

Złoto w walce z bakteriami



MARCIN FIAŁKOWSKI

Instytut Chemii Fizycznej
Polska Akademia Nauk, Warszawa
mfialkowski@ichf.edu.pl

Dr hab. Marcin Fiałkowski jest profesorem nadzwyczajnym IChF PAN. Jego zainteresowania naukowe to nanotechnologia, fizykochemia miękkiej materii, zjawiska samoorganizacji w nanoskali oraz fizyka statystyczna.

Zgodnie z ostatnim raportem Europejskiego Centrum Zapobiegania i Kontroli Chorób jeden na osiemnastu pacjentów szpitali w Europie przechodził co najmniej jedną chorobę będącą skutkiem zakażenia w czasie terapii. To rocznie 3,2 miliona osób. Patogenami są najczęściej bakterie z narzędzi oraz przedmiotów znajdujących się w szpitalu. W IChF PAN opracowaliśmy nieszkodliwą dla tkanek ludzkich metodę funkcjonalizacji powierzchni powłoką antybakteryjną

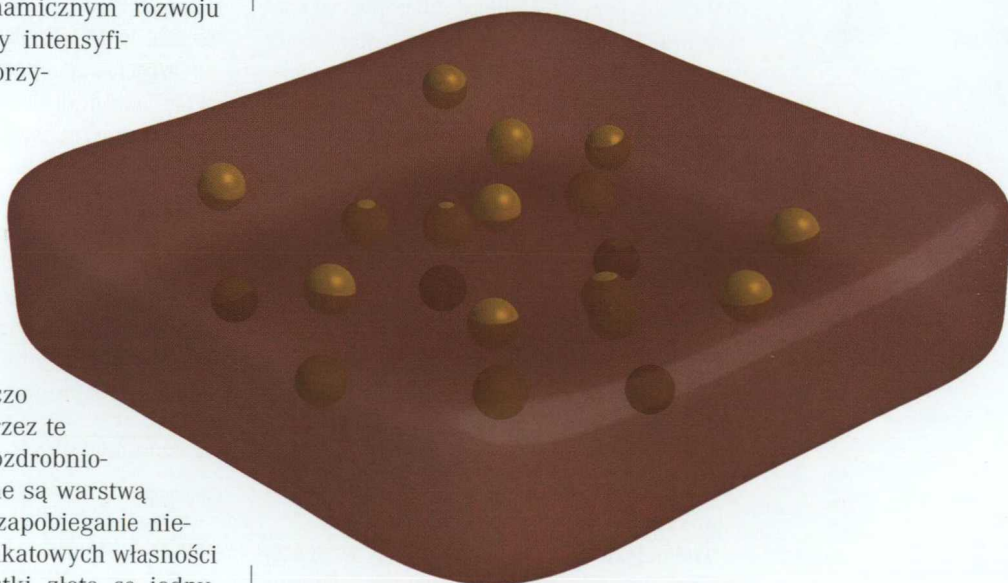
W postępującej w ostatnich dekadach miniaturyzacji urządzeń elektronicznych, dynamicznym rozwoju fizykochemii powierzchni oraz przy intensyfikacji prac nad technologiami wykorzystującymi zjawiska kwantowe coraz większe znaczenie zyskują nanocząstki. Są to obiekty, których przynajmniej jeden z wymiarów nie przekracza 100 nanometrów, zbudowane z kilku do nawet kilkudziesięciu tysięcy atomów, najczęściej kuliste. Ich właściwości, a więc również potencjalne zastosowania zasadniczo odbiegają od tych wykazywanych przez te same substancje w formie mniej rozdrobnionej. Nanocząstki z reguły pokrywane są warstwą stabilizującą, której zadaniem jest zapobieganie niekontrolowanej agregacji i utracie unikatowych właściwości materiałów w nanoskali. Nanocząstki złota są jednymi z najbardziej trwałych nanocząstek metalicznych. Ze względu na swoje unikatowe właściwości, które są ściśle związane z ich wielkością i kształtem, nanocząstki

złota znajdują wiele zastosowań, m.in. w chemii materiałów, katalizie, medycynie czy biologii.

W wyniku prac prowadzonych w naszym zespole w Instytucie Chemii Fizycznej PAN udało się nam otrzymać materiał nanokompozytowy posiadający silne właściwości antybakteryjne, będący zarazem zupełnie nieszkodliwym dla komórek ludzkich. Kluczem do stworzenia tego materiału okazało się unieruchomienie nanocząstek złota w hierarchicznej strukturze oksoboranowej.

