

УДК 615.45, 579.61

## Антибактериальная активность биodeградируемых частиц на основе хитозана, содержащих коллоидное серебро

© 2020 Н.Е. СЕДЯКИНА<sup>1\*</sup>, В.Ю. РЕШЕТОВА<sup>2</sup>, А.Ф. КРИВОЩЕПОВ<sup>2</sup>, И.А. БУТОРОВА<sup>2</sup>,  
Н.Б. ФЕЛЬДМАН<sup>1</sup>, С.В. ЛУЦЕНКО<sup>1</sup>, А.Н. КУСКОВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, 119991

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, 125047

\*e-mail: nseyakina@mail.ru

Поступила в редакцию 12.03.2020 г.

После доработки 28.03.2020 г.

Принята к публикации 24.07.2020 г.

В настоящей работе хитозановые частицы с включенным в полимерную матрицу коллоидным серебром были приготовлены введением хитозана в подкисленный золь наночастиц серебра с последующей двухстадийной шшивкой капель полученного раствора ионотропным гелеобразованием на первой стадии и ковалентным шшиванием полимерной матрицы с адипиновой кислотой — на второй. Морфология поверхности хитозановых частиц была изучена с помощью сканирующей электронной микроскопии. Данные, полученные с помощью Фурье-ИК-спектроскопии, подтвердили образование ковалентных связей между хитозаном и адипиновой кислотой. Оценку антибактериальной активности полученных частиц по отношению к культурам *S. aureus* и *E. coli* проводили методом диффузии в агар. Было показано, что хитозановые частицы, содержащие наноструктурированное серебро, обладают антимикробной активностью в отношении исследуемых штаммов и могут использоваться как основа для создания биodeградируемых ранозаживляющих покрытий с длительным антибактериальным эффектом.

*Ключевые слова:* хитозан, наночастицы серебра, антибактериальная активность, ранозаживляющие покрытия

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-4-87-93

В последние годы большое количество работ посвящено разработке ранозаживляющих покрытий на основе хитозановых носителей биологически активных веществ (БАВ) [1–4]. Хитозан является натуральным, нетоксичным, биосовместимым и биodeградируемым полимером, обладающим антимикробной активностью [5]. Благодаря перечисленным свойствам, он имеет большой потенциал в качестве материала для создания подобных систем доставки БАВ. В ряде работ авторы получали хитозановые макросферы с включенными антимикробными агентами, которые могут быть предложены для медицинского применения в составе средств для заживления ран [6–9].

В качестве одного из перспективных действующих веществ, обладающих антибактериальной

активностью, коллоидное серебро может быть использовано для включения в хитозановые носители [10–15]. Биомедицинское применение наночастиц серебра обусловлено их бактерицидными, фунгицидными и антиоксидантными свойствами [16].

Ранее, Yadollahi с соавторами [9] получали шшитые триполифосфатом натрия макросферы на основе хитозана, в процессе приготовления которых нитрат серебра вводили в раствор полимера и впоследствии восстанавливали боргидридом натрия. Полученные частицы хитозана, содержащие коллоидное серебро, проявляли антибактериальную активность в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий.

В данной работе были получены макросферы хитозана с введенным в них золем наночастиц

*Список сокращений:* БАВ – биологически активные вещества; ИК – инфракрасный; КГК – калиевые соли гуминовых кислот; МПК – минимальная подавляющая концентрация; НЧ – наночастицы; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; УФ – ультрафиолетовый; ЦКП – центр коллективного пользования.

серебра. Отверждение хитозановой оболочки проводили двухстадийной сшивкой: ионотропным гелированием с помощью гексаметафосфата натрия и ковалентной сшивкой адипиновой кислотой при нагревании. Последняя стадия является нетривиальным методом получения хитозановых макрофер. Сшивка хитозановых частиц ди- и трикарбоновыми кислотами при повышенных температурах с образованием ковалентной связи редко встречается в литературе, несмотря на то, что несомненным преимуществом описанного способа является возможность отказа от использования токсичных конденсирующих реагентов, таких как 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид [17]. Так, Orienti с соавторами [18] получали хитозановые микроферы для доставки индометацина на основе обратной эмульсии вода/растительное масло, шитые лимонной кислотой при 120 °С (термальный метод сшивания). Piatkowski с соавторами [19] сшивали хитозановые макроферы глутаминовой кислотой при 140–160 °С в условиях микроволнового облучения.

