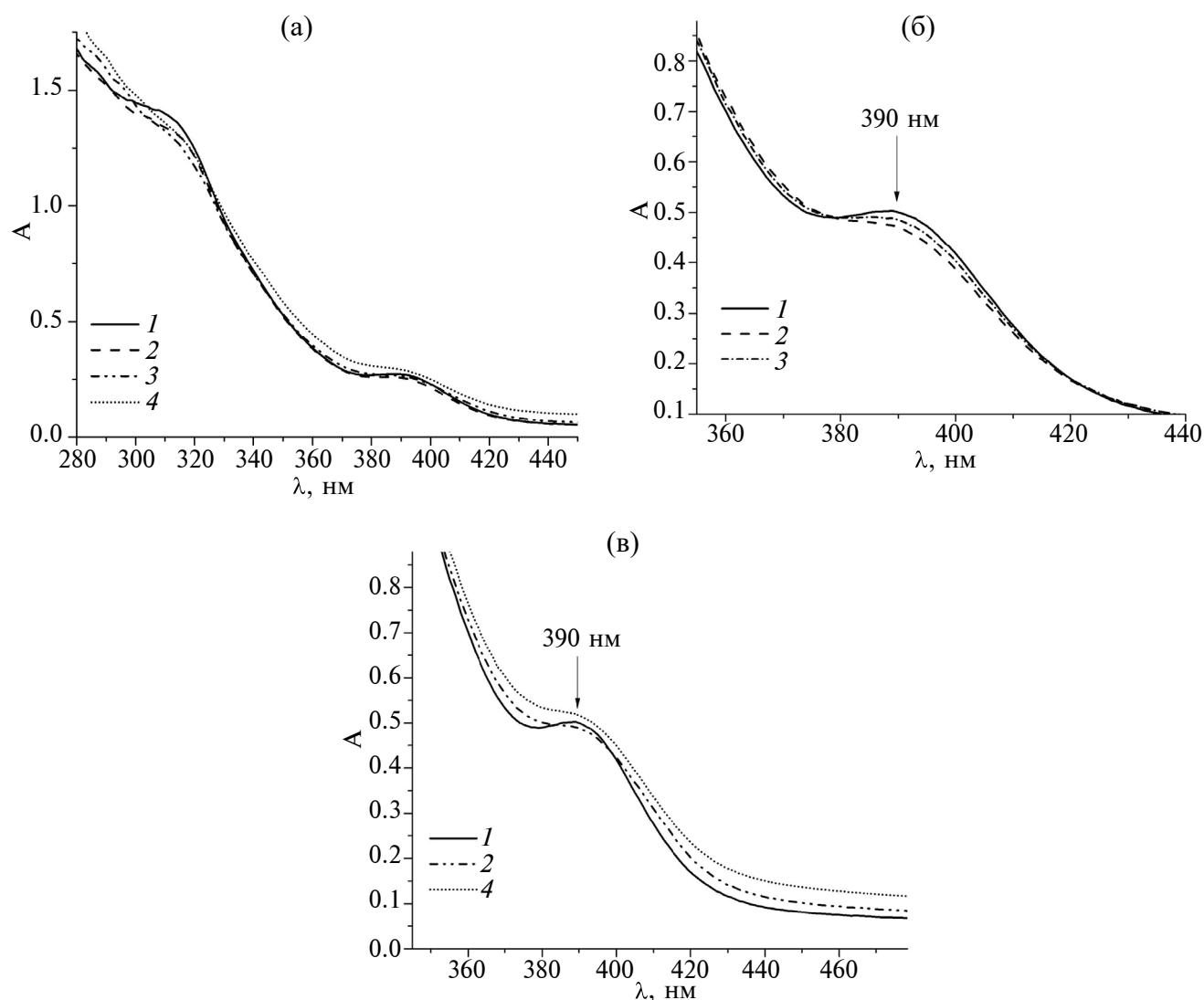
к полосам переноса заряда с лиганда (L-цистеин) на серебро в нанокластерах меркаптида серебра (ligand-to-metal charge transfer) и возникновением аргентофильного взаимодействия  $\text{Ag(I)}\cdots\text{Ag(I)}$  в  $[\cdots\text{Ag-S(R)}\cdots]_n$  в кластерных цепочках (R — остаток аминокислоты) [31, 32]. Как было указано выше, кластеры в ЦСР имеют структуру “ядро—оболочка”, при этом внутренняя структура кластеров стабилизируется за счет взаимодействующих атомов серы и серебра, а на поверхности кластеров сосредоточены функциональные группы  $\text{NH}_3^+$  и  $\text{COO}^-$ .

