

ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ ΠΥΡΙΤΙΑΣ ΩΣ ΦΟΡΕΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

Μ. Παπαγεωργίου^{1,2}, Μ. Δουλούδη¹, Α. Τσετσέκου², Ι. Κίτσου², Μ. Βαρδαβούλιας³, Υ. López⁴, S. M. Soto González⁴, S. López-Ibáñez⁵, I. Gutiérrez-del-Río⁵, C. J. Villar⁵, F. Lombó⁵, Μ. Αρκάς^{1,*}

¹Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης & Νανοτεχνολογίας Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», Αθήνα, Ελλάδα

²Σχολή Μηχανικών Μεταλλείων Μεταλλουργών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα

³Πυρογενεσις ΑΒΕΕ

⁴Institut de Salut Global de Barcelona, Hospital Clínic - Universitat de Barcelona

⁵Departamento de Biología Funcional (Microbiología), Universidad de Oviedo (Spain)

(*m.arkas@inn.demokritos.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Νέα λειτουργικά υλικά: υβριδικές υδρογέλες και ξηρά πηκτώματα παράγονται από ορθοπυριτικό οξύ και υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη. Το δένδριτικό πολυμερές διαθέτει κοιλότητες στις οποίες μπορούν να ενθυλακωθούν φαρμακευτικές ουσίες και η αποδέσμευση τους στο κατάλληλο περιβάλλον να είναι ελεγχόμενη και/ή παρατεταμένη. Παράλληλα εντάσσεται στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου του ορθοπυριτικού οξέος.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρήση μεταλλικών εμφυτευμάτων από τιτάνιο και χάλυβα για την αποκατάσταση κατεστραμμένων οστών είναι καθιερωμένη. Η επιτυχία όμως των μεταμοσχεύσεων περιορίζεται εξαιτίας του σχηματισμού βιοϋμενίων, που ευθύνονται για την εμφάνιση χρόνιων νοσημάτων. Η απομάκρυνσή τους είναι εξαιρετικά δυσχερής λόγω των βακτηρίων τα οποία τους προσδίδουν ανθεκτικότητα σε εξωτερικές μεταβολές και ενέχει τον κίνδυνο αυξημένης τοξικότητας καθώς απαιτεί σημαντικές ποσότητες αντιβιοτικής ουσίας^[1]. Η ανάπτυξη συνθέσεων πυριτίας-υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (HB-PEI)^[2-3] ως φορέων των δραστικών ουσιών που αναστέλλουν το σχηματισμό βιομενίων “antibiofilm” όπως το λινολενικό οξύ και/ή αντιβιοτικών όπως η γενταμικίνη σε ορθοπεδικά εμφυτεύματα αποτελεί μία καινοτόμα προσέγγιση.

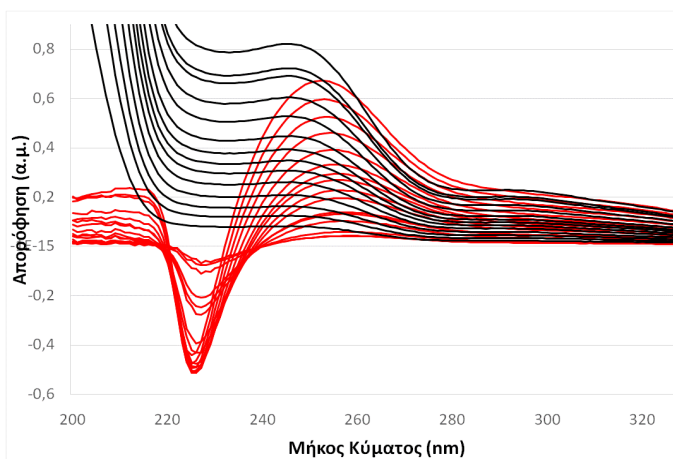
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σύνθεση επικαλύψεων υδρογελών-ξηρογελών

