

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 243140 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437226**

(22) Data zgłoszenia: **2021.03.07**

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

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.07.03 WUP 27/2023**

(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**  
**POLITECHNIKA GDAŃSKA, Gdańsk, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**MARTA KRYCHOWIAK-MAŚNICKA, Gdańsk, PL**  
**ALEKSANDRA KRÓLICKA, Gdańsk, PL**  
**EWA PALUSZKIEWICZ, Pruszcz Gdański, PL**  
**ALEKSANDRA BIELICKA-GIELDOŃ,**  
**Gdańsk, PL**

(74) Pełnomocnik:

**Justyna Pawłowska-Bajerska, Gdynia, PL**

(54) Tytuł:

**Mieszanina 1,4-naftochinonu i nanocząstek srebra do zastosowania medycznego jako środek przeciwbakteryjny do zwalczania Pseudomonas aeruginosa**

**PL 243140 B1**

## Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy sposobu aktywacji właściwości bakteriobójczych 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu, zwanego 3-chloroplumbaginą, wobec naturalnie odpornej pałeczki ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* za pomocą nanocząstek srebra, a tym samym za pomocą mieszaniny tych czynników. Wynalazek dotyczy zatem medycznego zastosowania mieszaniny do zwalczania *P. aeruginosa*, zwłaszcza do stosowania zewnętrznego, np. na skórę lub rany.

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 post-antybiotykowej niezbędne jest zastosowanie zrównoważonych strategii prewencji i leczenia chorób zakaźnych – WHO, 2019. ANTIBACTERIAL AGENTS IN CLINICAL DEVELOPMENT: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. 2019, WHO: Geneva, Switzerland.

*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. 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 – Church, D. i in. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev*, 2006. 19(2): p. 403–34. Poza antybiotykami, w terapiach ran oparzeniowych z dużym powodzeniem stosowane jest srebro jonowe, tj. azotan srebra i sulfadiazyna srebra. Niemniej jednak, coraz częściej obserwowane jest zjawisko nabywania oporności na preparaty zawierające srebro przez patogeny infekujące rany. Opisano to m.in. w: 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; 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.

W publikacji Ogihara et al. (2013) opisano aktywność ekstraktów z tkanek *Dionaea muscipula* stanowiących mieszaniny różnych związków w tych tkankach syntetyzowanych. Autorzy badań nie przeprowadzili analiz w kierunku ustalenia aktywności czystego związku, a jedynie stwierdzili jego obecność w badanych ekstraktach oraz aktywność tych ekstraktów m. in. wobec *P. aeruginosa*.

Niezbędne jest więc opracowanie strategii umożliwiających opóźnienie lub zniesienie wykształcania bakteryjnej oporności oraz rozszerzenie możliwości terapeutycznych.

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

W publikacji Ravichandiran et al. (2019) opisano wysoko zmodyfikowane pochodne naftochinonów, tzn. strukturę naftochinonu zmodyfikowaną na różne sposoby, dodając do niego wiele pierścieni fenolowych i innych grup chemicznych, co znacząco zmienia charakter chemiczny i właściwości biologiczne powstałych substancji w stosunku do substancji wyjściowej czyli 1,4-naftochinonu. Wśród wyników badań dotyczących zbadanej przez autorów aktywności przeciwbakteryjnej związków zsyntetyzowanych przez Ravichandiran i współpracowników nie ma 1,4-naftochinonu oraz nie ma prostych struktur chemicznych opartych na dwóch pierścieniach węglowych i prostych podstawnikach właściwych dla 1,4-naftochinonów, w tym dla 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu. Opisano najniższe stężenie hamujące 250–500 µg/mL. Stężenia powyżej 250 mg/L są stężeniami na granicy rozpuszczalności naftochinonów w pożywce mikrobiologicznej. Wskazana publikacja nie potwierdza aktywności 3-chloro-2-metylo-1,4 naftochinonu wobec *P. aeruginosa*.

