

საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

შორენა ცხადაძე

ვერცხლის ნანონაწილაკების შემცველი ბიოკომპოზიტური
ბაქტერიციოდული პრეპარატები ამინომჟავური
ბიოდეგრადირებადი პოლიმერების საფუძველზე

სადოქტორო პროგრამა - ქიმიური და ბიოლოგიური ინჟინერია

შიფრი - 0410

დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

წარდგენილი დისერტაციის

ა ვ ტ ო რ ე ფ ე რ ა ტ ი

თბილისი

2018 წელი

სამუშაო შესრულებულია საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტის ქიმიური ტექნოლოგიისა და მეტალურგიის ფაკულტეტის ქიმიური და ბიოლოგიური ტექნოლოგიის დეპარტამენტისა და ფარმაცევტული კომპანია „GM Pharmaceuticals“ LTD ხარისხის კონტროლის ლაბორატორიაში

ხელმძღვანელი: პროფ. რამაზ ქაცარავა
ასოც. პროფ. ნინო კუპატაძე

რეცენზენტები: -----

დაცვა შედგება ----- წლის ”-----“ -----, ----- საათზე საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტის ქიმიური ტექნოლოგიისა და მეტალურგიის ფაკულტეტის სადისერტაციო საბჭოს კოლეგიის სხდომაზე, კორპუსი -----, აუდიტორია -----
მისამართი: 0175, თბილისი, კოსტავას 77.

დისერტაციის გაცნობა შეიძლება სტუ-ს ბიბლიოთეკაში, ხოლო ავტორეფერატის - ფაკულტეტის ვებ-გვერდზე

სადისერტაციო საბჭოს მდივანი -----

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა. ბოლო ათწლეულში მრავალი სამეცნიერო ნაშრომი მიეძღვნა მეტალთა ნანონაწილაკების სინთეზს და მათი თვისებების შესწავლას. მათ შორის განსაკუთრებული ადგილი უკავია ვერცხლის ნანონაწილაკებს (AgNPs) თავისი უნიკალური თვისებებით, რამაც განაპირობა მათი გამოყენების პერსპექტივა ისეთ სფეროებში, როგორებიცაა კატალიზი, ოპტიკა, ელექტრონიკა, სენსორები, ფარმაცოლოგია, ბიომედიცინა და სხვა მრავალი დარგი. დადგენილია, რომ AgNPs-ის ბაქტერიციდული აქტივობა დამოკიდებულია რამდენიმე პარამეტრზე, როგორებიცაა მათი ზომა, ფორმა და სტაბილურობა ფიზიოლოგიურ არეში. AgNPs-ის სინთეზი სპეციფიკური ანტიბაქტერიული თვისებებით უმნიშვნელოვანესი გამოწვევაა, თუმცა ეს მხოლოდ პირველი ნაბიჯია მათი წარმატებული გამოყენებისათვის ბიოსამედიცინო სფეროში. როგორც წესი, ნანონაწილაკები ფიზიოლოგიურ არეში განიცდიან მნიშვნელოვან ცვლილებებს, როგორიცაა აგრეგაცია და ზედაპირის ინაქტივაცია, რაც მნიშვნელოვნად ასუსტებს სასურველ ანტიბაქტერიულ თვისებებს. მეორე ასპექტი ბიოსამედიცინო კვლევის სფეროში არის სამკურნალო აგენტების ბიოთავსებადობის გაუმჯობესება. როგორც წესი, AgNPs ფიზიოლოგიურ პირობებში, ამჟღავნებენ ციტოტოქსიკურობას, რის გამოც მათი გამოყენება ბიოსამედიცინო დანიშნულებით ლიმიტირებულია. ამიტომ, დღეისათვის დიდი ძალისხმევაა ფოკუსირებული AgNPs-ის შერწყმაზე ზედაპირულად აქტიურ ნივთიერებებთან, პოლიმერებთან და ანტიბიოტიკებთან, რამაც შესაძლებელია მიგვიყვანოს ანტიბაქტერიულ კომპოზიტამდე ახალი, გაუმჯობესებული თვისებებით, რაც მიუწვდომელია ცალკე აღებული კომპონენტისათვის.

პრობლემის გადასაჭრელად პერსპექტიულია ქირურგიული ინსტრუმენტებისა და ნაკეთობების დაფარვა ნანოვერცხლის შემცველი, ანტიმიკრობული, ბიოდეგრადირებადი პოლიმერული, თხელი, რამდენიმე

მიკრონის სისქის ნანოკომპოზიტებით, რომლებიც წარმოადგენენ პოლიმერულ მატრიქსში ჩართულ AgNPs-ს. აღნიშნული კომპოზიტები უწყვეტად გამოყოფენ (sustained release) „ბაქტერიების მკვლელ“ ანტიმიკრობულ ნანონაწილაკებს, რითაც ხელს უშლიან ბიოაფსკის წარმოქმნას.

კვლევის მიზანი. კვლევის მიზანს წარმოადგენა ახალი თაობის ნანოკომპოზიტების მიღება, რომლებშიც მატრიქსებად გამოვიყენებდით პოლი-N-ვინილ-პიროლიდონს და ბუნებრივი წარმოშობის α -ამინომჟავების საფუძველზე სინთეზირებულ, ეთილის სპირტში (დაშვებულია FDA-ს მიერ) ხსნად (პოლიმერების სპირტში ხსნადობა აუცილებელი პირობაა AgNPs-ის სტაბილიზაციისათვის) ბიოდეგრადირებად, ბიოშეთავსებად და ორგანიზმში ასიმილირებად პოლიესტერშარდოვანას და პოლიესტერამიდს, რომელთა სინთეზი განხორციელებული იყო ჩვენს მიერ შემუშავებული ორიგინალური მეთოდებით, მიღებულ ნანოკომპოზიტებში AgNPs-ის წარმოქმნის პროცესის შესწავლა, მათი ზომების, ფორმის და დროში აგრეგაციის შეფასება, ასევე ბაქტერიციდული აქტივობის განსაზღვრა ცდებში *in vitro* აგარის გაზონზე.

კვლევის ობიექტები, გამოყენებული მასალები: კვლევის ობიექტებს წარმოადგენდნენ: მასტაბილიზირებელ აგენტებად პოლი-N-ვინილ-პიროლიდონი (PVP, $M_w=40,000$, Sigma-Aldrich) და ჩვენს მიერ სინთეზირებული ორიგინალური ამინომჟავური ბიოდეგრადირებადი პოლიმერები პოლიესტერამიდი (PEA, $M_w=48,100$) და პოლიესტერშარდოვანა (PEU) - როგორც დაბალ-მოლეკულური (1L6(low) $M_w=8,500$), ასევე მაღალმოლეკულური (1L6(high) $M_w=46,600$), რომლებიც შემდგომ ეტაპზე ასრულებდნენ ბიოკომპოზიტური პრეპარატების მარტიქსის ფუნქციას. გამოყენებული მარილი - ვერცხლის ნიტრატი ($AgNO_3$, Sigma-Aldrich $\geq 99,0\%$) და აღმდგენი რეაგენტი - ეთანოლი (C_2H_5OH , 96,3%).

გამოყენებული მეთოდები: ვერცხლის ნანონაწილაკებს ვიღებდით ვერცხლის ნიტრატის ფოტოქიმიური აღდგენით ეთანოლის არეში. აღგენით

პროცესზე ფიზიკური ზემოქმედებისათვის ვიყენებდით ენერჯის იაფ წყაროს - დღის სინათლეს, რომელიც საშუალებას იძლევა დავასინთეზოთ სასურველი ზომის (≤ 10 ნმ) ვერცხლის ნანონაწილაკები, რომლებსაც გააჩნიათ პრაქტიკული გამოყენების მაღალი პოტენციური ბაქტერიციდული პრეპარატების სახით. ამისათვის აღნიშნულ ხსნარს ვდგამდით ფანჯრის რაფაზე. ამ შემთხვევაში ფანჯრის მინა ასრულებდა შუქფილტრის როლს, რამეთუ იგი ატარებს მხოლოდ სპექტრის ხილულ ნაწილს და არ ატარებს მოკლელტალღოვან ულტრაიისფერ გამოსხივებას. დღის სინათლის გამოყენებით ვერცხლის ნანონაწილაკების მიღება ჩვენს მიერ განხორციელებულია პირველად. AgNPs-ის წარმოქმნას ვადასტურებდით ულტრაიისფერი სპექტროსკოპიის (UV-visible Spectroscopy System, Agilent 8453), ტრანსმისიური ელექტრონული მიკროსკოპიის (JEOL JEM 100SX Transmission Electron Microscope) და დინამიკური შუქგაბნევის მეთოდის (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK) გამოყენებით. ნანოკომპოზიტების ბაქტერიციდული აქტივობა შევისწავლეთ ცდებში *in vitro* აგარის გაზონზე.

კვლევის პრაქტიკული მნიშვნელობა. კვლევის პრაქტიკული მნიშვნელობა არის AgNPs-ის ფოტოქიმიური სინთეზი და ბიოდეგრადირებადი ამინომჟავური პოლიმერების დარგში, არსებულ ცოდნასა და გამოცდილებაზე დაყრდნობით ახალი, ანტიმიკრობული AgNPs-ის შემცველი კომპოზიტების შექმნა, რომლებიც ეფექტური იქნებიან, როგორც ჰოსპიტალური ინფექციების წინააღმდეგ საბრძოლველად (კერძოდ სხვადასხვა სამედიცინო მასალისა და ქირურგიული ინსტრუმენტების ბაქტერიციდულ საფარად), ასევე სხვადასხვა სახის ინფიცირებული ჭრილობების სამკურნალოდ, იმ ბაქტერიული პათოგენების წინააღმდეგ, რომლებიც რეზისტენტულები არიან "სტანდარტული" ანტიბიოტიკური თერაპიის მიმართ.

AgNPs-ით იმპრეგნირებული ბიოდეგრადირებადი პოლიმერი წარმოადგენს პროლონგირებული მოქმედების და AgNPs-ის კონტროლირებადი გამოყოფის ანტიბაქტერიულ პრეპარატს, რომელიც უზრუნველყოფს ნანოვერცხლის ლოკალური კონცენტრაციის შენარჩუნებას სასურველ თერაპიულ დონეზე.

მეცნიერული სიახლე. შემუშავებულია ერთსაფეხურიანი, იაფი და მარტივი ფოტოქიმიური აღდგენის მეთოდი დღის სინათლის გამოყენებით. აღნიშნული მეთოდით AgNPs-ის მიღება განხორციელებულია პირველად.

მიღებულია ანტიბაქტერიული ნანოვერცხლის შემცველი კომპოზიტები PVP-სა და ჩვენს მიერ სინთეზირებული ორიგინალური ამინომჟავური ბიოდეგრადირებადი პოლიმერების - PEA-ის და PEU-ს ბაზაზე. ასევე, პირველადაა გამოყენებული ბიოდეგრადირებადი PEA და PEU საწყის, ვერცხლის ნაწილაკების ფორმირების ეტაპზე ნაწილაკების მასტაბილიზირებელ პოლიმერებად, ხოლო საბოლოოდ კი მატრიქსებად მიზნობრივი ბიოკომპოზიტებისათვის. შესწავლილია, ასევე ვერცხლის ნანოსუსპენზიების მიღება პოლიმერების ნარევის (PVP/PEA - 1/1 თანაფარდობა) და ვერცხლის ნიტრატის განსხვავებული კონცენტრაციებისას.

პუბლიკაციები: სადისერტაციო თემაზე გამოქვეყნებულია 3 სტატია და 3 თეზისი ადგილობრივ და საერთაშორისო კონფერენციებზე.

სამუშაოს აპრობაცია. დისერტაციის ძირითადი შედეგები წარდგენილია:

1. შ. ცხადაძე, ნ. კუპატაძე, დ. ტულუში, რ. ქაცარავა. „ნანოვერცხლის შემცველი ბიოკომპოზიტების პოტენციური გამოყენება ბიომედიცინაში“, „85-ე სტუდენტთა ღია საერთაშორისო სამეცნიერო კონფერენცია“, საქართველო, თბილისი 2017, 7 ივნისი - 1 ივლისი. (მოიპოვა მესამე საპრიზო ადგილი).

2. Sh. Tskhadadze , N. Kupatadze , M. Gurielidze, M. Gverdtsiteli, D. Tugushi, R. Katsarava. *“NANOSILVER CONTAINING BIOCOMPOSITIONS AS ANTI-*

MICROBIAL COATINGS“, „5 th International Caucasian Symposium on Polymers & Advanced Materials“, Georgia, Tbilisi 2017, 2-5 July, p. 126.

3. Tskhadadze Sh., Kupatadze N., Gaprindashvili R., Tugushi D., Katsarava R. Nanosilver „Containing Antibacterial Composites Made of Amino Acid Based Biodegradable Polymers“, „International Scientific Conference Future Technologies and Quality of Life“, Georgia, Batumi 2017, 29 September - 1 October, p. 156-157. (დასახელდა ერთ-ერთ საუკეთესო პოსტერულ მოხსენებად წარდგენილი 54 მოხსენებიდან).