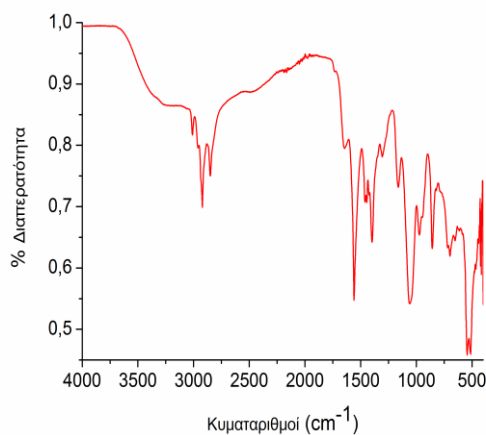
Η σύνθεση της υδρογέλης προέκυψε από την ανάμειξη σε διαφορετικές αναλογίες ορθοπυριτικού οξέος 1 M με διάλυμα υπερδιακλαδισμένης πολυεθυλενιμίνης μοριακού βάρους 25,000 συγκεντρώσεως 100 mM σε πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμινοομάδες. Πιο συγκεκριμένα, πρώτο στάδιο της διαδικασίας αποτέλεσε η υδρόλυση 2 ml διαλύματος τετρα-αιθοξυσιλανίου σε ορθοπυριτικό οξύ με υδροχλωρικό οξύ 5 mM. Στο διάλυμα εμβαπτίστηκαν τα προς επικάλυψη μεταλλικά δοκίμια ανοξείδωτου χάλυβα SS316 κατάλληλα τροποποιημένα με τιτάνιο. Κατόπιν προστέθηκε το διάλυμα του πολυμερούς. Το pH ρυθμίστηκε στο 7.5 με Trizma. Η δημιουργία των υδρογελών ολοκληρώθηκε σε διάστημα 1h. Στη συνέχεια τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ήπια ξήρανση υπό κενό υπεράνω P₂O₅ προς σχηματισμό ξηρογελών. Η διαδικασία επικάλυψης επαναλήφθηκε άλλη μια φορά. Η ενσωμάτωση των δραστικών ουσιών έγινε με διπλή διαβροχή υδατικού διαλύματος γενταμικίνης 0.09 M ακολουθούμενη από ξήρανση. Η προσρόφηση των δραστικών ουσιών συνοδεύεται από διόγκωση των ξηρών πηκτωμάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

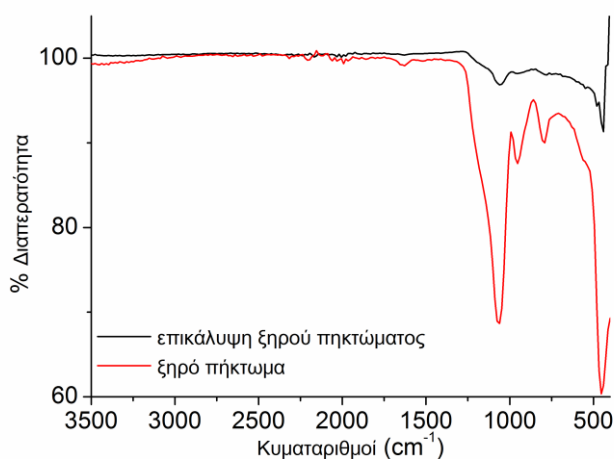
Η ενσωμάτωση των δραστικών ουσιών στην υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη μελετήθηκε φασματοσκοπικώς. Για τη μεν γενταμικίνη με φασματοσκοπία UV επιλέχθηκε ως δείγμα αναφοράς νερό αλλά και υδατικό διάλυμα πολυαιθυλενιμίνης 100mM προκειμένου να μην εμφανίζεται η απορρόφησή της (Σχήμα 1). Όπως φαίνεται από το σχήμα και στις 2 περιπτώσεις φαίνεται μεταβολή του φάσματος στα 255 nm καθώς το αντιβιοτικό εισέρχεται στις κοιλότητες του πολυμερούς. Όσον αφορά το λινολενικό οξύ ο σχηματισμός συμπλόκου με την πολυαιθυλενιμίνη φαίνεται με φασματοσκοπία IR του στερεού υπολείμματος όπου βρίσκεται υπό μορφή ανιόντος όπως προκύπτει από την κορυφή στους 1500 cm^{-1} (Σχήμα 2). Η δημιουργία σταθερής επικάλυψης στο μεταλλικό υπόστρωμα πιστοποιείται με φασματοσκοπία IR όπου παρατηρείται καθαρά το φάσμα της ξηρογέλης στο φάσμα του μεταλλικού δείγματος (Σχήμα 3) και με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης όπου η επικάλυψη φαίνεται ως λευκή στοιβάδα πάνω στην επιφάνεια του μετάλλου (Σχήμα 4).



