

BADANIA BIOLOGICZNE KOMPOZYTÓW POLIMEROWYCH ZAWIERAJĄCYCH NANOCZĄSTKI SREBRA

BIOLOGICAL STUDIES OF POLYMER COMPOSITES CONTAINING SILVER NANOPARTICLES

Magdalena Ziabka¹, Michał Dziadek², Karol Gryń³,
Karolina Klesiewicz⁴, Elżbieta Menaszek⁵

¹ Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki,
Katedra Ceramiki i Materiałów Ogniotrwałych, 30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30

² Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki,
Katedra Technologii Szkła i Powłok Amorficznych, 30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30

³ Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki,
Katedra Biomateriałów, 30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30

⁴ Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny,
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, 30-688 Kraków, ul. Medyczna 9

⁵ Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny,
Katedra Farmakobiologii, Zakład Cytobiologii, 30-688 Kraków, ul. Medyczna 9

*e-mail: ziabka@agh.edu.pl

STRESZCZENIE

Głównym celem pracy jest badanie właściwości biologicznych kompozytów polimerowych otrzymanych w procesie wytłaczania i wtrysku. Do badań użyto medycznego polietylenu o wysokiej gęstości, HDPE. Jako fazę modyfikującą zastosowano nanocząstki srebra, nAg. Właściwości biologiczne materiałów zostały ocenione w wyniku testu cytotoksyczności, żywotności/prolifracji komórek oraz testu działania przeciwbakteryjnego. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że materiały kompozytowe zawierające nanocząstki srebra nie wykazują działania cytotoksycznego wobec komórek osteoblastycznych i fibroblastów ludzkich. Dodatek nanosrebra nie powoduje działania przeciwbakteryjnego zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Zwiększenie ilości użytego modyfikatora nie zwiększa działania przeciwbakteryjnego. Komórki osiadłe na próbkach kontrolnych, polimerowych i kompozytowych miały prawidłowy, wrzecionowaty kształt. Zasiadły ich powierzchnie w dużych ilościach, w sposób równomierny. Zaobserwowano wzrost ilości komórek na powierzchni próbek wraz z zawartością nanocząstek srebra, co związane jest ze wzrostem chropowatości powierzchni.

Słowa kluczowe: kompozyty polimerowe, nanocząstki srebra, cytotoksyczność, działanie przeciwbakteryjne

ABSTRACT

The main aim of this research is the examination of biological properties of polymer composites obtained in the process of extrusion and injection molding. It has been decided to use high-density medical polyethylene (HDPE) as a matrix, which afterwards has been modified with silver nanoparticles. Biological properties have been examined during cytotoxicity tests, cell viability/cell proliferation tests and antibacterial activity tests. Based on obtained results, it has been proved that composites with addition of silver nanoparticles do not cause cytotoxic effect on osteoblast cells and human fibroblasts, concerning both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The increasing amount of modifier does not increase antibacterial activity. The control samples were characterized by high proliferation rate and evenly distributed cells of proper, spindle-like shape. The surface was settled with cells evenly and densely. It has been observed that amount of silver nanoparticles affects cells proliferation what is related to increasing surface roughness.

Keywords: polymer composites, silver nanoparticles, cytotoxicity, antibacterial activity

1. Wstęp

Zastosowanie srebra w różnych nanometrycznych formach w medycynie budzi w ostatnim czasie ogromne zainteresowanie ze względu na silne przeciwdrobnoustrojowe działanie. Nanocząstki srebra (nAg) stały się alternatywą dla antybiotyków, które, zbyt często stosowane, doprowadziły do większej oporności bakterii. Jedną z najważniejszych właściwości nanocząstek srebra jest ich działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko bakteriom, grzybom i wirusom. Dlatego też są szeroko używane jako środki antybakteryjne i grzybobójcze. nAg znajdują zastosowanie w wyrobach medycznych takich jak: plastry, bandaże, cewniki, skalpele, igły, w kosmetykach i środkach codziennego użytku: kremy, toniki, dezodoranty, szczoteczki do zębów oraz środkach gospodarstwa domowego takich jak: odzież, lodówki, opakowania spożywcze, telefony komórkowe [1, 2]. Właściwości nanocząstek metalicznych, w tym nanocząstek srebra zależą jednak silnie od ich kształtu, rozmiaru, konfiguracji, krystaliczności oraz struktury [3]. Aktywność biologiczna uzależniona jest od wielu parametrów. Im mniejsza i bardziej sferyczna nanocząstka srebra tym lepsza skuteczność działania [4]. Nanocząstki o mniejszych rozmiarach wykazują bowiem lepsze działanie inhibitujące, ponieważ występuje większa powierzchnia kontaktu wynikająca z większego stosunku powierzchni do objętości w porównaniu ze sferycznymi cząstkami o większych rozmiarach. Zatem mniejsze nanocząstki są w stanie uwolnić więcej jonów srebra niż większe cząstki, przez co skuteczność bakteriobójcza jest wyższa [5]. Duże znaczenie na skuteczność bakteriobójczą nanocząstek srebra ma ich kształt i forma w jakiej występują, co można znaleźć w wielu doniesieniach literaturowych. Przykładem mogą być trójkątne ścięte nanoformy srebra o płaszczyźnie sieciowej {111} wykazujące silniejsze działanie biobójcze w stosunku do form sferycznych w kształcie prętów. Ostro zakończone trójkątne nanoprzymy srebra wykazują także najlepsze właściwości antyseptyczne w porównaniu do cząstek kulistych [6]. Nanopłytki srebra wykazują natomiast silniejsze działanie antybakteryjne w stosunku do nanoform sferycznych czy nanoprętów [7].