სამუშაოს მოცულობა და სტრუქტურა: დისერტაცია მოიცავს 115 ნაბეჭდ გვერდს, ცხრილი 13, ნახაზი 31, სქემა 5, ციტირებული ლიტერატურას 132. დისერტაცია შედგება შემდეგი ძირითადი თავებისგან: შესავალი, ლიტერატურის მიმოხილვა, შედეგები და მათი განსჯა, დასკვნა და გამოყენებული ლიტერატურა.

ძირითადი შინაარსი

1. ლიტერატურის მიმოხილვა

ნაშრომის ლიტერატურის მიმოხილვაში გაანალიზებულია ძირითადი სამუშაოები, რომლებიც ეხება ნანოტექნოლოგიების უდიდეს როლსა და პერესპექტივებს პათოგენურ მიკროორგანიზმებთან ბრძოლაში, ბიოდეგრადირებად პოლიმერებს ზოგადად და ამინომჟავების საფუძველზე სინთეზირებულ, ახალი თაობის ბიოდეგრადირებადი პოლიმერების მიღების გზებს და მათი თვისებების მოდიფიკაციას, წამლის კონტროლირებადი და მიზანმიმართული გამოყოფის სისტემებს (ანტიმიკრობული საფარები და ნაკეთობები, ჭრილობის საფარი მასალები), ვერცხლის და მისი წარმოებულების ბაქტერიციდულ აქტივობას და ანტიბაქტერიული თვისებების მქონე ვერცხლის ნანონაწილაკების მისაღებად გამოყენებულ მეთოდებს, მასტაბილიზირებელ აგენტებსა და მატრიქსებს, აღმდგენ ნივთიერებებს, მათ დადებით და უარყოფით თვისებებს და გამოყენების პერსპექტივებს.

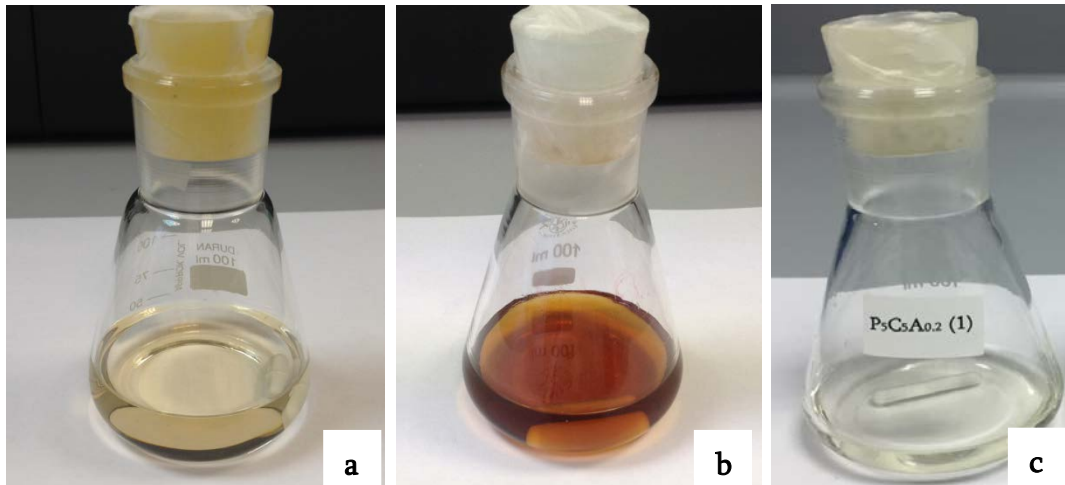
2. შედეგები და მათი განსჯა

2.1. ვერცხლის ნანონაწილაკების მიღება მარტივი ფოტოქიმიური

მეთოდით პოლი-N-ვინილ-პიროლიდონის თანაობისას

AgNPs-ის სინთეზის მრავალი ცნობილი მეთოდიდან ჩვენ შევარჩიეთ ფოტოქიმიური მეთოდი და განვახორციელეთ წინასწარი კვლევები. კვლევის აღნიშნულ ეპატზე ჩვენი სამუშაოს მიზანი იყო AgNPs-ის მიღება ვერცხლის ნიტრატის სპირტხსნარში მასტაბილიზირებელ აგენტად უკვე კარგად გამოცდილი PVP-ს გამოყენებით, ჩვენს მიერ შემუშავებული მარტივი და იაფი მეთოდით - ფოტოქიმიური აღდგენით, დღის შუქით (სპექტრის ხილული ნაწილით) დასხივებისას. ლიტერატურაში აღწერილია ფოტოქიმიური აღდგენა

ულტრაიისფერი დასხივებით. მაგრამ ეს მეთოდი მოითხოვს ულტრაიისფერი გამოსხივების სპეციალურ წყაროს. ჩვენს მიერ შერჩეული მეთოდი ყურადღებას იპყრობს თავისი სიიაფითა და სიმარტივით. ვერცხლის ნანონაწილაკებს ვიღებდით PVP-სა (1,0 გ, მოლ. მასა \approx 40 000, Sigma-Aldrich) და ვერცხლის ნიტრატის (0,1 გ) სპირტხსნარის (40,0 მლ) დღის სინათლით დასხივებით.



ნახ. 1. ვერცხლის ნანოსუსპენზია $P_{10}A_1$ -ის საკვლევი ხსნარი ეთანოლში დასხივებამდე (a), დასხივებიდან 24 სთ-ის შემდეგ (b) და მასტაბილიზირბელი დანამატის გარეშე (c)

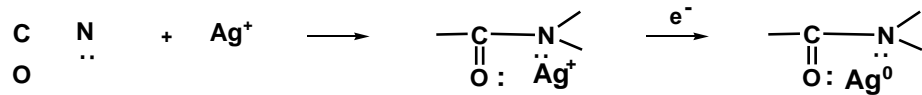
AgNPs-ის წარმოქმნა დასტურდება ვიზუალურად - საწყისი უფერული ხსნარი ხილული სხივების გავლენით იფერება ყავისფრად (ნახ. 1). შევნიშნავთ, რომ სიიაფისა და სიმარტივის გარდა შემოთავაზებული მეთოდი არის ეკოლოგიურად დამზოგი, ვინაიდან არ მოითხოვს ვერცხლის იონის (Ag^+) ატომურ ვერცხლამდე (Ag^0) აღსადგენად სპეციალური რეაგენტების (ხშირად ტოქსიკური) გამოყენებას, ვინაიდან ამ ფუნქციას ასრულებენ ეთილის სპირტის მოლეკულები. Ag^+ - ის აღდგენის პროცესი ეთანოლის

ხსნარში მასტაბილიზირებელი დანამატის - PVP-ს თანაობისას¹ მიმდინარეობს სქემა 1-ის შესაბამისად:



სქემა 1. ვერცხლის იონის აღდგენა ატომურ ვერცხლამდე ეთანოლის ხსნარში

მას შემდეგ, რაც წარმოიქმნება ვერცხლის ატომები, ისინი იწყებენ გაერთიანებას (ზრდას) ნანონაწილაკების ჩამოყალიბებამდე. დადგენილია, რომ როდესაც ნაწილაკების დიამეტრი არის 50 ნმ-ს ქვემოთ, ამიდის ჯგუფი (აზოტის ატომი) ურთიერთქმედებს ვერცხლთან და აყალიბებს დამცავ გარსს, რითაც ხელს უშლის ნაწილაკების აგლომერაციას (შეწებებას). პოსტულირდება კომპლექსის წარმოქმნა PVP-სა და Ag^+ - ს შორის (სქემა 2), რომელშიც ამიდური ბმა ასრულებს მასტაბილიზებელ ფუნქციას.

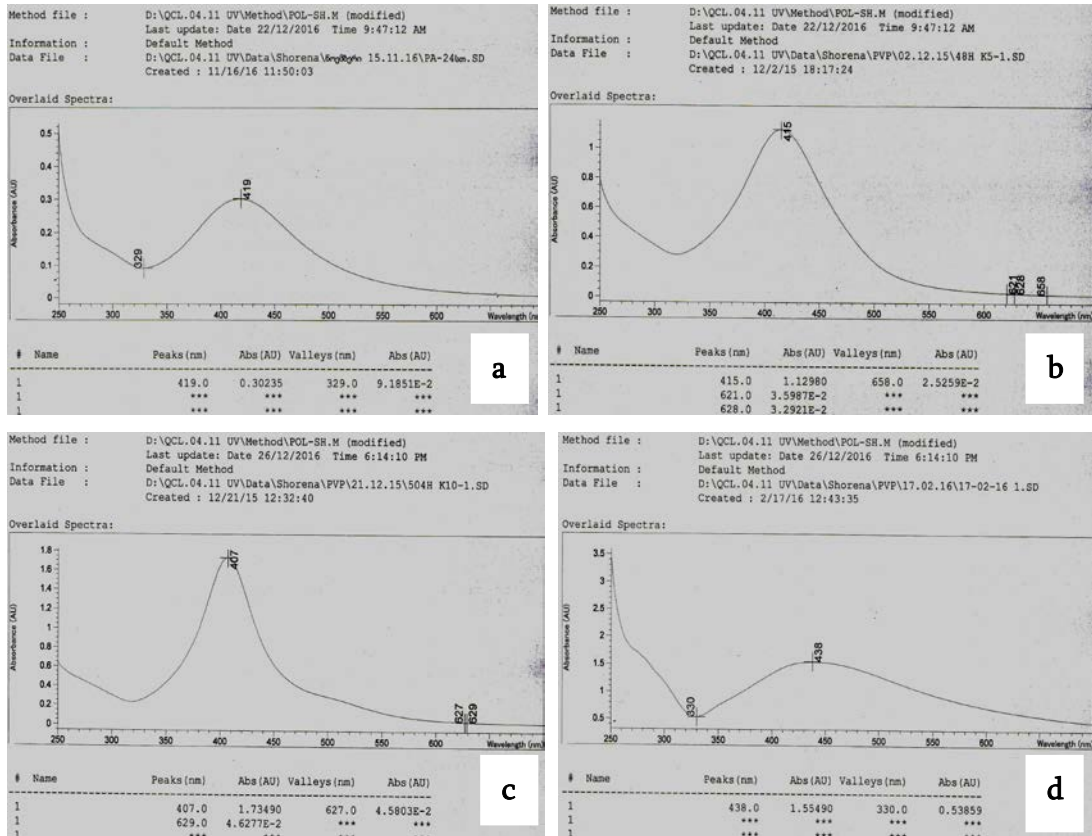


სქემა 2. პოლი-N-ვინილ-პიროლიდონსა და ვერცხლის ატომს შორის კომპლექსწარმოქმნის სავარაუდო სქემა

მოვახდინეთ მიღებული ნანოსუსპენზიის კვლევა ულტრაიისფერი (UV) სპექტროსკოპიის გამოყენებით. ცნობილია, რომ ვერცხლის ნანონაწილაკი (AgNP) წარმოადგენს პლაზმონს და აქვს შთანთქმის მაქსიმუმი ელექტრონულ სპექტრში დაახლოებით 400-460 ნმ დიაპაზონში, ნანონაწილაკის ზომისგან დამოკიდებულებით. ამასთან დადგენილია, რომ რაც უფრო ახლოსაა შთანთქმის მაქსიმუმი 400 ნმ-თან და რაც უფრო ვიწროა შთანთქმის პიკის ნახევარსიმაღლე, მით უფრო მცირეა ნაწილაკის ზომა. AgNPs ზომით 10 ნმ ან ქვემოთ, შთანთქმის მაქსიმუმი მდებარეობს 400-420 ნმ-ის დიაპაზონში.

¹ შევნიშნავთ, რომ მასტაბილიზირებელი დანამატის - PVP-ს გარეშე AgNO_3 -ის ფოტოქიმიური აღდგენის პროცესი ეთანოლში არ მიმდინარეობს, ხსნარი არ იფერება ხანგრძლივი დროის განმავლობაში.

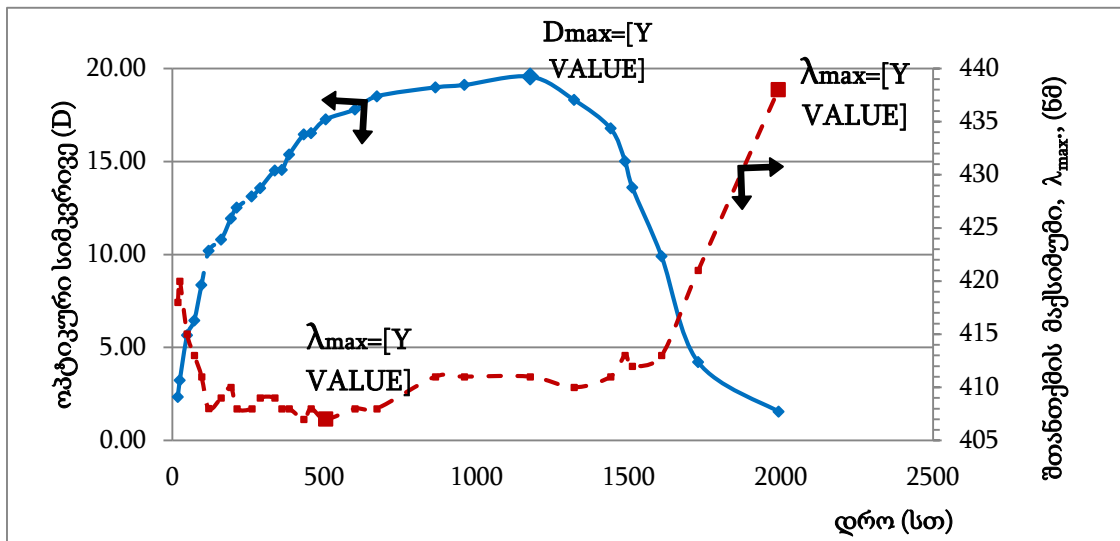
ჩვენს მიერ მიღებული AgNPs-ის ელექტრონული შთანთქმის სპექტრები მოყვნილია ნახ. 2-ზე, საიდანაც ჩანს, რომ ნაწილაკების პლაზმონის შთანთქმის მაქსიმუმები (λ_{max}) ვარიირებს ზღვრებში 407-438 ნმ, ხოლო შთანთქმის პიკის ნახევარსიმაღლე კი საკმაოდ ვიწროა განსაკუთრებით 48 და 500 სთ-ის განვლის შემდეგ, ნახ. 3, b და c). ეს კი მიუთითებს იმაზე, რომ მიღებული ნაწილაკების ზომები არის სასურველ დიაპაზონში - ≤ 10 ნმ .