Влияние ХЗ на структуру ЦСР проявляется в зависимости электронных спектров ЦСР-ХЗ образцов от концентрации полисахарида (рис. 4б). Как мы видим, увеличение концентрации ХЗ приводит к уменьшению поглощения полосы  $\sim 390$  нм. Кроме того, в результате добавления ХЗ в ЦСР поглощение падает и в области полосы  $\sim 316$  нм (рис. 4а, спектр 2). Можно предположить, что молекулы ХЗ, заряженные положительно, будут распределяться в растворе так, чтобы избежать контактов с положительно заряженными цепочечными фрагментами ЦСР. И тогда основной эффект ХЗ на ЦСР будет состоять в перераспределении противоионов (нитрат-анионов) для компенсации заряда молекул ХЗ. В ЦСР-ХЗ образцах формируются две подсистемы — ЦСР и ХЗ, и при повышении концентрации ХЗ под влиянием молекул ХЗ изменяется геометрия цепочек, нарушается баланс электростатических взаимодействий, в результате чего происходит изменение электронной конфигурации кластерных цепочек.

Электронные спектры гель-образцов, содержащих электролит, ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  и ЦСР- $\text{CuSO}_4$ , были зарегистрированы на толщине поглощающего слоя, равной 2 мм (рис. 4в). Из рисунка видно, что добавление сульфата меди в ЦСР вызывает рост поглощения в спектре в исследуемом диапазоне, при этом наблюдается и изменение формы полосы в области 390 нм. Поглощение в спектре трехкомпонентной ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  системы меньше, чем в спектре ЦСР- $\text{CuSO}_4$  образца, вследствие влияния хитозана как поликатиона на структуру положительно заряженных фрагментов гель-сетки.

Результаты, полученные с помощью метода динамического рассеяния света (рис. 5), помогут разобраться в этих эффектах.

Установлено, что через 5 мин после добавления в ЦСР раствора  $\text{CuSO}_4$  фиксируется уменьшение размеров кластеров с 44 до 8 нм (рис. 5а, распределения 1 и 2). Однако с течением времени наблюдается рост размеров частиц — до 18 нм через 30 мин и до 1473 нм через 2 ч, что свидетельствует о формировании фрагментов пространственной сетки. Сульфат-анион, как противоион, сначала

