

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΡΓΥΡΟΥ

**A. Ντόλια^{1*}, N. Ματσιοπούδη^{1,4}, E. Τριανταφύλλου⁴, Γ. Ευαγγελοπούλου⁴, Β. Καραχρήστου¹, E. Ρίζος¹,
Θ. Καραμανίδου³, A. Τσουκνίδας³, Δ. Παπαδόπουλος³, N. Μιχαηλίδης² & A. Αγγελή^{1*}**

¹Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πολυτεχνική Σχολή, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

²Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών, Πολυτεχνική Σχολή, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

³PLiN Nanotechnology S.A, Θέρμη Θεσσαλονίκης, Ελλάδα

⁴Ελληνικός Στρατός, Λάρισα, Ελλάδα

(*antoliac@cheng.auth.gr, aggeli@auth.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νανοσωματίδια αργύρου αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη επιλογή, για την σύνθεση αντιμικροβιακών υλικών. Έρευνες έχουν δείξει ότι τα οξείδια του μετάλλου έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση [1] και η σύστασή τους με τη μορφή νανοσωματιδίων οδηγούν στη σύνθεση αποτελεσματικών αντιβακτηριδιακών υλικών. [3] Η ευρεία και ισχυρή αντιβακτηριακή δράση των νανοσωματιδίων, οφείλεται στον πολύπλευρο μηχανισμό με τον οποίο επιδρούν στα μικρόβια. Ο άργυρος, αλλά και τα νανοσωματίδια αργύρου, σε υδατικό διάλυμα απελευθερώνουν ιόντα αργύρου, τα οποία είναι βιολογικώς δραστικά και προσδίδουν σε μεγάλο βαθμό, τη βακτηριοκτόνο δράση [2].

Η μελέτη της αντιβακτηριδιακής δράσης των νανοσωματιδίων αργύρου, επιτεύχθηκε με μία σειρά in vitro πειραμάτων με διαφορετικά είδη βακτηρίων, gram+, gram-, παθογόνων και μη παθογόνων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι είναι ισχυρά δραστικά σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 50 ppm. Ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων που χρησιμοποιήθηκαν, ως προς το μέγεθος, έγινε φασματοσκοπικά, με τη χρήση φασματοφωτομέτρου στο ορατό φως. Λόγω του έντονου φαινομένου Surface Plasmon Resonance (SPR), τα νανοσωματίδια αργύρου εμφάνισαν μέγιστη κορυφή στα 430nm, όπου με βάση τη βιβλιογραφία αντιστοιχεί σε μέγεθος διαμέτρου 25 nm. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα παραπάνω προκαταρκτικά πειράματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά. Ένας πληρέστερος φυσικοχημικός χαρακτηρισμός κρίνεται απαραίτητος, για να γίνει εφικτή η χρήση τους σε ένα μεγάλο εύρος προϊόντων βιοϊατρικής μηχανικής.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο άργυρος είναι ένα μη τοξικό ανόργανο υλικό που παρουσιάζει την υψηλότερη ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα μεταξύ όλων των μετάλλων και είναι γνωστό για την ανασταλτική του δράση κατά της ανάπτυξης 650 τύπων μικροβίων. Οι ιατρικές ιδιότητες του αργύρου είναι γνωστές εδώ και πάνω από 2000 χρόνια. Από τον 19ο αιώνα, οι αργυρούχες ενώσεις χρησιμοποιούνται σε πολλές αντιμικροβιακές εφαρμογές. Είναι γνωστό ότι τα ιόντα αργύρου και οι αργυρούχες ενώσεις είναι ισχυρά τοξικές εναντίον των μικροοργανισμών. Αυτή η ιδιότητα του αργύρου τον καθιστά εξαιρετική επιλογή για διάφορους ρόλους στο πεδίο της ιατρικής.

Η επιστήμη της νανοτεχνολογίας εξαπλώνεται ραγδαίως με την παραγωγή νανοπροϊόντων και νανοσωματιδίων (NPs), τα οποία παρουσιάζουν νέες φυσικοχημικές ιδιότητες και διαφέρουν σημαντικά από εκείνα με μεγαλύτερες διαστάσεις. Τα νανοσωματίδια αργύρου είναι σωματίδια αργύρου που το μέγεθός τους κυμαίνεται από 1 έως 100 nm. Παρουσιάζουν μοναδικές και βελτιωμένες ιδιότητες συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα υλικά στη μακροκλίμακα. Μπορούν να συντεθούν σε διάφορα σχήματα ανάλογα με την εφαρμογή κάθε φορά ενώ συνήθως χρησιμοποιούνται τα σφαιρικά νανοσωματίδια αργύρου.

Συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια αργύρου κερδίζουν ολοένα και περισσότερο έδαφος στον τομέα της βιοϊατρικής μηχανικής καθώς αποτελούν την τελευταία εξέλιξη στις αντιμικροβιακές

εφαρμογές, παρουσιάζοντας ισχυρή δράση ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς με στοχευμένη ικανότητα και μειωμένη κυτταροτοξικότητα. Ο άργυρος χρησιμοποιείται γενικά με την μορφή νιτρικών για να επάγει την αντιμικροβιακή δράση, αλλά όταν χρησιμοποιούνται νανοσωματίδια αργύρου, υπάρχει μία τεράστια αύξηση του εμβαδού επιφανείας στην οποία εκτίθεται το μικρόβιο.

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα νανοσωματίδια αργύρου λειτουργούν ώστε να δρουν κατά των μικροβίων δεν είναι πλήρως γνωστός και διερευνάται. Υπάρχουν, ωστόσο, ποικίλες θεωρίες όσον αφορά τη δράση τους ως μικροβιοκτόνα.

Αρχικά, η ικανότητα των AgNPs να ελέγχουν τη βακτηριακή δραστηριότητα βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις με τρία κύρια δομικά συστατικά των βακτηρίων: συγκεκριμένα με την πεπτιδογλυκάνη στο κυτταρικό τοίχωμα, με το DNA και με τις πρωτεΐνες, επηρεάζοντας κυρίως τα ένζυμα που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Επίσης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα AgNPs έχουν πολύ μεγάλη αναλογία επιφάνειας / όγκου. Ως εκ τούτου, η ισχύς των αλληλεπιδράσεων με τις βακτηριακές επιφάνειες διευκολύνεται και καθιστά υψηλή την αντιβακτηριακή δράση. Έχει αποδειχθεί ότι τα AgNPs είναι σίγουρα ένα αποτελεσματικό αντιβιοτικό κατά των *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus aureus*. [4] Ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών από τα νανοσωματίδια αργύρου μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο τα κύτταρα πεθαίνουν. Υπήρξαν μελέτες φασματοσκοπίας συντονισμού ηλεκτρονικού spin που πρότειναν ότι υπάρχει σχηματισμός ελεύθερων ριζών από τα νανοσωματίδια αργύρου όταν είναι σε επαφή με τα βακτήρια, και αυτές οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να βλάπτουν την κυτταρική μεμβράνη καθιστώντας την πορώδη, γεγονός που τελικά μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Η βακτηριοκτόνος δράση σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση AgNPs καθώς και με το μέγεθος τους. Επιστημονικά στοιχεία έχουν καταδείξει ότι η αντιμικροβιακή δράση των AgNPs εξαρτάται και από το σχήμα τους.

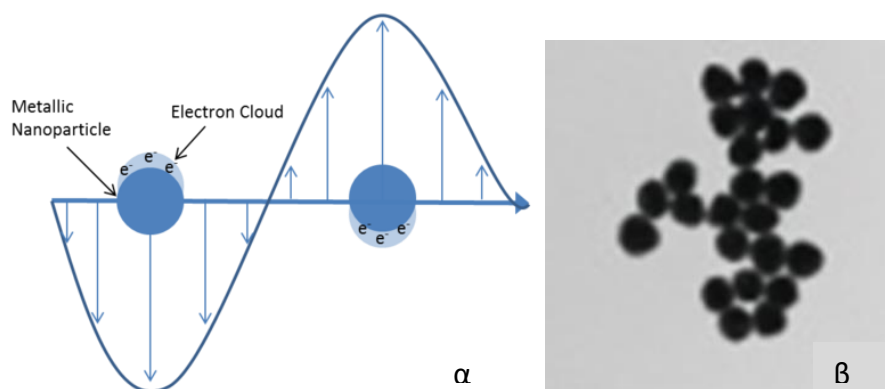
Το μέγεθος του νανοσωματιδίου υπονοεί ότι έχει μεγάλο εμβαδόν επιφανείας για να έρθει σε επαφή με τα βακτηριακά κύτταρα και ως εκ τούτου, θα έχει υψηλότερο ποσοστό αλληλεπίδρασης σε σχέση με μεγαλύτερα σωματίδια. [5]

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (Ultraviolet-Visible, UV-VIS) ανήκει στις φασματοσκοπικές μεθόδους χημικής ανάλυσης που χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την προσδιορισμό διαφόρων χημικών παραγόντων όπως αυτών που σχετίζονται με τη δομή, την κινητική, την ταυτοποίηση ή την ποσοτική ανάλυση διαφόρων ενώσεων.