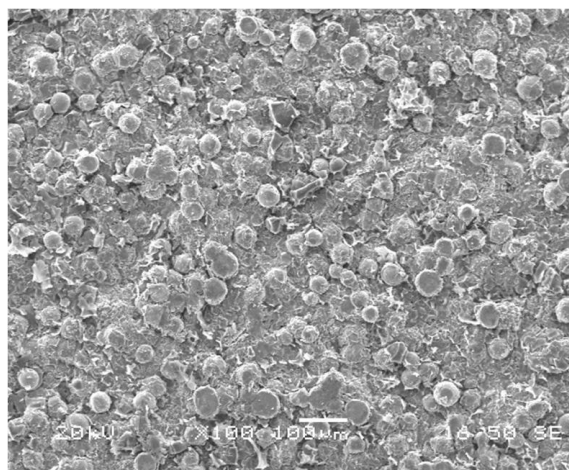
Σχήμα 1. Φάσματα Υπεριώδους Ορατού συμπλόκου HB-PEI γενταμικίνης σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα με νερό (μαύρες γραμμές) και HB-PEI στο θάλαμο αναφοράς (κόκκινες γραμμές).



Σχήμα 2. Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου HB-PEI λινολενικού οξέος.

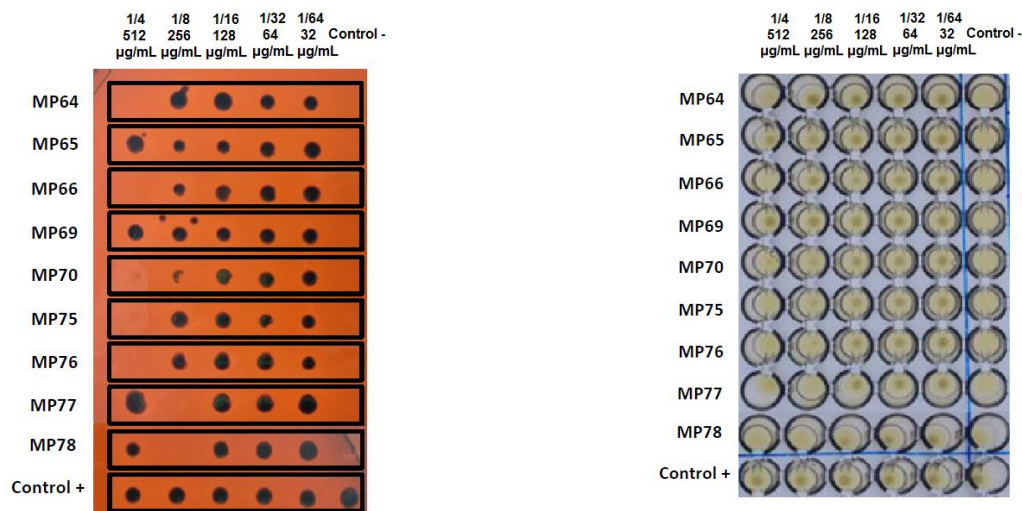


Σχήμα 3. Σύγκριση φασμάτων υπερύθρου του ξηρού πηκτώματος και της επικάλυψης του στα μεταλλικά δοκίμια