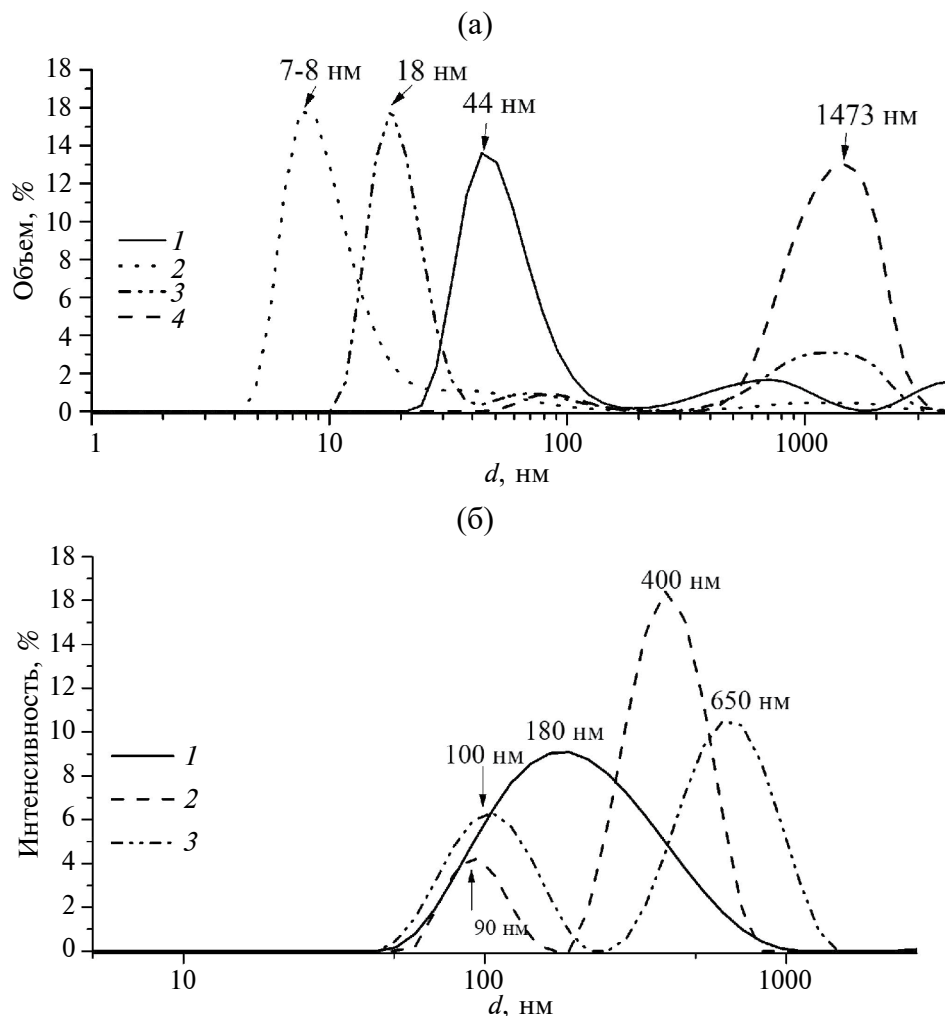


**Рис. 4.** Электронные спектры образцов в зависимости: от состава (а) – ЦСР (1), ЦСР-ХЗ (2), ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  (3), ЦСР- $\text{CuSO}_4$  (4)  $C_{\text{ХЗ}}=0.0100$  мг/мл,  $C_{\text{CuSO}_4}=0.4$  мМ, толщина кюветы – 1 мм, через 2 дня после синтеза; от концентрации ХЗ (б) – (0 (1), 0.0100 (2), 0.0150 (3) мг/мл) (3), толщина кюветы – 2 мм, через 7 дней после синтеза; от состава (в) – ЦСР (1), ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  (2), ЦСР- $\text{CuSO}_4$  (4),  $C_{\text{ХЗ}} = 0.0150$  мг/мл,  $C_{\text{CuSO}_4} = 0.6$  мМ; толщина кюветы – 2 мм, через 7 дней после синтеза.

уменьшает заряд нанокластеров, что вызывает их агрегацию вследствие уменьшения кулоновских сил отталкивания, и одновременно с этим двухзарядный анион выполняет роль линкера между кластерами различных цепочек. Таким образом, анион электролита инициирует процессы формирования пространственной геле-сетки.

Влияние ХЗ на ЦСР демонстрирует рис. 5б [25], на котором показано распределение рассеивающих частиц по размерам в образцах ЦСР, ХЗ, ЦСР-ХЗ. В растворе ЦСР достаточно широкое распределение нанокластеров по размерам с максимумом  $\sim 180$  нм (рис. 5б, распределение 1). Раствор ХЗ

характеризуется бимодальным распределением частиц с размерами  $\sim 90$  и  $\sim 400$  нм (рис. 5б, распределение 2). В ЦСР-ХЗ образце, как и в хитозане, наблюдается два типа частиц, однако их размеры увеличились до 100 и 650 нм (рис. 5б, распределение 3). В ЦСР-ХЗ образце существуют две подсистемы – кластерные цепочки МС и молекулы хитозана. Предположительно, вокруг макромолекул хитозана образуется анионное облако противоионов (нитрат ионов), которое позволяет цепочкам МС и молекулам хитозана, как двум положительно заряженным объектам, находиться в растворе в равновесии.