Λόγω των μοναδικών οπτικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων αργύρου, ένα μεγάλο μέρος των πληροφοριών, σχετικά κυρίως με την ποιοτική αλλά και με την ποσοτική κατάσταση των νανοσωματιδίων, μπορεί να ληφθεί με την ανάλυση των φασματικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων αργύρου στο διάλυμα.

Τα νανοσωματίδια αργύρου, απορροφούν το φως με εξαιρετική απόδοση. Η ισχυρή αλληλεπίδρασή τους με την ακτινοβολία παρουσιάζεται επειδή τα ηλεκτρόνια αγωγιμότητας στην επιφάνεια του μετάλλου υποβάλλονται σε ταλάντωση όταν διεγείρονται από φως σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Αυτή η συλλογική ταλάντωση είναι γνωστή ως συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR), και είναι η αιτία που η ένταση της απορρόφησης των νανοσωματιδίων αργύρου είναι πολύ υψηλότερη από ότι πανομοιότυπου μεγέθους μη πλασμονικά νανοσωματίδια.



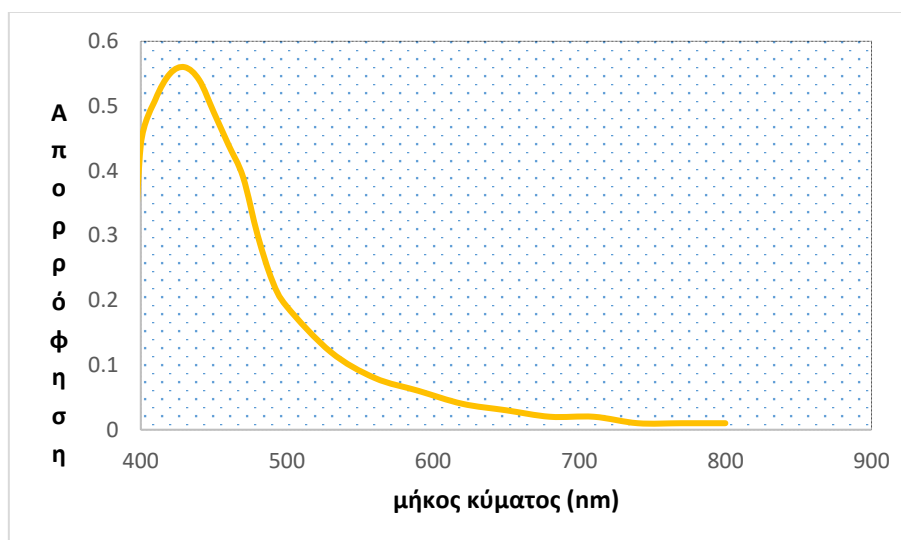
Σχήμα 1. α) Συντονισμός επιφανειακών πλάσμονίων - Surface Plasmon Resonance (SPR). β) Νανοσωματίδια Αργύρου [6].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων αργύρου έγινε στην περιοχή του ορατού φωτός, γιατί σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση. Η μέγιστη απορρόφηση σε σχέση με το μήκος κύματος δείχνουν μια εκτίμηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων Ag.

▪ Φασματοσκοπικές μετρήσεις

Στο σχήμα 2, το δείγμα που μετρήθηκε φασματοσκοπικά, ήταν εναιώρημα 300 ppm νανοσωματιδίων Ag. Είναι φανερό η κορυφή μεταξύ των 420 και 430 nm, όπου σύμφωνα με την βιβλιογραφία αντιστοιχεί σε μέγεθος μεταξύ 20-30 nm νανοσωματιδίων Ag.



Σχήμα 2. Απορρόφηση ορατού φωτός σε εναιώρημα 300 ppm νανοσωματιδίων Ag.

▪ Πειράματα in vitro

Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα στελέχη από τους παρακάτω μικροοργανισμούς :

1. *Salmonella Typhimurium* (NCTC 12023)
2. *Listeria monocytogenes* (NCTC 11994)
3. *Escherichia coli* (WDCM 00090)
4. *Staphylococcus aureus* (WDCM 00032)

Η δράση των νανοσωματιδίων αργύρου ελέγχθηκε σε διαφορετικούς αρχικούς πληθυσμούς των παραπάνω μικροοργανισμών και συγκεκριμένα :

1. 10^3 cfu/ml
2. 10^6 cfu/ml

Για τη μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις και συγκεκριμένα :

