



NANOCZĄSTKI NANOCZĄSTKOM NIERÓWNE

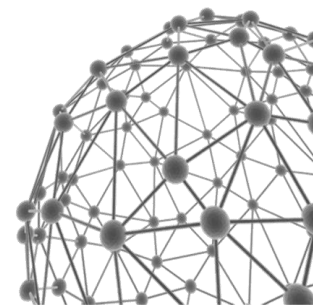
Dr inż. Marta Pawłowska, Nano-Tech Polska, WSIIZ
Chorzów, 2018

aXonnite[®]
Technology

Nanotechnologia

Wielodyscyplinarna dziedzina nauki

- Fizycy: określają mechanizmy działania i oddziaływania nanocząstek oraz ich morfologię
- Chemicy / Toksykolodzy: określają reaktywność i strukturę cząstek
- Biolodzy /Mikrobiolodzy: określają oddziaływanie na mikroorganizmy
- Lekarze: wpływ i badanie potencjału korzyści dla zdrowia człowieka
- Nauki przyrodnicze: badanie wpływu na struktury i organizmy roślinne i zwierzęce

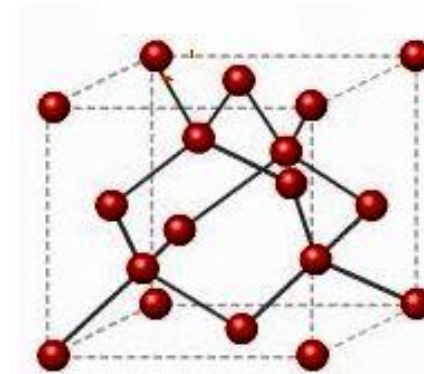


Nanotechnologia

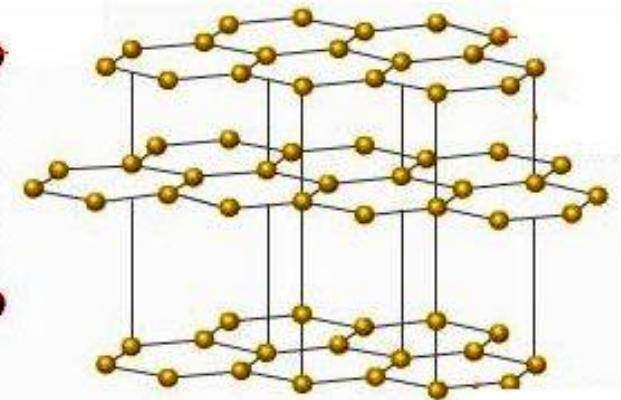
Struktura cząstki określa jej właściwości

Zmiany w rozmieszczeniu atomów określają czy materia jest bezwartościowa czy cenna, chora czy zdrowa. Ułożone w jeden sposób, atomy tworzą glebę, powietrze i wodę; ułożone w inny, tworzą (...) popiół i dym. "

- K. Eric Drexler



Struktura diamentu



Struktura grafitu

Zastosowanie



Definicja

Nanomateriał

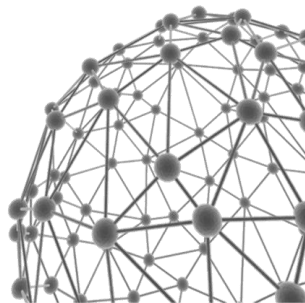
- nierozpuszczalny lub biotrwały,
- niereaktywny
- celowo wytworzony materiał

posiadający co najmniej jeden wymiar zewnętrzny lub strukturę wewnętrzną w **rozmiarze od 1 do 100 nm**

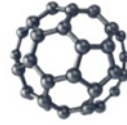
oraz

spełnia wymagania w których:

- 50% cząstek ma wielkość 1-100 nm co najmniej w jednym wymiarze,
- cząsteczki są w stanie swobodnym lub w formie agregatu, bądź aglomeratu.



Wielkość



Skuteczność i siła tkwi w rozmiarze

10 x mniejsza
od najmniejszego wirusa



200 x mniejsza
od najmniejszej bakterii



Wielkości cząstek aXonnite®

Atom

DNA

cząstka aXonnite

Wirus

Bakteria

Krwinki czerwone



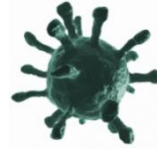
0, 1 nm



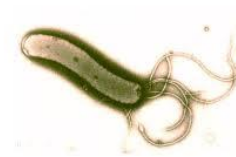
1nm



10nm



100nm



2000nm



10 000nm



Orzech włoski
0,018 m



Kartka A4
0,18m



Człowiek 1,8 m



Autobus
przegubowy
18 m



Stadion Narodowy
360m



Tor wyścigowy F1
1800m

Metody otrzymywania nanocząstek

BOTTOM – UP

BUDOWANIE NANOCZĄSTEK Z MNIEJSZYCH
ELEMENTÓW

Zaleta:

- najpopularniejsza
- najprostsza metoda wykorzystywana w chemicznym otrzymywaniu nanocząstek.