Gołe złoto

Do syntezy naszego materiału nanokompozytowego wykorzystaliśmy nanocząstki złota o średnicy około 4 nanometrów, które otrzymane zostały w wyniku redukcji jonów chlorozłotawych borowodorkiem sodu. W literaturze tego typu nanocząstki pokryte związkami nieorganicznymi określane są często jako „gołe”, gdyż nie zawierają organicznego liganda stabilizującego. Brak powłoki organicznej sprawia, że powierzchnia nanocząstek złota jest dostępna dla bakterii. Powstające w wyniku tej reakcji związki boru i tlenu (oksoborany) stabilizują powierzchnię otrzymanych nanocząstek oraz, dodatkowo, biorą udział w tworzeniu samego nanokompozytu. W roztworze poreakcyjnym współlistnieją różne typy anionów i polianionów składających się z jednostek



Agregaty złożone z nanocząstek otoczonych oksoboranami agregują, tworząc nanokompozytowe bloczki-cegiełki. Nanocząstki cząstki złota wystają z matrycy okołoboranowej, przez co są dostępne dla drobnoustrojów i mogą je zabijać



Wyparka, czyli ewaporator, sprzęt służący do kontrolowanego odparowywania cieczy, która była wykorzystywana na jednym z etapów projektu

podstawowych BO_3 i BO_4 , których liczba zależy od odczynu roztworu. W roztworach o wyższym stężeniu kwasu borowego tworzy się równowaga pomiędzy niezjonizowaną formą kwasu $\text{B}(\text{OH})_3$ a polinuklearnymi kompleksami $\text{B}_3\text{O}_3(\text{OH})^+$, $\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4^{2-}$, $\text{B}_5\text{O}_6(\text{OH})_5^{3-}$, $\text{B}_6\text{O}_6(\text{OH})_6^{4-}$ i $\text{B}(\text{OH})_4^-$. Dodatek jonów H^+ lub OH^- do roztworu prowadzi do kondensacji i utworzenia polioksoanionów. Różnica między kondensacją w środowisku kwaśnym a kondensacją w środowisku zasadowym dotyczy morfologii powstałych w tym procesie polianionów. W środowisku kwaśnym

obserwowana jest tendencja do tworzenia płaskich sieci, które następnie układają się warstwowo, natomiast w środowisku zasadowym kondensacja prowadzi do powstania amorficznych sieci.

W celu syntezy naszych nanostruktur wykorzystaliśmy kondensację indukowaną jonami H^+ . Po zakwaszeniu roztworu kwasem solnym wokół nanocząstek złota (otoczonych związkami boru) rozpoczyna się proces kondensacji oksoboratów. Tworzone wokół nanocząstek sieci polioksoboratów mają planarną (płaską) strukturę.

Dzięki połączeniom poprzez wiązania wodorowe tworzy się prawie heksagonalna struktura podobna do grafenu (rysunek powyżej). Odległość między warstwami wynosi 3.18 Å. Proces kondensacji oksoboranów wiąże się z delokalizacją i zmniejszeniem ładunku, powodując wzrost właściwości hydrofobowych powstałych struktur. Agregaty złożone z nanocząstek i otoczki polioksoboranowej łączą się dalej dzięki oddziaływaniom hydrofobowym oraz kondensują, tworząc wyżej zorganizowane struktury. Są to „cegiełki” utworzone z polioksoboranów, mające kształt spłaszczonych bloczków o boku o rozmiarach kilkudziesięciu nanometrów i grubości około 10 nanometrów. W tych bloczkach – pełniących funkcję matrycy albo rusztowania – unieruchomione są nanocząstki złota (rysunek na następnej stronie). Ze względu na kompozycję (bor plus tlen plus złoto) uzyskany materiał kompozytowy nazwaliśmy „BOA”. Procesowi kondensacji oksoboranów towarzyszy ich chemiczne (kowalencyjne) łączenie się za pośrednictwem grup hydroksylowych z powierzchnią materiału, który podlega funkcjonalizacji. W rezultacie uzyskuje się trwałe pokrycie powierzchni materiałem BOA. Dodajmy, że znana jest zdolność jonów oksoboranowych do tworzenia silnych kompleksów

z grupami OH, na przykład w celulozie czy polialkoholach. Do tej pory nie wykorzystano jednak tej właściwości oksoboranów w celu modyfikacji materiałów hydrofilowych nanocząstkami złota.

