

Połączenie nanocząstek srebra i metabolitów wtórnych produkowanych w tkankach roślin owadożernych w walce z bakteryjnymi patogenami ludzkimi
Combining silver nanoparticles and secondary metabolites from tissues of carnivorous plants as a strategy to combat human pathogenic bacteria

Promotor: dr hab. inż. Aleksandra Królicka, prof. UG
Pracownia Badania Związków Biologicznie Czynnych, Katedra Biotechnologii, MWB UG i GUMed

Streszczenie

Lekooporność drobnoustrojów jest fascynującym zjawiskiem z punktu widzenia badań nad właściwościami mikroorganizmów. Oporność patogennych mikroorganizmów na antybiotyki i chemioterapeutyki stanowi jednak poważny problem w ujęciu klinicznym i ekonomicznym. W związku z tym konieczne jest ciągle poszukiwanie nowych aktywnych substancji i opracowywanie skutecznych metod zwalczania mikroorganizmów patogennych wobec człowieka. W niniejszej pracy doktorskiej zbadano potencjał przeciwdrobnoustrojowy związków zawartych w tkankach roślin owadożernych (*Dionaea muscipula* i *Drosera* sp.) w połączeniu z nanocząstkami srebra do zwalczania patogennych bakterii wykazujących antybiotykooporność.

W ramach realizacji pracy doktorskiej wykorzystano kilka metod ekstrakcji metabolitów wtórnych zawartych w tkankach różnych gatunków roślin owadożernych do zbadania potencjału synergistycznego uzyskanych ekstraktów w połączeniu z nanocząstkami srebra. Uzyskane wyniki analiz fitochemicznych i mikrobiologicznych umożliwiły zidentyfikowanie metabolitów wtórnych z grupy naftochinonów, warunkujących synergistyczny efekt bakteriobójczy połączenia ekstraktów z tkanek roślin owadożernych i nanocząstek srebra. Wykazano również, że w wyniku synergistycznych oddziaływań bakteriobójcze stężenie naftochinonów zastosowanych w połączeniu z nanostrukturami srebra, podlega znaczącej redukcji, do 97% w przypadku *Staphylococcus aureus* i ponad 98,5% w przypadku *Pseudomonas aeruginosa*. W toku dalszych badań ustalono specyficzność zachodzącego między nanocząstkami srebra i naftochinonami zjawiska synergii. W tym celu wykorzystano nanocząstki stabilizowane poliwinylpirolidonem lub tioalkanami o zróżnicowanej długości łańcucha węglowego modyfikowanego grupami funkcyjnymi (aminową, karboksylową oraz trimetyloamoniową) oraz zróżnicowane pod względem struktury chemicznej naftochinony (plumbaginę, 3-chloroplumbaginę, ramentaceon, droseron, juglon, dichlon, lawson i lapachol). Badania wykazały, że w przypadku *S. aureus* za występowanie zjawiska synergii odpowiadają zarówno właściwości nanocząstek srebra (rodzaj ligandu stabilizującego), jak również struktura chemiczna naftochinonu. Spośród wszystkich zbadanych naftochinonów, wyłącznie plumbagina, 3-chloroplumbagina, ramentaceon, juglon i dichlon wykazywały silny

bakteriobójczy potencjał synergistyczny w połączeniu z nanocząstkami srebra. W pracy doktorskiej zbadano również potencjał naftochinonów do generowania stresu oksydacyjnego jako mechanizmu odpowiedzialnego za ich aktywność bakteriobójczą. Przeprowadzone analizy wykluczyły jednak znaczenie wysokiego poziomu reaktywnych form tlenu, generowanych w komórkach mikroorganizmów w wyniku działania naftochinonów jako głównego czynnika warunkującego ich synergię z nanostrukturami.

Ważnym aspektem prowadzonych badań była analiza cytotoksyczności nanocząstek srebra, naftochinonów oraz ich synergistycznych połączeń wobec hodowli *in vitro* ludzkich keratynocytów. Wykazano, że dzięki synergistycznym oddziaływaniom z nanocząstkami srebra bakteriobójcze stężenie naftochinonów ulega zmniejszeniu do poziomu, przy którym efekt cytotoksyczności wobec komórek eukariotycznych nie występuje lub jest nieznaczny. Niezmiernie istotny jest fakt, że w odróżnieniu od azotanu srebra w zakresach stężeń odpowiadających działaniu bakteriobójczemu, nanocząstki srebra badane w pracy doktorskiej nie wykazywały działania cytotoksycznego wobec hodowli keratynocytów. Uzyskane wyniki wykazały również, że obecność nanostruktur srebra nie zwiększała cytotoksyczności naftochinonów wobec komórek eukariotycznych. W pracy doktorskiej wykazano również, że zjawisko synergistycznego lub addytywnego działania bakteriobójczego nanocząstek srebra i naftochinonów występuje również w przypadku innych patogenów wykazujących oporność na antybiotyki – *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* oraz *Acinetobacter baumannii*.

Kolejnym krokiem w pracy doktorskiej były badania mające na celu próbę ustalenia mechanistycznych aspektów działania nanocząstek srebra warunkujących zjawisko synergii z naftochinonami. Uzyskane wyniki wykazały, że mechanizm toksycznego działania połączeń nanocząstek srebra i naftochinonów jest złożony. Opiera się on na współdziałaniu naftochinonów z jonami srebra oraz oddziaływaniach nanostruktur srebra z błonami komórkowymi bakterii i cząsteczkami naftochinonów. Potencjał przeciwniebezpieczny połączeń metabolitów wtórnych i nanostruktur srebra zbadano na modelu wykorzystującym nicienie – *Caenorhabditis elegans*. Zastosowane połączenia nanocząstek srebra i dwóch wybranych naftochinonów (plumbaginy i 3-chloroplumbaginy) zahamowało rozwój infekcji *C. elegans* wywołanej przez *P. aeruginosa*, warunkując ich przeżywalność na poziomie 47,19% lub 67,86% po czterech dniach od infekcji, która w kontroli wywoływała 100% śmiertelność nicieni.

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania wykazały wysoki potencjał przeciwdrobnoustrojowy połączeń naftochinonów zawartych w tkankach roślin owadożernych oraz nanocząstek srebra. Badania będą nadal kontynuowane w kierunku ustalenia molekularnych mechanizmów warunkujących obserwowane zjawisko synergii oraz aplikacyjnego wykorzystania połączenia nanocząstek srebra i naftochinonów do zwalczania bakteryjnych patogenów ludzkich.