

Środek antybakteryjny o działaniu przeciwbakteryjnym wobec *Pseudomonas aeruginosa* oraz jego zastosowanie

Wynalazek dotyczy sposobu aktywacji właściwości bakteriobójczych wybranego naftochinonu, wobec naturalnie odpornej pałeczki ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* za pomocą nanocząstek srebra, a tym samym za pomocą mieszaniny tych czynników. Wynalazek dotyczy również medycznego zastosowania mieszaniny do zwalczania *P. aeruginosa* oraz zastosowania tej mieszaniny jako środka o działaniu przeciwbakteryjnym wobec *P. aeruginosa*, zwłaszcza do stosowania zewnętrznie, np. na skórę lub rany.

Zjawisko antybiotykooporności 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 [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 szczególny 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.

Znane jest działanie pewnych związków chemicznych z grupy 1,4-naftochinonów wobec niektórych bakterii gram-dodatnich i grzybów [7]. Niemniej jednak, bakterie gram-ujemne wykazują umiarkowaną oporność na 1,4-naftochinony lub pozostają na nie

całkowicie odporne jak w przypadku *P. aeruginosa*, co opisano dla niektórych związków z grupy 1,4-naftochinonów [3].

Niniejszy wynalazek opiera się na zjawisku przywrócenia wrażliwości opornych komórek mikroorganizmu *P. aeruginosa* 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 wobec *P. aeruginosa* w oparciu o zjawisko aktywacji i synergii.

Według wynalazku opracowano nową mieszaninę dwóch składników dobranych w taki sposób, że dobrano jeden związek z grupy 1,4-naftochinonów oraz drugi składnik, tj. srebro.

Tak dobrana kompozycja tj. środek antybakteryjny wobec *Pseudomonas aeruginosa*, stanowi mieszaninę wykazującą oczekiwane działanie bakteriobójcze wobec *P. aeruginosa* opornego na ten 1,4-naftochinon.

Wynalazek dotyczy zatem sposobu aktywacji właściwości bakteriobójczych 5-hydroksy-1,4-naftochinonu, tj. juglonu, wobec naturalnie odpornej pałeczki ropy błękitnej, tj. *Pseudomonas aeruginosa*, za pomocą srebra, zwłaszcza w formie nanocząstek srebra.

Według wynalazku mieszanina zawiera działającą bakteriobójczo wobec *P. aeruginosa* dawkę srebra oraz 5-hydroksy-1,4-naftochinonu opisywanego inaczej jako juglon.

Wynalazek dotyczy również medycznego zastosowania tego środka antybakteryjnego, tj. mieszaniny do zwalczania *P. aeruginosa*, oraz zastosowania tej mieszaniny jako środka o działaniu przeciwbakteryjnym do stosowania zewnętrznie, tj. na skórę lub rany. Mieszanina według wynalazku zawiera srebro, zwłaszcza w formie nanocząstek srebra oraz 5-hydroksy-1,4-naftochinon, zwany juglonem.

Wynalazek dotyczy zatem również mieszaniny zawierającej aktywne bakteriobójczo wobec *P. aeruginosa* stężenie cząstek srebra, zwłaszcza w postaci nanocząstek srebra oraz 5-hydroksy-1,4-naftochinonu, która ma zastosowanie medyczne jako środek przeciwbakteryjny wobec *P. aeruginosa*.

Korzystnie, zawiera 5-hydroksy-1,4-naftochinon w dawce równej lub większej niż 16 µg/mL.

Korzystnie, zawiera nanocząstki srebra w stężeniu równym lub większym niż 2 µg Ag/mL.

Korzystnie zawiera wybrany preparat srebra czyli nanocząstki srebra stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanowym.

Korzystniej zawiera sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm.

Korzystnie, wynalazek dotyczy mieszaniny zawierającej juglon (5-hydroksy-1,4-naftochinon) i sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanowym.

Wykazany według wynalazku mechanizm oddziaływań nanocząstek srebra i juglonu stanowi zjawisko o wysokim potencjale do zwalczania jednego z najgroźniejszych patogenów bakteryjnych człowieka – *P. aeruginosa*, co stanowi korzyść wynalazku.