Silne działanie antybakteryjne naszego nanokompozytu zostało potwierdzone zarówno dla Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich szczepów bakterii. W naszych testach były to odpowiednio szczepy *Escherichia coli* oraz *Staphylococcus epidermidis*. Użyliśmy zmutowanego szczepu bakterii *E. coli*, który jest odporny na działanie dwóch silnych antybiotyków: chloramfenikolu i kanamycyny. Są to potencjalnie niebezpieczne drobnoustroje, ponieważ niektóre szczepy *E. coli* wywołują groźne zakażenia, takie jak zapalenia płuc czy zapalenia otrzewnej, które mogą prowadzić do sepsy. Mogą również być przyczyną zakażenia układu moczowego i biegunki. Dodatkowo toksyny wytwarzane przez *E. coli* uszkodzają narządy wewnętrzne. Drugi gatunek bakterii, *S. epidermidis*, to patogen należący do rodzaju gronkowców, który może wywoływać bardzo groźne infekcje oportunistyczne. Z tego powodu jest on potencjalnie niebezpieczny dla pacjentów przebywających w szpitalach po zabiegach chirurgicznych, ponieważ może wywołać zakażenia miejsca operowanego. Na infekcje *S. epidermidis* narażeni są również chorzy z ranami oparzeniowymi, cewnikami i z wszczepionymi implantami.

Aby określić właściwości bakteriobójcze pokryć nanokompozytowych, przeprowadziliśmy badania, w których wspomniane szczepy bakterii inkubowane były w obecności strzępków waty bawełnianej, która została zmodyfikowana nanokompozytem BOA. Dla obu rodzajów drobnoustrojów po 24 godzinach inkubacji obserwowany był znaczny spadek liczby bakterii, osiągający dwa lub trzy rzędy wielkości w porównaniu z wyjściową populacją. Wynik ten świadczy o doskonałej skuteczności antybakteryjnej naszych nanostrukturalnych pokryć.