**Рис. 5.** Распределение рассеивающих частиц по размерам: а) ЦСР (1) после добавления сульфат-аниона в зависимости от времени: 2 – 5, 3 – 30, 4 – 120 мин;  $C_{L-Cys} = 0,750$  мМ,  $C_{AgNO_3} = 0,953$  мМ,  $C_{CuSO_4} = 0,025$  мМ. б) в ЦСР (1), 2 – ХЗ (2), 3 – ЦСР-ХЗ (3),  $C_{L-Cys} = 0,750$  мМ,  $C_{AgNO_3} = 0,938$  мМ,  $C_{ХЗ} = 0,0019$  мг/мл [25].

**Таблица 1.**  $\zeta$ -потенциал частиц в анализируемых системах\*

| Образец          | $\zeta$ , мВ | Стандартное отклонение, мВ |
|------------------|--------------|----------------------------|
| ЦСР              | +56,2        | $\pm 4,01$                 |
| ЦСР- $CuSO_4$    | +43,6        | $\pm 4,07$                 |
| ЦСР-ХЗ- $CuSO_4$ | +44,7        | $\pm 3,33$                 |
| ХЗ               | +11,5        | $\pm 6,30$                 |

\*Разбавление образцов 1:4.  $C_{L-Cys} = 0,750$  мМ,  $C_{AgNO_3} = 0,953$  мМ,  $C_{CuSO_4} = 0,025$  мМ,  $C_{ХЗ} = 0,0019$  мг/мл.

Значения  $\zeta$ -потенциала различных образцов (табл. 1) подтверждают электростатическую природу взаимодействий, инициирующих процесс гелеобразования в цистеин-серебряном растворе.

Как мы видим,  $\zeta$ -потенциал кластеров ЦСР понижается после добавления  $CuSO_4$  с +56.2 до +43.6 мВ, что согласуется с результатами, полученными с помощью ДСР (рис. 5а), согласно которым, сульфат-анион как противоион уменьшает заряд кластеров и выступает в роли линкера, образуя связи между кластерами различных цепочек.  $\zeta$ -потенциал ЦСР-ХЗ- $CuSO_4$  системы (+44.7 мВ) соизмерим с величиной заряда ЦСР- $CuSO_4$  образца (+43.6 мВ). Хотя макромолекулы хитозана в водном растворе имеют положительный заряд, равный +11.5 мВ, их влияние на заряд агрегатов в ЦСР-ХЗ- $CuSO_4$  образце оказывается незначительным. Вероятнее всего, часть сульфат-анионов аккумулируется вблизи макромолекул ХЗ и частично нейтрализует заряд его групп.