ნახ. 2. ვერცხლის ნანოსუსპენზია P10A1-ის უი-სპექტრი სინათლეზე დაყოვნებიდან 24,0 სთ-ის (a), 48,0 სთ-ის შემდეგ (b), 500,0 სთ-ის (c) და 2000,0 სთ-ის შემდეგ (d)

შევისწავლეთ AgNPs-ის ოპტიკური პარამეტრების ცვლილება დროში. შევნიშნავთ, რომ სისტემა მრავალჯერ გადიოდა სინათლე - სიბნელის (ვტოვებდით ღამით სიბნელეში) ციკლს. მიღებული შედეგები - ნანოსუსპენზიის ოპტიკური სიმკვრივის და პლაზმონის შთანთქმის მაქსიმუმის ცვლილება დროში წარმოდგენილია ნახ. 3-ზე. როგორც ნახ. 3-დან ჩანს,

ოპტიკური სიმკვრივე განუხრელად იზრდება 1300 სთ-ის განმავლობაში, ამასთან 500 - 600 სთ-დან 1300 სთ-მდე ოპტიკური სიმკვრივე იცვლება მცირედ, რაც შეიძლება მიუთითებდეს, რომ ვერცხლის ნიტრატი პრაქტიკულად სრულად შევიდა რეაქციაში². რაც შეეხება შთანთქმის მაქსიმუმს იგი მცირდება პირველი 500 სთ-ის განმავლობაში $\approx 407-409$ ნმ-მდე, შემდეგ კი განიცდის უმნიშვნელო ცვლილებას (რაც შეიძლება მიუთითებდეს იმაზე, რომ ნანონაწილაკების ზომები დროში განიცდის მცირე ცვალებადობას. დაწყებული 1500 -1600 საათიდან, შთანთქმის მაქსიმუმი იზრდება და 2000 სთ-თვის აღწევს 438 ნმ-ს. თითქმის ამავედროულად იწყება ნანოსუსპენზიის ოპტიკური სიმკვრივის მკვეთრი შემცირება. ყოველივე ეს შესაძლოა მიუთითებდეს ნაწილაკების აგრეგაციასა და დამსხვილებაზე. ჭურჭლის ფსკერზე წარმოქმნილი შავი ნალექი ადასტურებს ამ მოსაზრებას.



ნახ. 3. ვერცხლის ნანოსუსპენზია P10A1-ის ოპტიკური სიმკვრივის (D) და შთანთქმის მაქსიმუმის (λ_{max} , ნმ) ცვლილება დროში

შედეგები: მიღებულია ანტიბაქტერიული ნანოვერცხლის შემცველი კომპოზიცია PVP-ს ბაზაზე, ენერჯის წყაროდ დღის სინათლის გამოყენებით.

² ოპტიკური სიმკვრივის განსასაზღვრად, საჭიროების შემთხვევაში, მიღებულ ნანოსუსპენზიას ვანზავებდით 5-10-ჯერ, ისე, რომ ხელსაწყოს ჩვენება ყოფილიყო 2 ოპტიკურ ერთეულზე ნაკლები.

აღსანიშნავია, რომ დღის სინათლის გამოყენებით AgNPs-ის მიღება განხორციელებულია პირველად. მიღებული ნანოსუსპენზია დახასიათებულია ელექტრონული სპექტრომეტრიით - AgNPs-ის პლაზმონის შთანთქმით. ამასთან მიღებული ნანოსუსპენზია გამოირჩევა მდგრადობით - პრაქტიკულად არ იცვლის პარამეტრებს 1300 - 1400 სთ-ის (თითქმის 2 თვის) განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე, რაც პერსპექტულს ხდის მის პრაქტიკულ გამოყენებას მედიცინაში, კვებით მრეწველობაში, მეღვინეობაში და სხვ.

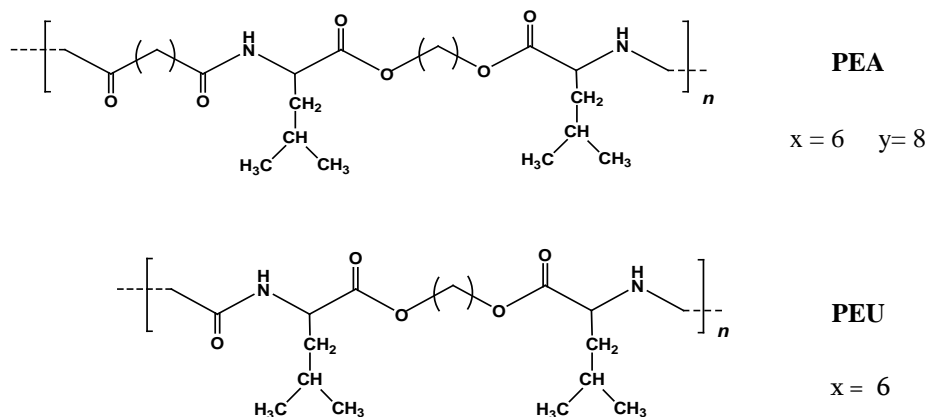
2.2. ნანოვერცხლის შემცველი ანტიბაქტერიული კომპოზიტები ამინომჟავური ბიოდეგრადირებადი პოლიესტერამიდების და პოლიესტერმარდოვანების საფუძველზე

კვლევის აღნიშნულ ეტაპზე სამუშაოს მიზანი იყო AgNPs-ის ანტიბაქტერიული პრეპარატების მიღება ჩვენს მიერ პირველად სინთეზირებული ბიოდეგრადირებადი პოლიმერების - პოლიესტერამიდის და პოლიესტერმარდოვანას საფუძველზე, ენერჯის იაფი წყაროს - დღის სინათლის გამოყენებით.

მიუხედავად იმისა, რომ PVP კარგი მასტაბილიზირებელი აგენტია, ნანოკომპოზიტის მატრიქსის სახით მის გამოყენებას გააჩნია რიგი შეზღუდვები, როგორებიცაა მაღალი ხსნადობა წყალში (ადვილად გამოირეცხება ნანოკომპოზიტის ფირიდან) და არადეგრადირებადი ბუნება, რაც, მისი წყალში უხსნარ ფორმაში გადაყვანის შემთხვევაშიც კი, ვერ უზრუნველყოფს ფირის ზედაპირიდან ნანოვერცხლის უწყვეტ და კონტროლირებად გამოყოფას. აქედან გამომდინარე, ლოგიკური იყო შემდგომ ცდებში გამოგვეყენებინა ბიოდეგრადირებადი, ეთანოლში ხსნადი და წყალში უხსნარი პოლიმერები, კერძოდ, ჩვენს ლაბორატორიაში პირველად სინთეზირებული პოლიესტერამიდი (PEA) და პოლიესტერმარდოვანა (PEU), როგორც დაბალმოლეკულური 1L6(low), ასევე მაღალმოლეკულური 1L6 (high).

პოლიესტერამიდი (PEA). ერთი თანა-პოლიესტერამიდი (**8L6**)_{0.75}-**(8F6)**_{0.25}), რომელიც შედება ამინომჟავების - L-ლეიცინის (0.75 მოლ.%) და L-ფენილალანინის (0.25 მოლ.%), სებაცინის მჟავასა და 1,6-ჰექსანდიოლისაგან. აღნიშნული თანაპოლიესტერამიდი, წარმოადგენს პრეპარატ „კოლადერმის“ მთავარ კომპონენტს. პოლიმერი რეგისტრირებულია საქართველოს შრომის, ჯანმრთელობის და სოციალური დაცვის სამინისტროს სამედიცინო საქმიანობის სახელმწიფო რეგულირების სააგენტოში (სამკურნალო საშუალებების სარეგისტრაციო მოწმობა #N 003999, 24.XI.2010). გამოყენებული პოლიმერის საშუალო მასა არის (M_w) = 48,100, საშუალო რიცხვი - (M_n)= 25,600, ხოლო საშუალო მასისა და საშუალო რიცხვის თანაფარდობა (M_w / M_n) = 1.87.

პოლიესტერშარდოვანა (PEU). პოლიესტერშარდოვანა შედგება ამინომჟავა L-ლეიცინის და 1,6-ჰექსანდიოლისაგან. ექსპერიმენტისთვის შევარჩიეთ ორი ნიმუში - „დაბალმოლეკულური“ და „მაღალმოლეკულური, რათა შეგვესწავლა პოლიმერის მოლეკულური წონის გავლენა AgNPs-ის წარმოქმნის პროცესზე. გამოყენებული პოლიმერების მახასიათებლები არის: „დაბალმოლეკულურის“ შემთხვევაში: $M_w = 8,500$, $M_n = 8,300$, $M_w / M_n = 1.02$, ხოლო „მაღალმოლეკულურისას“ - $M_w = 46,600$, $M_n = 32,000$, $M_w / M_n = 1.46$



სქემა 3. კვლევაში გამოყენებული ბიოდეგრადირებადი პოლიმერები, პოლიესტერამიდი (PEA) და პოლიესტერშარდოვანა (PEU)

აღნიშნული პოლიმერები PVP-ს მსგავსად ჯაჭვში შეიცავენ ამიდური ჯგუფების აზოტის ატომებს, რაც აუცილებელია ნანონაწლაკების სტაბილიზაციისათვის. მნიშვნელოვანია, რომ აღნიშნული პოლიმერების „საშენ ბლოკებად“ გამოყენებულია არატოქსიკური ნივთიერებები – ამინომჟავა ლეიცინი და ალიფატური ნივთიერებები - 1,6-ჰექსანდიოლი და სებაცინის მჟავა. მიღებულ ნანოსუსპენზიებში პოლიესტერამიდს („კოლადერმს“) აღვნიშნავთ, როგორც C, PEU-ს დაბალმოლეკულურს როგორც – 1L6(low), მაღალმოლეკულურს – 1L6(high), ხოლო ვერცხლის ნიტრატს როგორც A.

ცხრილი 1. ექსპერიმენტში გამოყენებული AgNPs-ის მასტაბილიზირებელი აგენტები (PEA და PEU), ვერცხლის ნიტრატის (AgNO₃) და აღმდგენი ნივთიერების (ეთანოლი) წონითი თანაფარდობები და კონცენტრაციები

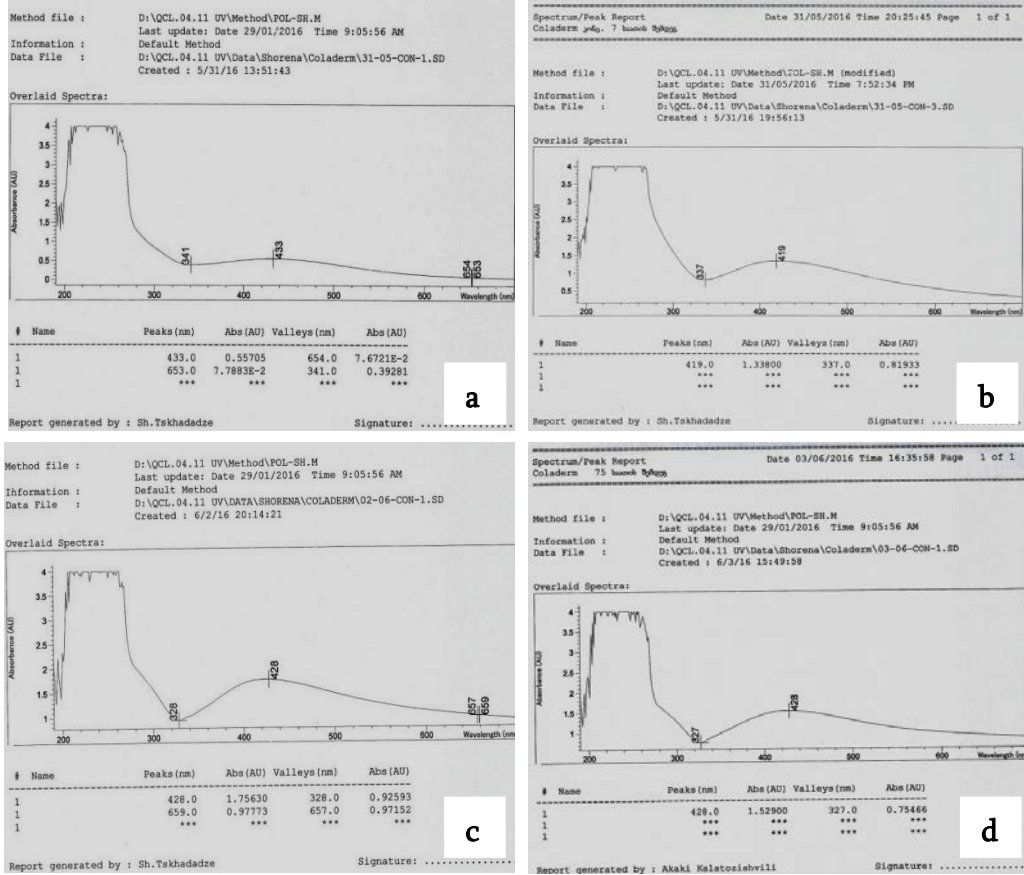
საწყისი ნარევი*		პოლიმერი, მგ		AgNO ₃ (A), მგ	EtOH, მლ	პოლიმერის კონცენტრაცია, მგ/მლ	AgNO ₃ -ის კონცენტრაცია, მგ/მლ
		PEA	PEU				
ექსპერიმენტის I სერია	C ₁₀ A ₁	1000		100	40	25	2,50
	1L6(low) ₁₀ A ₁		1000	100	40	25	2,50
	1L6(high) ₁₀ A ₁		1000	100	40	25	2,50
ექსპერიმენტის II სერია	C ₁₀ A ₂	1000		200	40	25	5,0
	1L6(low) ₁₀ A ₂		1000	200	40	25	5,0
	1L6(high) ₁₀ A ₂		1000	200	40	25	5,0