Poza silnym działaniem biobójczym nanocząstek srebra skutkiem ubocznym jest ich wysoka cytotoksyczność. Wiele prac pokazuje, że w badaniach *in vitro* nAg są toksyczne dla komórek pochodzących ze skóry, wątroby, płuc, mózgu, układu naczyniowego i narządów rozrodczych. Nanocząstki srebra mogą potencjalnie wpływać na geny związane z komórką progresji cyklu, uszkodzenia DNA i apoptozę w komórkach ludzkich w nie-cytotoksycznych dawkach [8]. Dlatego też ważne jest by badania ukierunkowane były nie tylko na działanie biobójcze nanocząstek srebra, ale i na ich cytotoksyczność wobec komórek. Takie podejście jest kluczowe w celu dostosowania ilości stosowanych nanocząstek i bezpieczeństwa ich aplikacji.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu dodatku nanocząstek srebra nAg na cytotoksyczność badanych materiałów. Cytotoksyczność materiałów względem fibroblastów i osteoblastów określono na podstawie ilościowego oznaczenia metodą bioluminescencyjną. W celu ustalenia całkowitej liczebności komórek, świadczącej o ich żywotności i proliferacji użyto testu ToxiLight. Przeciwbakteryjne właściwości kompozytów zawierających nanocząstki srebra badano wobec szczepów wzorcowych *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Uzyskane wyniki analizowano i omawiano w świetle dostępnej literatury.

2. Materiały i metody

Materiały polimerowe z grupy polimerów medycznych wykonane z polimeru o wysokiej gęstość (HDPE) oraz kompozytowe modyfikowane nanocząstkami srebra (nAg) produkcji NanoAmor w ilości 0,5%, oraz 1% wag. zostały przygotowane w kształcie krążków o średnicy 10 mm w procesie przetwórstwa tworzyw sztucznych. Następnie przeprowadzono proces sterylizacji przy użyciu niskotemperaturowej plazmy (aparatus Sterrad 120) z zastosowaniem pary nadtlenu wodoru w cyklu podwójnym (2 x 45 minut). Tak przygotowane materiały zostały poddane testom biologicznym (cytotoksyczność, żywotność/proliferaacja komórek i aktywność przeciwbakteryjna).

2.1. Badania żywotności/proliferaacji i cytotoxyczości

W celu przeprowadzenia badań żywotności/proliferaacji komórek w bezpośrednim kontakcie z materiałami wybranymi do wytworzenia protezy ucha środkowego, a także oceny ich cytotoxyczości wytypowane zostały dwie linie komórkowe. Pierwszą z nich stanowiła linia komórkowa fibroblastów ludzkich z tkanki tchawicy Hs680.Tr. Drugą reprezentowała linia ludzkich komórek osteoblastycznych Saos-2. Rodzaj linii komórkowych użytych do badań został skonsultowany i zatwierdzony przez zespół laryngologów Kliniki Otolaryngologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Linie komórkowe pochodziły z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowej – ATCC. Badania przeprowadzone zostały w Pracowni Katedry Farmakobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-5 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania cytotoxyczości: metody in vitro”.

2.2. Hodowla komórkowa

Komórki linii Hs680.Tr oraz Saos-2 hodowano w polistyrenowych butelkach hodowlanych (Nunclon, Dania) o powierzchni 75 cm², odpowiednio w pożywce hodowlanej DMEM (ATCC, Anglia) z 10% dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej FBS (HyClone, USA), a także w pożywce McCoy's 5A (ATCC, Anglia) z 15% dodatkiem FBS (HyClone, USA). Hodowle prowadzono w inkubatorze hodowlanym HeraCell (ThermoSci, Niemcy) w atmosferze 5% CO₂ i temperaturze 37 °C do uzyskania 70% konfluencji.

2.3. Eksperyment

Do badań użyto komórki Hs680.Tr oraz Saos-2 z trzeciego pasażu. W celu uzyskania zawiesiny komórek hodowlę dwukrotnie przepłukano buforowanym roztworem soli fizjologicznej PBS, a następnie dodano 5% roztwór trypsyny z EDTA (HyClone, USA). Po przepłukaniu i odwirowaniu komórki zawieszono w świeżej pożywce. Następnie do dołków 48-dółkowych płytek hodowlanych (Nunc, Dania), zawierających sterylne krążki badanych materiałów dodano po 1 ml uzyskanej zawiesiny komórek o gęstości 10⁴ komórek/ml. Kontrolę dla przeprowadzonych badań stanowił polistyren dna dołków płytki hodowlanej (TCPS). Dla testów cytotoxyczości TCPS był kontrolą negatywną. Hodowlę komórek krążków bezpośrednim kontakcie z badanymi materiałami prowadzono przez trzy siedem dni.

2.4. Test cytotoxyczości

Cytotoxyczość badanych materiałów względem fibroblastów i komórek osteoblastycznych określono na podstawie ilościowego oznaczenia metodą bioluminescencyjną z użyciem gotowego zestawu odczynników Toxilight Bioassay kit (Lonza, USA), wykrywającego aktywność kinazy adenylowej AK w nadsączu zebrany z hodowli komórkowych. Kinaza adenylowa, obecna we wszystkich komórkach, uwalniana jest przez uszkodzone komórki do pożywki hodowlanej, a jej aktywność jest proporcjonalna do liczby uszkodzonych w hodowli komórek. Odczyt luminescencji przeprowadzono przy pomocy czytnika PolarStar Omega (BMG Labtech, Niemcy). Test wykonywany był w nadsączu uzyskanym z hodowli komórkowej, a otrzymane wyniki odniesiono do całkowitego stężenia enzymu w komórkach i nadsączu (proporcjonalnego do całkowitej liczebności komórek).

2.5. Test żywotności/prolifracji

W celu ustalenia całkowitej liczebności komórek, świadczącej o ich żywotności i proliferacji użyto testu ToxiLight Bioassay kit po uprzedniej dezintegracji błony komórkowej hodowanych komórek za pomocą odczynnika dostarczonego wraz z zestawem ToxiLight 100% Lysis Reagent set (Lonza, USA). Ilość uwolnionej kinazy adenylanowej, proporcjonalnej do liczby komórek zmierzono przy pomocy czytnika PolarStar Omega (BMG Labtech, Niemcy).

2.6. Obserwacje hodowli w mikroskopie fluorescencyjnym

W celu oceny morfologii komórek zaadherowanych na powierzchni badanych materiałów zastosowano optyczny mikroskop fluorescencyjny. Przylegające do materiałów komórki barwiono przez minutę 0,01% roztworem oranżu akrydyny AO (Sigma, USA), przepłukano buforowanym roztworem soli fizjologicznej PBS (HyClone, USA) i obserwowano za pomocą mikroskopu Olympus CX-41 (Olympus, Japonia) z przystawką fluorescencyjną. Zdjęcia komórek przylegających do badanych materiałów wykonano aparatem cyfrowym E-520 (Olympus, Japonia).