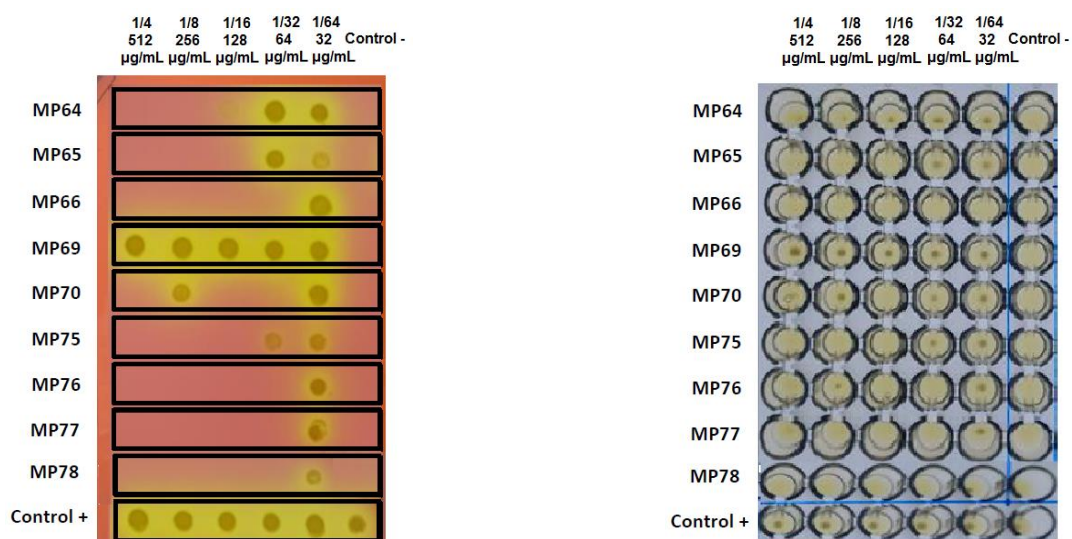


Σχήμα 4. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης της επιφάνειας δοκιμίου ανοξείδωτου χάλυβα με τιτάνιο όπου φαίνεται η επικάλυψη ξηρογέλης

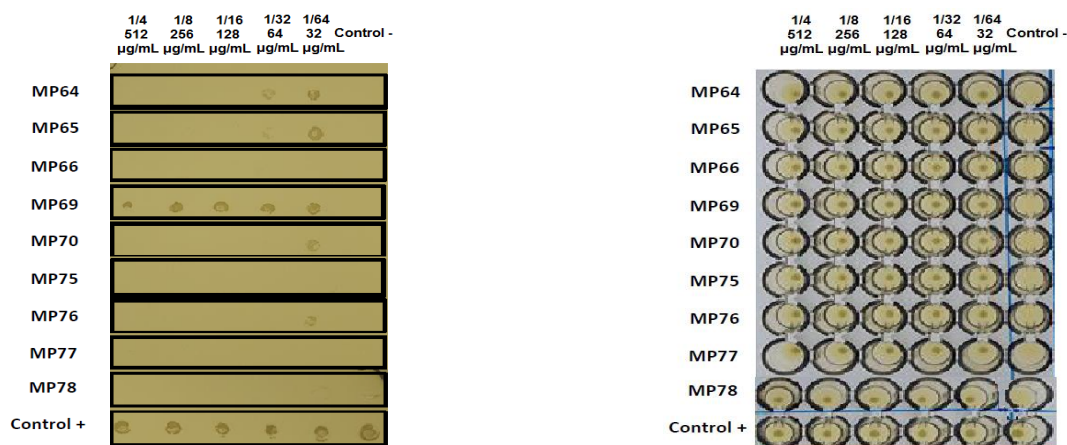
Για τον έλεγχο της αντιβακτηριακής δράσης εννέα δειγμάτων ξηρογέλης-γενταμικίνης έναντι των βακτηριακών/μυκητιακών στελεχών *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Candida parapsilosis*., υπολογίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) κάθε δείγματος, μετά από έκθεσή τους στα αντίστοιχα μικροβιακά εναιωρήματα με τη χρήση κατάλληλων πλακιδίων μικροτιτλοδότησης. Κάθε πλακίδιο, το οποίο περιλαμβάνει διαφορετική συγκέντρωση δείγματος αναλύθηκε κατόπιν άμεσης ανίχνευσης κυτταρικού ιζήματος (Σχήματα 5-7). Προκειμένου να αποσαφηνιστεί εάν η δράση κάθε δείγματος ξηρογέλης βασίζεται σε βακτηριοκτόνο ή σε βακτηριοστατική ιδιότητα, σε κάθε πλακίδιο τοποθετήθηκε ένα επιλεγμένο θρεπτικό υλικό για καλλιέργειες βακτηρίων στερεής φάσης, με βάση το επιλεχθέν πρωτόκολλο ενώ υπολογίστηκε η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (Minimum Bactericidal Concentration). Στην περίπτωση του μικροοργανισμού *C. Parapsilosis* υπολογίστηκε αντίστοιχα η ελάχιστη μυκητιοκτόνος συγκέντρωση (Minimum Fungicidal Concentration, MFC).



