

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245203 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437062**

(22) Data zgłoszenia: **2021.02.19**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.01.10 BUP 02/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.06.03 WUP 23/2024**

(51) MKP:

A61K 31/122 (2006.01)

A61K 33/38 (2006.01)

A61P 31/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A01N 59/16 (2006.01)

A01N 31/16 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Gdański, Gdańsk, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MARTA KRYCHOWIAK-MAŚNICKA, Gdańsk, PL

ALEKSANDRA KRÓLICKA, Gdańsk, PL

ALEKSANDRA BIELICKA-GIEŁDOŃ,

Gdańsk, PL

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Justyna Pawłowska-Bajerska,

Gdynia, PL

(54) Tytuł:

Mieszaniny 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu i preparatów srebra do zastosowania jako środek przeciwbakteryjny do zwalczania *Pseudomonas aeruginosa*

PL 245203 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy sposobu aktywacji właściwości bakteriobójczych 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu, zwanego plumbaginą, wobec naturalnie odpornej pałeczki ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* za pomocą srebra formie jonowej lub nanocząstek srebra, a tym samym za pomocą mieszaniny tych czynników. Wynalazek dotyczy zatem medycznego zastosowania mieszaniny do zwalczania *P. aeruginosa*.

Zjawisko antybiotykoodporności mikroorganizmów, tj. zdolność do namnażania się w obecności antybiotyku, jest coraz powszechniejszym problemem, z którym musi mierzyć się medycyna. Wraz z rosnącą liczbą drobnoustrojów wykazujących oporność na coraz większy zakres antybiotyków, zmniejsza się pula możliwych terapii stosowanych w leczeniu zakażeń, a tym samym rośnie zagrożenie zdrowia i życia ludzkiego. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) i Amerykańskie Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób (CDC) wskazują w swoich najnowszych raportach, że w związku z nastąpieniem ery postantybiotykowej niezbędne jest zastosowanie zrównoważonych strategii prewencji i leczenia chorób zakaźnych [1, 2].

Pseudomonas aeruginosa jest gram-ujemną bakterią oraz oportunistycznym patogenem człowieka i zwierząt, charakteryzującym się znaczącą wirulencją. *P. aeruginosa* wykazuje naturalną oporność na wiele cząsteczek chemicznych, które są aktywne wobec innych patogenów [3]. W przypadku infekcji ran oparzeniowych *P. aeruginosa* jest jednym z najczęściej izolowanych gatunków bakterii i stanowi szczególnie problemem w ich leczeniu ze względu na wielolekooporność ograniczającą możliwości terapeutyczne [4]. Poza antybiotykami, w terapiach ran oparzeniowych z dużym powodzeniem stosowane jest srebro jonowe, tj. azotan srebra i sulfadiazyna srebra [5]. Niemniej jednak, coraz częściej obserwowane jest zjawisko nabywania oporności na preparaty zawierające srebro przez patogeny infekujące rany [6]. Niezbędne jest więc opracowanie strategii umożliwiających opóźnienie lub zniesienie wykształcania bakteryjnej oporności oraz rozszerzenie możliwości terapeutycznych.

Niniejszy wynalazek opiera się na zjawisku przywrócenia wrażliwości opornych komórek mikroorganizmu na cząsteczki związku chemicznego dzięki zastosowaniu drugiego czynnika pełniącego funkcję substancji uwrażliwiającej.

Znane jest działanie związków z grupy 1,4-naftochinonów wobec bakterii gram-dodatnich i grzybów [7]. Niemniej jednak, bakterie gram-ujemne wykazują umiarkowaną oporność na 1,4-naftochinony, w tym 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon lub pozostają na nie całkowicie odporne jak w przypadku *P. aeruginosa* [3].

W publikacji R. BANASIUK, ET AL: CARNIVOROUS PLANTS USED FOR GREEN SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES WITH BROAD-SPECTRUM ANTIMICROBIAL ACTIVITY; ARABIAN JOURNAL OF CHEMISTRY; VOLUME 13, ISSUE 1, 2020, PAGES 1415–1428 opisano wykorzystanie ekstraktu zawierającego między innymi plumbaginę do syntezy nanocząstek srebra. Wyniki przedstawione pokazują przyłączenie związków fenolowych, do których należą m. in. naftochinony, do powierzchni nanocząstek.

W publikacji Sajan, D., Kuruvilla, T., Laladhas, K.P. et al. Surface-enhanced Raman scattering and DFT theoretical studies on the adsorption behavior of plumbagin on silver nanoparticles. Indian J Phys 85, 477–484 (2011) opisano raport badań nad bezpośrednim oddziaływaniem plumbaginy i nanocząstek srebra i istnienie koniugatów, czy kompleksów nanocząstek i plumbagina. W literaturze istnieje wiele doniesień o aktywności srebra wobec bakterii, w tym wobec *P. aeruginosa* np. w Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Kristiansen S, Phipps R, Nielsen AK, Jensen PØ, Høiby N, Givskov M. Silver against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. APMIS. 2007 Aug; 115(8):921-8. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_646.x.

Publikacja H. OGIHARA, et al.: Antimicrobial Activity of the Carnivorous Plant *Dionaea muscipula* Against Food-Related Pathogenic and Putrefactive Bacteria; Biocontrol Science, 2013, Vol. 18, No. 3, 151–155 opisuje aktywność ekstraktów z tkanek *Dionaea muscipula* stanowiących mieszaniny różnych związków w tych tkankach syntetyzowanych – nie opisano jednakże analiz w kierunku ustalenia aktywności czystego związku, a jedynie jego obecność w badanych ekstraktach oraz aktywność tych ekstraktów m. in. wobec *P. aeruginosa*.

W publikacja George Tegos, et al.: Multidrug Pump Inhibitors Uncover Remarkable Activity of Plant Antimicrobials; ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Oct. 2002, Vol. 46, No. 10, p. 3133–3141 znajdują się wyniki analiz aktywności plumbaginy, tj. czystego związku, wobec dwóch

szczepów *P. aeruginosa*, które stwierdzają brak takiej aktywności. Dane zawarte w publikacji wskazują, że minimalne stężenie hamujące (MIC) plumbaginy jest wyższe niż 500 µg/mL.

Zjawisko synergistycznych oddziaływań dwóch czynników przeciwbakteryjnych nie jest powszechne, tak więc również nie jest efektem spodziewanym, co wielokrotnie opisywano w literaturze, na przykład w: Odds FC (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 1-1. W większości przypadków połączeń czynników biologicznie czynnych nie dochodzi do żadnych interakcji lub interakcje są nieznaczące, a tym samym czynniki zastosowane w połączeniu działają z taką samą aktywnością, co czynniki zastosowane osobno.

Opracowana według wynalazku mieszanina jest przykładem systemu dwuskładnikowego, w którym wykorzystuje się interakcję czynników do zwiększenia ich potencjału biologicznego w oparciu o zjawisko aktywacji i synergii.

Wynalazek dotyczy sposobu aktywacji właściwości bakteriobójczych 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu, tj. plumbaginy, wobec naturalnie odpornej pałeczki ropy błękitnej, tj. *Pseudomonas aeruginosa*, za pomocą srebra w formie jonowej lub nanocząstek srebra. Wynalazek dotyczy medycznego zastosowania tej mieszaniny do zwalczania *P. aeruginosa* czyli do zastosowania jako środka przeciwbakteryjnego wobec *P. aeruginosa* redukujące liczbę komórek bakteryjnych. Mieszanina według wynalazku zawiera albo sole srebra albo nanocząstki srebra oraz 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon, zwany plumbaginą. Czynnikiem aktywnym w przypadku obu rodzajów preparatów srebra są jony srebra, ale odmienna jest forma ich zastosowania w mieszaninie. Istotą wynalazku jest to, że w mieszaninie 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon jest w dawce równej lub większej niż 8 µg/mL zaś stężenie soli lub nanocząstek srebra wynosi 1 µg Ag/mL lub jest większe niż 1 µg Ag/m. Wykazany mechanizm oddziaływań srebra i wybranego 1,4-naftochinonu (plumbaginy) stanowi specyficzne zjawisko o wysokim potencjale do zwalczania jednego z najgroźniejszych patogenów bakteryjnych człowieka – *P. aeruginosa*.

Korzystnie, wynalazek dotyczy 7 odmian mieszaniny tj.: zawiera plumbaginę i jeden z preparatów srebra, tj. sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanowym lub azotan srebra lub sulfadiazynę srebra lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane chlorkiem (11-merkaptoundecylo)-N,N,N-trimetyloamononiowym lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane eterem mono-11-merkaptoundecyloowym glikolu trietylenowego lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane cytrynianem sodu lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane poliwinylpirolidonem.