Результаты, полученные с помощью метода СЭМ, позволяют визуализировать изменения

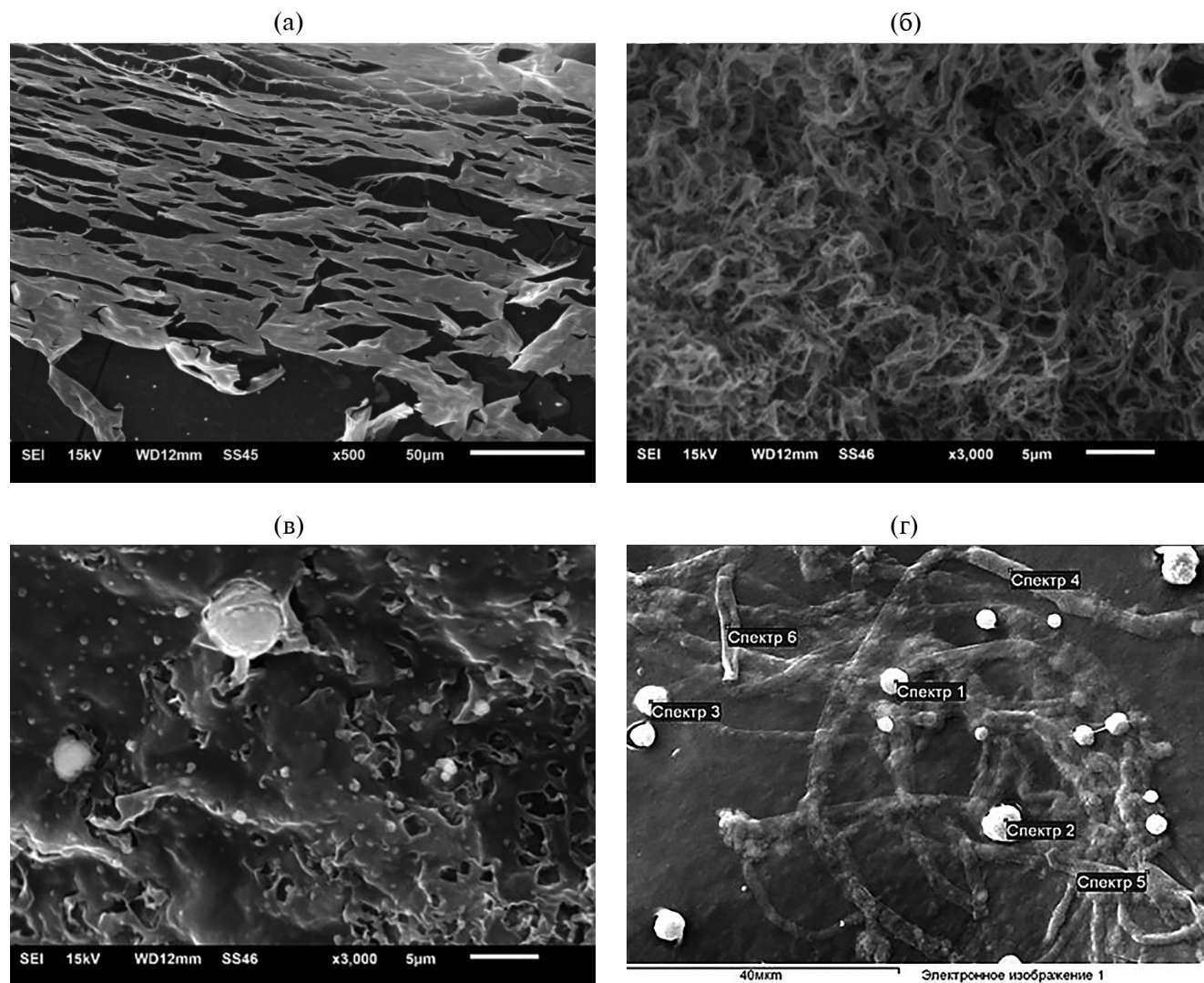


Рис. 6. СЭМ-микрофотографии образцов: а – ЦСП; б, г – ЦСП- $\text{CuSO}_4$ ; в – ЦСП-ХЗ- $\text{CuSO}_4$ ; г – ЦСП-ХЗ.

морфологии ЦСП (рис. 6а) под влиянием хитозана и электролита. В ЦСП- $\text{CuSO}_4$  гидрогеле мы наблюдаем формирование высокопористой сетчатой структуры, характерной для пространственной гель-сетки (рис. 6б). Морфология ЦСП-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогеля отличается от структуры ЦСП- $\text{CuSO}_4$  образца уменьшением пористости и образованием под влиянием хитозана сферических агрегатов. Такие изменения в структуре ЦСП-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогеля могут быть связаны с перераспределением сульфат-анионов между кластерами ЦСП и молекулами ХЗ, вследствие чего в образце формируются более короткие цепочки и более фрагментированная гель-сетка, что подтверждается ПЭМ-изображением ЦСП-ХЗ- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  образца [25]. ПЭМ-изображению ЦСП- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  гидрогеля, в котором формируется волокнообразная пространственная сетка [25], соответствует пористая структура ЦСП- $\text{CuSO}_4$  образца

(рис. 6б). Таким образом, существенные различия в морфологии ЦСП-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  и ЦСП- $\text{CuSO}_4$  гидрогелей, вызванные влиянием поликатиона ХЗ, сводятся к перераспределению сульфат-аниона между двумя подсистемами: ЦСП и ХЗ.

Данные энергодисперсионного анализа ЦСП-ХЗ образца (рис. 6г, табл. 2) подтверждают наши предположения о существовании двух подсистем – кластерных цепочек МС и молекул хитозана. На рисунке мы видим два типа структур: сферические агрегаты с повышенным содержанием серы/серебра (спектры 1–3), предположительно цепочечные кластеры меркаптида серебра в ЦСП, и волокнообразные структуры на основе хитозана (спектры 4–6), характеризующиеся пониженным содержанием серы/серебра.