* ქვედა ინდექსებში 10 აღნიშნავს C-ის, 1L6(low)-ისა და 1L6(high)-ის, ხოლო 1 - A-ს წონით თანაფარდობას

ექსპერიმენტი წარიმართა ცხრილი 1-ში მოყვანილი თანმიმდევრობით. მოვახდინეთ მიღებული ნანოსუსპენზიების კვლევა UV-სპექტროსკოპიის გამოყენებით და შევისწავლეთ AgNPs-ის ოპტიკური პარამეტრების ცვლილება დროში. შევნიშნავთ, რომ სისტემა მრავალჯერ გადიოდა სინათლე-სიბნელის ციკლს (ვტოვებდით ღამით სიბნელეში).

ექსპერიმენტის პირველი (I) სერია. PEA თანაობისას მიღებული AgNPs-ის ელექტრონული შთანთქმის სპექტრები მოყვანილია ქვემოთ (ნახ. 4), საიდანაც ჩანს, რომ AgNPs-ის პლაზმონის შთანთქმის მაქსიმუმი (λ_{max})

სინათლეზე დაყოვნებიდან 1 სთ-ის შემდეგ არის 433 ნმ, 7 სთ-ის შემდეგ 419 ნმ, ხოლო 24 და 72 სთ-ის შემდეგ 428 ნმ, რაც ნაწილაკების საკმაოდ მცირე ზომებზე მიუთითებს.



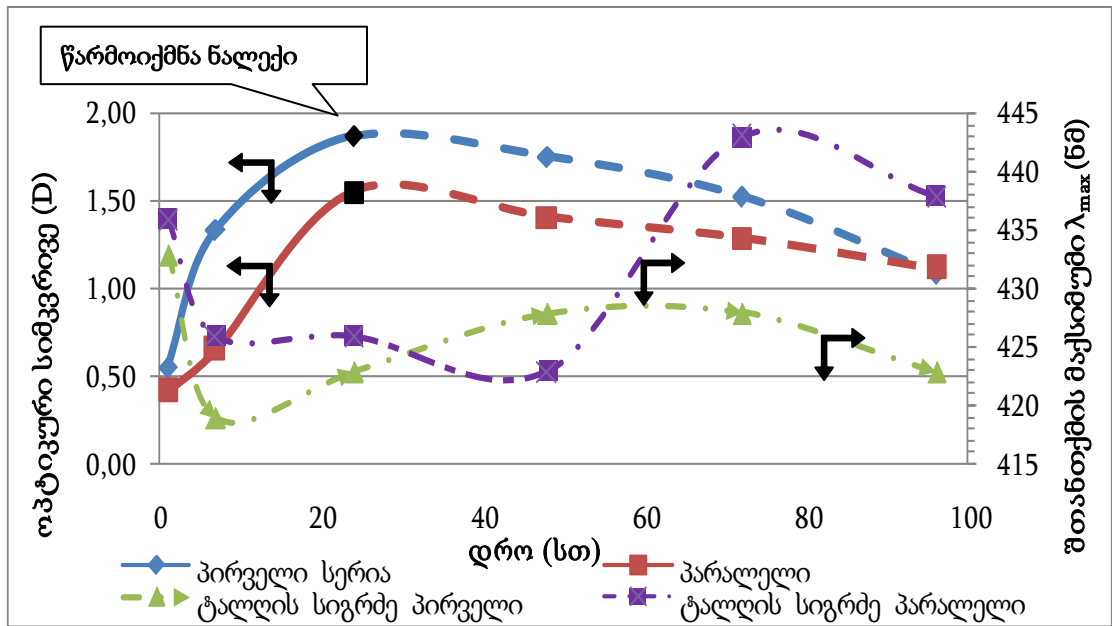
ნახ. 4. ვერცხლის ნანოსუსპენზია - $C_{10}A_1$ -ის უი-სპექტრი სინათლეზე დაყოვნებიდან 1 (a), 7 (b), 24 (c) და 72 (d) სთ-ის შემდეგ

მიღებული შედეგები - ნანოსუსპენზიის ოპტიკური სიმკვრივის და შთანთქმის მაქსიმუმის ცვლილება დროში წარმოდგენილია ნახ. 5-ზე (PEA-ის თანაობისას), ნახ. 6-ზე (დაბალმოლეკულური PEU-ს თანაობისას) და ნახ. 7-ზე (მაღალმოლეკულური PEU-ს თანაობისას) (ექსპერიმენტი ჩავატარეთ ორ პარალელურ სერიად).

როგორც, ნახ. 5-დან ჩანს, PEA-იანი ნანოსუსპენზიის ოპტიკური სიმკვრივე დროში თანდათან იზდება და აღწევს მაქსიმუმს დაყოვნებიდან ჯამური 24 სთ-ის შემდეგ. შემდგომი დაყოვნებისას ხსნარი თანდათანობით იმღვრება, რაც მიუთითებს ნაწილაკების აგრეგაციასა და დამსხვილებაზე.

იწყება ვერცხლის გამოლექვა (ჭურჭლის ფსკერზე წარმოიქმნება შავი ნალექი), რის შედეგადაც ნანოსუსპენზიის ოპტიკური სიმკვრივე დროში მცირდება (გაზომვას ვაწარმოებდით ჯამურ 100 სთ-მდე). ექსპერიმენტის პირველ სერიაში ტალღის სიგრძე მერყეობს 419-439 ნმ-ს შორის, ხოლო პარალელურში - 423-443 ნმ-ს შორის, რაც მიუთითებს, რომ მიღებული ნაწილაკების ზომები არის სასურველ დიაპაზონში.

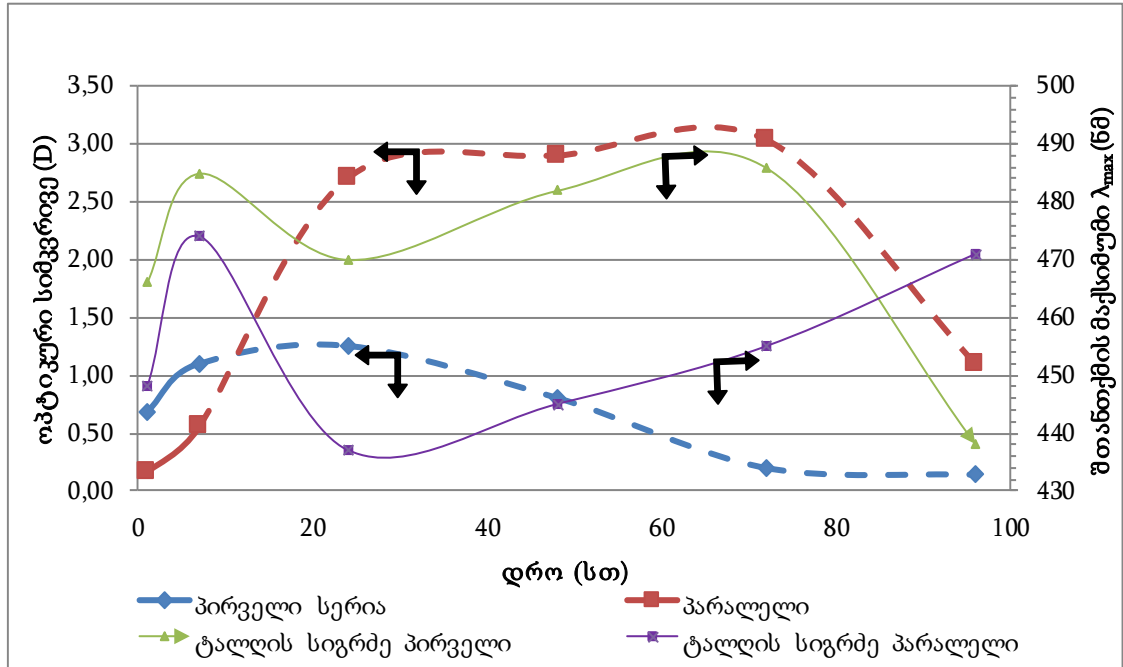
ნახ. 6-დან კი ჩანს, რომ დაბალმოლკულური PEU-ს თანობისას ოპტიკური სიმკვრივე ექსპერიმენტის დადგმიდან თანდათან იზდება და პირველ ექსპერიმენტში მაქსიმუმს აღწევს სინათლეზე დაყოვნებიდან 24 სთ-ის



ნახ. 5. ვერცხლის ნანოსუსპენზია $C_{10}A_1$ -ის ოპტიკური სიმკვრივის (D) და შთანთქმის მაქსიმუმის (λ_{max} , ნმ) ცვლილება დროში

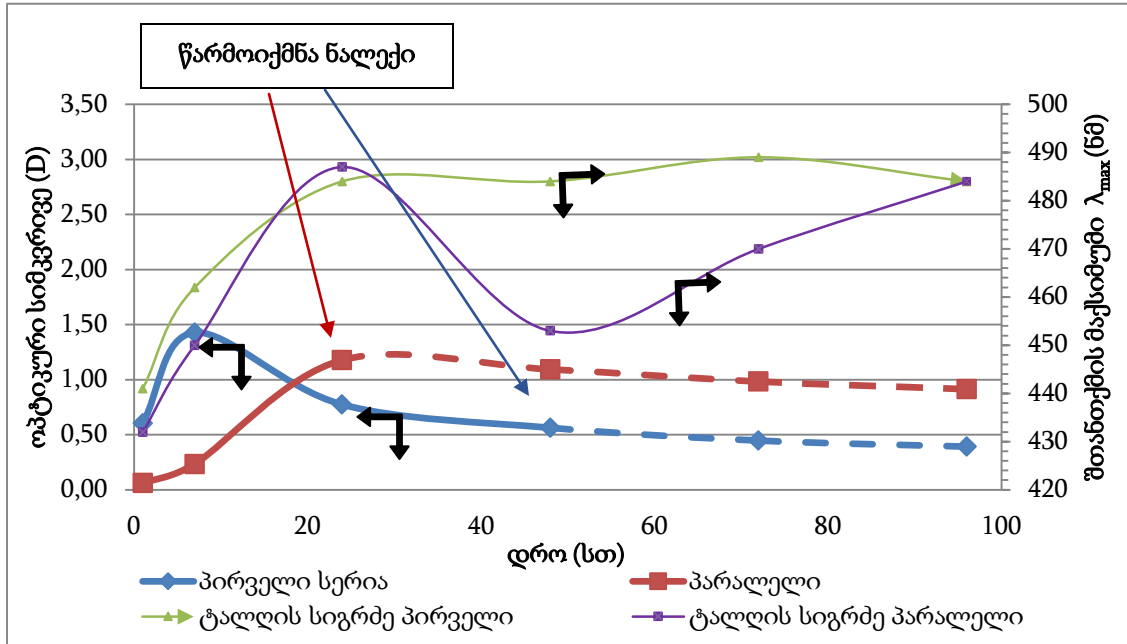
შემდეგ, ხოლო პარალელურში - 72 საათის შემდეგ, ამ დროისათვის ვერცხლის ნაწილაკების ნაწილი გამოლექილია, თუმცა ოპტიკური სიმკვრივის ზრდა მაინც ფიქსირდება - პირველ სერიაში ოპტიკური სიმკვრივე იზრდება $\approx 1,3$ -მდე, ხოლო მეორე სერიაში $\approx 3,0$ - მდე (რაც დაკავშირებულია ხსნარის შემღვრევასთან მსხვილი ნაწილაკების წარმოქმნის ხარჯზე), რაც მიუთითებს ექსპერიმენტის არასათანადო განმეორებადობაზე. ექსპერიმენტის პირველ

სერიაში სიგრძე მერყეობს 466 - 486 ნმ-ს შორის, ხოლო პარალელურში - 437-471 ნმ-ს შორის, რაც ასევე მიუთითებს არასათანადო განმეორებადობასა და შედარებით მსხვილი ნაწილაკების წარმოქმნაზე.