W przykładzie wynalazku mieszanina zawiera sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanowym w stężeniu równym lub wyższym niż 2 µg Ag/mL oraz 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon w stężeniu równym lub wyższym niż 16 µg/mL. Zawiera minimalną dawkę obu składników działającą bakteriobójczo wobec *P. aeruginosa* występującego w stężeniu około $2,5 \times 10^5$ jednostek tworzących kolonie (JTK)/mL, co oznacza, że dawka ta redukuje o 99,9% liczbę komórek bakteryjnych, tj. do co najmniej $2,5 \times 10^2$ JTK/mL.

Przy obniżonym stężeniu komórek *P. aeruginosa*, tj. około 1×10^4 JTK/mL, minimalna efektywna dawka składników w mieszaninie, tj. dawka hamująca wzrost drobnoustrojów lub redukująca liczbę komórek bakteryjnych w stosunku do ich liczby początkowej, wynosi równo lub więcej niż 1 µg Ag/mL sferycznych nanocząstek srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowanych kwasem 11-merkaptoundekanowym oraz równo lub więcej niż 8 µg/mL 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu.

Zamiast sferycznych nanocząstek srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowanych kwasem 11-merkaptoundekanowym mieszanina może zawierać azotan srebra lub sulfadiazynę srebra lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane chlorkiem (11-merkaptoundecylo)-N,N,N-trimetyloamononiowym lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane eterem mono-11-merkaptoundecyloowym glikolu trietylenowego lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane cytrynianem sodu lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane poliwinylpirolidonem.

Wykazano aktywność przeciwbakteryjną mieszaniny wobec wielu szczepów *P. aeruginosa*, w tym izolatów klinicznych opornych na antybiotyki, hamując ich wzrost. Mieszanina zawierająca aktywne bakteriobójczo wobec *P. aeruginosa* stężenie srebra w postaci soli lub nanocząstek srebra oraz 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon ma zastosowania jako środek przeciwbakteryjny wobec *P. aeruginosa*.

Literatura cytowana powyżej :

1. CDC, Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. 2019, U.S. Department of Health and Human Services: Atlanta, GA.

2. WHO, 2019. ANTIBACTERIAL AGENTS IN CLINICAL DEVELOPMENT: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. 2019, WHO: Geneva, Switzerland.
3. Coban, A.Y. i in., Effects of efflux pump inhibitors phenyl-arginine-beta-naphthylamide and 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine on the antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Chemother*, 2009. 21(5): p. 592–4.
4. Church, D. i in. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev*, 2006. 19(2): p. 403–34.
5. Atiyeh, B.S. i in., Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns*, 2007. 33(2): p. 139–48.
6. Percival, S.L., Bowler P.G. i Russell D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect*, 2005. 60(1): p. 1–7.
7. Widhalm J.R. i Rhodes D. Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. *Hortic Res*, 2016, 3: 16046.

Wynalazek opisano bliżej w przykładach potwierdzających efektywność mieszanin i zastosowanie i na rysunku:

Fig. 1. Struktura chemiczna plumbaginy, tj. 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu.

Fig. 2. Zmiany minimalnych stężeń bakteriobójczych plumbaginy i preparatu nanocząstek srebra stabilizowanych kwasem 11-merkaptoundekanowym ($\text{AgC}_{10}\text{COOH}$) zastosowanych jednocześnie wobec *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Fig. 3. Wzrost *P. aeruginosa* ATCC 27853: A) w hodowli bez dodatku plumbaginy przed inkubacją, B) w hodowli bez dodatku plumbaginy po 24 godzinach w 37°C, C) w hodowli traktowanej plumbaginą w stężeniu 8 µg/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C, D) w hodowli traktowanej plumbaginą w stężeniu 512 µg/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C.

Fig. 4. Wzrost *P. aeruginosa* ATCC 27853: A) w hodowli traktowanej azotanem srebra w stężeniu 1 µg Ag/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C, B) w hodowli traktowanej azotanem srebra w stężeniu 1 µg Ag/mL i plumbaginą w stężeniu 8 µg/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C, C) w hodowli traktowanej sulfadiazyną srebra w stężeniu 1 µg Ag/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C, D) w hodowli traktowanej sulfadiazyną srebra w stężeniu 1 µg Ag/mL i plumbaginą w stężeniu 8 µg/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C.

Fig. 5. Wzrost *P. aeruginosa* ATCC 27853: A) w hodowli traktowanej nanocząstkami srebra stabilizowanymi chlorkiem (11-merkaptoundecylo)-N,N,N-trimetyloamononiowym ($\text{AgC}_{11}\text{NMe}_3$) w stężeniu 1 µg Ag/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C, B) w hodowli traktowanej nanocząstkami srebra $\text{AgC}_{11}\text{NMe}_3$ w stężeniu 1 µg Ag/mL i plumbaginą w stężeniu 8 µg/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C, C) w hodowli traktowanej nanocząstkami srebra stabilizowanymi kwasem 11-merkaptoundekanowym ($\text{AgC}_{10}\text{COOH}$) w stężeniu 1 µg Ag/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C, D) w hodowli traktowanej nanocząstkami srebra $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$ w stężeniu 1 µg Ag/mL i plumbaginą w stężeniu 8 µg/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C, E) w hodowli traktowanej nanocząstkami srebra stabilizowanymi eterem mono-11-merkaptoundecyloowym glikolu trietylenowego ($\text{AgC}_{11}\text{EG}_3\text{OH}$) w stężeniu 1 µg Ag/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C, F) w hodowli traktowanej nanocząstkami srebra $\text{AgC}_{11}\text{EG}_3\text{OH}$ w stężeniu 1 µg Ag/mL i plumbaginą w stężeniu 8 µg/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C.

Fig. 6. Wzrost *P. aeruginosa* ATCC 27853: A) w hodowli traktowanej nanocząstkami srebra stabilizowanymi cytrynianem (AgCit) w stężeniu 1 µg Ag/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C, B) w hodowli traktowanej nanocząstkami srebra AgCit w stężeniu 1 µg Ag/mL i plumbaginą w stężeniu 8 µg/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C, C) w hodowli traktowanej nanocząstkami srebra stabilizowanymi poliwinylpirolidonem (AgPVP) w stężeniu 1 µg Ag/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C, D) w hodowli traktowanej nanocząstkami srebra AgPVP w stężeniu 1 µg Ag/mL i plumbaginą w stężeniu 8 µg/mL po 24 godzinach inkubacji w 37°C.

Fig. 7. Potencjał mieszanin plumbaginy (8 µg/mL) i preparatów zawierających srebro (1 µg Ag/mL) do hamowania wzrostu szczepu referencyjnego ATCC 27853 oraz trzech izolatów klinicznych *P. aeruginosa* opornych na antybiotyki (409, 1430, 3926). Poszczególne panele wskazują następujący sposób traktowania hodowli bakteryjnych: A) hodowle nietraktowane – kontrola, B) plumbagina + azotan srebra, C) plumbagina + nanocząstki $\text{AgC}_{11}\text{NMe}_3$, D) plumbagina + nanocząstki $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$, E) plumbagina + nanocząstki $\text{AgC}_{11}\text{EG}_3\text{OH}$, F) plumbagina + nanocząstki AgCit , G) plumbagina + nanocząstki AgPVP . Oś Y: wartość absorbancji przy długości fali 600 nm; oś X: czas (godziny).

Fig. 8. Potencjał mieszanin plumbaginy (8 µg/mL) i preparatów zawierających srebro (1 µg Ag/mL) do hamowania wzrostu szczepu laboratoryjnego PA14 oraz trzech izolatów klinicznych *P. aeruginosa*

opornych na antybiotyki (2642, 2721, 3109). Poszczególne panele wskazują następujący sposób traktowania hodowli bakteryjnych: A) hodowle nietraktowane – kontrola, B) plumbagina + azotan srebra, C) plumbagina + nanocząstki $\text{AgC}_{11}\text{NMe}_3$, D) plumbagina + nanocząstki $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$, E) plumbagina + nanocząstki $\text{AgC}_{11}\text{EG}_3\text{OH}$, F) plumbagina + nanocząstki AgCit , G) plumbagina + nanocząstki AgPVP . Oś Y: wartość absorbancji przy długości fali 600 nm; oś X: czas (godziny).

W przykładzie 1 opisano mieszaninę zawierającą plumbaginę i sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanolowym.

W przykładzie 2 opisano mieszaninę plumbaginy i azotan srebra lub sulfadiazyny srebra lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane chlorkiem (11-merkaptoundecylo)-N,N,N-trimetyloamononiowym lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanolowym lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane eterem mono-11-merkaptoundecyloowym glikolu trietylenowego lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane cytrynianem sodu lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane poliwinylpirolidonem.