2.7. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej

Oceniono aktywność przeciwbakteryjną samych nanocząstek srebra oraz materiałów polimerowych modyfikowanych srebrem wobec szczepów wzorcowych: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (SA) oraz *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC).

Aktywności nanocząstek srebra zbadano metodą mikrorozcieńczeń w bulionie na płytkach 96-dołkowych. Przygotowano 9 kolejnych, połówkowych rozcieńczeń badanych nanocząstek na podłożu płynnym (bulion Mueller-Hinton, Oxoid), w zakresie od 500 µg/ml do 2 µg/ml. Z czystej, 24-godzinnej hodowli badanych szczepów bakteryjnych wykonano zawiesinę 1,0 w skali McFarlanda. Następnie nakrapiano po 10 µl zawiesiny bakteryjnej do studzienek zawierających 150 µl bulionu oraz nanocząstek w odpowiednim stężeniu. Kontrolę dodatnią stanowił bulion zaszczerpiony zawiesiną bakteryjną bez nanocząstek. Wyjściowe stężenie bakterii w studzience wynosiło 10⁶ CFU/ml. Kontrolę ujemną stanowił sam bulion. Potwierdzono również czystość roztworów nanocząstek. Analizę wyników prowadzono po 24 godzinach inkubacji, w warunkach tlenowych, w 37 °C, z wytrząsaniem (120 rpm), w odniesieniu do kontroli dodatniej. Za wartość MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*) przyjmowano najmniejsze stężenie, w którym nie zaobserwowano wzrostu bakterii (zmętnienia bulionu). Po inkubacji, celem analizy ilościowej skuteczności przeciwbakteryjnej badanych nanocząstek, wysiewano po 100 µl zawiesiny z każdej studzienki na podłożu TSA (ang. *tryptic soy agar*). Płytki inkubowano 24 godziny w warunkach tlenowych, w 37 °C. Po inkubacji zliczano ilość kolonii na każdej płytce.

Przeprowadzono również ocenę aktywności materiałów polimerowych modyfikowanych nanocząstkami srebra. Do 2 ml bulionu Mueller Hinton dodano 20 µl zawiesiny bakterii o gęstości 1 w skali McFarlanda (w studzienkach otrzymano stężenie bakterii rzędu 10⁶ CFU/ml). Następnie wprowadzono do bulionu krążki polimerowe zawierające nanocząstki w stężeniu 0,5% oraz 1%.

Przeprowadzono także kontrolę czystości badanych krążków, inkubując niemodyfikowane krążki polimerowe. Po 24-godzinnej inkubacji, w atmosferze tlenowej, w 37 °C, z wytrząsaniem (110 rpm), przeniesiono 100 µl zawiesiny na podłożu TSA i rozszano hokejką. Wynik odczytywano po 24 godzinach inkubacji w warunkach tlenowych, w 37 °C, oceniając liczbę kolonii na płytkach.

2.8. Analiza statystyczna wyników

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu STATISTICA 10 (StatSoft Inc., USA). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), wykorzystując test post-hoc Tukeya HSD na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

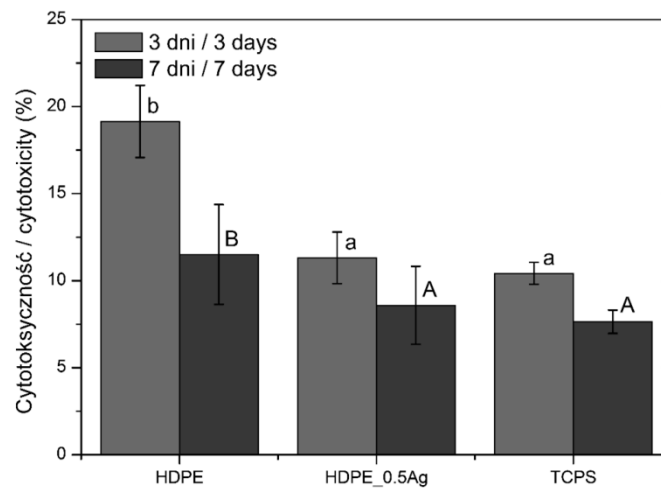
3. Wyniki i dyskusja

Na rysunkach 1 i 2 przedstawiono cytotoksyczność polimeru HDPE i kompozytu zawierającego 0,5% wagowych nanocząstek srebra wyrażoną jako procent komórek uszkodzonych w odniesieniu do całko-

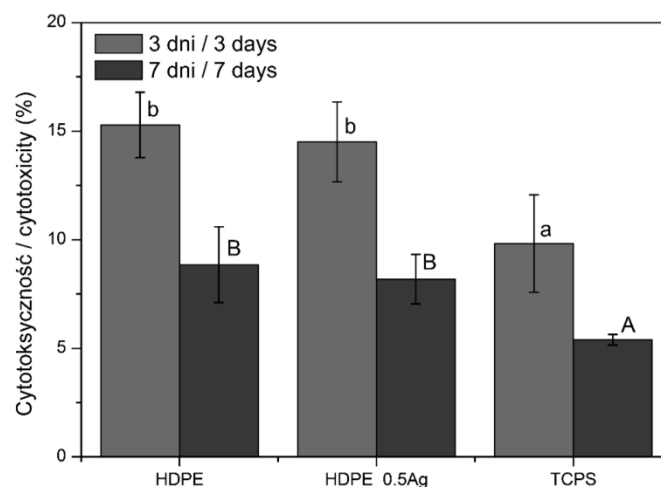
witej liczby komórek. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli negatywnej, którą stanowił polistyren do celów hodowli komórkowych (TCPS). Przeprowadzone testy wykazały brak działania cytotoksycznego badanych materiałów na komórki fibroblastyczne linii Hs-680.Tr i osteoblastyczne linii Saos-2. W przypadku obu linii komórkowych, cytotoksyczność obniżyła się przy dłuższym czasie hodowli.

Biorąc pod uwagę komórki linii Hs-680.Tr, zarówno po trzech, jak również siedmiu dniach hodowli istotnie najwyższą cytotoksycznością charakteryzował się polimer HDPE, jednak średnie wartości nie przekraczały odpowiednio 20% oraz 12%. Cytotoksyczność kompozytu HDPE/0,5%Ag po obydwu okresach prowadzenia hodowli była na poziomie materiału kontrolnego i po siedmiu dniach nie przekraczała 10%.