Таким образом, в работе удалось синтезировать и исследовать гидрогели супрамолекулярной

**Таблица 2.** Энергодисперсионный анализ ЦСР-ХЗ образца, атомные проценты (к рис. 6г)

| Спектр   | C     | N     | O     | S    | Ag   |
|----------|-------|-------|-------|------|------|
| Спектр 1 | 40.43 | 23.94 | 18.81 | 7.48 | 9.34 |
| Спектр 2 | 38.67 | 26.34 | 16.34 | 9.02 | 9.63 |
| Спектр 3 | 42.34 | 27.74 | 17.73 | 5.60 | 6.58 |
| Спектр 4 | 48.04 | 23.02 | 24.21 | 2.43 | 2.30 |
| Спектр 5 | 44.38 | 19.31 | 27.59 | 3.88 | 4.85 |
| Спектр 6 | 65.09 | 11.35 | 20.79 | 1.56 | 1.20 |

природы различного композиционного состава: ЦСР-ХЗ, ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$ , ЦСР- $\text{CuSO}_4$ . Установлено, что гелеобразование в ЦСР системах, содержащих ХЗ и  $\text{CuSO}_4$ , происходит в узком концентрационном диапазоне ( $C_{\text{ХЗ}} = 0.0100\text{--}0.0150$  мг/мл),  $C_{\text{CuSO}_4} = 0.4\text{--}0.6$  мМ). Результаты энергодисперсионного анализа ЦСР-ХЗ образца (рис. 6г, табл. 2) подтверждают существование в гидрогеле двух подсистем – кластерных цепочек МС, формирующих пространственную гель-сетку, и молекул хитозана. В ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогелях предположительно происходит перераспределение сульфат-анионов между кластерами ЦСР и ХЗ, вследствие чего формируется более фрагментированная пространственная гель-сетка. Введение в ЦСР-ХЗ образцов сульфата меди способствует формированию более прочного гидрогеля за счет ассоциации с сульфат-анионом кластеров меркаптида серебра и молекул ХЗ, а также координации ионов  $\text{Cu(II)}$  с депротонированными карбоксильными группами различных кластеров МС [27], при этом не исключается возможность комплексообразования ионов  $\text{Cu(II)}$  с молекулами ХЗ [28, 29]. Роль катиона электролита в процессе гелеобразования в ЦСР системах установлена благодаря вискозиметрическим испытаниям: вязкость ЦСР-ХЗ- $\text{CuSO}_4$  гидрогелей выше ЦСР-ХЗ- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  образцов в одном и том же концентрационном диапазоне [25], как следствие комплексообразующей способности ионов  $\text{Cu(II)}$ . Подобные системы можно рассматривать не только как перспективную матрицу для разработки материалов биомедицинского назначения, но и как объект для изучения процессов самосборки и гелеобразования в ЦСР системе под влиянием полимерных молекул.

Данная работа выполнена на оборудовании лабораторий спектроскопии и электронной микроскопии ЦКП ТвГУ.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета университета. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jagrosse M.L., Agredo P., Abraham B.L., Toriki E.S., Nilsson B.L. Supramolecular phenylalanine-derived hydrogels for the sustained release of functional proteins // ACS Biomater. Sci. Eng. 2023. V. 9. № 2. P. 784–796. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c01299>
2. Alam N., Sarma D. Thixotropic supramolecular met-allogel with 2D sheet morphology: Iodine sequestration and column based dye // Soft Matter. 2020. V. 16. № 47. P. 10620–10627. <https://doi.org/10.1039/D0SM000959H>
3. Du X., Zhou J., Shi J., Bing Xu B. Supramolecular hydrogelators and hydrogels: From soft matter to molecular biomaterials // Chem. Rev. 2015. V. 115. № 24. P. 13165–13307. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00299>
4. Pramanik B. Short peptide-based smart thixotropic hydrogels // Gels. 2022. V. 8. № 9. P. 569. <https://doi.org/10.3390/gels8090569>
5. Liangchun L., Rongqin S., Renlin Z., Yi H. Anions-responsive supramolecular gels: A review // Materials & Design. 2021. № 205. P. 109759. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matdes.2021.109759>
6. Qin L., Wang P., Guo Y., Chen C., Liu M. Self-assembled soft nanomaterials via silver(I)-coordination: Nanotube, nanofiber, and remarkably enhanced antibacterial effect // Advanced Science. 2015. V. 2. № 11. P. 1500134. <https://doi.org/10.1002/advs.201500134>
7. Ma Y., Shi L., Liu F., Zhang Y., Pang Y., Shena X. Self-assembled thixotropic silver cluster hydrogel for anticancer drug release // Chemical Engineering J.