ნახ. 6. ვერცხლის ნანოსუსპენზია 1L6(low)₁₀A1-ის ოპტიკური სიმკვრივის (D) და შთანთქმის მაქსიმუმის (λ_{max}, ნმ) ცვლილება დროში

მაღალმოლეკულური PEU-ს თანაობისას ოპტიკური სიმკვრივე ექსპერიმენტის დადგმიდან თანდათან იზდება და პირველ ექსპერიმენტში მაქსიმუმს აღწევს სინათლეზე დაყოვნებიდან 7 სთ-ის შემდეგ, ხოლო პარალელურში - 24 საათის შემდეგ (ნახ. 7), პირველ სერიაში ოპტიკური სიმკვრივე იზრდება 1,43-მდე, ხოლო მეორე სერიაში - 1,18-მდე, ორივე ექსპერიმენტში ნაწილაკების ფორმირების პირველივე საათში შთანთქმის მაქსიმუმი არის 441 და 432 ნმ, რაც მიუთითებს მცირე ნაწილაკების წარმოქმნაზე, შემდგომი დაყოვნებისას კი ხსნარი თანდათანობით იმღვრევა და შეინიშნება შთანთქმის მაქსიმუმის მკვეთრი გაზრდა და ვერცხლის ექსპერიმენტის პირველ სერიაში ტალღის სიგრძე მერყეობს 441-489 ნმ-ს შორის, ხოლო პარალელურში - 432-487 ნმ-ს შორის, რაც მიუთითებს ასევე დიდი ზომის ნანონაწილაკების წარმოქმნაზე.

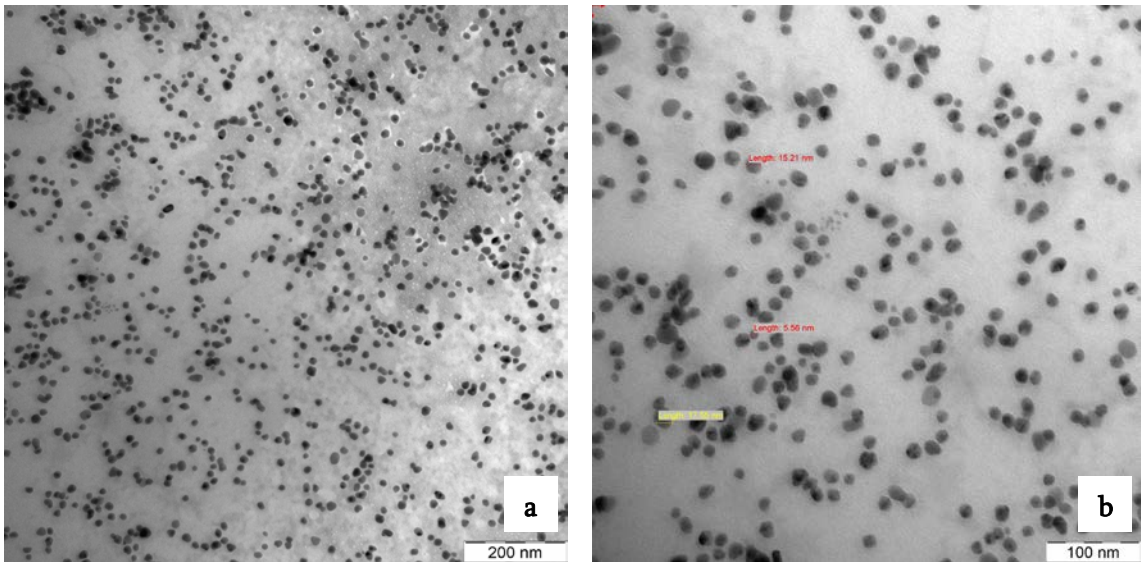


ნახ. 7. ვერცხლის ნანოსუსპენზია 1L6(high)₁₀A₁-ის ოპტიკური სიმკვრივის (D) და შთანთქმის მაქსიმუმის (λ_{max} , ნმ) ცვლილება დროში

მიღებული შედეგები გვიჩვენებს, რომ შესწავლილ პოლიმერებს შორის AgNPs-ის უკეთესი მასტაბილიზირებელია PEA, რომელიც ამავდროულად იძლევა უფრო მდგრად შედეგებს. რაც შეეხება PEU-ს (როგორც დაბალმოლეკულური ასევე მაღალმოლეკულური) ნაკლებად ეფექტური აღმოჩნდნენ, როგორც AgNPs-ის ჩამოყალიბება - სტაბილიზაციის, ასევე შედეგების განმეორადობის თვალსაზრისით.

შესაბამისად შემდგომი კვლევები გავაგრძელებთ PEA თანაობისას მიღებულ ნანონაწილაკებზე. შევისაწავლეთ PEA-ის თანაობისას მიღებული ნანონაწილაკების მახასიათებლები დინამიკური შუქგაბნების მეთოდისა (DLS) და ტრანსმისიური ელექტრონული მიკროსკოპიის (TEM) გამოყენებით. DLS-ით განვსაზღვრეთ ნანონაწილაკების ზომები და ზომითი განაწილება. დავადგინეთ, რომ ეთანოლის ხსნარში ჩამოყალიბებული ნანონაწილაკების საშუალო ზომა არის 50 ნმ (დასხივების დრო - 24 სთ), პოლიდისპერსიულობა კი - $PDI \leq 0,16$, რაც მიუთითებს ხსნარში ნანონაწილაკების საშუალო განაწილებაზე (Mean distribution).

მიუხედავად იმისა რომ ნანონაწილაკების საშუალო ზომა განისაზღვრა 50 ნმ-ის ტოლად, ეს არ გამორიცხავდა, რომ ნაწილაკების ნაწილი ყოფილიყო სასურველი 10 ნმ-ზე ნაკლები ზომის. TEM-ით გამოკვლევამ დაადასტურა, რომ ნარევი საკმაოდ 10 ნმ-ზე ნაკლები ზომის ნანონაწილაკები (ნახ. 8), რაც განსაზღვრავს მიღებული კომპოზიტის მაღალ ბაქტერიციდულ აქტივობას.

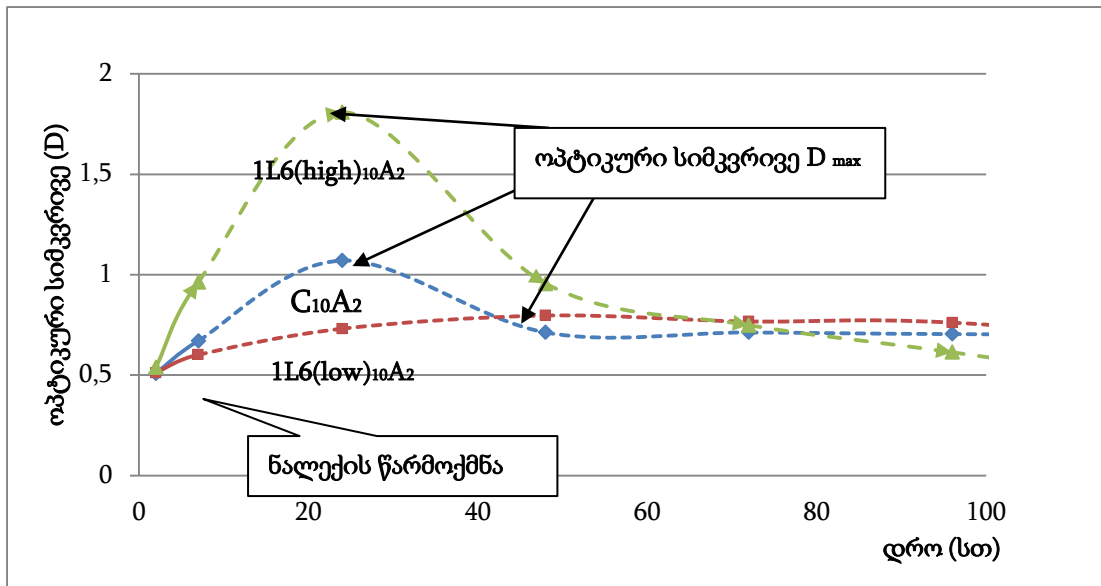


ნახ. 8. TEM გამოსახულება ვერცხლის ნანონაწილაკები (სხვადასხვა გადიდებაზე) მიღებულია ფოტოქიმიური (დღის სინათლის) დასხივებით. დასხივების დრო: 24 სთ

შედეგები: მიღებულია და შესწავლილია ანტიბაქტერიული ნანოვერცხლის შემცველი კომპოზიტები ბიოდეგრადირებადი PEA-სა და PEU-ის საფუძველზე. პირველადაა გამოყენებული ბიოდეგრადირებადი PEA და PEU საწყის, ვერცხლის ნაწილაკების ფორმირების ეტაპზე ნაწილაკების მასტაბილიზირებელ პოლიმერებად, ხოლო საბოლოოდ კი მატრიქსებად მიზნობრივი ბიოკომპოზიტებისათვის (მიიღება უშუალოდ სარეაქციო ნარევის გამოყენებით, მათი განცალკევების და დამატებითი დამუშავების გარეშე). დავადგინეთ, რომ PEA-სა და PEU-ს შორის ვერცხლის ნანონაწილაკების საუკეთესო მასტაბილიზირებელია PEA, რომელიც ამავდროულად იძლევა განმეორებად შედეგებს. PEU ნაკლებად ეფექტურია როგორც ვერცხლის ნანონაწილაკების ჩამოყალიბება - სტაბილიზაციის, ასევე

შედეგების სტაბილურობის თვალსაზრისით. მიღებული ნანოსუსპენზია დახასიათებულია ელექტრონული სპექტრებით - ვერცხლის ნანონაწილაკების პლაზმონის შთანთქმით, დინამიკური შუქგაბნების მეთოდით (DLS) და ტრანსმისიური ელექტრონული მიკროსკოპით (TEM).

ექსპერიმენტის მეორე სერია. ექსპერიმენტის მეორე სერია, პირველისგან განსხვავდებოდა მხოლოდ დამატებული ვერცხლის ნიტრატის (გაორმაგებული - 200 მგ) რაოდენობით (იხ. ცხრილი 1). აღნიშნული ექსპერიმენტის პირველი და პარალელური ნიმუშების გაერთიანებული შედეგები მოცემულია ნახ. 9-ზე. საიდანაც ჩანს, რომ პირველი 7 სთ-ის გასვლის შემდეგ სამივე პოლიმერის შემთხვევაში ვერცხლი ნაწილაკების დიდი ნაწილი გამოილექა.

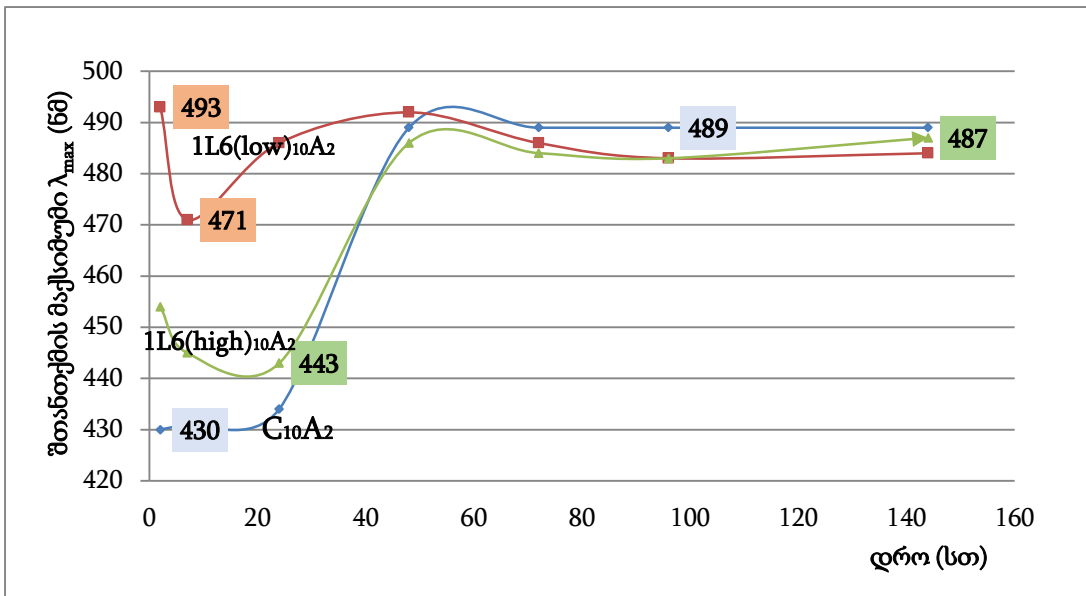


ნახ. 9. ვერცხლის ნანოსუსპენზიების $C_{10}A_2$, $1L6(low)_{10}A_2$ და $1L6(high)_{10}A_2$ -ის ოპტიკური სიმკვრივის დროსთან დამოკიდებულება

ნანოსუსპენზიების $C_{10}A_2$ და $1L6(low)_{10}A_2$ -ის შემთხვევაში ოპტიკური სიმკვრივე მაქსიმუმს აღწევს სინათლეზე დაყოვნებიდან 24 სთ-ის, ხოლო ნანოსუსპენზია $1L6(high)_{10}A_2$ -ის შემთხვევაში კი დაყოვნებიდან 48 სთ-ის შემდეგ. ამ დროისათვის ვერცხლის ნაწილაკების დიდი ნაწილი გამოილექილია, თუმცა ოპტიკური სიმკვრივის ზრდა მაინც ფიქსირდება. ნანოსუსპენზია $C_{10}A_2$ -

ის ოპტიკური სიმკვრივე იზრდება $\approx 1,1$ -მდე, $1L6(low)_{10A2}$ -ის $\approx 1,8$ -მდე, ხოლო $1L6(high)_{10A2}$ -ის $\approx 0,8$ -მდე (რაც შეიძლება დაკავშირებული იყოს ხსნარის შემღვრევასთან მსხვილი ნაწილაკების წარმოქმნის ხარჯზე).