Были изучены физико-химические характеристики полученных нами макрофер хитозана, содержащих коллоидное серебро, и проведена оценка их антибактериальных свойств в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Получение золя НЧ серебра

3,145 г  $\text{AgNO}_3$  (квалификации ХЧ) растворяли в 10 мл дистиллированной воды, затем при постоянном перемешивании раствор прикапывали к 200 мл предварительно отфильтрованного 0,9% раствора калиевых солей гуминовых кислот (КГК) (АО «Щелково Агрохим», Россия). Добавляли водный раствор аммиака 25% (ЧДА) до полного растворения выпавшего осадка. Систему перемешивали в течение 30 мин при 50 °С, затем обрабатывали ультразвуком (Elma S30-H Elmasonic, Elma Schmidbauer GmbH, Германия), при 70 °С в течение 60 мин. По окончании воздействия ультразвука полученный золь оставляли при комнатной температуре до полного остывания и далее отфильтровывали на воронке Бюхнера.

### Оценка характеристик золя наночастиц серебра

Определение pH золя проводили с помощью pH-метра FiveEasy «Mettler Toledo» (Швейцария) с использованием стеклянного электрода.

Анализ спектральных свойств наночастиц (НЧ) серебра проводили с помощью спектрометра GBC Cintra 303 (GBC, Австралия) в центре

коллективного пользования (ЦКП) РХТУ им. Д.И. Менделеева с использованием кюветы с толщиной слоя 10 мм. Измерения выполняли в диапазоне длин волн от 340 нм до 510 нм при разбавлении образца золя в 300 раз.

Определение гидродинамического радиуса наночастиц серебра проводили методом динамического светорассеяния с помощью лазерного анализатора Nanotracs ULTRA (Microtracs Inc., США) в ЦКП РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Определение электрокинетического потенциала наночастиц серебра, основанное на измерении электрофоретической подвижности частиц с использованием эффекта Доплера, проводили с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания).

### Получение хитозановых частиц с наносеребром

Для получения хитозановых частиц с включенным в полимерную матрицу коллоидным серебром к 3%-ному раствору уксусной кислоты в золе серебра при перемешивании на магнитной мешалке и нагревании добавляли хитозан (500 кДа, степень деацетилирования 83%, ЗАО «Биопрогресс», Россия), затем полученный 2% раствор полимера прикапывали к 6%-ному раствору гексаметафосфата натрия в воде. Сформировавшиеся капли раствора хитозана отверждали в течение 20 мин при перемешивании и комнатной температуре. Частицы отфильтровывали и промывали дистиллированной водой, затем добавляли к 3%-ному раствору адипиновой кислоты и выдерживали при перемешивании и нагревании (80 °С) в течение 15 мин. После второй стадии сшивки полученные частицы отфильтровывали и промывали дистиллированной водой. Образец хитозановых частиц, не содержащий наносеребра (контроль), получали по описанной выше методике, при использовании 3%-ного раствора уксусной кислоты в воде для растворения хитозана.

### Оценка характеристик хитозановых частиц

Изучение микроструктуры поверхности хитозановых частиц с включенным наносеребром и контрольного образца проводили на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6490 LV (Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ, детекторе SEM, размере электронного пучка 30, в высоком вакууме. Исследуемые образцы фиксировали на предметном диске с помощью двухсторонней углеродной клейкой ленты и покрывали 24 нм (50 сек при 40 мА) слоем платины в автоматическом коутере JEOL JFC-1600 (Япония).