W przykładzie 3 opisano mieszaninę plumbaginy i azotan srebra lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane chlorkiem (11-merkaptoundecylo)-N,N,N-trimetyloamononiowym lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanolowym lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane eterem mono-11-merkaptoundecyloowym glikolu trietylenowego lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane cytrynianem sodu lub sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane poliwinylpirolidonem poza sulfadiazyną srebra.

Przykład 1: Znoszenie oporności *Pseudomonas aeruginosa* na 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon za pomocą nanocząstek srebra.

W początkowych etapach badań jako źródło srebra wykorzystano preparaty sferycznych nanocząstek srebra (AgNPs) stabilizowanych kwasem 11-merkaptoundekanolowym ($\text{AgC}_{10}\text{COOH}$) o średniej wielkości rdzenia metalicznego 5 nm (Prochimia Surfaces Sp. z o.o.). Stężenie srebra w preparatach ustalono za pomocą analizy pierwiastkowej z wykorzystaniem techniki optycznej spektrometrii emisyjnej w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-OES). Działanie spektrometru optycznego ICP-OES (Perkin Elmer ICP-OES Optima 2000 DV) było optymalizowane przed każdą serią pomiarów. Preparat nanocząstek srebra rozcieńczano wstępnie 10-krotnie za pomocą wody destylowanej. Następnie do 250 μL przygotowanej zawiesiny dodawano 1 mL kwasu azotowego cz.d.a. (65%), a następnie uzupełniano wodą demineralizowaną do objętości 5 mL. Następujące parametry spektrometru ICP-OES zostały wykorzystane podczas analiz: moc generatora 1300 W, częstotliwość generatora 40 MHz; demontowalny palnik kwarcowy; osiowy widok plazmy; gaz argon (Ar): przepływ gazu plazmowego 15,0 L/min, przepływ gazu wspomagającego 0,2 L/min; przepływ gazu w rozpylaczu 0,8 L/min; szklana cykloniczna komora rozpylająca; prędkość przepływu próbki: 1,5 L/min. Pomiarów stężenia jonów srebra (Ag^+) dokonywano przy długości fali 328,068 nm w 3 powtórzeniach. Działanie bakteriobójcze nanocząstek srebra $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$ i plumbaginy (Sigma Aldrich) stosowanych osobno badano wobec referencyjnego szczepu *P. aeruginosa* ATCC 27853 za pomocą znanej metody mikrorozcieńczeń pożywki jak opisano w: Krychowiak M, Kawiak A, Narajczyk M, Borowik A, Królicka A: Silver Nanoparticles Combined With Naphthoquinones as an Effective Synergistic Strategy Against *Staphylococcus aureus*. *Front Pharmacol* 2018, 9:816. W pierwszej kolejności w pożywce Mueller-Hinton suplementowanej kationami (CA-MHB, Beckton Dickinson) przygotowywano roztwory badanych czynników za pomocą seryjnych dwukrotnych rozcieńczeń.

Opis przygotowania mieszaniny

Na potrzeby eksperymentu mieszaniny przygotowywano w pożywce mikrobiologicznej, niemniej jednak mieszaninę można przygotować również w wodzie lub wodnych roztworach, np. soli fizjologicznej. Zatężone wodne zawiesiny nanocząstek srebra po oznaczeniu zawartości srebra (Ag) dodawano bezpośrednio do pożywki CA-MHB do końcowego stężenia wynoszącego 128 $\mu\text{g Ag/mL}$, a następnie wykonywano seryjne dwukrotne rozcieńczenia w pożywce do uzyskania mieszaniny o stężeniu 64, 32, 16, 8, 4, 2 lub 1 $\mu\text{g Ag/mL}$.

W przypadku plumbaginy (Fig. 1) przed dodaniem do pożywki przygotowywano jej skoncentrowane roztwory w dimetylosulfotlenku (DMSO) zawierające 51,2 mg związku w 1 mL. W celu wykonania eksperymentu tak przygotowane roztwory dodawano do pożywki do końcowego stężenia 512 $\mu\text{g/mL}$, tj w objętości 10 μL do 0,99 mL, a następnie wykonywano seryjne dwukrotne rozcieńczenia w pożywce do uzyskania roztworów o stężeniu 256, 128, 64, 32, 16, 8 lub 4 $\mu\text{g/mL}$. Z przygotowanych mieszanin

AgC₁₀COOH i roztworów plumbaginy w pożywce pobierano po 100 μ L i przenoszono do studzienek 96-dołkowej płytki mikrottestowej do badania aktywności bakteriobójczej poszczególnych czynników. W procedurze badania interakcji preparatów zawierających srebro i 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon wykorzystano podejście *Checkerboard Titration*, które opisano również w: Krychowiak M, Kawiak A, Narajczyk M, Borowik A, Królicka A: Silver Nanoparticles Combined With Naphthoquinones as an Effective Synergistic Strategy Against *Staphylococcus aureus*. *Front Pharmacol* 2018, 9:816, polegające na jednoczesnym zastosowaniu dwóch badanych czynników na płytce mikrottestowej, gdzie każdy czynnik jest stosowany w następującym gradiencie stężeń w pożywce: $2 \times \text{MBC}$, $1 \times \text{MBC}$, $0,5 \times \text{MBC}$, $0,25 \times \text{MBC}$, $0,125 \times \text{MBC}$, $0,06 \times \text{MBC}$ i $0,03 \times \text{MBC}$. Tym sposobem każdy dołek płytki mikrottestowej zawiera unikalną kombinację stężeń badanych czynników. W przypadku związków lub czynników niewykazujących aktywności bakteriobójczej, tak jak ma to miejsce w przypadku plumbaginy, stosuje się gradient stężeń rozpoczynający się od najwyższego możliwego do uzyskania stężenia związku, tj. najczęściej 512, 256, 128, 64, 32, 16 i 8 μ g/mL. W przypadku preparatu srebra gradient stężeń zastosowanych w eksperymencie był następujący: 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 i 0,25 μ g Ag/mL.

Mieszaniny przygotowywano w taki sposób, że zatężone wodne zawiesiny nanocząstek srebra po oznaczeniu zawartości srebra (Ag) dodawano bezpośrednio do pożywki CA-MHB do końcowego stężenia wynoszącego 32 μ g Ag/mL, a następnie wykonywano seryjne dwukrotne rozcieńczenia w pożywce do uzyskania mieszanin o stężeniu 16, 8, 4, 2, 1 oraz 0,5 μ g Ag/mL. Przed dodaniem do pożywki plumbaginy przygotowywano jej skoncentrowane roztwory w dimetylosulfotlenku (DMSO) zawierające 51,2 mg związku w 1 mL. W celu wykonania eksperymentu tak przygotowane roztwory dodawano do pożywki do końcowego stężenia 1024 μ g/mL, tj. w objętości 20 μ L do 0,98 mL, a następnie wykonywano seryjne dwukrotne rozcieńczenia w pożywce do uzyskania roztworów o stężeniu 512, 256, 128, 64, 32 oraz 16 μ g/mL. Następnie mieszaniny przygotowano przez połączenie zawiesin nanocząstek i roztworów plumbaginy w stosunku objętościowym 1 : 1.

Następnie do studzienek zawierających po 100 μ L zawiesin, roztworów lub mieszaniny w pożywce dodawano 10 μ L inokulum bakteryjnego zawierającego ok. $2,5 \times 10^5$ jednostek tworzących kolonie (JTK) w 1 mL. Inokulum otrzymywano przez rozcieńczenie 6-godzinnej hodowli bakteryjnej (CA-MHB, 37°C, 150 rpm) w świeżej pożywce CA-MHB do uzyskania zmętnienia równego 0,5 stopni w skali McFarlanda mierzonego za pomocą densytometru (DensiMeter II, EMO). Płytki mikrottestowe inkubowano przez 24 godziny w 37°C, po czym zawartość dołków, w których obserwowano zahamowanie wzrostu bakterii, wysiewano na agar odżywczy TSA (ang. *Tryptic Soy Agar*; BTL Polska Sp. z o.o.). Tak przygotowane szalki z agarem inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C w celu zliczenia komórek bakteryjnych (JTK) pozostałych w dołkach po traktowaniu czynnikiem, a tym samym ustalenia minimalnego stężenia bakteriobójczego badanych czynników (MBC, ang. *Minimal Bactericidal Concentration*). Stężenie MBC definiowano jako najniższe stężenie czynnika redukujące w ciągu 24 godzin wyjściową liczbę JTK w dołku (ok. $2,5 \times 10^5$ JTK/mL) o 99,9 %, tj. o 3 logarytmy (ok. $2,5 \times 10^2$ JTK/mL).