Σχήμα 5: Αποτελέσματα αντιβιοτικής δράσης. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση σε αντιστοιχία με τον βαθμό ανάπτυξης για το *Escherichia coli* AR



Σχήμα 6: Αποτελέσματα αντιβιοτικής δράσης. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση σε αντιστοιχία με τον βαθμό ανάπτυξης για το *Staphylococcus aureus* S54F9



Σχήμα 7: Αποτελέσματα αντιβιοτικής δράσης. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση σε αντιστοιχία με τον βαθμό ανάπτυξης για το *C. Parapsilosis*

Έλεγχος Αντιβιομεμβρανικής Δράσης InVitro

50μl από κάθε δείγμα ξηρού πηκτώματος προστέθηκαν σε πλακίδια και αραιώθηκαν με προσθήκη 50μl βακτηριακού εναιωρήματος (10^6 UFC/ml) σε θρεπτικό μέσο (YNB 2X για *C. parapsilosis*, M63 2X για *E. coli* και TSB 2X για *S. aureus*). Έπειτα οι πλάκες επώαστηκαν όλη τη νύχτα στους 37°C (για *Gram positive*, *C. parapsilosis*) ή στους 30°C (για *E. coli*). Την επόμενη ημέρα έγινε πλύση των πλακών με στείρο PBS (phosphate-buffered saline) και χρώση με 200 μl από 0,2% χρωστικής τύπου Crystal Violet. Τέλος, για την οπτική παρατήρηση της απώλειας προσκόλλησης των κυττάρων από τις πλάκες, ο κρύσταλλος επαναιωρήθηκε χρησιμοποιώντας ψυχρό διάλυμα οξικού οξέος 3%, και προσδιορίστηκε η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα των βιομεμβρανών εκφράστηκαν ως το πηλίκο της οπτικής πυκνότητας στα 580nm προς την οπτική πυκνότητα του θετικού δείγματος αναφοράς (ODδιάθλασης/ODθετικής αναφοράς). Προκειμένου να υπάρχουν συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ των δειγμάτων, υπολογίστηκε το ποσοστό ανασταλτικής δράσης και η συγκέντρωση που δίνει το 80% αναστολής (Πίνακες 1-2). Σύμφωνα με τις τιμές αυτές, το δείγμα MP75 ήταν το πιο δραστικό έναντι του *S. aureus*, ενώ τα δείγματα MP77 και MP78 παρουσίασαν έντονη ανασταλτική δραστηριότητα έναντι των *E. coli* και *S. aureus*. Τα τρία αυτά δοκίμια επιλέχθηκαν για πρόσθετες δοκιμές τοξικότητας.