При выполнении дисперсионного анализа подсчет макросфер по фракциям проводили, используя не менее 300 частиц каждого образца. По результатам анализа рассчитывали среднечисленный диаметр макросфер по формуле:  $D_n = \sum n_i D_i / \sum n_i$ , где  $n_i$  — число частиц с диаметром  $D_i$  (мм).

Инфракрасные спектры образцов хитозановых макросфер снимали на ИК-Фурье спектрометре IR-380 (Nicolet, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, США) с использованием таблеток KBr в ЦКП РХТУ им. Д.И. Менделеева.

### Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) золя серебра

Для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) золя серебра в отношении тест-микроорганизмов *Esheria coli ATCC 25 922* (штамм из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection)) и *Staphylococcus aureus FDA 209 P* (штамм из коллекции микроорганизмов ФБУН Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ)) использовали метод серийных разведений. Испытуемые образцы, концентрации препарата в которых отличались в соседних пробирках в 2 раза, получали разведением золя наночастиц серебра с исходной концентрацией Ag 1%, КГК 0,9% в L-бульоне. Суспензию тест-организмов готовили из предварительно выращенных на скошенном L-агаре тест-культур микроорганизмов путем смыва стерильной дистиллированной водой до получения мутности, соответствующей по плотности 0,5 по стандарту Мак-Фарланда и содержащий  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. По 0,5 мл инокулюма вносили в каждую пробирку, содержащую по 0,5 мл соответствующего разведения золя. Суспензию тест-штамма без золя использовали в качестве контроля. Пробирки инкубировали при температуре 37 °С 24 ч и выдерживали в течение сут при комнатной температуре. Учет результатов включал определение коэффициентов пропускания и оптической плотности раствора в пробирках с исследуемыми и контрольными образцами на спектрофотометре UNICO 1201 (UNICO, США). Эксперименты проводили в трех повторностях.

### Оценка антимикробной активности хитозановых частиц с включенным золем серебра

Исследование антимикробной активности незаполненных хитозановых частиц и образцов с включенным золем серебра проводили

методом диффузии в агар. В качестве тест-микроорганизмов использовали чистые культуры *Esheria coli ATCC 25 922* и *Staphylococcus aureus FDA 209 P*. В чашки Петри с L-агаром вносили тест-культуры, сверху помещали испытуемые образцы, предварительно выдержанные в дистиллированной воде в течение 72 ч [9]. Чашки Петри инкубировали 24 ч в термостате при 37 °С и определяли диаметры зон ингибирования роста микроорганизмов хитозановыми частицами, модифицированными коллоидным серебром, и контрольными образцами, не содержащими наночастицы серебра.

Для выявления пролонгированного действия испытуемых образцов на микроорганизмы чашки выдерживали в течение 8 сут в термостате при 37 °С и фиксировали изменения результатов на 3 и 8 сутки эксперимента. Эксперименты проводили в трех повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Получение и свойства наночастиц серебра

Гидрозоль серебра с содержанием металлических наночастиц 1% масс. был синтезирован восстановлением  $AgNO_3$  в присутствии гуминовых веществ в водно-аммиачной среде. Показатель pH золя составлял 9,15. Появление в спектре экстинкции полученного образца интенсивной полосы поглощения на длине волны возбуждения поверхностных плазмонов ( $\lambda = 420$  нм) подтверждало формирование коллоидного серебра в гидрозоле (рис. 1).

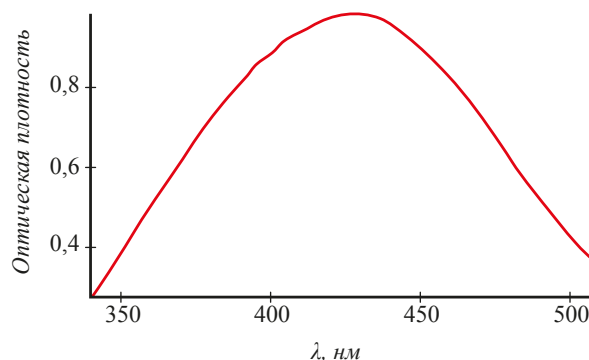


Рис. 1. Спектр экстинкции гидрозоля серебра.