ნახ. 10-დან კი ჩანს, რომ ნანოსუსპენზია C_{10A2} -ის შემთხვევაში ტალღის სიგრძე მერყეობს 430-489 ნმ-ს, $1L6(low)_{10A2}$ -ის - 483-493 ნმ-სა და $1L6(high)_{10A2}$ - 443-487 ნმ-ს შორის, რაც ასევე მიუთითებს ვერცხლის მსხვილი ნაწილაკების არსებობაზე.



ნახ. 10. ვერცხლის ნანოსუსპენზიების C_{10A2} , $1L6(low)_{10A2}$ და $1L6(high)_{10A2}$ -ის შთანთქმის მაქსიმუმის (λ_{max} ნმ) ცვლილება დროში

ექსპერიმენტის მეორე სერიიდან მიღებული შედეგები გვიჩვენებს, რომ სამივე პოლიმერის შემთხვევაში ვერცხლის ნიტრატის გაორმაგებულმა რაოდენობამ გამოიწვია ვერცხლის ნაადრევი გამოლექვა, რაც კიდევ ერთხელ ამყარებს ლიტერატურულ მონაცემებს იმის შესახებ, რომ ვერცხლის ნანონაწილაკების ზომები და დისპერსულობა (განაწილება ზომებით) დამოკიდებულია ხსნარში ვერცხლის იონების კონცენტრაციასა და ალდგენის პირობებზე. ვერცხლის იონების დაბალი საწყისი კონცენტრაციისას წარმოიქმნება მცირე ზომის ნანონაწილაკები; ნაწილაკების ზომები იზრდება ვერცხლის იონების კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად.

შედეგი: შესწავლილია ნანოვერცხლის შემცველი კომპოზიტები ბიოდეგრადირებადი PEA-სა და PEU-ის საფუძველზე, ვერცხლის ნიტრატის გაზრდილი რაოდენობით, UV-სპექტროსკოპიის გამოყენებით. დავადგინეთ, რომ ვერცხლის ნიტრატის კონცენტრაციის გაზრდა არაფექტურია, როგორც ვერცხლის ნანონაწილაკების ჩამოყალიბება - სტაბილიზაციის, ასევე შედეგების განმეორადობის თვალსაზრისით.

2.3. ნანოვერცხლის შემცველი ანტიბაქტერიული კომპოზიტები ბიოდეგრადირებადი პოლიესტერამიდის და პოლი-N-ვინილ-პიროლიდონის ნარევის საფუძველზე

წინა კვლევებით დავადგინეთ, რომ შესწავლილ პოლიმერებს შორის AgNPs-ის საუკეთესო მასტაბილიზირებელია PVP, ხოლო გამოყენებულ ბიოდეგრადირებად პოლიმერებს შორის, როგორც AgNPs-ის ზომის, ასევე შედეგების სტაბილურობის თვალსაზრისით - PEA, რომელიც ასრულებს AgNPs-ის მასტაბილიზირებელ ფუნქციას, მაგრამ აშკარად ჩამორჩება PVP-ს. ამგვარად, ერთი მხრივ, PVP არის კარგი მასტაბილიზირებელი აგენტი, მაგრამ იგი ადვილად იხსნება წყალში და ნაკლებად მისაღებია მატრიქსად ბიოკომპოზიტებისათვის, ხოლო მეორე მხრივ, ბიოდეგრადირებადი PEA ნაკლებად ეფექტურია როგორც მასტაბილიზირებელი აგენტი, მაგრამ არ იხსნება წყალში და ამ თვალსაზრისით PVP-თან შედარებით ხასითდება უპირატესობით. ასევე PEA ხასიათდება შემდეგი თვისებებით: ეთანოლში ხსნადობით, ბიოშეთავსებადობით, ბიოდეგრადირებადობით, ასტიმულირებს ქსოვილის რეგენერაციას, შედგება არატოქსიკური კომპონენტებისგან და აქვს ფირწარმოქმნის უნარი (ქმნის უფერო, გამჭვირვალე და მოქნილ ფირს). აღნიშნულის გათვალისწინებით გადავწყვიტეთ ამ პოლიმერების დადებითი თვისებების შერწყმა - ანუ მათი ნარევის გამოყენება ფოტოქიმიური აღდგენის მეთოდით AgNPs-ის შემცველი ბიოკომპოზიტების მისაღებად. ნარევი პოლიესტერამიდს („კოლადერმს“) აღვნიშნავთ, როგორც C, PVP-ს როგორც -

P, ხოლო ვერცხლის ნიტრატს როგორც A. ვერცხლის ნიტრატის (A) შემცველობა ნარევი იცვლებოდა 5-დან 50 მგ-მდე, ხოლო C და P კომპონენტების თანაფარდობა (50:50) და ეთანოლის მოცულობა (20 მლ) იყო მუდმივი (ცხრილი 2).

ამგვარად, ჩვენი ვარაუდით პოლიმერული ნარევის ერთი კომპონენტი - PEA მიაჩნებდა ნანოკომპოზიტს ბიოდეგრადაციის უნარს და ფირის ზედაპირიდან AgNPs-ის უწყვეტ გამოყოფას, ხოლო მეორე მხრივ PVP-ს შეეყვანა უზრუნველყოფდა ნაწილაკების უკეთესად ფორმირებას და პოლიმერული ნარევის სტაბილიზაციას.

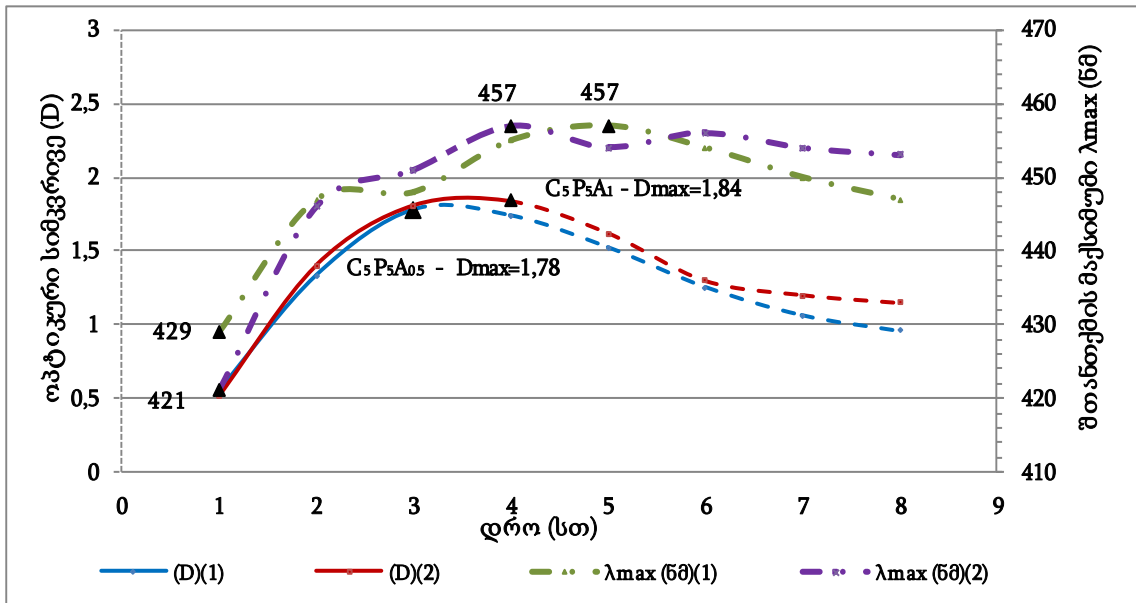
ცხრილი 2. ექსპერიმენტში გამოყენებული AgNPs-ის მასტაბილიზირებელი აგენტები (PEA და PVP), ვერცხლის ნიტრატის ($AgNO_3$) და აღმდგენი ნივთიერების (ეთანოლი) წონითი თანაფარდობები და კონცენტრაციები

საწყისი ნარევი*	პოლიმერი, მგ		$AgNO_3$ (A), მგ	EtOH, მლ	პოლიმერის კონცენტრაცია მგ/მლ	$AgNO_3$ -ის კონცენტრაციამ გ/მლ
	PEA (C)	PVP (P)				
C ₅ P ₅ A ₁	250	250	50	20	25	2,50
C ₅ P ₅ A _{0.5}	250	250	25	20	25	1,25
C ₅ P ₅ A _{0.2}	250	250	10	20	25	0,50
C ₅ P ₅ A _{0.1}	250	250	5	20	25	0,25

* ქვედა ინდექსებში 5 აღნიშნავს C-ისა და P-ის, ხოლო 1, 0.5, 0.2 და 0.1 - A-ს წონით თანაფარდობას

მოვახდინეთ მიღებული ნანოსუსპენზიების კვლევა UV-სპექტროსკოპიის გამოყენებით და შევისწავლეთ ვერცხლის ნანოსუსპენზიების წარმოქმნის ოპტიმალური დრო და მათი მდგრადობა ოპტიკური სიმკვრივისა და პლაზმონის შთანთქმის მაქსიმუმის (λ_{max}) ცვლილებით. ეს მონაცემები ნანოსუსპენზია - P₅C₅A₁-ის და P₅C₅A_{0.5}-ის წარმოდგენილია ნახ. 11-ზე (თითოეული ნანოსუსპენზიისათვის ექსპერიმენტი ჩავატარეთ ორი სერიად და თითოეულ სერიაზე ორ - ორი პარალელური ცდა. ვინაიდან პარალელური ცდების მონაცემებს შორის განსხვავება არ აღემატებოდა 5 - 8%-ს,

ნახ. 11-ზე წარმოდგენილია პარალელური ცდების გასაშუალებული მონაცემები.

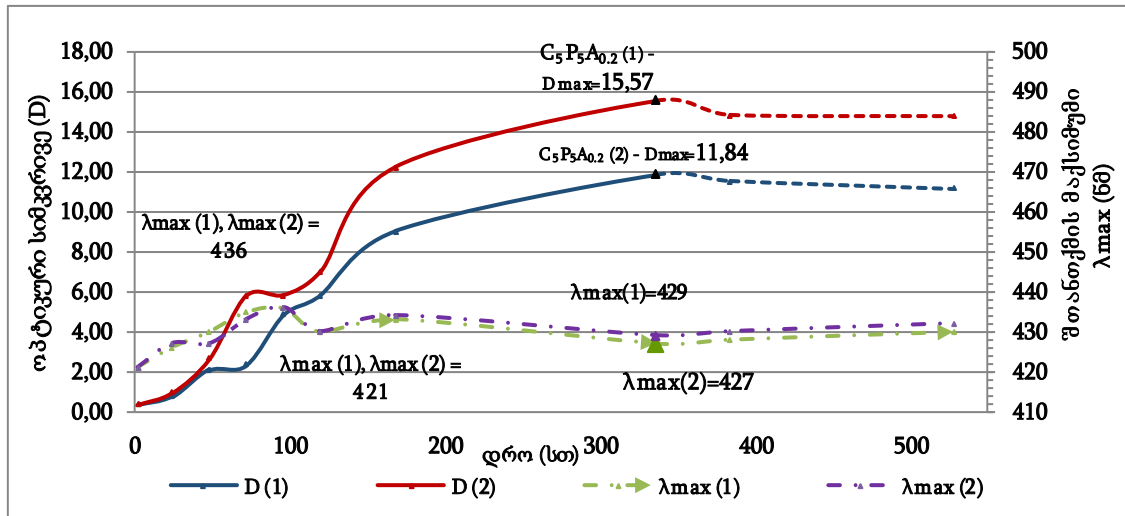


ნახ. 11. ვერცხლის ნანოსუსპენზიების $P_5C_5A_1$ -ის და $P_5C_5A_{0.5}$ -ის ოპტიკური სიმკვრივის (D) და შთანთქმის მაქსიმუმის (λ_{max} , ნმ) ცვლილება დროში

როგორც ნახ.11-დან ჩანს, ორივე ნანოსუსპენზიის ($P_5C_5A_1$ და $P_5C_5A_{0.5}$) ოპტიკური სიმკვრივე დროში თანდათან იზღვება პირველი 3,0 სთ-ის ($P_5C_5A_1$ -ის λ_{max} არის 1,84, ხოლო $P_5C_5A_{0.5}$ -ის - 1,78) განმავლობაში, ამასთან 3,0-დან 4,0 სთ-მდე ოპტიკური სიმკვრივე იცვლება მცირედ. შემდგომი დაყოვნებისას ხსნარი თანდათანობით იმღვრება, რაც მიუთითებს ნაწილაკების აგრეგაციასა და დამსხვილებაზე. იწყება ვერცხლის გამოლექვა (ჭურჭლის ფსკერზე წარმოიქმნება შავი ნალექი). ვერცხლის გამოლექვის გამო ნანონაწილაკების კონცენტრაცია და, შესაბამისად, ნარევის ოპტიკური სიმკვრივე დროში მცირდება (გაზომვას ვაწარმოებდით 8 სთ-ის განმავლობაში). ნანოსუსპენზია $P_5C_5A_1$ -ის პლაზმონის შთანთქმის მაქსიმუმი (λ_{max}) მერყეობს 421 - 457 ნმ-ს შორის, ხოლო $P_5C_5A_{0.5}$ -ის - 429 - 457 ნმ-ს შორის (ორივე შემთხვევაში დაბალია საწყის ეტაპზე - 1 საათიანი ექსპოზიციის შემდეგ), რაც მიუთითებს, რომ 3-4 საათიანი ექსპოზიციის შედეგად მიღებული ნაწილაკების ზომები არის შედარებით დიდი.