Jak wskazano w Tabeli 1, plumbagina nie wykazuje aktywności bakteriobójczej wobec *P. aeruginosa* (MBC >512 μ g/mL). Niemniej jednak, zastosowanie plumbaginy w połączeniu z nanocząstkami srebra AgC₁₀COOH (MBC = 8 μ g Ag/mL) skutkowało uzyskaniem efektu bakteriobójczego przy jej stężeniu równym 16 μ g/mL i stężeniu nanocząstek odpowiadającym 4 μ g Ag/mL (Tabela 1, Fig. 2). Powyższe wyniki wskazują, że srebro efektywnie współdziała z plumbaginą, tj. 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonem, znosząc oporność *P. aeruginosa* na ten związek. Pozwala to osiągnąć efekt bakteriobójczy mieszaniny przy znacząco zredukowanym stężeniu preparatu srebra (nawet do 75%) i stężeniu plumbaginy do 16 μ g/mL. Pozwala to na szeroki zakres możliwości modulowania aktywności biologicznej obu czynników oraz optymalizacji składu mieszaniny.

Tabela 1

Stężenia plumbaginy (5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu) i nanocząstek srebra w mieszaninach w pożywce CA-MHB warunkujące efekt bakteriobójczy wobec szczepu referencyjnego *P. aeruginosa* ATCC 27853.

| Plumbagina ($\mu\text{g/mL}$) | $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$ ($\mu\text{g Ag/mL}$) |
|------------------------------------|---|
| > 512 | 0 |
| 512 | 0,25 |
| 512 | 0,5 |
| 256 | 1 |
| 128 | 1 |
| 64 | 2 |
| 32 | 4 |
| 16 | 4 |
| 0 | 8 |

$\text{AgC}_{10}\text{COOH}$ - nanocząstki srebra stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanowym.

Ag, jony srebra.

Przykład 2: Mieszaniny plumbaginy i zróżnicowanych preparatów zawierających srebro jako efektywne preparaty bakteriobójcze wobec *P. aeruginosa*.

W celu ustalenia potencjału innych źródeł srebra do aktywacji działania bakteriobójczego plumbaginy wykorzystano szeroki zakres zróżnicowanych preparatów (Tabela 2), tj. sole srebra stosowane w terapii ran oparzeniowych, tj. azotan srebra (Sigma Aldrich) i sulfadiazynę srebra (Sigma Aldrich) oraz komercyjnie dostępne preparaty sferycznych nanocząstek srebra (AgNPs) o zróżnicowanej powierzchni. Jako model do badań wybrano AgNPs o średniej wielkości rdzenia metalicznego około 5 nm, ze względu na odwrotnie proporcjonalną zależność wielkości nanostruktur i ich aktywności, którą opisano m. in. w: Martinez-Castanon GA, Nino-Martinez N, Martinez-Gutierrez F, Martinez-Mendoza JR i Ruiz F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J Nano Res* 2008, 10 (8): 1343–1348. W przykładzie wykorzystano nanocząstki srebra dwóch niezależnych producentów: i) Prochimia Surfaces Sp. z o.o., tj. AgNPs stabilizowane chlorkiem (11-merkaptoundecylo)-N,N,N-trimetyloamononiowym ($\text{AgC}_{11}\text{NMe}_3$), AgNPs stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanowym ($\text{AgC}_{10}\text{COOH}$) oraz AgNPs stabilizowane eterem mono-11-merkaptoundecyloowym glikolu trietylenowego ($\text{AgC}_{11}\text{EG}_3\text{OH}$), ii) Nanocomposix, tj. AgNPs stabilizowane cytrynianem sodu (AgCit) i AgNPs stabilizowane poliwinylpirolidonem (AgPVP). Sole srebra rozpuszczano w jałowej wodzie destylowanej do stężenia 1 mg Ag/mL. W przypadku preparatów AgNPs korzystano bezpośrednio z zawiesin nanocząstek w wodzie dostarczanych przez producenta. Tak szeroki zakres źródła srebra, a w tym zróżnicowanie czynników stabilizujących powierzchnię nanocząstek, miał na celu zbadanie specyficzności oddziaływań srebra i plumbaginy w zależności od właściwości zastosowanego preparatu.

W pierwszej kolejności ustalono zawartość jonów srebra w preparatach AgNPs w celu normalizacji ich stężenia do stężenia srebra za pomocą ICP-OES według metodyki opisanej w Przykładzie 1. W przypadku soli srebra stężenie jonów srebra obliczono na podstawie stężenia molowego związków. Następnie wykorzystując metodę mikrorozcieńczeń pożywki opisaną w Przykładzie 1 ustalono stężenia MBC wszystkich preparatów wobec referencyjnego szczepu *P. aeruginosa* ATCC 27853 uwzględniając

zawartość jonów srebra w preparacie ($\mu\text{g Ag/mL}$). Jak wskazują wyniki przedstawione w Tabeli 2, zastosowane sole srebra wykazywały taką samą aktywność przeciwbakteryjną ($\text{MBC} = 2 \mu\text{g Ag/mL}$). Pomiędzy preparatami nanocząstek srebra różniących się czynnikiem stabilizującym ich powierzchnię obserwowano różnice w aktywności, tj. stężenie MBC wynosiło od 2 do $32 \mu\text{g Ag/mL}$. Następnie zbadano efektywność bakteriobójczą wymienionych preparatów srebra w połączeniu z plumbaginą, tj. 5-hydroksy-3-metylo-1,4-naftochinonem.

Sposób przygotowania mieszaniny

Przygotowano następujące roztwory i mieszaniny robocze badanych czynników w pożywce CA-MHB:

i) roztwory plumbaginy o stężeniu $16 \mu\text{g/mL}$ przygotowane poprzez dodanie do 10 mL pożywki mikrobiologicznej zatężonego roztworu tego 1,4-naftochinonu ($51,2 \text{ mg/mL}$) w DMSO w objętości $3,125 \mu\text{L}$,
ii) roztwory plumbaginy o stężeniu $512 \mu\text{g/mL}$ przygotowane poprzez dodanie do 9,9 mL pożywki mikrobiologicznej $100 \mu\text{L}$ zatężonego roztworu tego 1,4-naftochinonu ($51,2 \text{ mg/mL}$) w DMSO, iii) roztwory lub mieszaniny preparatów zawierających srebro w stężeniu $2 \mu\text{g Ag/mL}$ uwzględniając ustaloną uprzednio zawartość srebra w wyjściowych roztworach i zawiesinach. Tak przygotowane robocze roztwory i mieszaniny dodawano do dołków na 96-dołkowej płytce mikrotestowej jak opisano poniżej:

- dodawano $50 \mu\text{L}$ roztworu zawierającego $16 \mu\text{g/mL}$ plumbaginy i uzupełniano $50 \mu\text{L}$ pożywki CA-MHB uzyskując $100 \mu\text{L}$ pożywki zawierającą plumbaginę w stężeniu $8 \mu\text{g/mL}$,
- dodawano $100 \mu\text{L}$ roztworu zawierającego $512 \mu\text{g/mL}$ plumbaginy,
- łączono ze sobą roztwory lub mieszaniny poszczególnych źródeł srebra w pożywce zawierające $2 \mu\text{g Ag/mL}$ i roztwory plumbaginy o stężeniu $16 \mu\text{g/mL}$ w pożywce poprzez dodanie $50 \mu\text{L}$ każdego z nich do dołków płytki mikrotestowej, uzyskując $100 \mu\text{L}$ pożywki zawierające srebro w stężeniu $1 \mu\text{g Ag/mL}$ i plumbaginę w stężeniu $8 \mu\text{g/mL}$,
- dodawano $50 \mu\text{L}$ roztworu lub mieszaniny badanego źródła srebra zawierające $2 \mu\text{g Ag/mL}$ i uzupełniano $50 \mu\text{L}$ pożywki CA-MHB uzyskując $100 \mu\text{L}$ pożywki zawierającej srebro w stężeniu $1 \mu\text{g Ag/mL}$.

Do dołków wyznaczonych jako kontrola w postaci nietraktowanych mieszaniną komórek bakteryjnych dodawano $100 \mu\text{L}$ pożywki CA-MHB. Następnie dołki płytki mikrotestowej uzupełniano inokulum bakteryjnym w objętości $10 \mu\text{L}$ do finalnego stężenia ok. $1 \times 10^4 \text{ JTK/mL}$. Inokulum uzyskiwano z 6-godzinnej hodowli bakteryjnej w CA-MHB (37°C , 150 rpm) przez jej rozcieńczenie w świeżej pożywce do 0,5 McFarlanda (Densimeter, Brno) i ponownie 100-krotne rozcieńczenie w świeżej pożywce. Po 24 godzinach inkubacji w 37°C wykonywano po cztery następujące po sobie 10-krotne rozcieńczenia zawartość dołków w jałowej soli fizjologicznej (0,85% NaCl). Następnie z przygotowanych zawiesin pobierano po $90 \mu\text{L}$ i wysiewano na agar odżywczy TSA (BTL Polska Sp. z o.o.). Po 24 godzinach (37°C) fotografowano kolonie bakteryjne pojawiające się na pożywce agarowej.