Fig. 1. The extinction spectrum of silver nanoparticles

Гидродинамические радиусы наночастиц в золе были определены методом динамического светорассеяния и находились в диапазоне от 10 до 50 нм, при этом наиболее вероятным являлось значение, равное 10 нм (рис. 2). Электрокинетический потенциал частиц серебра составлял –10 мВ.

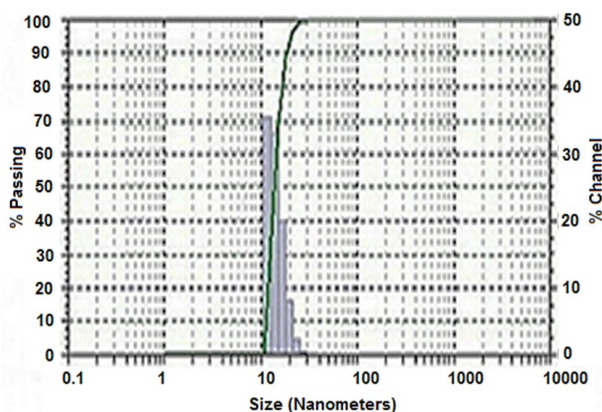


Рис. 2. Распределение по размерам наночастиц золя серебра.

Fig. 2. Size distribution of silver nanoparticles

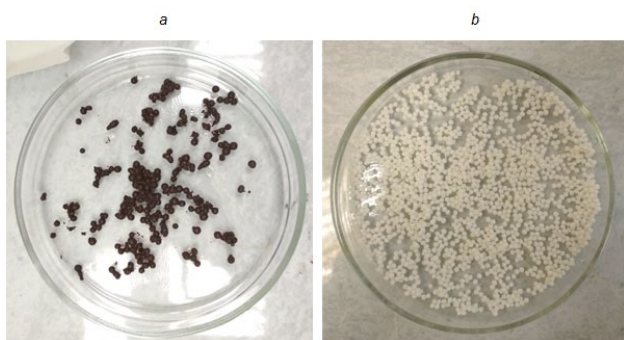


Рис. 3. Фотографии хитозановых частиц (до сушки): (a) MC1 и (b) MC2.

Fig. 3. Photographs of wet chitosan beads (a) MC1 and (b) MC2.

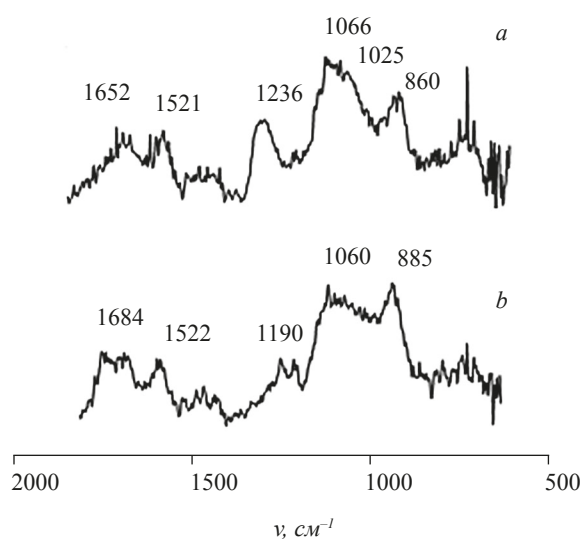


Рис. 4. Фурье-ИК спектры образцов (a) MC1 и (b) MC2.

Fig. 4. FT-IR spectra of chitosan beads (a) MC1 and (b) MC2.

### Получение хитозановых частиц с включенным золем серебра и их характеристики

В работе были получены хитозановые частицы с включенным золем серебра (MC1) и изучены их свойства. Незаполненные макросферы хитозана (MC2) использовали в качестве контроля.