W publikacji Krychowiak Maśnicka et. al. (2002), opisano wyniki analiz aktywności plumbaginy, tj. czystego związku, wobec dwóch szczepów *P. aeruginosa*, które potwierdzają brak takiej aktywności. Dane zawarte w publikacji wskazują, że minimalne stężenie hamujące (MIC) plumbaginy jest wyższe

niż 500 µg/mL w przypadku obu badanych szczepów, co potwierdza oporność tego patogenu na naftochinony. Stężenie MIC jest niższe jedynie, gdy plumbagina zostaje zastosowana z badanymi w inhibitorami pomp typu „efflux”.

Zjawisko synergistycznych oddziaływań dwóch czynników przeciwbakteryjnych nie jest powszechne, tak więc również nie jest efektem oczekiwanym, 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. Jak wskazano m. in. w: Berenbaum MC (1978). A method for testing for synergy with any number of agents. *Journal of Infectious Diseases*, 137(2), 122–130, w przypadku czynników bakteriobójczych oznacza to, że uzyskiwany jest efekt bakteriobójczy, gdy stosujemy całą dawkę bakteriobójczą czynnika pierwszego lub całą dawkę bakteriobójczą czynnika drugiego oraz gdy stosujemy mieszaninę gdzie czynnik pierwszy w obniżonej o połowę dawce bakteriobójczej uzupełnimy czynnikiem drugim również w obniżonej o połowę dawce bakteriobójczej, natomiast dalsze obniżanie dawek obu czynników w mieszaninie będzie skutkowało zniesieniem działania bakteriobójczego mieszaniny. Odmiennie jest w przypadku oddziaływań synergistycznych, tzn. obniżanie dawek obu czynników w mieszaninie nie skutkuje zniesieniem efektu bakteriobójczego mieszaniny.

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

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 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu, tj. 3-chloroplumbaginy, wobec naturalnie odpornej pałeczki ropy błękitnej, tj. *Pseudomonas aeruginosa*, za pomocą srebra w danej formie – nanocząstek srebra. Wynalazek dotyczy zatem medycznego zastosowania mieszaniny do zwalczania *P. aeruginosa* jako środka o działaniu przeciwbakteryjnym do stosowania zewnątrz, tj. na skórę lub rany. Mieszanina według wynalazku zawiera dany rodzaj nanocząstek srebra oraz 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon, zwany 3-chloroplumbaginą przy czym zawiera 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon w dawce równej lub większej niż 16 µg/mL i nanocząstki srebra w stężeniu równym lub większym niż 1 µg Ag/mL. Według wynalazku mieszanina zawiera działającą bakteriobójczo wobec *P. aeruginosa* dawkę nanocząstek srebra ( $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$ ) oraz 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon. Wykazany mechanizm oddziaływań nanocząstek srebra i 3-chloroplumbaginy stanowi specyficzne dla związków z grupy 1,4-naftochinonów zjawisko o wysokim potencjale do zwalczania jednego z najgroźniejszych patogenów bakteryjnych człowieka – *P. aeruginosa*.

Korzystnie, wynalazek dotyczy zastosowania medycznego mieszaniny zawierającej 3-chloroplumbaginę (3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon) i sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanowym ( $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$ ).

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

Korzystnie zawiera sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm.

W przykładzie wynalazku opisano, że mieszanina zawiera sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanowym w stężeniu równym lub wyższym niż 1 µg Ag/mL oraz 3-chloro-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.

Wynalazek opisano bliżej w przykładzie potwierdzającym efektywność mieszaniny i jej zastosowanie. W przykładzie opisano mieszaninę zawierającą 3-chloroplumbaginę i sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanowym. Wykazano, że sam naftochinon nie działa na ten szczep bakterii tj. MBC jest wyższy niż 512 µg/mL.