Uzyskane wyniki wskazały, że bakterie nietraktowane srebrem, plumbaginą (5-hydroksy-3-metylo-1,4-naftochinonem) lub ich mieszaniną (Fig. 3A) wykazują wzrost po 24 godzinach i dochodzi do zwiększania liczby jednostek tworzących kolonie (JTK) na agarze odżywcym TSA (Fig. 3B). Również w przypadku plumbaginy w stężeniu $8 \mu\text{g/mL}$ oraz $512 \mu\text{g/mL}$ po 24 godzinach zwiększała się liczba JTK (Fig. 3C oraz Fig. 3D), co potwierdza brak aktywności bakteriobójczej tego 1,4-naftochinonu wobec *P. aeruginosa*. Sole srebra, tj. azotan srebra i sulfadiazyna srebra, zastosowane indywidualnie w stężeniu $1 \mu\text{g Ag/mL}$ redukowały stukrotnie (o 2 logarytmy dziesiętne) liczbę JTK (Fig. 4A i 4C) w porównaniu do ich wyjściowej zawartości w nietraktowanej kontroli (Fig. 3A). Dodatek plumbaginy w stężeniu $8 \mu\text{g/mL}$ wzmocnił aktywność bakteriobójczą obu soli srebra prowadząc do eliminacji wszystkich komórek bakteryjnych (Fig. 4B) lub znaczącą redukcję ich liczby (Fig. 4D). W przypadku preparatów nanocząstek srebra zakupionych z Prochimia Surfaces SP. z o.o. (Fig. 5) zastosowanych w stężeniu $1 \mu\text{g Ag/mL}$ obserwowano zróżnicowany potencjał do redukcji liczby JTK na agarze odżywcym TSA (Fig. 5A, Fig. 5C i Fig. 5E) proporcjonalny do stężenia MBC wyznaczonego uprzednio dla tych preparatów (Tabela 2). W zastosowanej dawce nanocząstki $\text{AgC}_{11}\text{NMe}_3$ ($\text{MBC} = 32 \mu\text{g Ag/mL}$) nie wykazały efektu bakteriobójczego i nie obserwowano redukcji liczby JTK (Fig. 5A). Z kolei nanocząstki $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$ ($\text{MBC} = 8 \mu\text{g Ag/mL}$) oraz nanocząstki $\text{AgC}_{11}\text{EG}_3\text{OH}$ ($\text{MBC} = 8 \mu\text{g Ag/mL}$) zredukowały liczbę komórek bakteryjnych o odpowiednio 2 oraz 3 logarytmy dziesiętne, jak pokazano na Fig. 5C i Fig. 5E. Niemniej jednak, niezależnie od wyjściowej aktywności bakteriobójczej preparatu nanocząstek, we wszystkich przypadkach doszło do zwiększenia efektu bakteriobójczego, tj. zwiększonej redukcji liczby JTK po dodaniu plumbaginy w dawce $8 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 5B, Fig. 5D i Fig. 5F). Takie samo zjawisko obserwowano w przypadku preparatów nanocząstek srebra firmy Nanocomposix (Fig. 6), które zastosowane oddzielnie nie hamowały wzrostu komórek bakteryjnych (Fig. 6A) i nie redukowały liczby JTK

(Fig. 6C). Po dodaniu plumbaginy (8 µg/mL) obserwowany był efekt zahamowania wzrostu bakterii w przypadku nanocząstek AgCit (Fig. 6B) i efekt znaczącej redukcji liczby JTK w przypadku nanocząstek AgPVP (Fig. 6D), tj. o 3 logarytmy w stosunku do nietraktowanej kontroli (Fig. 3A). Opisywane wyniki pokazują, że samo srebro nie działa tak dobrze jak mieszanina, plumbagina w ogóle nie działa, a dopiero mieszanina daje efekt synergiczny.

Uzyskane wyniki potwierdziły brak znaczenia właściwości fizyko-chemicznych źródeł srebra, tj. formy jonowej i właściwości powierzchni nanocząstek dla występowania interakcji srebra i badanego 1,4-naftochinonu. Wszystkie zbadane preparaty srebra aktywowały potencjał plumbaginy do zwalczania *P. aeruginosa*. Niemniej jednak, na końcowy efekt bakteriobójczy mieszaniny srebra i plumbaginy, tj. na poziom redukcji liczby komórek bakteryjnych, wpływ ma potencjał bakteriobójczy preparatów zawierających srebro. Tym samym niezbędna jest optymalizacji składu mieszaniny z uwzględnieniem efektywnych stężeń bakteriobójczych stosowanych źródeł srebra.

Tabela 2

Charakterystyka preparatów zawierających srebro zastosowanych w badaniach oraz ich potencjał bakteriobójczy wobec *P. aeruginosa* ATCC 27853.

| Preparat srebra | Czynnik stabilizujący | MBC (µg Ag/mL) |
|--------------------------------------|---|----------------|
| Azotan srebra | n/d | 2 |
| Sulfadiazyna srebra | n/d | 2 |
| AgC ₁₁ NMe ₃ | Chlorek (11-merkaptoundecylo)-N,N,N-trimetyloamononiowy | 32 |
| AgC ₁₀ COOH | Kwas 11-merkaptoundekanowy | 8 |
| AgC ₁₁ EG ₃ OH | Eter mono-11-merkaptoundecyloowy glikolu trietylenowego | 2 |
| AgCit | Cytrynian sodu | 4 |
| AgPVP | Poliwinylopirolidon | 4 |

MBC – minimalne stężenie bakteriobójcze czynnika; Ag- jony srebra; n/d - nie dotyczy.

Przykład 3. Mieszaniny 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu i preparatów srebra jako środek hamujący wzrost izolatów klinicznych *P. aeruginosa* niezależnie od profilu oporności na antybiotyki.

W celu zbadania zakresu działania mieszanin zawierających srebro i plumbaginę wobec różnych szczepów i izolatów klinicznych *P. aeruginosa* przeprowadzono analizy ich zdolności do hamowania wzrostu drobnoustrojów. W badaniach wykorzystano szczep referencyjny ATCC 27853 oraz laboratoryjny szczep PA14. Wykorzystano również izolaty kliniczne uzyskane od pacjentów Szpitala Wojewódzkiego w Gdańsku, dla których wykonano analizy wrażliwości na trzy antybiotyki: piperacylinę (antybiotyk β-laktamowy), gentamycynę (antybiotyk aminoglikozydowy) i cyprofloksacynę (antybiotyk fluorochinolonowy). Wśród 6 badanych izolatów (Tabela 3), zidentyfikowano 3 izolaty wrażliwe na antybiotyki (409, 1430, 3926) oraz 3 izolaty oporne na wszystkie badane antybiotyki (2642, 2721, 3109).

Z analiz wykluczono sulfadiazynę srebra, ze względu na wyjściowe zmętnienie jej roztworów w pożywce CA-MHB interferujące z pomiarami wzrostu drobnoustrojów.

Opis sposobu otrzymania mieszaniny

Na potrzebę wykonania badań mieszaniny przygotowywano w pożywce mikrobiologicznej. Niemniej jednak, opisane mieszaniny można przygotować również w wodzie lub w innych wodnych roztworach. Najpierw przygotowywano roztwory robocze plumbaginy przez dodanie do pożywki jej roztworu

w DMSO (51,2 mg/mL) do końcowego stężenia 16 µg/mL, tj. dodając 3,125 µL roztworu do 10 mL pożywki mikrobiologicznej. Mieszaniny robocze preparatów srebra przygotowano dodając ich roztwory lub zawiesiny w wodzie do pożywki mikrobiologicznej do końcowego stężenia 2 µg Ag/mL uwzględniając ustalone uprzednio za pomocą ICP-OES stężenie srebra w preparatach. Następnie robocze mieszaniny preparatu srebra i plumbaginy mieszano ze sobą w stosunku 1 : 1 (v/v) uzyskując pożywkę zawierającą srebro w postaci jonów lub nanocząstek w stężeniu odpowiadającym 1 µg Ag/mL i plumbaginę w stężeniu 8 µg/mL.

Tak uzyskaną mieszaninę umieszczano w dołkach 96-dołkowej płytki mikrotestowej w objętości 100 µL i uzupełniano 10 µL inokulum bakteryjnego zawierającego ok. 1×10^6 JTK. Inokulum bakteryjne przygotowywano z 6-godzinnej hodowli bakterii w pożywce CA-MHB (37°C, 150 rpm) rozcieńczanej do 0,5 McFarlanda (Densimeter, Brno). Następnie płytki umieszczano w czytniku mikroplatek (Envision, Perkin Elmer) i inkubowano je przez 8 godzin z wytrząsaniem (150 rpm). Co 30 minut czytnik dokonywał automatycznego pomiaru zmętnienia pożywki w dołkach przy długości fali 600 nm (OD_{600}).