При получении частиц наносеребро вводили в раствор хитозана, капли которого впоследствии отверждали двухстадийной сшивкой. На первой стадии капли раствора хитозана сшивали методом ионотропного гелирования в растворе гексаметафосфата натрия при комнатной температуре, затем выдерживали при перемешивании и нагревании в водном растворе адипиновой кислоты до образования ковалентных связей между аминогруппами хитозана и карбоксильными группами дикарбоновой кислоты. Были получены частицы сферической формы, полые внутри (рис. 3). Среднечисленный диаметр частиц, содержащих золь MC1, составлял 1,64 мкм, незаполненных частиц MC2 — 0,84 мкм. Распределение макросфер по размерам приведено на рис. S1 a,b (дополнительный материал).

Исследование образцов MC1 и MC2 с помощью СЭМ показало, что частицы в обоих образцах имели гладкую поверхность с незначительными шероховатостями, в большей степени присутщими незаполненным макросферам (рис. S2 a,b) (дополнительный материал).

На рис 4 приведены Фурье-ИК спектры хитозановых макросфер, сшитых гексаметафосфатом натрия и адипиновой кислотой.

В спектрах образцов MC1 и MC2 присутствовали пики в области 1190, 1060 и 1025  $\text{см}^{-1}$ , характерные для хитозана и отвечающие валентным колебаниям  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}$  группы в простых эфирах,  $-\text{C}-\text{O}$  связи вторичных спиртов и  $\text{C}-\text{C}$  связи, соответственно [20]. Пик при 1236  $\text{см}^{-1}$  образца MC1 соответствовал валентным колебаниям  $\text{C}-\text{N}$  связи в алифатических аминах. Присутствие в спектрах пиков при 860 и 890  $\text{см}^{-1}$ , отвечающих валентным колебаниям  $-\text{P}=\text{O}$  связи, свидетельствовало о взаимодействии между гексаметафосфатом натрия и протонированными аминогруппами хитозана [21]. На образование ковалентной связи между адипиновой кислотой и хитозаном указывали пики в области 1700–1630  $\text{см}^{-1}$  (амид I, валентные колебания  $-\text{C}=\text{O}$  группы в амидах) и 1620–1510  $\text{см}^{-1}$  (амид II, деформационные колебания  $\text{N}-\text{H}$  связи и валентные колебания  $\text{C}-\text{N}$  связи в амидах). Смещение первого из указанных пиков в коротковолновую область спектра при введении золя серебра в хитозановые частицы (пики

при 1652 и 1684 см<sup>-1</sup> образцов MC1 и MC2), по всей вероятности, происходило вследствие связывания атомов азота с металлическими наночастицами [12].

**Антимикробная активность наночастиц серебра**

Оценку антибактериальной активности золя наночастиц серебра проводили методом серийных разведений. В качестве тест-штаммов использовали *Esherichia coli* ATCC 25 922 и *Staphylococcus aureus* FDA 209 P.

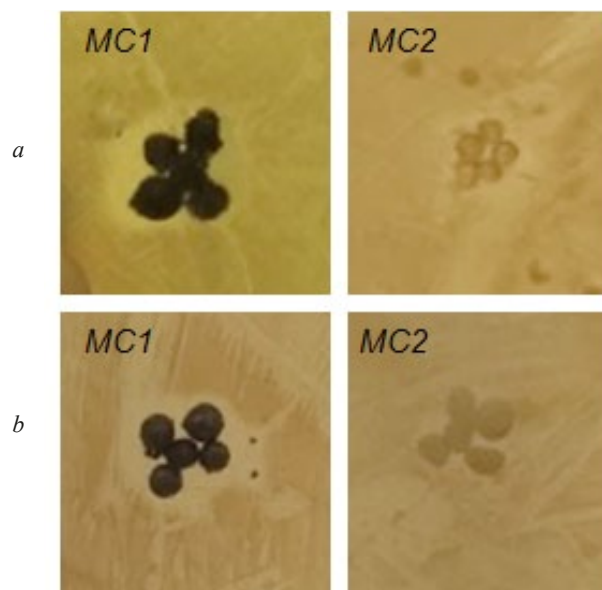
Было показано, что полученный золь обладает высокой антибактериальной активностью в отношении исследованных тест-штаммов, при этом оказывает более сильное действие на грамотрицательные бактерии. В отношении *Esherichia coli* ATCC 25 922 подавление роста бактерий происходило при концентрации наночастиц серебра менее 19,5 мкг/мл, тогда как минимальная подавляющая концентрация золя для *Staphylococcus aureus* FDA 209 P составила 39,1 мкг/мл,