W przypadku komórek linii Saos-2, po obydwu okresach prowadzenia hodowli badane materiały odznaczały się istotnie wyższą cytotoksycznością w odniesieniu do materiału kontrolnego (TCPS), jednak średnie wartości były na poziomie 15% w trzecim dniu eksperymentu oraz 8% w dniu siódmym. Otrzymane wyniki potwierdzają brak negatywnego oddziaływania nanocząstek srebra na obydwa rodzaje komórek.

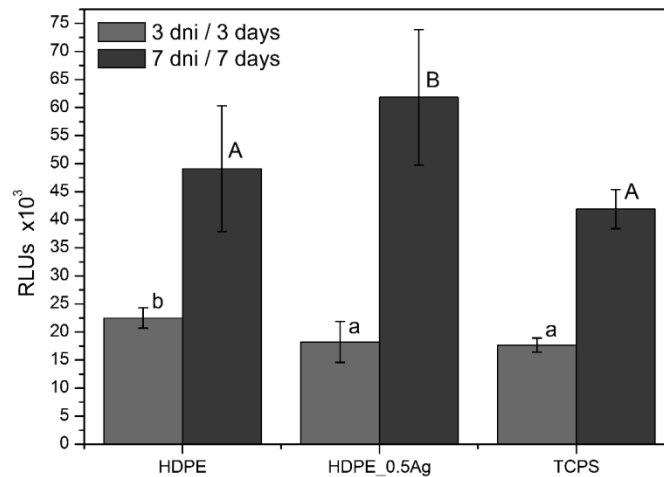


Rys. 1. Cytotoksyczność materiałów oceniona w bezpośrednim kontakcie z komórkami linii Hs-680.Tr. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe. Statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) pomiędzy badanymi materiałami zostały oznaczone literami a-b dla hodowli 3-dniowej oraz A-B dla hodowli 7-dniowej

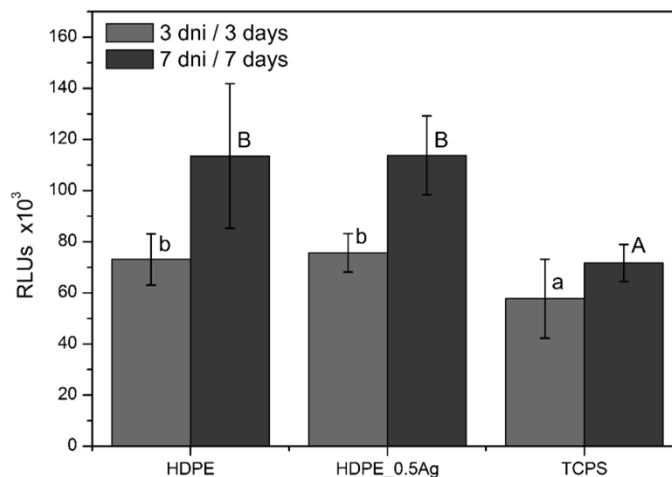


Rys. 2. Cytotoksyczność materiałów oceniona w bezpośrednim kontakcie z komórkami linii Saos-2. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe. Statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) pomiędzy badanymi materiałami zostały oznaczone literami a-b dla hodowli 3-dniowej oraz A-B dla hodowli 7-dniowej

Na rysunkach 3 i 4 przedstawiono cytotoksyczność badanych materiałów w odniesieniu do materiału kontrolnego (TCPS), ocenioną na podstawie poziomu kinazy adenylowej AK uwolnionej do pożywki hodowlanej w trakcie trwania hodowli. Porównując wartości uzyskane dla eksperymentu prowadzonego przy użyciu komórek linii Hs-680.Tr, po trzech dniach istotnie najwyższym poziomem cytotoksyczności charakteryzował się polimer HDPE, z kolei po siedmiu dniach najwyższą cytotoksyczność zanotowano dla kompozytu HDPE/0,5%Ag. Biorąc pod uwagę komórki linii Saos-2, zarówno po trzech, jak również po siedmiu dniach hodowli, wyższą cytotoksycznością w odniesieniu do materiału kontrolnego odznaczały się oba badane materiały (HDPE oraz HDPE/0,5%Ag).



Rys. 3. Cytotoksyczność materiałów oceniona w bezpośrednim kontakcie z komórkami linii Hs-680.Tr. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe. Statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) pomiędzy badanymi materiałami zostały oznaczone literami a-b dla hodowli 3-dniowej oraz A-B dla hodowli 7-dniowej



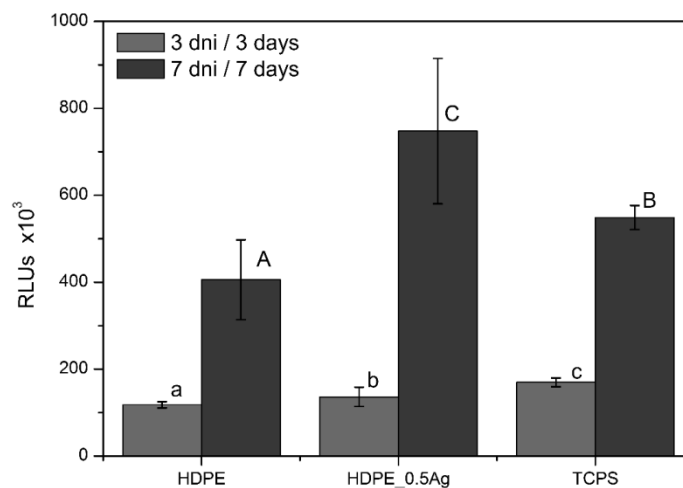
Rys. 4. Cytotoksyczność materiałów oceniona w bezpośrednim kontakcie z komórkami linii Saos-2. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe. Statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) pomiędzy badanymi materiałami zostały oznaczone literami a-b dla hodowli 3-dniowej oraz A-B dla hodowli 7-dniowej

Na rysunkach 5 i 6 przedstawiono liczebność komórek linii Hs-680.Tr oraz Saos-2 po trzech oraz siedmiu dniach hodowli w bezpośrednim kontakcie z badanymi materiałami oraz na materiale kontrolnym. Znaczny wzrost liczebności komórek obu linii po siedmiu dniach hodowli, w stosunku do dnia trzeciego, wskazuje na wysoki poziom proliferacji, a więc warunki sprzyjające namnażaniu komórek fibroblastycznych oraz osteoblastycznych.