განსხვავებული სურათი მივიღეთ $P_5C_5A_{0.2}$ და $P_5C_5A_{0.1}$ შემთხვევაში. ვერცხლის ნიტრატის დაბალი შემცველობისას (0.5 და 0.25 მგ/მლ) - ექსპოზიციის ოპტიმალური დრო აქ გაცილებით მეტი აღმოჩნდა, ვიდრე ვერცხლის ნიტრატის მაღალი შემცველობისას (ნანოსუსპენზია $P_5C_5A_1$ და $P_5C_5A_{0.5}$ - 2.5 და 1.25 მგ/მლ).

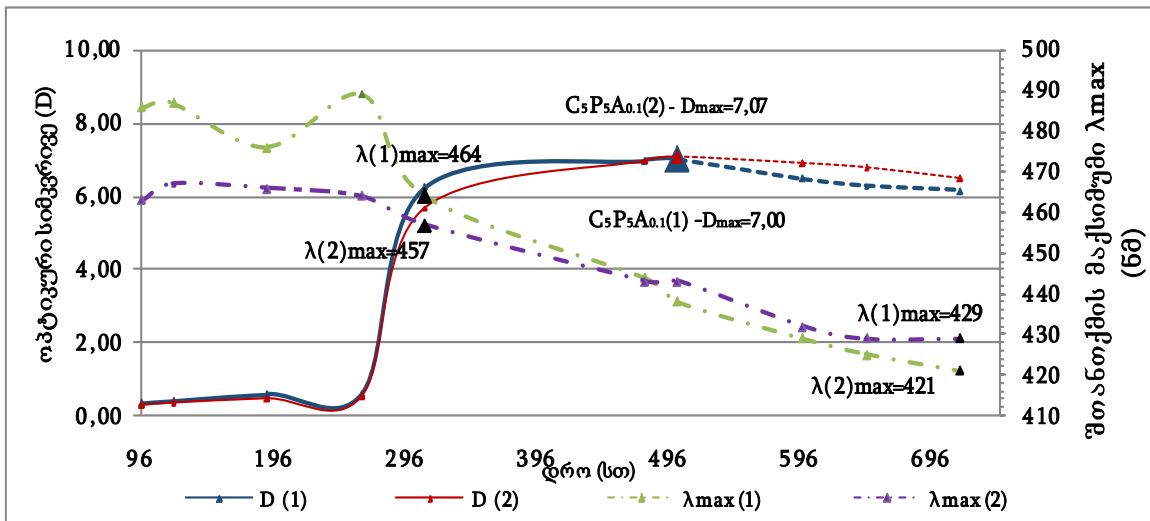
ნანოსუსპენზია - $P_5C_5A_{0.2}$ -ის შემთხვევაში (ნახ. 12), ოპტიკური სიმკვრივე განუხრელად იზდება დროში და მაქსიმუმს (12-15-ს) აღწევს დაყოვნებიდან 336 სთ - ის (14 დღის) შემდეგ და მიუთითებს ნანონაწილაკების წარმოქმნის დაბალ სიჩქარეზე (რაც სასურველია, რათა არ მოხდეს მათი აგლომერაცია).



ნახ. 12. ვერცხლის ნანოსუსპენზიების $P_5C_5A_{0.2}$ -ის ოპტიკური სიმკვრივის (D) და შთანთქმის მაქსიმუმის (λ_{max} , ნმ) ცვლილება დროში. წარმოდგენილია ორი პარალელური ცდის შედეგი

შემდგომი დაყოვნებისას სინათლეზე ნანოსუსპენზიის ოპტიკური სიმკვრივე დროში მცირდება, პარალელურად ხსნარი იმღვრევა და იწყება ვერცხლის გამოლექვა. აღსანიშნავია, რომ ამ პერიოდისათვის - და ეს გრძელდება საკმაოდ ხანს (500 სთ-ზე მეტს), ნარევის ვერცხლის ნანოსუსპენზია - $P_5C_5A_{0.2}$ -ის სუპერნატანტის ფენის შთანთქმის მაქსიმუმი (λ_{max} , ნმ), არის 427-429 ნმ-ს ზღვრებში, რაც მიუთითებს ამ ფენაში სასურველი ზომის ნანონაწილაკების არსებობაზე (მიუხედავად გამოლექილი ვერცხლისა).

ხოლო ნანოსუსპენზია - $P_5C_5A_{0.1}$ -ის შემთხვევაში (ნახ. 13) ოპტიკური სიმკვრივე ასევე განუხრელად იზდება დროში და მაქსიმუმს აღწევს დაყოვნებიდან 480 სთ-ის (20 დღის) შემდეგ. ამ შემთხვევაში (ანუ ვერცხლის ნიტრატის კიდევ უფრო დაბალი შემცველობისას) ნანონაწილაკების ფორმირება მიმდინარეობს კიდევ უფრო დაბალი სიჩქარით, რაზეც მეტყველებს ოპტიკური სიმკვრივის დაბალი მნიშვნელობა (<1 -ზე) ≈ 10 დღიანი ექსპოზიციის შემდეგ. დაწყებული ამ პერიოდიდან ნარევის ოპტიკური სიმკვრივე მკვეთრად იზრდება (შემდგომი 4-5 დღის განმავლობაში) და აღწევს მაქსიმუმს შემდგომი 6 დღის, ანუ ჯამში 20 დღის (480 სთ) ექსპოზიციის შემდეგ; შემდგომ პერიოდში კი ძალიან უმნიშვნელოდ მცირდება. საინტერესოა აღინიშნოს, რომ ამასთან მცირდება შთანთქმის მაქსიმუმიც (λ_{max} ნმ), 421-429 ნმ-მდე, რაც მიუთითებს სასურველი ზომის ნანონაწილაკების წარმოქმნაზე.

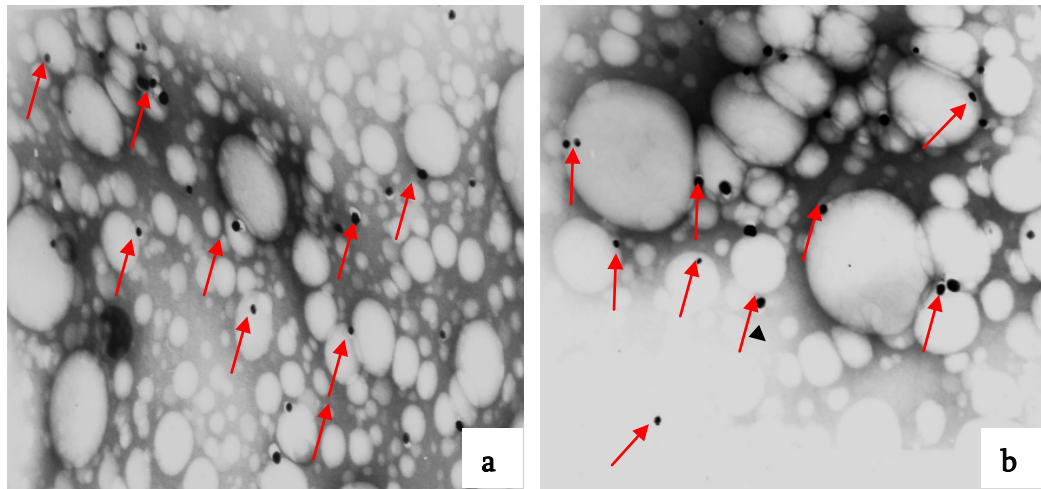


ნახ. 13. ვერცხლის ნანოსუსპენზიების $P_5C_5A_{0.1}$ -ის ოპტიკური სიმკვრივის (D) და შთანთქმის მაქსიმუმის (λ_{max} , ნმ) ცვლილება დროში. წარმოდგენილია ორი პარალელური ცდის შედეგი

აღსანიშნავია, რომ შთანთქმის მაქსიმუმის (λ_{max} , ნმ), განუხრელი შემცირება ნარევის კომპონენტების აღნიშნული თანაფარდობისას, შეიძლება მიუთითებდეს დროში ნანონაწილაკების ზომების გადანაწილებაზე უფრო მცირე ზომის ნაწილაკების წარმოქმნის მიმართულებით, რაც შეიძლება

ჩავთვალთ ახალ, დღემდე შეუსწავლელ მოვლენად. მნიშვნელოვანია აგრეთვე ის ფაქტიც, რომ შესწავლილი ხანგრძლივობისას (30 დღე) კომპონენტთა აღნიშნული თანაფარდობისა და კონცენტრაციისას ($P_5C_5A_{0.1}$) ნანოსუსპენზია იყოს სტაბილური და არ შეინიშნებოდა ვერცხლის გამოლექვა.

TEM-ის გამოყენებით (ამაჩქარებელი ძაბვა 80 გადიდება 75,000) შევისწავლეთ აღნიშნული ნარეგების - $P_5C_5A_{0.2}$ და $P_5C_5A_{0.1}$ საფუძველზე მიღებულ ნანოსუსპენზიებში AgNPs-ის ზომები.



ნახ. 14. ვერცხლის ნანოსუსპენზია $C_5P_5A_{0.2}$ -ის (a) და $C_5P_5A_{0.1}$ -ის (b) TEM გამოსახულება ვერცხლის ნანონაწილაკები (ნაჩვენებია წითელი ისრებით) მიღებულია ფოტოქიმიური (დღის სინათლის) დასხივებით

TEM გამოკვლევამ დაადასტურა (ნახ. 14), რომ ორივე ნარეგში საკმაოა ≤ 10 ნმ და ნაკლები ზომის ნაწილაკები, რომლებიც, ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, განაპირობებენ AgNPs-ის ბაქტერიციდულ აქტივობას. ნანოსუსპენზია $P_5C_5A_{0.2}$ -ში AgNPs-ის ზომა მერყეობს 12-33 ნმ-ის ფარგლებში, ხოლო ნანოსუსპენზია $P_5C_5A_{0.1}$ -ში - 8-39 ნმ-ის ფარგლებში, რაც ემთხვევა ზემოთ მოყვანილ UV-სპექტროსკოპიის მონაცემთა საფუძველზე გაკეთებულ დასკვნებს. როგორც მოსალოდნელი იყო, მიღებულ ნანოკომპოზიტებს აღმოაჩნდათ მაღალი ბაქტერიციდული აქტივობა. მიღებული ნანოსუსპენზიების ($P_5C_5A_{0.2}$ და $P_5C_5A_{0.1}$) დასხივით გლუვ, ჰიდროფობურ ზედაპირზე და სპირტის აორთქლებით დავამზადეთ ვერცხლის ნანონაწილაკების შემცველი

ნანობიოკომპოზიტური ფირები და შვეისწავლეთ *in vitro* ბაქტერიციდული აქტივობა შემდეგ შტამებზე: *Staphylococcus aureus*, *E.coli* და *Bacillus cereus*. ძლიერი ანტიბაქტერიული თვისებები ორივე ნანოკომპოზიტმა გამოავლინა ორ შტამზე: *Staphylococcus aureus*-სა და *E.coli*, ხოლო თითქმის არაეფექტური აღმოჩნდნენ *Bacillus cereus*-ის მიმართ. აღნიშნული ბაქტერიული შტამები არიან ქირურგიული ინსტრუმენტების და ასევე ზედაპირული ჭრილობების დაბინძურების ძირითადი წყარო.