Fig. 1 pokazuje schemat syntezy 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu (3-chloroplumbaginy). (1) 2,3-epoksy-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon. (2) 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon.

Fig. 2 pokazuje strukturę chemiczną 3-chloroplumbaginy, tj. 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu.

Fig. 3 pokazuje zmiany minimalnych stężeń bakteriobójczych 3-chloroplumbaginy i preparatu nanocząstek srebra stabilizowanych kwasem 11-merkaptoundekanowym ( $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$ ) zastosowanych jednocześnie wobec *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Przykład: Znoszenie oporności *Pseudomonas aeruginosa* na 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon za pomocą nanocząstek srebra.

W badaniach wykorzystano gotowy preparaty sferycznych nanocząstek srebra (AgNPs) stabilizowanych kwasem 11-merkaptoundekanowy ( $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$ ) 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  $\mu\text{L}$  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 ( $\text{Ag}^+$ ) dokonywano przy długości fali 328,068 nm w 3 powtórzeniach.

Związek 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon (3-chloroplumbagina) został zsyntezowany zgodnie z metodą przedstawioną poniżej, która została przedstawiona na Fig. 1. Struktury chemiczne produktów reakcji zostały potwierdzone metodą spektralną – protonowym rezonansem magnetycznym, a czystość związków sprawdzana była przy użyciu metody TLC. Układ chromatograficzny – 10:1 heksan:octan etylu. Widma  $^1\text{H}$  NMR zostały wykonane na spektrometrze Varian VXR-S pracującym przy 500 MHz. Przesunięcia chemiczne podano w jednostkach  $\delta$  w ppm w dół pola od wewnętrznego tetrametylosilanu. Użyte skróty w opisach widm  $^1\text{H}$  NMR są następujące: br.s-szeroki sygnał, s-singlet, d-dublet, dd-dublet dubletów, t-triplet, k-kwartet i m-multiplet.

1 g 5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon rozpuszczono w 250 mL zimnego etanolu i dodano do roztworu nadboranu sodu (2,5 g) w 270 mL wody. Reakcję prowadzono przez 2 minuty, doprowadzając roztwór do pH 5 za pomocą 1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Następnie wytrząsano nasyconym roztworem NaCl i eterem naftowym (3-krotnie). Warstwę organiczną wysuszono za pomocą  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkty reakcji 2,3-epoksy-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon (1) i 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon, tj. 3-chloroplumbaginę (2) oczyszczono stosując chromatografię kolumnową. Eluent startowy heksan : octan etylu (50:1), następnie 20:1.

Produkt pośredni: 2,3-epoksy-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon (1): wydajność 50%

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz): 1,75 (3H, s); 3,84 (1H, s); 7,28-7,30 (1H, m); 7,60-7,62 (1H, m); 7,66 (1H, t,  $J=7,8\text{Hz}$ ); 11,22 (1H, s).

3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon był doczyszczany ponownie przy użyciu chromatografii kolumnowej. Eluent heksan : octan etylu (20:1).

3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon, tj. 3-chloroplumbagina (2): wydajność 10%

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz): 2,38 (3H, s); 7,30-7,32 (1H, m); 7,65-7,72 (2H, m); 11,80 (1H, s).