Πίνακας 1. Ποσοστό αναστολής ξηρογελών για τους τρεις τύπους μικροοργανισμών

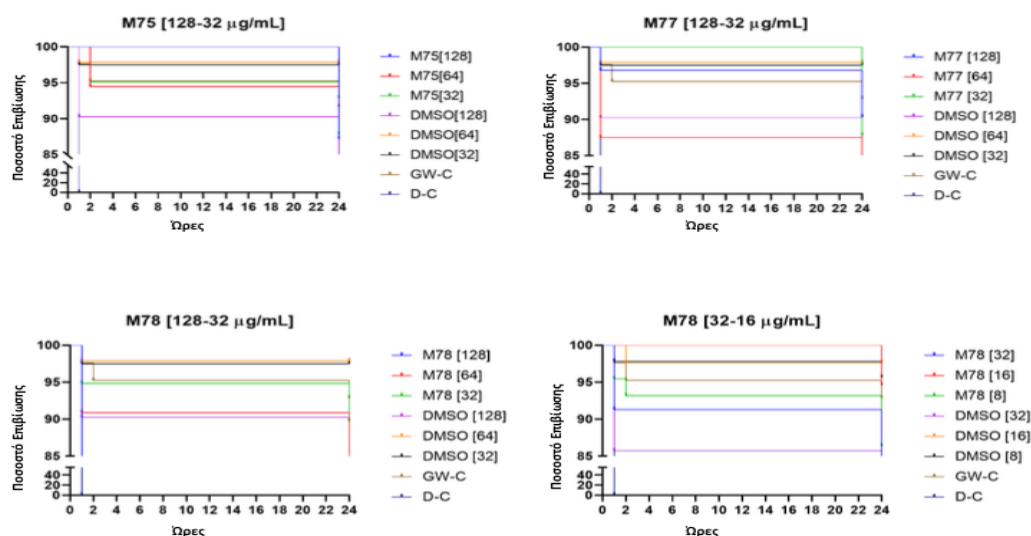
	E. coli		S. aureus		C. parapsilosis	
	% αναστολή	Συγκέντρωση (mg/L)	%αναστολή	Συγκέντρωση (mg/L)	%αναστολή	Συγκέντρωση (mg/L)
MP64	-	-	43	256	60	1024
MP65	80	128	36	256	-	-
MP66	80	128	63	512	-	-
MP69	35	512	30	1024	-	-
MP70	70	64	43	128	-	-
MP75	65	64	45	32	-	-
MP76	55	64	38	128	-	-
MP77	60	32	60	64	-	-
MP78	50	8	63	64	20	1024

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις ξηρογελών για ποσοστό αναστολής 80% για τους τρεις τύπους μικροοργανισμών

	E. coli	S. aureus	C. parapsilosis
	80% αναστολή	80% αναστολή	80% αναστολή
MP64	-	476	1365
MP65	128	569	-
MP66	128	650	-
MP69	1170	2730	-
MP70	73	232	-
MP75	79	57	-
MP76	93	269	-
MP77	42	85	-
MP78	12,8	81	4096