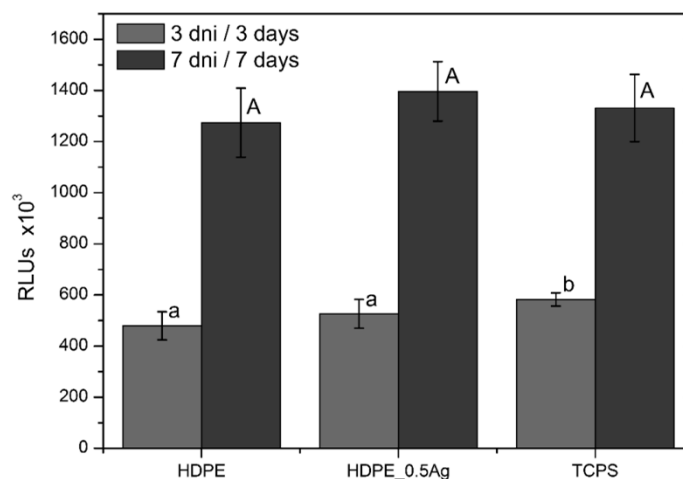
Rozpatrując komórki linii Hs-680.Tr, po trzech dniach hodowli liczebność fibroblastów wzrasta w następujący sposób: HDPE < HDPE/0,5%Ag < TCPS. Z kolei w siódmym dniu eksperymentu,

istotnie najniższą liczebnością charakteryzowały się komórki będące w kontakcie z polimerem HDPE. Można zauważyć, że istotnie najwyższy poziom proliferacji osiągnęły fibroblasty osadzone na kompozycie zawierającym nanocząstki srebra. Prawdopodobną przyczyną wzmożonego tempa namnażania komórek w przypadku materiału kompozytowego, jest obecność nanocząstek wpływających na nanotopografię powierzchni, w tym wzrost jej chropowatości, co wykazano wcześniej [9].

W przypadku komórek osteoblastycznych, po trzech dniach eksperymentu istotnie niższą liczebnością w odniesieniu do materiału kontrolnego charakteryzowały się oba badane materiały (HDPE oraz HDPE/0,5%nAg). Jednak po dłuższym okresie hodowli, liczebność komórek osadzonych na analizowanych materiałach osiągnęła poziom zbliżony do wartości zanotowanych dla materiału kontrolnego. Wyniki te ponownie potwierdzają wysoką biogodność otrzymanych materiałów w bezpośrednim kontakcie z komórkami fibroblastycznymi oraz osteoblastycznymi w warunkach *in vitro*.



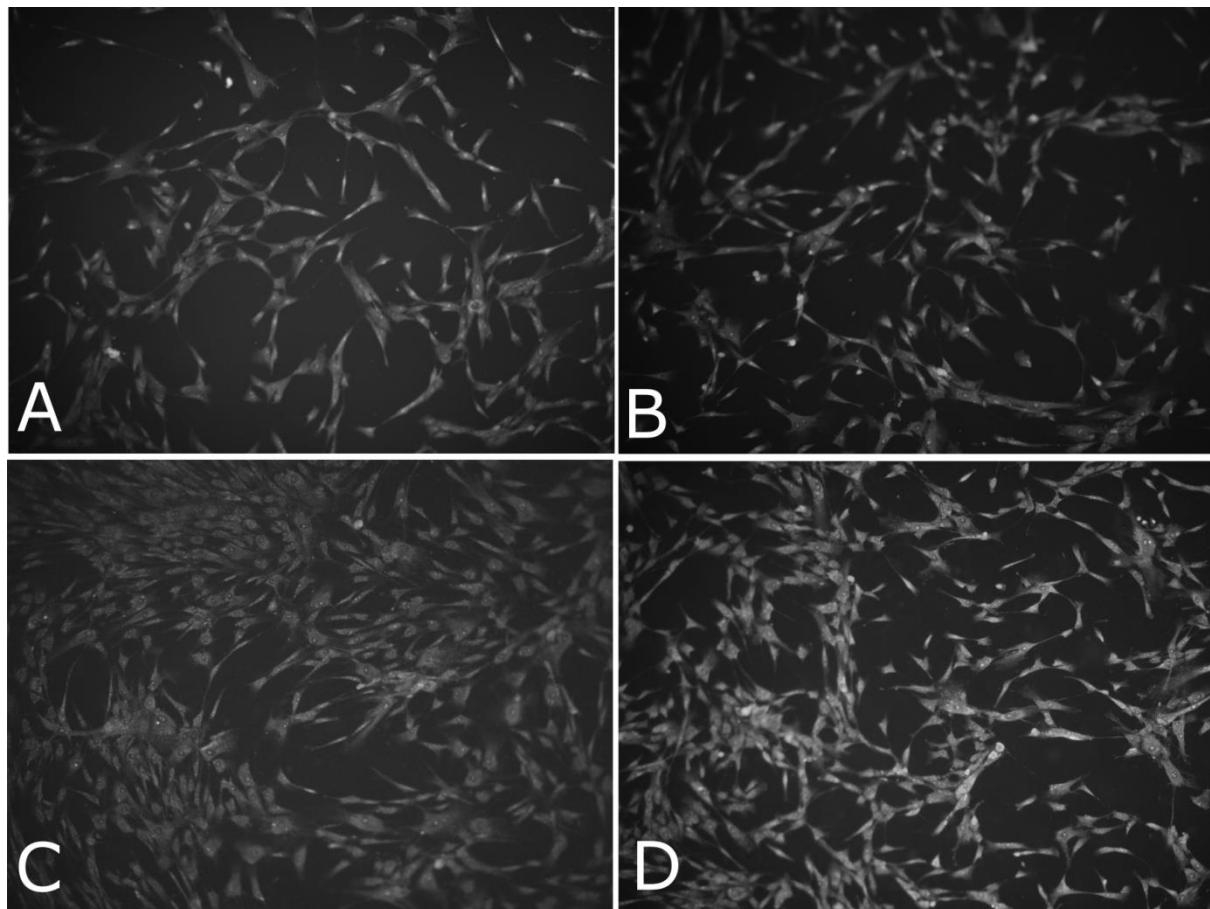
Rys. 5. Liczebność komórek linii Hs-680.Tr hodowanych w bezpośrednim kontakcie z materiałami. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe. Statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) pomiędzy badanymi materiałami zostały oznaczone literami a-c dla hodowli 3-dniowej oraz A-C dla hodowli 7-dniowej