Działanie bakteriobójcze nanocząstek srebra  $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$  i 3-chloroplumbaginy (Fig. 2) 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 3-chloroplumbaginy (Fig. 2) przed dodaniem do pożywki przygotowywano jej skoncentrowane roztwory w dimetylosulfotlenku (DMSO) zawierające 25,6 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 20  $\mu\text{L}$  do 0,98 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  $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$  i roztworów 3-chloroplumbaginy w pożywce pobierano po 100  $\mu\text{L}$  i przenoszono do studzienek 96-dołkowej płytki mikrottestowej do badania aktywności bakteriobójczej poszczególnych czynników. W procedurze badania interakcji nanocząstek srebra i 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu 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 płycie mikrottestowej, gdzie każdy czynnik jest stosowany w następującym gradiencie stężeń w pożywce: 2 x MBC, 1 x MBC, 0,5 x MBC, 0,25 x MBC, 0,125 x MBC, 0,06 x MBC i 0,03 x MBC. Tym sposobem każdy dołek płytki mikrottestowej zawiera unikalną kombinację stężeń badanych czynników. W przypadku związków lub czynników nie wykazujących aktywności bakteriobójczej, tak jak ma to miejsce w przypadku 3-chloroplumbaginy, stosuje się gradient stężeń rozpoczynający się od najwyższego możliwego do uzyskania stężenia związku, tj. najczęściej 512, 256, 128, 64, 32, 16 i 8  $\mu\text{g/mL}$ . W przypadku nanocząstek srebra gradient stężeń zastosowanych w eksperymencie był następujący: 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 i 0,25  $\mu\text{g Ag/mL}$ .

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  $\mu\text{g Ag/mL}$ , a następnie wykonywano seryjne dwukrotne rozcieńczenia w pożywce do uzyskania mieszanin o stężeniu 16, 8, 4, 2, 1 oraz 0,5  $\mu\text{g Ag/mL}$ . Przed dodaniem do pożywki 3-chloroplumbaginy przygotowywano jej skoncentrowane roztwory w dimetylosulfotlenku (DMSO) zawierające 25,6 mg związku w 1 mL. W celu wykonania eksperymentu tak przygotowane roztwory dodawano do pożywki do końcowego stężenia 1024  $\mu\text{g/mL}$ , tj w objętości 40  $\mu\text{L}$  do 0,96 mL, a następnie wykonywano seryjne dwukrotne rozcieńczenia w pożywce do uzyskania roztworów o stężeniu 512, 256, 128, 64, 32 oraz 16  $\mu\text{g/mL}$ . Następnie mieszaniny przygotowano przez połączenie zawiesin nanocząstek i roztworów 3-chloroplumbaginy w stosunku objętościowym 1:1.

Następnie do studzienek zawierających po 100  $\mu\text{L}$  zawiesin, roztworów lub mieszaniny w pożywce dodawano 10  $\mu\text{L}$  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, 3-chloroplumbagina nie wykazuje aktywności bakteriobójczej wobec *P. aeruginosa* (MBC >512  $\mu\text{g/mL}$ ). Niemniej jednak, zastosowanie plumbaginy w połączeniu z nanocząstkami srebra  $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$  (MBC = 8  $\mu\text{g Ag/mL}$ ) skutkowało uzyskaniem efektu bakteriobójczego przy jej stężeniu równym 16  $\mu\text{g/mL}$  i stężeniu nanocząstek odpowiadającym 2  $\mu\text{g Ag/mL}$  (Tabela 1, Fig. 3). Powyższe wyniki wskazują, że srebro efektywnie współdziała z 3-chloroplumbaginą, tj. 3-chloro-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 3-chloroplumbaginy do 16  $\mu\text{g/mL}$ . Pozwala to na szeroki zakres możliwości modulowania aktywności biologicznej obu czynników oraz optymalizacji składu mieszaniny.

Tabela 1. Stężenia 3-chloroplumbaginy (3-chloro-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.

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

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

Ag - jony srebra.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Mieszanina zawierająca srebro w postaci nanocząstek i 1,4-naftochinon, zawierająca działającą bakteriobójczo wobec *Pseudomonas aeruginosa* dawkę nanocząstek srebra oraz 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinonu przy czym 3-chloro-5-hydroksy-2-metylo-1,4-naftochinon jest w dawce równej lub większej niż  $16 \mu\text{g/mL}$ , zaś nanocząstki srebra są w stężeniu równym lub większym niż  $2 \mu\text{g Ag/mL}$  do zastosowania jako środek przeciwbakteryjny wobec *P. aeruginosa*, korzystnie do zastosowania na skórę lub rany.
2. Mieszanina do zastosowania według zastrz. 1, **znamienna tym**, że zawiera sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm.
3. Mieszanina do zastosowania według zastrz. 1–2, **znamienna tym**, że zawiera nanocząstki srebra stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanowym.
4. Mieszanina do zastosowania według zastrz. 1–3 **znamienna tym**, że zawiera sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanowym.