**Антимикробная активность хитозановых частиц с включенным золем серебра**

На рис 5 и в табл. 1 представлены данные эксперимента по изучению действия хитозановых частиц с введенным в полимерную матрицу золем серебра на *Esherichia coli* ATCC 25 922 и *Staphylococcus aureus* FDA 209 P на L-агаризованной среде.

Контрольный образец практически не оказывал бактерицидного действия в отношении тест-культур. Образец, содержащий наносеребро ингибировал рост как грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* так и грамотрицательных *Esherichia coli*. С течением времени наблюдалось некоторое уменьшение диаметров зон ингибирования роста тест-штаммов, но в целом бактерицидное действие хитозановых частиц с включенным золем серебра оставалось достаточно устойчивым в течение 8 сут. Это связано с пролонгированным высвобождением коллоидного серебра из ковалентно сшитой хитозановой оболочки частиц MC1, в результате которого антимикробный эффект полученного образца может сохраняться длительное время. Для сравнения, диаметры зон подавления роста *Esherichia coli* содержащими наночастицы серебра макросферами хитозана, сшитыми триполифосфатом натрия, которые получали Yadollahi с соавторами [9], находились в диапазоне от 5 до 8 мм по истечении 24 ч, но уменьшались до нуля за 7 дней эксперимента.

Предложенный нами способ сшивки полимерной матрицы макросфер позволил получить



**Рис. 5.** Зоны подавления роста тест-штаммов *Esherichia coli* ATCC 25 922 (a) и *Staphylococcus aureus* FDA 209 P (b) образцами хитозановых частиц MC1 и MC2.

**Fig. 5.** The inhibition zones of against (a) *Esherichia coli* ATCC 25 922 and (b) *Staphylococcus aureus* FDA 209 P for the chitosan beads.

Таблица 1

**Диаметры зон подавления роста тест-штаммов *Esherichia coli* ATCC 25 922 и *Staphylococcus aureus* FDA 209 P образцами хитозановых частиц.**

**The inhibition zones of against *Esherichia coli* ATCC 25 922 and *Staphylococcus aureus* FDA 209 P for the chitosan beads.**

Образец	Тест-штамм	Диаметр зон подавления роста бактерий, мм		
		1 день	3 дня	8 дней
MC1	<i>E. coli</i>	9	8,5	7,5
	<i>S. aureus</i>	8	7	6
MC2	<i>E. coli</i>	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	0	0	0

хитозановые частицы с включенным коллоидным серебром, обладающие пролонгированным антибактериальным эффектом в отношении штаммов *Esherichia coli* ATCC 25 922 и *Staphylococcus aureus* FDA 209 P и большей эффективностью в отношении лизиса тестируемого грамотрицательного штамма по сравнению с описанными ранее в литературе образцами [9]. Полученные биodeградируемые макросферы, содержащие наноструктурированное серебро, могут использоваться как основа для создания биodeградируемых ранозаживляющих покрытий с длительным антибактериальным эффектом.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа поддержана «Проектом повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров».

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-18039.