2019. V. 362. P. 650–657.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccej.2019.01.096>
8. *Vandera K.-K.A., Pague C., Omar J., González-Gaitano G., Twana M.W., Khutoryanskiy V.V., Dreiss C.A.* Formation of supramolecular gels from host-guest interactions between PEGylated chitosan and  $\alpha$ -cyclodextrin // *Macromol. Mater. Eng.* 2023. V. 308. № 6. P. 2200646.  
<http://dx.doi.org/10.1002/mame.202200646>
  9. *Furlani F., Marfoglia A., Marsich E., Donati I., Sacco P.* Strain hardening in highly acetylated chitosan gels // *Biomacromolecules*. 2021. V. 22. № 7. P. 2902–2909.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00293>
  10. *Azam A., Ziafat S., Anjum F., Faseeh H., Ban, R., ur Rehman A., Bashir A.* Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in tissue engineering: Chitosan-based polysaccharide biomaterials // *Pakistan Journal of Health Sciences*. 2023. V. 4. № 9. P. 10–16.  
<https://doi.org/10.54393/pjhs.v4i09.1038>
  11. *Liu H., Wang C., Li C., et al.* A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing // *RSC Advances*. 2018. V. 8 № 14. P. 7533–7549.  
<https://doi.org/10.1039/C7RA13510F>
  12. *Kaur M., Sharma A., Puri V., et al.* Chitosan-based polymer blends for drug delivery systems // *Polymers*. 2023. V. 15. № 9. P. 2028.  
<https://doi.org/10.3390/polym15092028>
  13. *Paradowska-Stolarz A., Milkulewicz M., Laskowska J., Karolewicz B., Owczarek A.* The importance of chitosan coatings in dentistry // *Mar. Drugs*. 2023. V. 21. № 12. P. 613.  
<https://doi.org/10.3390/md21120613>
  14. *García-Cabezón C., Godinho V., Salvo-Comino C., Torres Y., Martín-Pedrosa F.* Improved corrosion behavior and biocompatibility of porous titanium samples coated with bioactive chitosan-based nanocomposites // *Materials*. 2021. V. 14. № 21. P. 6322.  
<https://doi.org/10.3390/ma14216322>
  15. *Bashir S., Teo Y.Y., Ramesh S., Ramesh K., Khan A.A.* N-succinyl chitosan preparation, characterization, properties and biomedical applications: A state of the art review // *Reviews in Chemical Engineering*. 2015. V. 31. № 6. P. 563–597.  
<http://dx.doi.org/10.1515/revce-2015-0016>
  16. *He R., Sun S., Wang Z., Hu S.* Synthesis and performance study of pH/magnetic dual response chitosan based emulsifiers // 2023 9th International Conference on Applied Materials and Manufacturing Technology (ICAMMT-2023) 24/04/2023–26/04/2023 Qingyuan, China. 2023. V. 2587. P. 012019.  
<https://doi.org/10.1088/1742–6596/2587/1/012019>
  17. *Lee S., Shanti A.* Effect of exogenous pH on cell growth of breast cancer cells // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 18. P. 9910.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22189910>
  18. *Tenorio-Barajas A.Y., Olvera M.L., Romero-Paredes G., Altuzar V., Garrido-Guerrero E., Mendoza-Barraera C.* Chitosan, chitosan/IgG-loaded, and N-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as potential adjuvant and carrier-delivery systems // *Molecules*. 2023. V. 28. № 10. P. 4107.  
<https://doi.org/10.3390/molecules28104107>
  19. *Begum R., Shenbagarathai R., Lavanya U., Bhavan K.* Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of extracted chitosan-based silver nanoparticles // *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2023. V. 12. № 5. P. e4215.  
<https://doi.org/10.55251/jmbfs.4215>
  20. *Pakhomov P.M., Ovchinnikov M.M., Khizhnyak S.D., Roshchina O.A., Komarov P.V.* A supramolecular medical hydrogel based on L-cysteine and silver ions // *Polym. Sci. Ser. A*. 2011. V. 53. № 9. P. 820–826.  
<http://dx.doi.org/10.1134/S0965545X11090094>
  21. *Khizhnyak S., Komarov P., Ovchinnikov M., Zherenkova L., Pakhomov P.* Mechanism of gelation in low-concentration aqueous solutions of silver nitrate with L-cysteine and its derivatives // *Soft Matter*. 2017. V. 30. № 13. P. 5168–5184.  
<https://doi.org/10.1039/C7SM00772H>
  22. *Komarov P., Ovchinnikov M., Khizhnyak S., Alekseev V., Mikhailov I., Pakhomov P.* On molecular gelation mechanism of L-cysteine based hydrogel // *Nanoscience and Nanoengineering*. 2013. V. 1. № 1. P. 23–35.  
<http://dx.doi.org/10.13189/nn.2013.010104>
  23. *Бабуркин П.О., Комаров П.В., Малышев М.Д., Хижняк С.Д., Пахомов П.М.* Компьютерное моделирование структурообразования в водных растворах L-цистеина и нитрата серебра под влиянием соли-инициатора // *Коллоидн. журн.* 2017. Т. 79. № 5. С. 534–543.  
<https://doi.org/10.7868/S0023291217050020>
  24. *Овчинников М.М., Червинец В.М., Червинец Ю.В., Михайлова Е.С., Хижняк С.Д., Пахомов П.М.* Новые катионные антисептики на основе композиций L-цистеин-серебряного раствора и хитозана // *Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия*. 2016. № 1. С. 140–151.
  25. *Зеников Г.Р., Хижняк С.Д., Пахомов П.М.* Супрамолекулярные гидрогели на основе аминокислоты L-цистеин, нитрата серебра и хитозана // *Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия*. 2021. Т. 4. № 46. С. 131–141.
  26. *Андрианова Я.В., Вишневецкий Д.В., Хижняк С.Д., Пахомов П.М.* Исследование процессов гелеобразования в цистеин-серебряном растворе при добавлении сульфатов металлов // *Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия*. 2023. Т. 3. № 53. С. 21–29.
  27. *Андрианова Я.В., Вишневецкий Д.В., Иванова А.И., Хижняк С.Д., Пахомов П.М.* Процессы гелеобразования в водном растворе L-цистеин/ $\text{AgNO}_3$  под влиянием солей металлов различной