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 2 µg Ag/mL oraz 5-hydroksy-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.

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. Kuete, V. i in., Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *Int J Antimicrob Agents*, 2011. 37: p. 156-61.
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 przykładzie potwierdzającym efektywność mieszaniny i zastosowanie. W przykładzie opisano mieszaninę zawierającą juglon i sferyczne nanocząstki srebra o średniej wielkości 5 nm stabilizowane kwasem 11-merkaptoundekanowym. Wykazano, że sam ten naftochinon nie działa na referencyjny szczep bakterii *P. aeruginosa*, tj. jego minimalne stężenie bakteriobójcze jest wyższe niż 512 µg/mL. Wynalazek zobrazowano też na rysunku.

Fig. 1 pokazuje strukturę chemiczną juglonu, tj. 5-hydroksy-1,4-naftochinonu.

Fig. 2 pokazuje zmiany minimalnych stężeń bakteriobójczych juglonu (JUGL) i preparatu nanocząstek srebra stabilizowanych kwasem 11-merkaptoundekanowym (Ag) zastosowanych jednocześnie wobec *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Przykład

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

W badaniach wykorzystano gotowy preparaty wybranych sferycznych nanocząstek srebra (AgNPs) stabilizowanych kwasem 11-merkaptoundekanowy (AgC₁₀COOH) 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 sprężonej 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.

W badaniach wykorzystano komercyjnie dostępny wybrany związek 5-hydroksy-1,4-naftochinon, tj. juglon (Sigma Aldrich). Działanie bakteriobójcze nanocząstek srebra $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$ i juglonu (Fig. 1) 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, co opisano poniżej.

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 juglonu przed dodaniem do pożywki przygotowywano jego 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 $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$ i roztworów juglonu w pożywce pobierano po 100 μL i przenoszono do studzienek 96-dółkowej płytki mikrotestowej do badania aktywności bakteriobójczej poszczególnych czynników. W procedurze badania interakcji nanocząstek srebra i 5-hydroksy-1,4-naftochinonu, tj. juglonu, 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 mikrotestowej, 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 $0,03 \times \text{MBC}$, gdzie MBC jest minimalnym stężeniem bakteriobójczym (MBC, ang. *Minimal Bactericidal Concentration*). Tym sposobem każdy dołek płytki mikrotestowej zawiera unikalną kombinację stężeń badanych czynników. W przypadku związków lub czynników nie wykazujących aktywności bakteriobójczej, tak jak ma to miejsce w przypadku juglonu, 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 $\mu\text{g Ag/mL}$.

Mieszanki 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 juglonu przygotowywano jego 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 $\mu\text{g/mL}$, tj. w objętości 20 μL do 0,98 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 juglonu w stosunku objętościowym 1:1.

Następnie do studzienek zawierających po 100 μL zawiesin, roztworów lub mieszaniny w pożywce dodawano 10 μL 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 mikrotestowe 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. 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, juglon nie wykazuje aktywności bakteriobójczej wobec *P. aeruginosa* (MBC > 512 $\mu\text{g/mL}$). Niemniej jednak, zastosowanie juglonu w połączeniu z nanocząstkami srebra $\text{AgC}_{10}\text{COOH}$ (MBC = 8 $\mu\text{g Ag/mL}$) skutkowało uzyskaniem efektu bakteriobójczego przy jego stężeniu równym nawet 16 $\mu\text{g/mL}$ i stężeniu nanocząstek odpowiadającym 2 $\mu\text{g Ag/mL}$ (Tabela 1, Fig. 2). Powyższe wyniki wskazują, że srebro efektywnie współdziała z juglonem, tj. 5-hydroksy-1,4-naftochinonu, znosząc oporność *P. aeruginosa* na ten związek. Pozwala to osiągnąć efekt bakteriobójczy mieszaniny przy znacząco zredukowanym stężeniu preparatu srebra (nawet do 87,5%) i stężeniu juglonu do 16 $\mu\text{g/mL}$. Tym samym pozwala to na szeroki zakres możliwości modulowania aktywności biologicznej obu czynników oraz optymalizacji składu mieszaniny.

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

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

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

Ag, jony srebra.