## Дополнительный материал

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <http://www.biotechnology-journal.ru>

**Рис. S1.** Гистограммы распределения по размерам образцов (а) МС1 и (б) МС2 (после сушки).

**Рис. S2.** СЭМ-микрофотографии образцов МС1 (а) и МС2 (б).

## ЛИТЕРАТУРА

- Ahmed S., Ikram S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. *Achiev. Life Sci.*, 2016, 10 (1), 27–37. [dx.doi.org/10.1016/j.als.2016.04.001](https://doi.org/10.1016/j.als.2016.04.001)
- Moeinia A., Pedram P., Makvandi P., Malinconico M., d'Ayala G.G. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: a review. *Carbohydr. Polym.*, 2020, 233 (1), 115839. [doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115839](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115839)
- Shamloo A., Sarmadi M., Aghababaie Z., Vossoughi M. Accelerated full-thickness wound healing via sustained bFGF delivery based on a PVA/chitosan/gelatin hydrogel incorporating PCL microspheres. *Int. J. Pharm.*, 2018, 537 (1–2), 278–289. [doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.045](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.045)
- Romić D., Klarić M.Š., Lovrić J., Pepić I., Cetina-Čizmek B., Filipović-Grčić J., Hafner A. Melatonin-loaded chitosan/Pluronic® F127 microspheres as in situ forming hydrogel.
- An innovative antimicrobial wound dressing. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2016, 107, 67–79. [doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.06.013](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.06.013)
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, 2006, 31, 603–632. [doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001)
- Yuvaraja G., Pathak J.L., Weijiang Z., Yaping Z., Jiao X. Antibacterial and wound healing properties of chitosan/poly(vinyl alcohol)/zinc oxide beads (CS/PVA/ZnO). *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, 103, 234–241. [doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.020](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.020)
- Yu S.-H., Wu S.-J., Wu J.-Y., Wen D.-Y., Mi F.-L. Preparation of fucoidan-shelled and genipin-crosslinked chitosan beads for antibacterial application. *Carbohydr. Polym.*, 2015, 126 (1), 97–107. [doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.068](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.068)
- Farhoudian S., Yadollahi M., Namazi H. Facile synthesis of antibacterial chitosan/CuO bio-nanocomposite hydrogel beads. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, 82, 837–843. [doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.018](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.018)
- Yadollahi M., Farhoudian S., Namazi H. One-pot synthesis of antibacterial chitosan/silver bio-nanocomposite hydrogel beads as drug delivery systems. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, 79, 37–43. [doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.032](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.032)
- Qin Y., Liu Y., Yuan L., Yong H., Liu J. Preparation and characterization of antioxidant, antimicrobial and pH-sensitive films based on chitosan, silver nanoparticles and purple corn extract. *Food Hydrocoll.*, 2019, 96, 102–111. [doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.017](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.017)
- Shah A., Hussain I., Murtaza G. Chemical synthesis and characterization of chitosan/silver nanocomposites films and their potential antibacterial activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 116, 520–529. [doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.057](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.057)
- Kadam D., Momin B., Palamthodi S., Lele S.S. Physicochemical and functional properties of chitosan-based nanocomposite films incorporated with biogenic silver nanoparticles. *Carbohydr. Polym.*, 2019, 211, 124–132. [doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.005](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.005)
- An J., Ji Z., Wang D., Luo Q., Li X. Preparation and characterization of uniform-sized chitosan/silver microspheres with antibacterial activities. *Mater. Sci. Eng. C*, 2014, 36, 33–41. [dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.11.037](https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.11.037)
- Yang C.H., Wang L.S., Chen S.Y., Huang M.C., Li Y.H., Lin Y.C., Chen P.F., Shaw J.F., Huang K.S. Microfluidic assisted synthesis of silver nanoparticle-chitosan composite microparticles for antibacterial applications. *Int. J. Pharm.*, 2016, 510, 493–500. [dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.010](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.010)
- Shen J., Jin B., Qi Y.-C., Jiang Q.-Y., Gao X.-F. Carboxylated chitosan/silver-hydroxyapatite hybrid microspheres with improved antibacterial activity and cytocompatibility. *Mater. Sci. Eng. C*, 2017, 78, 589–597. [dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.100](https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.100)
- Sánchez-López E., Gomes D., Esteruelas G., Bonilla L., Lopez-Machado A.L., Galindo R., Cano A., Espina M., Ettcheto M., Camins A., Silva A.M., Durazzo A., Santini A., Garcia M.L., Souto E.B. Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials*, 2020, 10, 292. [doi:10.3390/nano10020292](https://doi.org/10.3390/nano10020292)
- Valderruten N.E., Valverde J.D., Zuluaga F., Ruiz-Durantez E. Synthesis and characterization of chitosan hydrogels cross-linked with dicarboxylic acids. *React. Funct. Polym.*, 2014, 84, 21–28. [dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.08.006](https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.08.006)
- Orienti I., Aiedeh K., Gianasi E., Bertasi V., Zecchi V. Indomethacin loaded chitosan microspheres. Correlation between the erosion process and release kinetics. *J Microencapsul.*, 1996, 13, 463–472. <https://doi.org/10.3109/02652049609026031>