## Rysunki

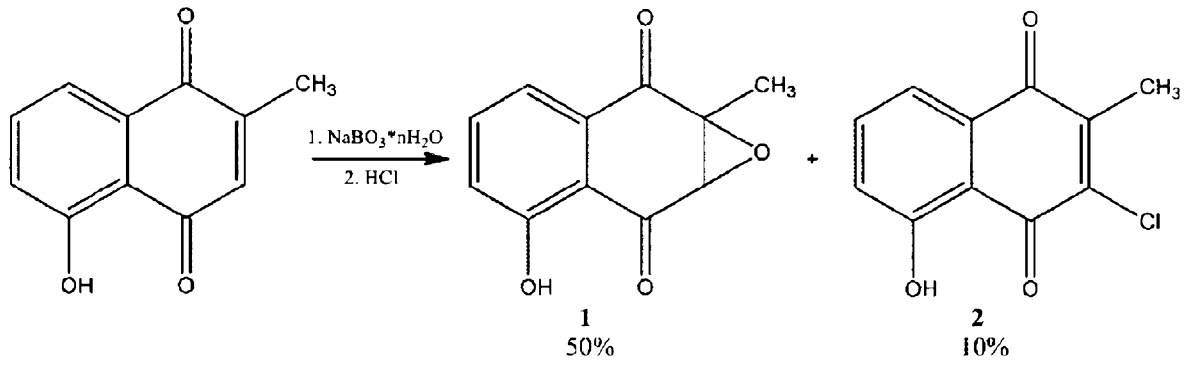


Fig. 1

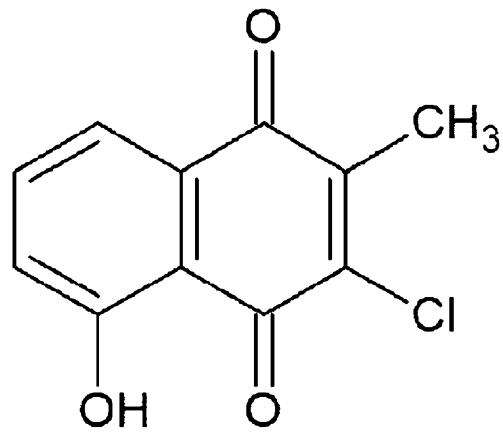


Fig. 2

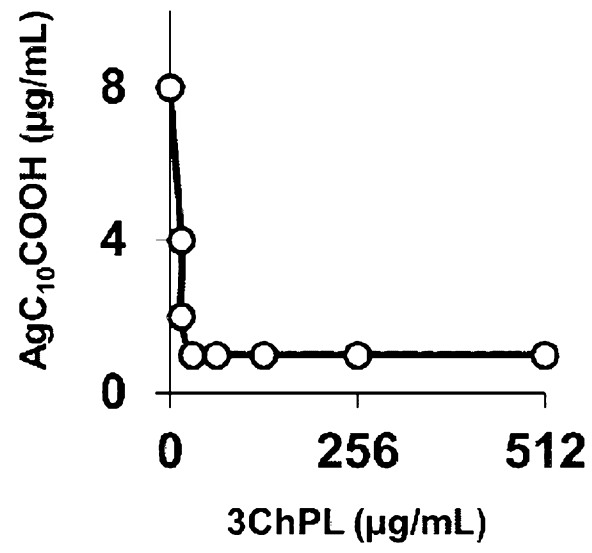


Fig. 3