Έλεγχος Τοξικότητας In Vitro

Η κινητική συμπεριφορά των νηματοειδών οργανισμών είναι ενδεικτική της ηλικίας και της φυσικής κατάστασής τους. Για το συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε μικροπλάκα πολυστυρενίου με 96 μαύρα/διαυγή πλακίδια, ώστε να είναι δυνατή η στερεομικροσκοπική παρατήρηση των σκωλήκων και κατ' επέκταση ο καθορισμός της κίνησής τους. Στη συνέχεια καταγράφηκε η θανατηφόρος ($t = 1h$ και $t = 2h$ μετά την προσθήκη των δειγμάτων στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των σκωλήκων) ή τοξική ($t = 24h$) δράση των δειγμάτων. Ακόμα, αναλύθηκαν οι αλλαγές στη συμπεριφορά αναπαραγωγής ($t = 48h$). Για να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση των τοξικών ιδιοτήτων κάθε δείγματος στους σκώληκες για 1h, 2h και 24h αντίστοιχα, υπολογίστηκε ο δείκτης ζωτικότητας (Vitality Index) για κάθε δείγμα (Σχήμα 8 Πίνακας 3).

**Σχήμα 8.** Ποσοστό Επιβίωσης Σκωλήκων συναρτήσει του χρόνου**Πίνακας 3.** Αποτελέσματα ελέγχου τοξικότητας για διάστημα 24h

Για t=24 h					
Δείγμα	(mg/mL)	Αριθμός (σκώληκες)	Δείκτης	Χαρακτηρισμός (χρόνια δράση)	Συμπεριφορά Αυτογονιμοποίησης
M75	32	41	0,88	Μη τοξικό	Απόγονοι
M75	64	36	0,92	Μη τοξικό	Απόγονοι
M75	128	39	0,87	Μη τοξικό	Απόγονοι
M77	32	41	0,88	Μη τοξικό	Απόγονοι
M77	64	40	0,83	Μη τοξικό	Απόγονοι
M77	128	31	0,90	Μη τοξικό	Απόγονοι
M78	32	39	0,90	Μη τοξικό	Απόγονοι
M78	64	33	0,85	Μη τοξικό	Απόγονοι
M78	128	31	0,84	Μη τοξικό	Απόγονοι
M78	8	44	0,86	Μη τοξικό	Απόγονοι
M78	16	37	0,95	Μη τοξικό	Απόγονοι
M78	32	46	0,85	Μη τοξικό	Απόγονοι

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η σύνθεση των τελικών υλικών αλλά και ο χαρακτηρισμός τους μέσα από τις προαναφερθείσες τεχνικές δίνουν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα. Η αντιβακτηριδιακή, αντιμυκητιακή δράση των νανοσύνθετων επιβεβαιώθηκε μέσω βακτηριακών καλλιεργειών. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι επτά από τους εννέα τύπους ξηρογέλης εμφάνισαν αντιβιοτική δράση έναντι του *E. coli*, οκτώ από τους εννέα έναντι του *S. aureus* και οκτώ από τους εννέα αντιμυκητιακή δράση έναντι του *C. parapsilosis*. Παράλληλα αξιολογήθηκε η δυνατότητα παρεμπόδισης σχηματισμού βιοϋμενίων ενώ ελέγχθηκε και η τοξικότητα των δειγμάτων μέσω αντίστοιχων κυταροκαλλιεργειών. Τα δείγματα φαίνεται πως αναστέλλουν σημαντικά το σχηματισμό βιοφίλμ ενώ κανένα από αυτά δεν έδειξε κάποια χρόνια επίδραση ούτε επενέβησαν στην αυτογονιμοποιητική συμπεριφορά των σκωλήκων. Συνεπώς είναι χρήσιμο να επεκταθούν οι μελέτες των ξηρογελών σε περαιτέρω *in vivo* πλέον δοκιμές.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία χρηματοδοτείται από το ευρωπαϊκό έργο H2020 NOMORFILM-634588 που εντάσσεται στο πλαίσιο του Horizon 2020.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] R. Roy, M. Tiwari, G. Donelli, V. Tiwari (2018) Virulence 9: 522-554
- [2] M. Arkas, G. Kithreoti, N. Boukos, I. Kitsou, F. Petrakli, K. Panagiotaki. Nano-Structures & Nano-Objects. 14 (2018) 138-148.
- [3] M. Arkas, D. Tsiourvas. (2009) Journal of Hazardous Materials 170: 35-42.