1. 10 ppm
2. 50 ppm
3. 100 ppm

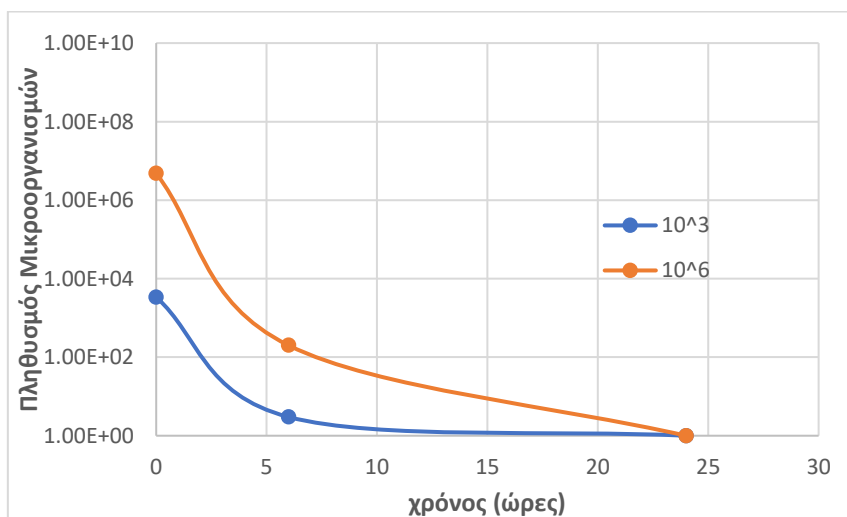
Στη συνέχεια, όλοι οι θρεπτικοί ζωμοί επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37°C . Για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των ζωντανών κυττάρων των βακτηρίων, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση ύστερα από 0, 6, 24 και 48 ώρες. Η καταμέτρηση πραγματοποιήθηκε σε TSYEA (Tryptic Soy Yeast Extract Agar, BIOLIFE), με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης. Συγκεκριμένα, 100 μl βακτηριακού εναιωρήματος τοποθετήθηκαν σε τρυβλία petri και προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα θερμοστατημένου στους 47°C , θρεπτικού υλικού. Μετά τη στερεοποίηση του υποστρώματος, τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 24 – 48 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των αποικιών με τη βοήθεια μετρητή αποικιών.

Όλος ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε (κλίβανοι επώασης, πιπέτες, υδατόλουτρο) ήταν διακριβωμένος από διαπιστευμένο εργαστήριο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε τέσσερις διαφορετικά είδη βακτηρίων: παθογόνα και μη, gram + και gram-. Η αντιβακτηριδιακή τους δράση, έγινε φανερή σε όλα τα είδη αλλά κυρίως από συγκέντρωση ≥ 50 ppm. Ενδεικτικά στο ακόλουθο σχήμα παρουσιάζεται η αντιμικροβιακή δράση των νανοσωματιδίων Ag με συγκέντρωση 50ppm στο βακτήριο *Staphylococcus* στη διάρκεια των 48 ωρών. Μετά από διάστημα 5 ωρών και με διαφορετικούς αρχικούς πληθυσμούς του βακτηρίου, η πτώση τους είναι ραγδαία.

Staphylococcus



Σχήμα 3. Η αντιβακτηριδιακή δράση των νανοσωματιδίων Ag (εναιώρημα 50 ppm) στο μη παθογόνο gram+βακτήριο, *Staphylococcus*.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα Νανοσωματίδια Ag απορροφούν στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος με κορυφή να εμφανίζεται σε μήκος κύματος 430 nm περίπου (σχήμα 2), που

αντιστοιχεί σε μέγιστη απορρόφηση και μέγεθος περίπου 25 nm. Είναι αποτελεσματικά αντιβακτηριδιακά σε συγκεντρώσεις ≥ 50 ppm σε παθογόνα βακτήρια (*Lysteria*, *Salmonella*) και μη παθογόνα (*E.coli*, *Staphylococcus*). Δρουν, επίσης αποτελεσματικά σε gram + (*Staphylococcus*, *Listeria*) και gram - (*E.coli*, *Salmonella*) βακτήρια.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, μελλοντικός μας στόχος είναι η περεταίρω διερεύνηση τους, πιο ακριβής χαρακτηρισμός τους, για να γίνει εφικτή η εφαρμογή τους σε νέα προϊόντα βιοϊατρικής μηχανικής

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Stoimenov PK, Klinger RL, Marchin GL, Klabunde KJ. (2002). *Langmuir*, 18: 6679-6686.
- [2] Lok CN, (2007). *J.Biol.Inorg.Chem*, 12: 527-534.
- [3] FrestaM, PuglisiG, GiammonaG, CavallaroG, MicaliN, FurneriPM. (1995). *J. Pharm. Sci* 84: 895-902.
- [4] Ingle, A. et al., (2008). *Current Nanoscience* 4: 141-144.
- [5] Morones, J. R. et al. (2005). *Nanotechnology*, 16: 2346-2353.
- [6] <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>.