Wzrost szczepu referencyjnego ATCC 27853 i szczepów wrażliwych na antybiotyki był hamowany przez wszystkie mieszaniny srebra i plumbaginy (Fig. 7). Nie zaobserwowano różnic we wrażliwości izolatów klinicznych wrażliwych na piperacylinę, gentamycynę i cyprofloksacynę na mieszaniny srebra jonowego lub nanocząstek srebra i plumbaginy. Niemniej jednak, preparaty otrzymane z wykorzystaniem nanocząstek $AgC_{11}NMe_3$, tj. preparatu o najniższej aktywności bakteriobójczej (Tabela 2), w najmniejszym stopniu hamowały wzrost wszystkich badanych szczepów *P. aeruginosa* (Fig. 1C). Również szczep laboratoryjny PA14 oraz wszystkie izolaty kliniczne odporne na badane antybiotyki wykazywały zahamowany wzrost w obecności srebra i plumbaginy (Fig. 8). Nie zaobserwowano oporności izolatów klinicznych wobec testowanych mieszanin, a jedynie niższą aktywność mieszaniny zawierającej nanocząstki $AgC_{11}NMe_3$ (Fig. 8C), jak miało to miejsce dla szczepów wrażliwych (Fig. 1C). Tym samym, potwierdzono aktywność mieszanin srebra i plumbaginy wobec szerokiego zakresu szczepów *P. aeruginosa* niezależnie od profilu oporności na antybiotyki. Wskazuje to na wysoki potencjał wynalazku w zwalczaniu groźnego antybiotykoopornego patogenu bakteryjnego jakim jest *P. aeruginosa*.

Tabela 3
Profil wrażliwości izolatów klinicznych *P. aeruginosa* na wybrane antybiotyki.

| Szczep <i>P. aeruginosa</i> | MIC (µg/mL) | | |
|--------------------------------|-------------|-------|--------|
| | PIP* | GEN** | CIP*** |
| 409 | 8 | 0,25 | 0,06 |
| 1430 | 8 | 0,25 | 0,125 |
| 3926 | 8 | 0,5 | 0,125 |
| 2642 | >128 | >128 | >128 |
| 2721 | >128 | 128 | 64 |
| 3109 | 128 | 64 | 64 |

MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost mikroorganizmów; PIP, piepracylina; GEN, gentamycyna; CIP, cyprofloksacyna.

Wartość graniczna stężenia MIC dla szczepów opornych według EUCAST:

* ≥ 16 µg/mL,

** ≥ 4 µg/mL,

*** ≥ 1 µg/mL.

Zastrzeżenia patentowe

1. Mieszanina zawierająca sole srebra lub nanocząstki srebra oraz 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon, przy czym w mieszaninie 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon jest w dawce równej lub większej niż 8 $\mu\text{g/mL}$ zaś stężenie soli lub nanocząstek srebra wynosi 1 $\mu\text{g Ag/mL}$ lub jest większe niż 1 $\mu\text{g Ag/m}$ do zastosowania jako środek przeciwbakteryjny wobec *P. aeruginosa* redukujące liczbę komórek bakteryjnych.
2. Mieszanina zawierająca sole srebra lub nanocząstki srebra oraz 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon do zastosowania według zastrz. 1, **znamienna tym**, że zawiera sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm.
3. Mieszanina zawierająca sole srebra lub nanocząstki srebra oraz 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon do zastosowania według zastrz. 1–2, **znamienna tym**, że zawiera nanocząstki srebra stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanowym lub azotan srebra lub sulfadiazynę srebra lub nanocząstki srebra stabilizowane chlorkiem (11-merkaptoundecylo)-N,N,N-trimetyloamoniowym lub nanocząstki srebra stabilizowane eterem mono-11-merkaptoundecyloowym glikolu trietylenowego lub nanocząstki srebra stabilizowane cytrynianem sodu lub nanocząstki srebra stabilizowane poliwinylpirolidonem.
4. Mieszanina zawierająca sole srebra lub nanocząstki srebra oraz 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon do zastosowania według zastrzeżeniu 1–3, **znamienna tym**, że ma zastosowanie jako środek na skórę lub rany.