Rys. 6. Liczebność komórek linii Saos-2 hodowanych w bezpośrednim kontakcie z materiałami. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe. Statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) pomiędzy badanymi materiałami zostały oznaczone literami a-b dla hodowli 3-dniowej oraz A dla hodowli 7-dniowej

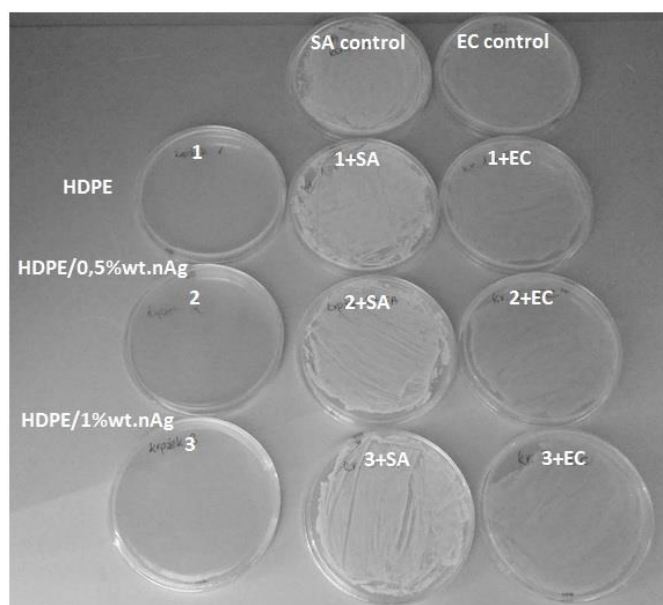
Na podstawie zdjęć uzyskanych z mikroskopu fluorescencyjnego (p. rys. 7) zaobserwowano, że komórki fibroblastyczne miały prawidłowy kształt i zasiedlały powierzchnie materiałów HDPE, HDPE/0,5%wt.nAg, HDPE/1%wt.nAg, a także materiału kontrolnego w sposób równomierny. Ponadto, większa liczba komórek występuje na powierzchni materiałów zawierających wyższą zawartość

nanocząstek srebra, co oznacza że ich obecność sprzyja namnażaniu się komórek. Jak już wcześniej wspomniano, może to wynikać z modyfikacji topografii powierzchni materiałów kompozytowych spowodowanej obecnością nanododatku w matrycy polimerowej.



Rys. 7. Obraz komórek fibroblastycznych linii Hs-680.Tr osadzonych na TCPS (A), HDPE (B), HDPE/0,5%wt.nAg (C), HDPE/1%wt.nAg (D) po trzech dniach hodowli. Powiększenie 20x

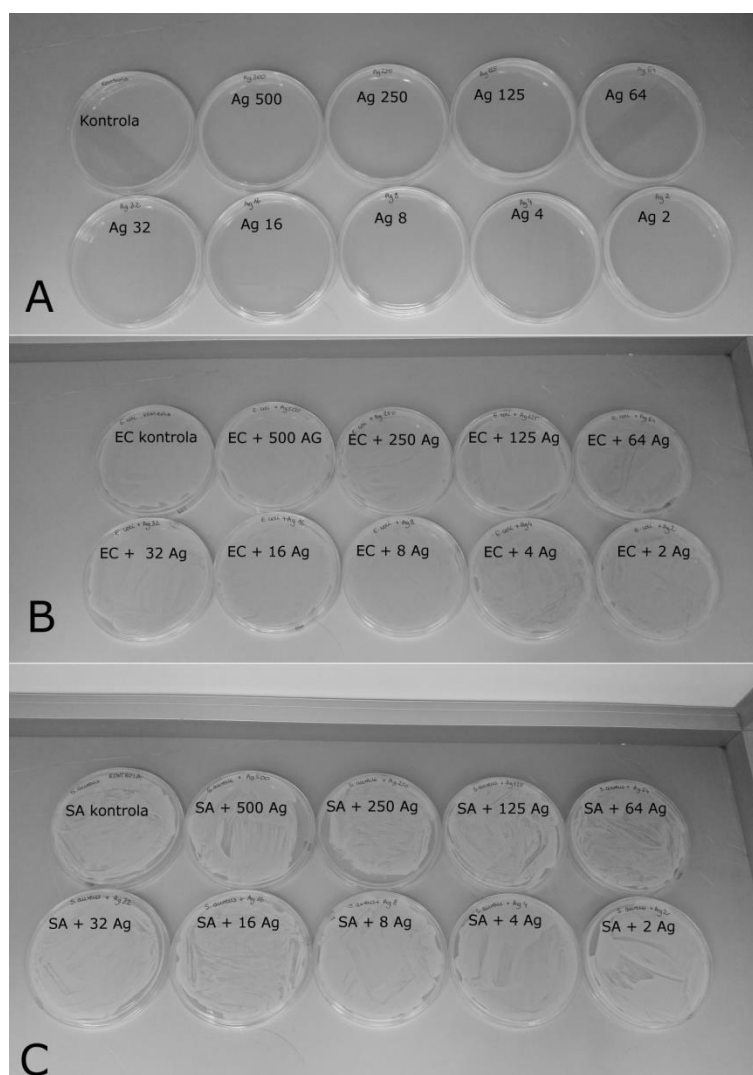
Przeprowadzone badania nie wykazały aktywności przeciwbakteryjnej badanych nanocząstek srebra ani kompozytu na osnowie z polimeru HDPE zawierającego 0,5% i 1% nanocząstek srebra nAg firmy NanoAmor wobec wzorcowych szczepów *Staphylococcus aureus* (SA) oraz *Escherichia coli* (EC). W obu przypadkach uzyskano wzrost zlewny wzorcowych szczepów SA oraz EC (p. rys. 8). Takie zachowanie znajduje wytłumaczenie w braku aktywności samych nanocząstek. Na podstawie testów mających na celu określenie wartości minimalnego stężenia nanocząstek hamującego wzrost drobnoustrojów wykazano, że wartość MIC wynosi powyżej 500 $\mu\text{g/ml}$. Nie wykazano działania przeciwbakteryjnego nanocząstek w badanych stężeniach.