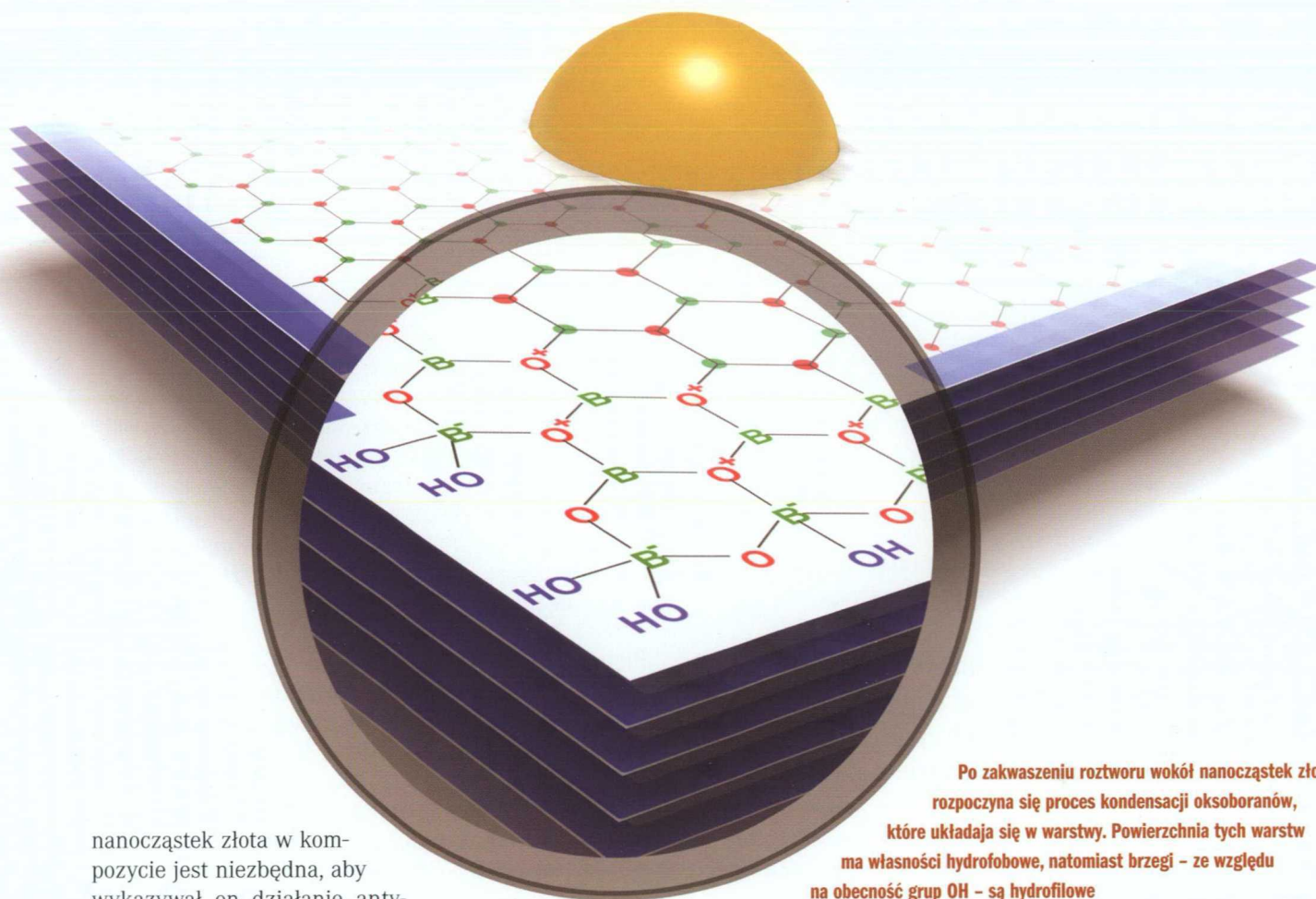
BOA wielofunkcyjne

Przedmiotem naszych zainteresowań był również mechanizm antybakteryjny nanostruktur BOA. W wyniku przeprowadzonych badań ustaliliśmy, że nanokompozyt nie wydziela do roztworu żadnego czynnika, który byłby toksyczny dla bakterii. Okazało się, że takiego czynnika antybakteryjnego nie zawiera również roztwór, który pozostaje po syntezie kompozytu. Oznacza to, że drobnoustroje giną w wyniku bezpośredniego kontaktu z nanostrukturą. Ustaliliśmy również, że obecność



Wata nasączona roztworem pozostałym po syntezie nanokompozytu wykazuje właściwości bakteriobójcze

Jakub Ostrowski



Po zakwaszeniu roztworu wokół nanocząstek złota rozpoczyna się proces kondensacji oksoboranów, które układają się w warstwy. Powierzchnia tych warstw ma własności hydrofobowe, natomiast brzegi – ze względu na obecność grup OH – są hydrofilowe

nanocząstek złota w kompozycie jest niezbędna, aby wykazywał on działanie antibakteryjne. Sprawdziliśmy to, badając właściwości bakteriobójcze powierzchni pokrytych warstwą samych polioksoboranów, niezawierających w swojej strukturze nanocząstek złota. Nie wiemy jeszcze, w jaki sposób bezpośredni kontakt bakterii z nanocząstkami złota uwięzionymi w matrycy polioksoboranej prowadzi do jej śmierci. Nie ulega jednak wątpliwości, że opisany wyżej mechanizm zabijania drobnoustrojów wykazywany przez nanokompozyt BOA jest niezwykle korzystny z zarówno ekonomicznego, jak i ekologicznego punktu widzenia. Materiał ten zastosowany jako pokrycie bakteriobójcze nie zużywa się lub zużywa się w bardzo niewielkim stopniu, a jego stosowanie nie wiąże się z emisją do środowiska toksycznych substancji.

Niezwykle ważną właściwością pokryć antybakteryjnych jest ich wpływ na komórki ludzkie. We współpracy z naukowcami z Collegium Medicum UJ oraz z Małopolskim Centrum Biotechnologii UJ zbadaliśmy cytotoxycznosc nanostruktur BOA na cztery linie komórkowe: nerwowe LN18, wątrobowe HepG2, trzustki BTC-6 oraz tkanki tłuszczowej SVF. Do badania cytotoxycznosci wykorzystano metode ilościową, polegającą na oznaczaniu aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH). LDH jest enzymem cytozolowym, który uwalniany jest do środowiska w wyniku uszkodzenia mechanicznego błony plazmatycznej oraz śmierci komórki. Aktywność tego enzymu świadczy o obecności czynnika wykazującego działanie cytotoxyczne na komórki. Nasze badania

wykazały, że wata bawełniana pokryta nanokompozytem BOA nie wykazuje cytotoxycznosci względem żadnej z badanych linii komórkowych. Co więcej, obserwacje mikroskopowe ujawniły, że testowane komórki rozwijały się na włóknach zmodyfikowanej bawełny nawet cztery tygodnie po inokulacji.

Materiał BOA ma olbrzymi potencjał aplikacyjny. Może zostać wykorzystany do wytwarzania materiałów antyseptycznych, a w szczególności do pokrywania tym materiałem nanokompozytowym rozmaitych powierzchni, na przykład polimerowych (szalki Petriego, implanty, rusztowania do wzrostu komórek), szklanych (szklane kувety, włókno szklane), metalowych (sprzęt medyczny, implanty) czy bawełnianych (bandaże, nici). ■

Opisane badania zostały zrealizowane w ramach programu TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (TEAM/2010-6/4) współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego oraz grantów NCN SONATA 2012/07/D/ST5/02240 i Opus UMO-2012/07/B/ST4/01400.

Chcesz wiedzieć więcej?

Wybrańska K., Paczesny J., Serejko K., Sura K., Włodyga K., Dzieciulewski I., Jones S.T., Śliwa A., Wybrańska I., Hotyst R., Scherman O.A., and Fiałkowski M., Gold-Oxoborate. (2015). Nanocomposites and Their Biomedical Applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7 (7), 3931–3939.