შედეგი: დავადგინეთ, რომ საწყის ნარევი ვერცხლის ნიტრატის რაოდენობის შემცირება ხელს უწყობს მცირე (სასურველი) ზომის AgNPs-ის წარმოქმნას. მიღებული შედეგების საფუძველზე შეიძლება დავასკვნეთ, რომ სინათლის შუქით ფოტოქიმიური აღდგენისას ეთანოლის არეში, მასტაბილიზირებელ აგენტად PVP-სა და ბიოდეგრადირებადი ამინომჟავური PEA-ს გამოყენებისას, სასურველი ზომის AgNPs-ის მისაღებად უპირატესია ვერცხლის ნიტრატის დაბალი კონცენტრაცია (0.50 - 0.25 მგ/მლ - ნარევი $P_5C_5A_{0.2}$ და $P_5C_5A_{0.1}$) და ექსპოზიციის მაღალი ხანგრძლივობა (14-20 დღე სინათლე-სიბნელის ციკლის გათვალისწინებით), ხოლო რაც შეეხება ვერცხლის ნიტრატის მაღალი შემცველობის ნანოსუსპენზია - $P_5C_5A_{0.5}$ -ს და $P_5C_5A_1$ -ს ნაკლებად ეფექტური აღმოჩნდნენ AgNPs-ის ჩამოყალიბება-სტაბილიზაციის თვალსაზრისით (იძლევიან უფრო დიდი ზომის AgNPs-ის შემცველ, არასტაბილურ ნანოსუსპენზიებს). მიღებული ნანოსუსპენზიებისაგან ($P_5C_5A_{0.2}$ და $P_5C_5A_{0.1}$) დავამზადეთ ვერცხლის ნანონაწილაკების შემცველი ნანობიოკომპოზიტური ფირები, ორივე ნანოკომპოზიტმა ძლიერი ბაქტერიციდული თვისებები გამოავლინა *Staphylococcus aureus*-სა და *E.coli*-ზე, ხოლო არაეფექტური აღმოჩნდნენ *Bacillus cereus*-ის მიმართ.

დასკვნა

1. დავამუშავეთ ერთსაფეხურიანი, იაფი და მარტივი ფოტოქიმიური აღდგენის მეთოდი დღის სინათლის გამოყენებით.
2. მივიღეთ და შევისწავლეთ ანტიბაქტერიული ნანოვერცხლის შემცველი კომპოზიცია პოლი-N-ვინილ-პიროლიდონის ბაზაზე, ენერჯის წყაროდ დღის სინათლის გამოყენებით. აღსანიშნავია, რომ დღის სინათლის გამოყენებით ვერცხლის ნანონაწილაკების მიღება განხორციელებულია პირველად. მიღებული ნანოსუსპენზია დახასიათებულია ელექტრონული სპექტრომეტრით - ვერცხლის ნანონაწილაკების პლაზმონის შთანთქმით და გამოირჩევა მდგრადობით - პრაქტიკულად არ იცვლის პარამეტრებს 1300-1400 სთ-ის (თითქმის 2 თვის) განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე, რაც პერსპექტულს ხდის მის პრაქტიკულ გამოყენებას მედიცინაში, კვებით მრეწველობაში, მეღვინეობაში და სხვ.
3. მიღებულია და შესწავლილია ანტიბაქტერიული ნანოვერცხლის შემცველი კომპოზიტები ბიოდეგრადირებადი PEA-სა და PEU-ის საფუძველზე. პირველად არის გამოყენებული ბიოდეგრადირებადი PEA და PEU საწყის, ვერცხლის ნაწილაკების ფორმირების ეტაპზე ნაწილაკების მასტაბილიზირებელ პოლიმერებად, ხოლო საბოლოოდ კი მატრიქსებად მიზნობრივი ბიოკომპოზიტებისათვის. დავადგინეთ, რომ PEA-სა და PEU-ს შორის ვერცხლის ნანონაწილაკების საუკეთესო მასტაბილიზირებელია PEA, რომელიც ამავდროულად იძლევა განმეორებად შედეგებს. PEU ნაკლებად ეფექტურია როგორც ვერცხლის ნანონაწილაკების ჩამოყალიბება-სტაბილიზაციის, ასევე შედეგების სტაბილურობის თვალსაზრისით.
4. შესწავლილია ნანოვერცხლის შემცველი კომპოზიტები ბიოდეგრადირებადი PEA-სა და PEU-ის საფუძველზე და დავადგინეთ, რომ ვერცხლის ნიტრატის კონცენტრაციის გაზრდა არაეფექტურია, როგორც ვერცხლის

ნანონაწილაკების ჩამოყალიბება - სტაბილიზაციის, ასევე შედეგების განმეორადობის თვალსაზრისით.

5. შევისწავლეთ ვერცხლის ნანოსუსპენზიების წარმოქმნის ოპტიმალური დრო და მათი მდგრადობა ოპტიკური სიმკვრივისა (D) და პლაზმონის შთანთქმის მაქსიმუმის (λ_{max}) ცვლილებით და დავადგინეთ, რომ სასურველი ზომის AgNPs-ის შემცველი და სტაბილური ნანოსუსპენზიების მისაღებად ფოტოქიმიური აღდგენის მეთოდით, პოლი-N-ვინილ-პიროლოდინისა და ამინომჟავური პოლიესტერამიდის, როგორც მასტაბილიზირებალი აგენტების თანაობისას, უმჯობესია ვერცხლის ნიტრატის დაბალი კონცენტრაციის შემცველი ნანოკომპოზიტების $P_5C_5A_{0.2}$ და $P_5C_5A_{0.1}$ გამოყენება, რაც ამავდროულად იძლევა სტაბილურ ნანოსუსპენზიებს, ხოლო რაც შეეხება ვერცხლის ნიტრატის მაღალი შემცველობის ნანოკომპოზიტ - $P_5C_5A_{0.5}$ -ს და $P_5C_5A_1$ -ს ნაკლებად ეფექტური აღმოჩნდნენ ვერცხლის ნანონაწილაკების ჩამოყალიბება - სტაბილიზაციის თვალსაზრისით.

6. მიღებული ნანოსუსპენზიებისაგან ($P_5C_5A_{0.2}$ და $P_5C_5A_{0.1}$) დავამზადეთ ვერცხლის ნანონაწილაკების შემცველი ნანობიოკომპოზიტური ფირები, ორივე ნანოკომპოზიტმა ძლიერი ბაქტერიციდული თვისებები გამოავლინა *Staphylococcus aureus*-სა და *E.coli* - ზე, ხოლო არაეფექტური აღმოჩნდნენ *Bacillus cereus*-ის მიმართ.

**დისერტაციის ძირითადი შედეგები გამოქვეყნებულია შემდეგ
შრომებში:**

1. შ. ცხადაძე, ნ. კუპატაძე, რ. გაფრინდაშვილი, დ. ტულუში, რ. ქაცარავა. ვერცხლის ნანონაწილაკების მიღება მარტივი ფოტოქიმიური მეთოდით. საქართველოს კერამიკოსთა ასოციაციის ჟურნალი. 2016, ტ. 18. 2(36), გვ. 60-67.
2. შ. ცხადაძე, ნ. კუპატაძე, დ. ტულუში, რ. ქაცარავა. ნანოვერცხლის შემცველი ანტიბაქტერიული კომპოზიტები ამინომჟავური ბიოდეგრადირებადი პოლიესტერამიდების და პოლიესტერმარდოვანების საფუძველზე. საქართველოს კერამიკოსთა ასოციაციის ჟურნალი. 2017, ტ. 19. 2(38), გვ. 65-72.
3. ცხადაძე შ.ა., კუპატაძე ნ.ო., ტულუში დ.ს., ქაცარავა რ.დ. ნანოვერცხლის შემცველი ანტიბაქტერიული კომპოზიტები ბიოდეგრადირებადი პოლიესტერამიდის და პოლი-N-ვინილ-პიროლიდონის ნარევის საფუძველზე. ჟურნალი საქართველოს საინჟინრო სიახლენი. 2017, N.4 (ტ. 84), გვ. 35-41.

Abstract

Antibiotic resistant new strains of pathogenic bacteria are one of the main problem for modern pharmacy and biomedicine. During the last decade, a lot of scientific works have been dedicated to synthesis of metal nanoparticles and study of their antimicrobial effect. Silver nanoparticles (AgNPs) can be considered as the most promising in the list of effective antimicrobial drug products. Formation of polymeric nanocomposites, containing antimicrobial AgNPs of desirable size, is a significant technological challenge.

The current work describes formation of bactericidal agents containing AgNPs using the cheap source of energy – the day light, in presence of stabilizing agents – Poly-N-vinyl-pyrrolidone (PVP, Mw=40,000, Sigma-Aldrich) and original biodegradable amino-acidic polymers - Polyesteramide, synthesized by our team (PEA, Mw=48,100) (API of drug product Coladerm, registered in Georgia) and Polyester-urea (PEU - 1L6(low) Mw=46,600 and 1L6(high) Mw=8,500). AgNPs were obtained by photochemical reduction (using daylight irradiation) of silver nitrate ($\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich) in ethanol solution (96,0%). For this, the solution was placed on the windowsill. In this case, the window glass acted as optical filter as far as it transmitted only the visible part of spectrum rather than the short-wave UV.

At the initial stage of the research, AgNPs were fabricated using PVP as stabilizing agent. PVP is biocompatible, film-forming polymer and it is soluble in ethanol (solubility in ethanol is a precondition for stabilization of AgNPs). The references describe photochemical recovery by UV radiation and microwave processing. Main limitation of the process is that it requires expensive equipment and caution to avoid boiling and drying of ethanol.

The method which we have chosen is attractive because of its cheapness and simplicity. In addition, the proposed method is environmentally friendly as far as it does not need the use of specific reagents (often toxic) to reduce silver ion (Ag^+) to atomic silver (Ag^0) in given case it is the function of ethyl alcohol molecules. It is well known that AgNP is a Plasmon and its maximum absorbance in electronic spectrum is within approximately 400-460 nm, depended on the size of nanoparticles. The obtained nano-suspension was characterized by UV spectroscopy. Actually, it does not change the parameters during 1300-1400 hours at room temperature, which makes its practical use more perspective.

PVP is a good stabilizing agent, however, it has some limitations like high water solubility (it is easily washed away from nanocomposite film) and PVP is not biodegradable polymer. Therefore, it was logical to use biodegradable, ethanol soluble and water insoluble polymers such as Polyester amide (PEA) and Polyester urea (PEU) for the next experiments. Like PVP, structure of these polymers includes nitrogen atoms of amide groups that are nanoparticles stabilizing atoms. It is worth mentioning

that these polymers are made of non-toxic substances – amino-acid leucine and aliphatic substances – 1,6 Hexandiol and sebacic acid.

At this stage of study it was concluded that PEA is better stabilizer of silver nanoparticles than PEU. PEA gives repeatable results but PEU (the both, with low- and high-molecular weight) turned out to be less effective not only in terms of formation - stabilization of silver nanoparticles, but for stability of results as well. Accordingly, the further studies of silver nanoparticles was carried out in presence of PEA. The obtained AgNPs were characterized by physicochemical methods of analysis. Size of nanoparticles was determined with Dynamic Light Scattering (DLS) method. It was found out that average size of the formed nanoparticles is 50 nm (radiation time – 24 hours), which allows for the possibility that particles of desirable size (≤ 10 nm) exist. Study with Transmission Electron Microscope (TEM) demonstrated that number of particles with size of less than 10 nm, is quite big in the mixture.

Based on the research conducted one may conclude that out of the studied polymers, the best stabilizer for AgNPs is PVP. As for PEA, it is the best one out the used biodegradable polymers from the perspective of AgNPs size and stability of the results as far as it acts as stabilizer of AgNPs but cannot be as good as PVP. With consideration of all the mentioned, it was decided to merge the positive properties of these polymers and use their combination to form the biocomposites containing AgNPs. Content of silver nitrate in mixture varied from 5 to 50. As for and correlation of polymers (50:50) and volume of ethanol (20 ml), they were constant. Hence, one component of polymer mixture – PEA, leads biodegradability of nanocomposite and permanent release of AgNP from the surface of the film, and PVP provides better formation of particles and and stabilization. It was established that reduction of silver nitrate in the mixture contributes to formation of small (desirable) size AgNPs. Low concentration of silver nitrate (0,50 – 0,25 mg/ml) and long exposition (14-20 days with consideration of light-dark cycle) are preferable for obtaining the AgNPs of desirable size. AgNPs sizes in nano-suspensions have been studied with TEM. The research justified that the both mixtures contain quite big number of particles with ≤ 10 nm size and less. According to the references, these particles provide bactericidal effect of AgNPs. Nanocomposite films, containing AgNPs, were prepared by pouring the nano-suspensions on smooth hydrophobic surface and evaporation of alcohol. Further the *in vitro* bactericidal effect was studied for the following strains: *Staphylococcus aureus*, *E.coli* and *Bacillus cereus*, as far as they are the main sources of surgical device infections and superficial infected wounds.

Thus, a single-stage, cheap and simple method of photochemical recovery has been developed with the use of daylight. This method allows obtaining of silver nanoparticles of desirable size (≤ 10 nm) which have the high potential for being practically used as bactericidal drug products. In addition, the study covered the optimal time and resistance of nanoparticles (aggregation of nanoparticles in time) with change of optical density and maximum Plasmon absorption, also the sizes, shape

and bactericidal effect of nanoparticles. It should be noted that we are the first to use daylight for PVP –based formation of AgNPs. Besides, it is the first case of using PEA and PEU as particle stabilizing polymers at initial stage of silver particle formation and using them finally as matrices for targeted biocomposites.