Rys. 8. Wzrost wzorcowych szczepów bakterii Gram-dodatnich - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz Gram-ujemnych - *Escherichia coli* ATCC 25922 po kontakcie z badanymi materiałami.

1 – kontrola jałowości krążka polimeru HDPE, 2 – kontrola jałowości krążka kompozytu HDPE/0,5%wt.nAg, 3 – kontrola jałowości krążka kompozytu HDPE/1%wt.nAg, SA control – kontrola wzrostu szczepu *Staphylococcus aureus*, EC control – kontrola wzrostu szczepu *Escherichia coli*, 1+SA – krążek polimeru HDPE plus szczep *S. aureus* (itd)

Na rysunku 9 pokazano wzrost wzorcowych szczepów bakterii Gram-dodatnich – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz Gram-ujemnych – *Escherichia coli* ATCC 25922 po kontakcie z nanocząstkami srebra w zakresie od 500 $\mu\text{g/ml}$ do 2 $\mu\text{g/ml}$. W każdym dołku płytki zaobserwowano zmętnienie, a po wysianiu obserwowano wzrost zlewny. Rosnące stężenie nanocząstek srebra nie wpływa na aktywność przeciwbakteryjną wobec badanych szczepów. Zarówno bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne wykazywały wzrost, z tym że silniejsze zmętnienie można było zaobserwować w przypadku bakterii Gram-ujemnych. Efektywność działania nanocząstek srebra wynika głównie z budowy ściany komórkowej bakterii, ale także uzależniona jest od ilości uwalnianych do otoczenia jonów srebra. Silniejsze działanie bakteriobójcze obserwuje się zazwyczaj dla bakterii Gram-dodatnich, dla których peptydoglikan stanowi 50–90% składników ściany komórkowej (tylko jedna warstwa chroni cytoplazmę). Ścianę komórkową bakterii Gram-ujemnych cechuje natomiast bardziej skomplikowana budowa zarówno pod względem strukturalnym jak i chemicznym. Dla bakterii Gram-ujemnych cienka warstwa peptydoglikanu (5–20% składników ściany komórkowej) znajduje się między błoną zewnętrzną i błoną cytoplazmatyczną (cytoplazma chroniona jest przez dwie warstwy). Dodatkowo błona zewnętrzna ściany komórkowej zawiera lipopolisacharydy wspomagające odporność komórkową [10, 11, 12, 13].



Rys. 9. Wzrost wzorcowych szczepów bakterii Gram-dodatnich – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz Gram-ujemnych – *Escherichia coli* ATCC 25922 po kontakcie z nanocząstkami srebra w zakresie od 500 $\mu\text{g/ml}$ do 2 $\mu\text{g/ml}$.
 A – kontrola czystości, wysiany bulion + nAg, B – kontrola wzrostu szczepu *Escherichia coli* + nAg,
 C – kontrola wzrostu szczepu *Staphylococcus aureus* + nAg

Mechanizm odpowiedzialny za aktywność antybakteryjną nanocząstek srebra nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony, jednakże skuteczność bakteriobójczą nanocząstek upatruje się w absorpcji wolnych jonów srebra, i następnie przerywaniu produkcji trifosforanu adenozy (ATP) oraz replikacji DNA, powstawaniu reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS), a także bezpośrednim uszkodzeniu błony komórkowej [14]. Srebro w formie metalicznej jest obojętne, jednakże w kontakcie z wilgocią i tlenem ulega jonizacji. Powstałe jony srebra wykazują bardzo dużą reaktywność, reagują z grupami tiolowymi (-SH) bakterii i wirusów usuwają z nich atomy wodoru i tworzą mostki disiarczkowe (-S-S-), w związku z czym bakteria traci możliwość oddychania [15]. Jony srebra powodują także uszkodzenie ściany komórkowej, a tworzący się kompleks pomiędzy jonami srebra i białkami może zakłócić metabolizm komórek bakteryjnych [16]. Ponadto, jony srebra mogą wchodzić w interakcje z DNA i RNA bakterii poprzez denaturację oraz hamować replikację bakterii [17]. Brak aktywności biologicznej nanocząstek srebra zależy od wielu czynników. Do najistotniejszych należą kształt, rozmiar, prekursorzy syntezy oraz liczba powstałych i uwalnianych do otoczenia jonów Ag^+ . Najpopularniejszymi kształtami są kule, podwójne wielościany foremne, trójkąty i sześciąny. Rozmiar nanocząstek w zależności od metody syntezy waha się od około 1 do 100 nm w przynajmniej jednym wymiarze. Syntezy można podzielić na trzy główne typy: chemiczne, fizyczne i biologiczne [18]. Obecny trendem w chemii jest tworzenie „zielonych” metod syntezy. Polegają one na projektowaniu

procesów reakcji, które wywierają najmniejszy nacisk na środowisko. W większości publikacji jako substancję redukującą i ograniczającą rozmiar cząstki stosuje się ekstrakty pochodzenia naturalnego. Wiąże się to ze zmiennością składu mieszaniny reakcyjnej w zależności od partii materiału biologicznego. W przypadku syntez biologicznych i chemicznych pomimo podobnego kształtu i wielkości AgNPs uzyskuje się często całkowicie różne właściwości biologiczne. Może być to częściowo przypisywane różnym typom zanieczyszczeń. Kompozycja chemiczna nanocząstek ma bezpośredni wpływ na dysocjację jonów Ag^+ z ich struktury. W ostatnich latach udowodniono iż efekt toksyczności roztworów AgNPs pochodzi wyłącznie od jonów srebrnych [19]. Doniesienia naukowe wskazują, że wielkość nanocząstek ma znaczny wpływ na aktywność AgNPs. W pracy Sukdeb Pal et al. [20] nanocząstki srebra w kształcie sferycznym oraz w kształcie prętów wykazywały bardzo słabą aktywność bakteriobójczą, a w niektórych przypadkach obserwowano wzrost kolonii. Kuliste formy nanocząstek obecne w dużej koncentracji nie wykazywały bakteriobójczości a jedynie powodowały przedłużone opóźnienie wzrostu bakterii. Można także przypuszczać, że nanocząstki srebra o takich samych powierzchniach kontaktu, ale o różnych kształtach mogą mieć różne skuteczne powierzchnie pod względem czynnych aspektów. Nanocząstki srebra o rozmiarach mniejszych niż 10 nm wykazują także wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową [21]. Tak więc brak działania nanocząstek srebra autorzy tłumaczą przede wszystkim kształtem nanocząstki, a także jej rozmiarem i skłonnością do tworzenia aglomeratów, co również może mieć ogromne znaczenie.

4. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych testów *in vitro* pokazano, że kompozyty otrzymane metodą wytlaczania i wtrysku z medycznego polietylenu o wysokiej gęstości nie wykazują działania cytotoksycznego wobec komórek linii Hs680.Tr oraz Saos-2. Oba rodzaje komórek miały prawidłowy kształt i zasiedlały powierzchnie badanych materiałów w sposób równomierny. Zaobserwowano wzrost liczebności komórek po siedmiu dniach hodowli, co potwierdza wysoką biogodność otrzymanych materiałów. Ocena działania przeciwbakteryjnego nanocząstek wykazała natomiast brak aktywności nanocząstek wobec wzorcowych szczepów bakterii *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Wzrost zawartości nanocząstek nAg nie zwiększał efektu działania przeciwbakteryjnego natomiast pozytywnie wpływał na proliferację komórek. Dodatek nanocząstek srebra jako modyfikatora wpływa zatem pozytywnie z punktu widzenia zmian właściwości powierzchniowych. Obecność dodatku wpływa bowiem na wzrost chropowatości materiałów i sprzyja proliferacji komórek, co opisane będzie w kolejnej publikacji.

Podziękowania: Praca finansowana przez Narodowe centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu LIDER /154/L-6/14/NCBR/2015

LITERATURA

- [1] S.Galdiero, A. Falanga, M. Vitiello, M. Cantisani, V. Marra, M.Galdiero: *Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents*, *Molecules*, vol. 16, 2011, s. 8894–8918.
- [2] S. Chernousova, M. Epple: *Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal*, *Angewandte Chemie International Edition*, col. 51, 2012, s. 2–20.
- [3] S. Pal, Y.K. Tak, J.M. Song: *Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, 2007, s. 1712–1720.
- [4] M.A. Raza, Z. Kanwal, A. Rauf, A.N. Sabri, S. Riaz, S. Naseem: *Size- and Shape-Dependent Antibacterial Studies of Silver Nanoparticles Synthesized by Wet Chemical Routes*, *Nanomaterials*, vol. 6, 2016, doi:10.3390/nano6040074
- [5] Z. Xiu, Q. Zhang, H.L. Puppala, V.L. Colvin, P.J.J Alvarez: *Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles*, *Nano Letters*, vol. 12, 2012, s. 4271–4275.
- [6] P.V. Dong, C.H. Ha, L.T. Binh, J. Kasbohm: *Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles*, *International Nano Letters*, vol. 2, 2012, s. 1–9.
- [7] B. Sadeghi, F.S. Garmaroudi, M. Hashemi, H.R. Nezhad, A. Nasrollahi, S. Ardalan: *Comparison of the anti-bacterial activity on the nanosilver shapes: Nanoparticles, nanorods and nanoplates*, *Advanced Powder Technology*, vol. 23, 2012, s. 22–26.

- [8] M. Ahamed, M.S. Al Salhi, M.K.J. Siddiqui: *Silver nanoparticle applications and human health*, Clinica Chimica Acta, vol. 411, 2010, s. 23–24.
- [9] M. Ziąbka, A. Mertas, W. Król, A. Bobrowski, J. Chlopek: *High Density Polyethylene Containing Antibacterial Silver Nanoparticles for Medical Applications*, Macromolecular Symposia, vol. 315, 2012, s. 218–225.
- [10] G. Bugła-Płoskońska, A. Leszkiewicz: *Biologiczna aktywność srebra i jego zastosowanie w medycynie*, Kosmos, vol. 56(1–2), 2007, s. 115–122.
- [11] A.P. Fraiese, P.A. Lambert, J.-Y. Maillard (red.): *Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization*, Wiley-Blackwell, 2004.
- [12] Bacterial Morphology: <http://micro.digitalproteus.com/morphology2.php>.
- [13] B. Sadeghi, M. Jamali, Sh. Kia, A. Amininia, S. Ghafari: *Synthesis and characterization of silver nanoparticles for antibacterial activity*, International Journal of Nano Dimension, vol. 1(2), 2010, s. 119–124.
- [14] C. Marambio-Jones, E.M.V. Hoek: *A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment*, Journal of Nanoparticles Research, vol. 12, 2010, s. 1531–1551.
- [15] Z. Wzorek, M. Konopka: *Nanosrebro – nowy środek bakteriobójczy*, Czasopismo Techniczne ICh, 2007, s. 1–7.
- [16] C. Damm, H. Munstedt, A. Rosch: *The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites*, Materials Chemistry and Physics, vol. 108, 2008, s. 61–66.
- [17] M. Rai, A. Yadav, A. Gade: *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*, Biotechnology Advances, vol. 27, 2009, s. 76–83.
- [18] S. Iravani, H. Korbekandi, S.V. Mirmohammadi, B. Zolfaghari: *Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods*, Research in Pharmaceutical Sciences, vol. 9(6), 2014, s. 385–406.
- [19] S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Koller, M. Epple: *Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions*, Chemistry of Materials, vol. 22(16), 2010, s. 4548–4554.
- [20] S. Pal, Y.K. Tak, J.M. Song: *Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium Escherichia coli*, Applied Environmental Microbiology, vol. 73(6), 2007, s. 1712–1720.
- [21] A. Ivask, I. Kurvet, K. Kasemets, I. Blinova, V. Aruoja, S. Suppi, M. Visnapuu: *Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro*, PLoS one, vol. 9(7), 2014, e102108.

otrzymano / submitted: 09.12.2016
zaakceptowano / accepted: 13.05.2017