20. Piatkowski M., Janus L., Radwan-Pragłowska J., Bogdał D., Matysek D. Biodegradable, pH-sensitive chitosan beads obtained under microwave radiation for advanced cell culture *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2018, 164, 324–331. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.061
21. Nagaonkar, D., Gaikwad, S., Rai, M. Catharanthus roseus leaf extract-synthesized chitosan nanoparticles for controlled in vitro release of chloramphenicol and ketoconazole. *Colloid Polym. Sci.* 2015, 293, 1465–1473. <https://doi.org/10.1007/s00396-015-3538-3>
22. Walke S., Srivastava G., Nikalje M., Doshi J., Kumar R., Ravetkar S., Doshi P. Fabrication of chitosan microspheres using vanillin/TPP dual crosslinkers for protein antigens encapsulation. *Carbohydr. Polym.*, 2015, 128, 188–198. [dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.020](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.020)

## Antibacterial Activity of Biodegradable Particles based on Chitosan Containing Colloidal Silver

N.E. SEDYAKINA<sup>1\*</sup>, V.Yu. RESHETOVA<sup>2</sup>, A.F. KRIVOSHCHEPOV<sup>2</sup>, I.A. BUTOROVA<sup>2</sup>,  
N.B. FELDMAN<sup>1</sup>, S.V. LUTSENKO<sup>1</sup>, and A.N. KUSKOV<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup> Russian University of Chemical Technology named after D.I Mendeleev (MUCTR), Moscow, 125047 Russia

\*e-mail: nsedyakina@mail.ru

Received March 12, 2020

Revised March 28, 2020

Accepted July 24, 2020

**Abstract**—Chitosan beads with colloidal silver nanoparticles included in the polymer matrix have been obtained by the introduction of chitosan into an acidified nanosilver sol. Dual interconnection of drops of the resulting solution was then carried out by ionotropic gelation at the first stage and covalent crosslinking of the polymer matrix with adipic acid at the second stage. The surface morphology of the obtained beads was studied by scanning electron microscopy. Data of Fourier transform IR spectroscopy confirmed the formation of covalent bonds between chitosan and adipic acid. The antibacterial activity of obtained beads against *S. aureus* and *E. coli* was evaluated using agar diffusion test. It was shown that the chitosan beads modified with nanostructured silver exhibited an antibacterial effect against the tested strains, and they can be used as a basis for creating biodegradable wound healing dressings with a prolonged antibacterial effect.

**Key words:** chitosan, silver nanoparticles, antibacterial activity, wound dressings

**Funding**—This work was supported by the “Russian Academic Excellence Project 5–100”.

The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research in the framework of the Scientific Project no. 18-29-18039.

**Supplementary material**—The online version of this paper contains supplementary material available free of charge at <http://www.biotechnology-journal.ru>

**Fig. S1.** Particle size distributions in dry chitosan beads (a) MC1 and (b) MC2.

**Fig. S2.** SEM microphotographs of MC1 (a) и MC2 (b).

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-4-87-93