Rysunki

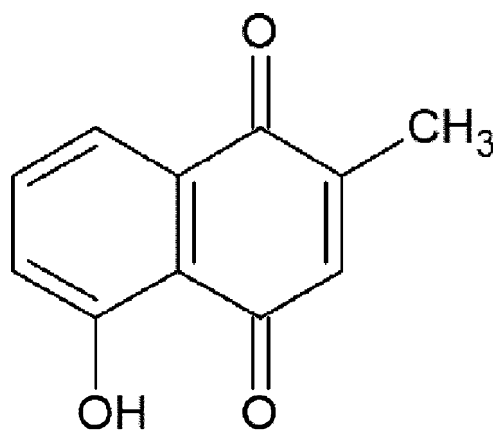


Fig. 1

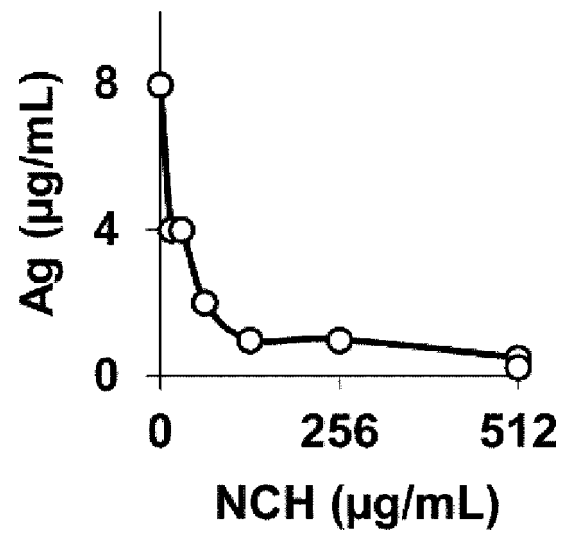


Fig. 2

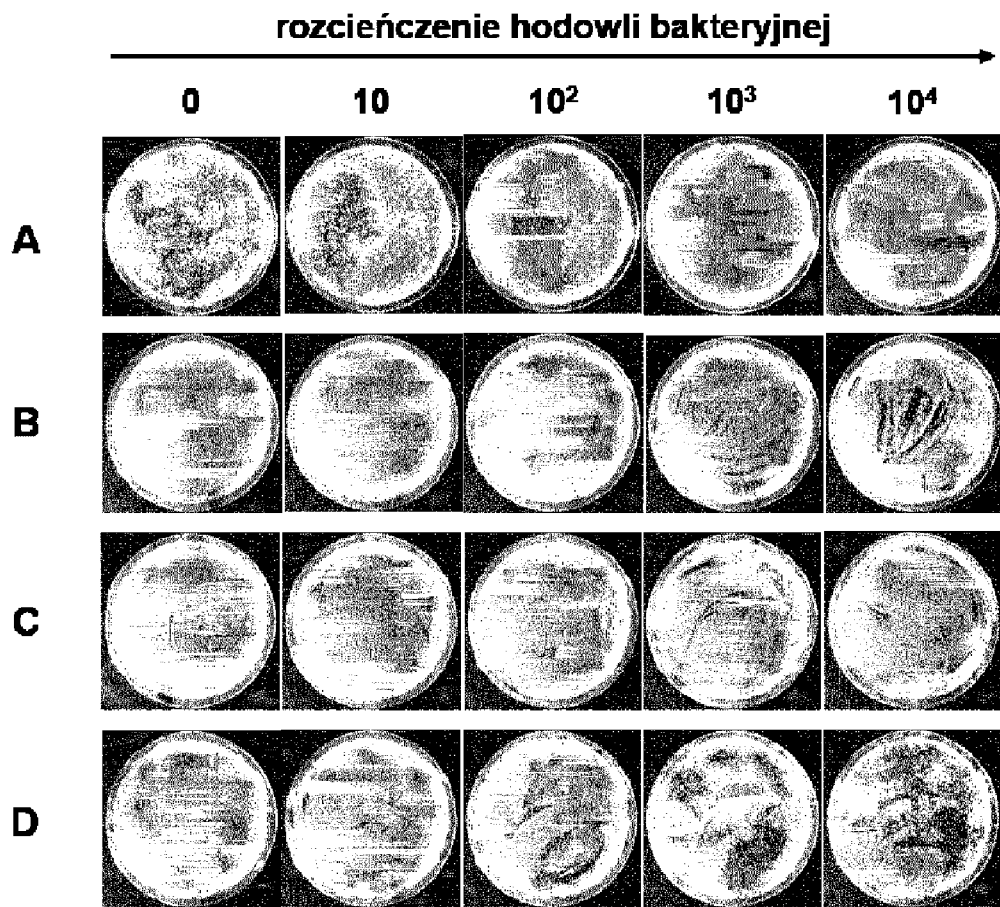


Fig. 3

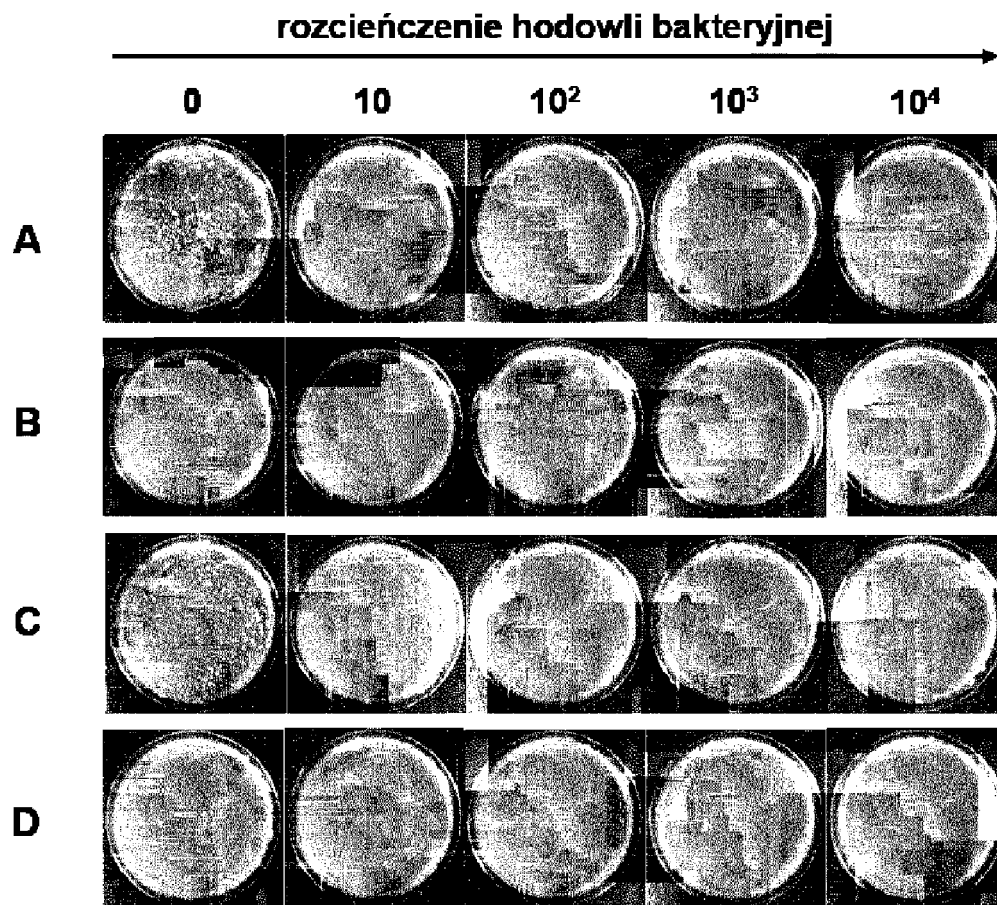


Fig. 4

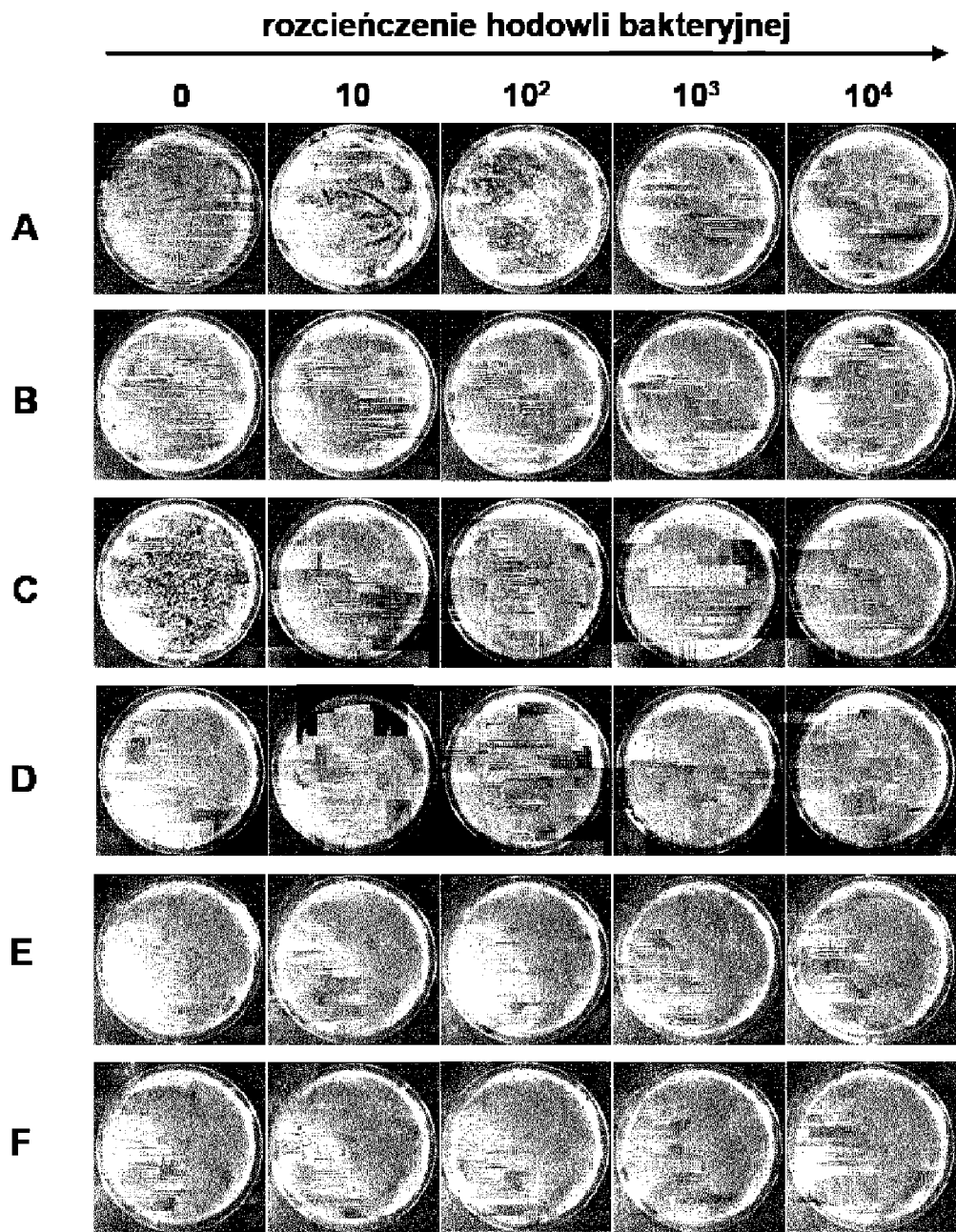