- валентности // Известия Академии Наук. Серия Химическая. 2023. Т. 72. № 9. С. 2171–2179.
28. Brunel F., El Gueddari N.E., Moerschbacher B.M. Complexation of copper(II) with chitosan nanogels: Toward control of microbial growth // Carbohydrate Polymers. 2013. V. 92. № 2. P. 1348–1356. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.025>
29. Mekahlia S., Bouzid B. Chitosan-Copper (II) complex as antibacterial agent: Synthesis, characterization and coordinating bond- activity correlation study // Physics Procedia. 2009. V. 2. № 3. P. 1045–1053. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2009.11.061>
30. Malyshev M.D., Khizhnyak S.D., Zherenkova L.V., Pakhomov P.M., Komarov P.V. Self-assembly in systems based on L-cysteine–silver–nitrate aqueous solution: Multiscale computer simulation // Soft Matter. 2022. V. 18. № 39. P. 7524–7536. <https://doi.org/10.1039/D2SM00846G>
31. Shen J.-S., Li D.-H., Zhang M.-B., Zhou J., Zhang H., Jiang Y.-B. Metal-metal-interaction-facilitated coordination polymer as a sensing ensemble: A case study for cysteine sensing // Langmuir. 2011. V. 27. № 1. P. 481–486. <https://doi.org/10.1021/la103153e>
32. Odriozola I., Casuso P., Loinaz I., Cabanero G., Grande H.J. Designing neutral metallophilic hydrogels from di- and tripeptides // Org. Biomol. Chem. 2011. V. 9. № 14. P. 5059–5061. <http://dx.doi.org/10.1039/c1ob05520h>