Fig. 5

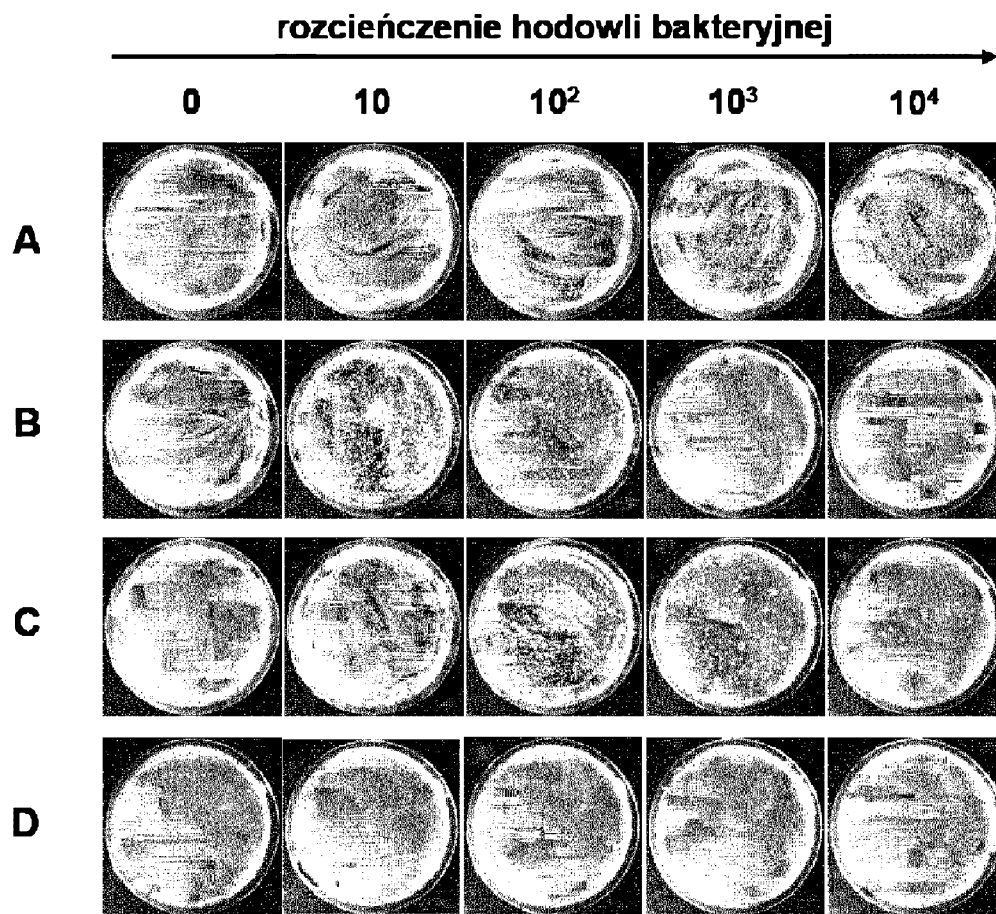


Fig. 6

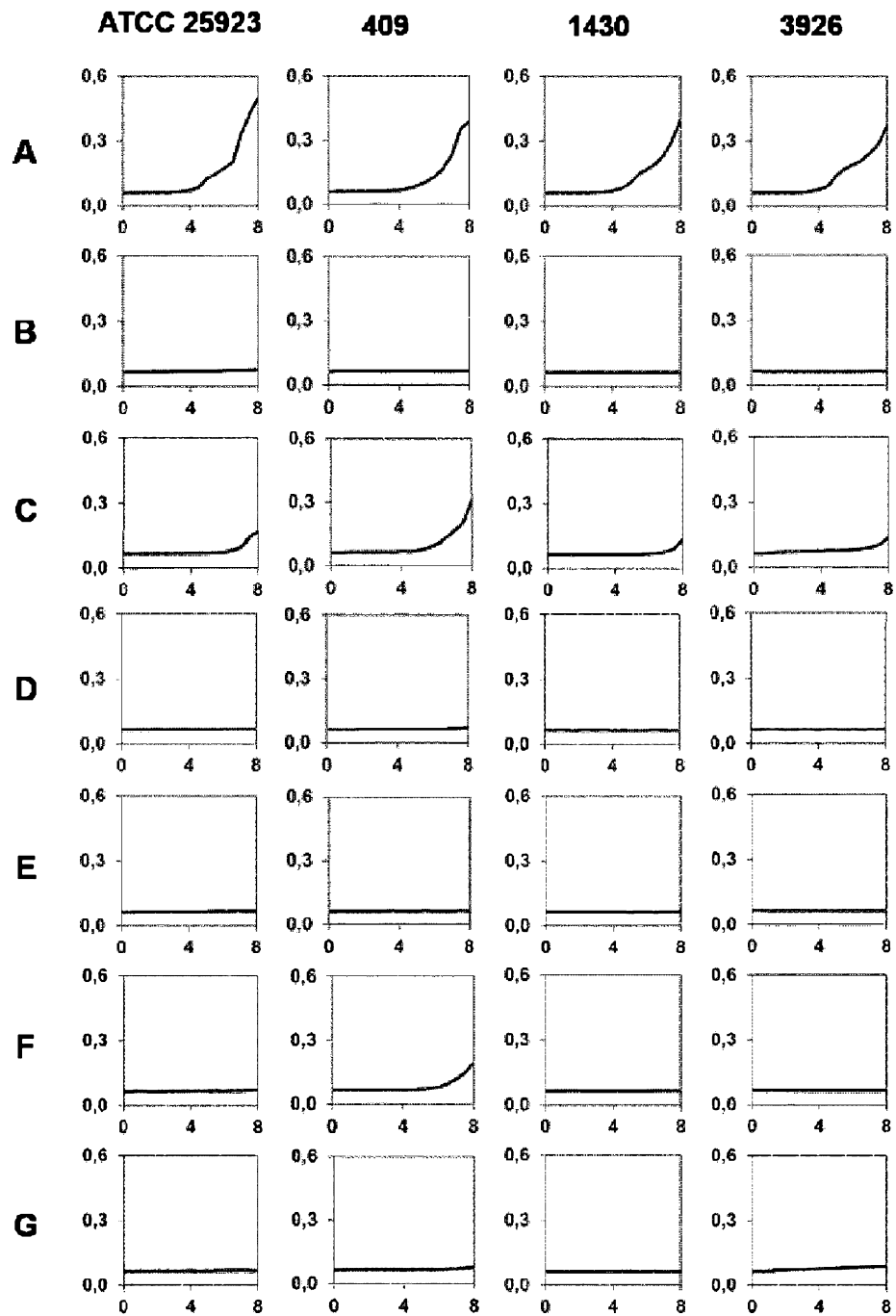
Szczep *Pseudomonas aeruginosa*

Fig. 7

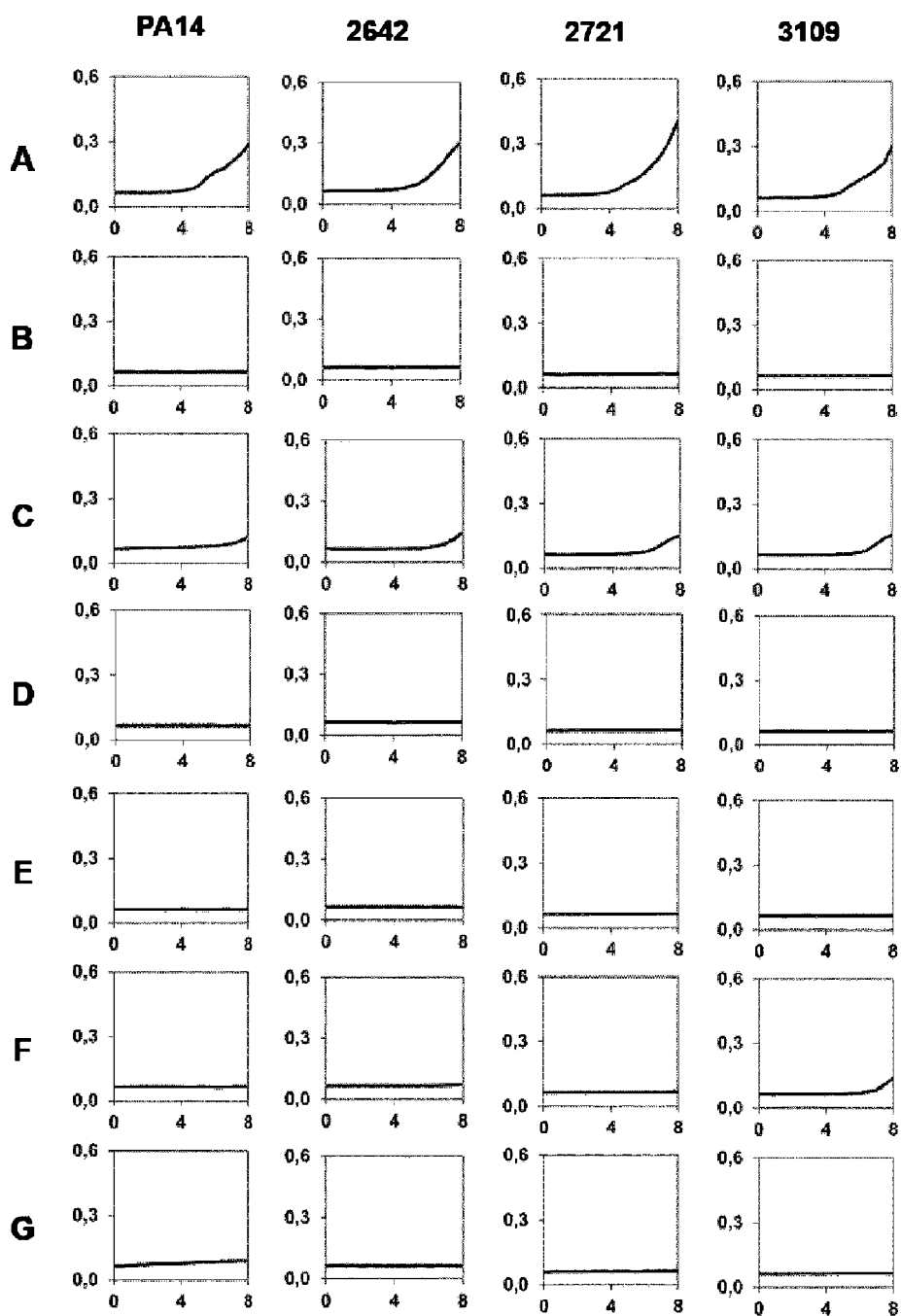
Szczep *Pseudomonas aeruginosa*

Fig. 8