Wada:

- metoda ta obarczona jest obecnością wielu zanieczyszczeń, bardzo trudnych do usunięcia

TOP – DOWN

BUDOWANIE NANOCZĄSTEK PRZEZ
ROZDRABNIANIE WIĘKSZYCH CZĄSTEK

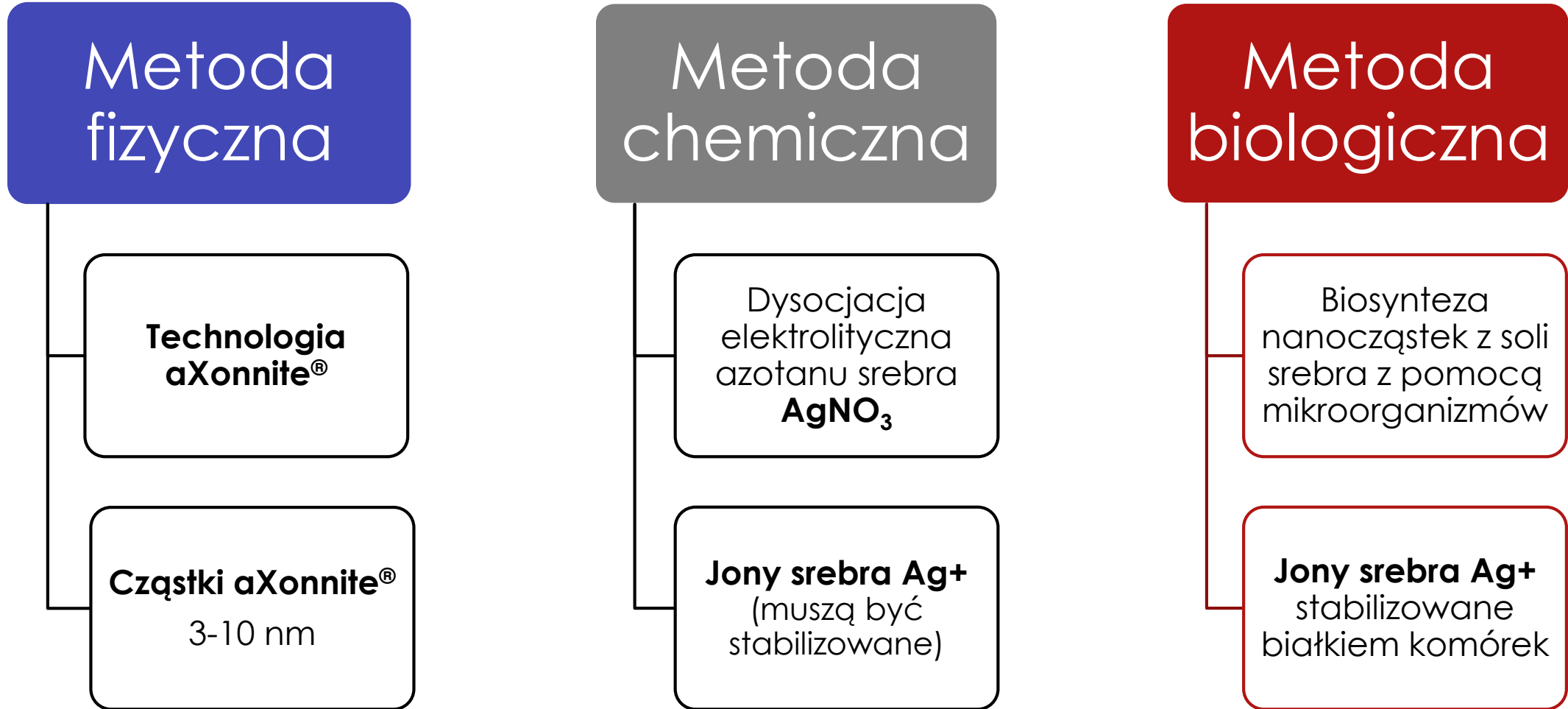
Zaleta:

- umożliwia osiągnięcie lepszej dokładności
- generuje mniej odpadów wykorzystywana w fizycznym procesie otrzymywania nanocząstek

Wada:

- wymaga współpracy i zaangażowania naukowców

Różne metody otrzymywania



Nanocząstki nanocząstkom nierówne

AgNO₃ + silny reduktor (NaBH₄)

Ag + 12H₂ + 12B₂H₆ + Na⁺



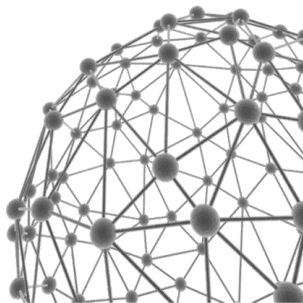
Stabilizacja nanocząstek chemicznych - problemy

- **REAKTYWNOŚĆ**

- po syntezie, nanocząstki w większości przypadków muszą być poddane funkcjonalizacji czyli stabilizacji otrzymanego układu w celu zapobieżenia powrotowi do postaci jonowej.

- **AGLOMERACJA**

- Używane stabilizatory zmniejszają napięcie powierzchniowe zapobiegając aglomeracji, ale równocześnie wpływają na sposób działania nanocząstki i wpływają na jakość i skuteczność jej działania



Stabilizacja nanocząstek chemicznych - problemy

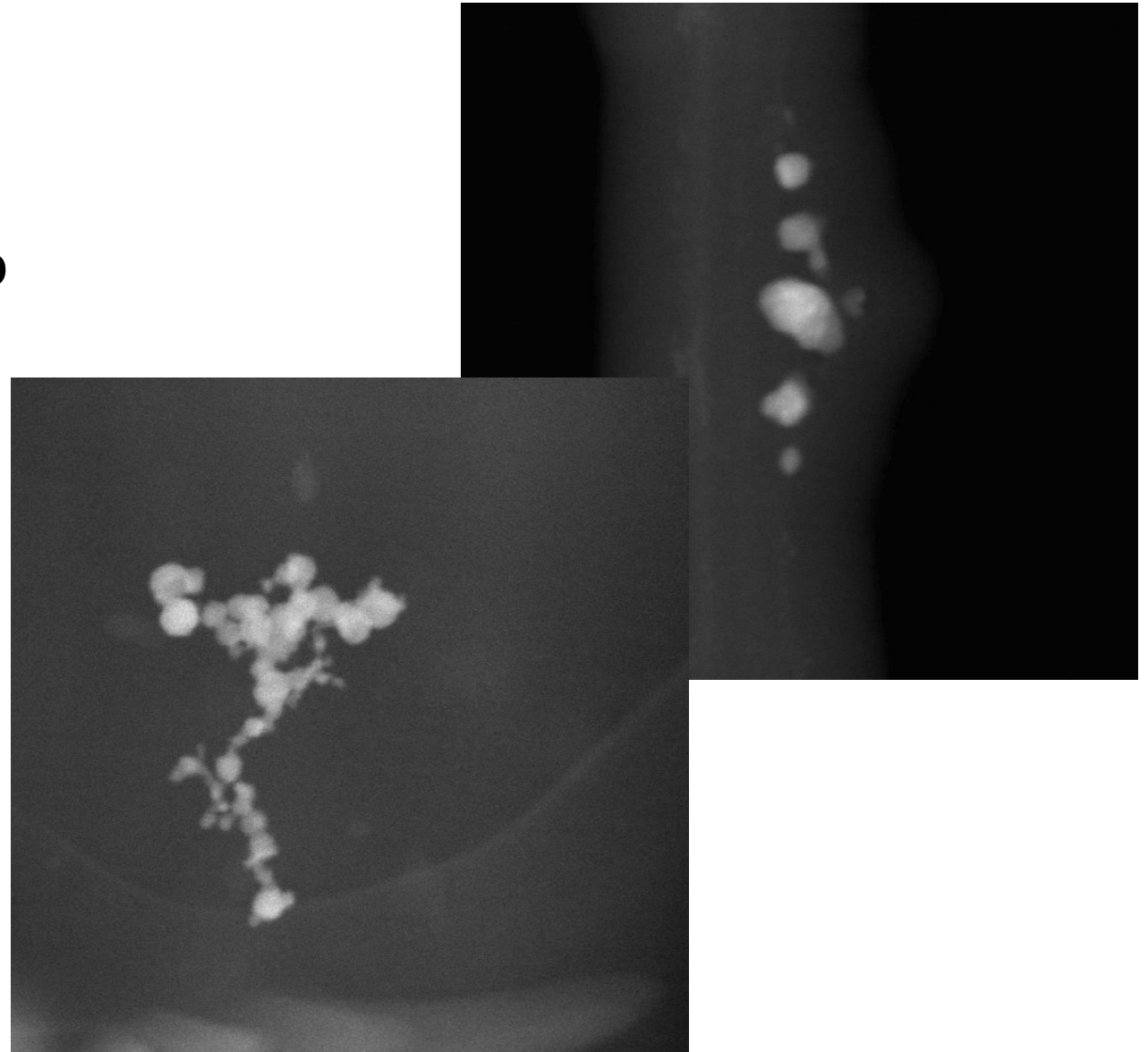
RODZAJE STABILIZATORÓW:

- **kwasy**, które jonami otaczają nanocząstkę utrzymując pojedyncze nanostruktury w pewnej odległości między sobą poprzez wzajemne odpychanie się jednoładunkowych jonów stabilizatora znajdujących się na powierzchni nanocząstki
- **środki powierzchniowo czynne**
- **polimery** o właściwościach antystatycznych (PVP) czyli takie, które zawierają atomy azotu, siarki czy fosforu, obdarzone wolną parą elektronową i możliwością rozłożenia ładunku na całej długości łańcucha, działanie antystatyczne w tym przypadku zwiększa się oczywiście wraz z ilością użytych podstawników czy łańcuchów bocznych

Technologia aXonnite[®]

Metoda wytwarzania

- umożliwia wytworzenie cząstek o jednolitej morfologii
- cząstki o zbliżonej wielkości
- wolne od zanieczyszczeń
- wolne od dodatkowych substancji stabilizujących

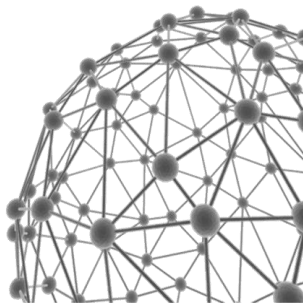


Dlaczego aXonnite[®]

UNIKATOWA, FIZYCZNA METODA OTRZYMYWANIA NANOCZĄSTEK

W TECHNOLOGII AXONNITE[®]

- brak konieczności użycia stabilizatorów
- bardzo małe rozmiary 2-8 nm
- wysoki stosunek powierzchni nanocząstek do ich masy pozwala na uzyskanie silnego efektu antymikrobowego już przy niskich stężeniach.
- czystość chemiczna produktu



aXonnite® - zakres produkcji

Metale aXonnite® :

Srebro

Złoto

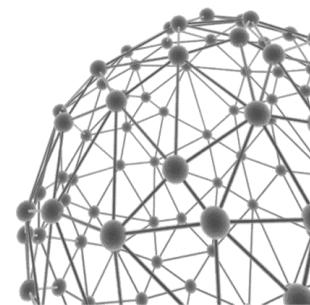
Miedź

Platyna

Pallad

stopy metali

Czystość 4N – 99,99%



Dlaczego aXonnite®?

Srebro Jonowe	aXonnite® Silver
biobójczość na średnim poziomie	wysoka biobójczość
silny reagent, może tworzyć np. toksyczne sole srebra – siarczki	neutralny chemicznie
ulega reakcji fotochemicznej – reaguje na UV	odporny na promieniowanie UV
----	duża powierzchnia czynna
100 000 x bardziej zanieczyszczone niż aXonnite Silver	bez zanieczyszczeń chemicznych, jest wytwarzany z czystego srebra Ag 4N 99,99%/
aktywność: a/ w określonych warunkach (odpowiednia temperatura i wilgotność) b/ malejąca w czasie	Wysoka aktywność

Czym jest koloid ?

Jest zawiesiną cząstek w jednej fazie skupienia (A) w układzie rozpraszającym znajdującym się w fazie skupienia (B).

Każda faza jest odrębnym indywiduum. Jednak trudnym do odseparowania.

- **dym** – cząstki stałe zawieszona w powietrzu (gaz)
- **bita śmietana** – cząstki tłuszczu zawieszona w powietrzu (gaz)
- **koloidy metali w wodzie**

Często koloidem są nazywane nie koloidy a rozwory

Koloid? - Roztwór?

O tym czy coś jest koloidem nie decyduje wielkość cząstki?

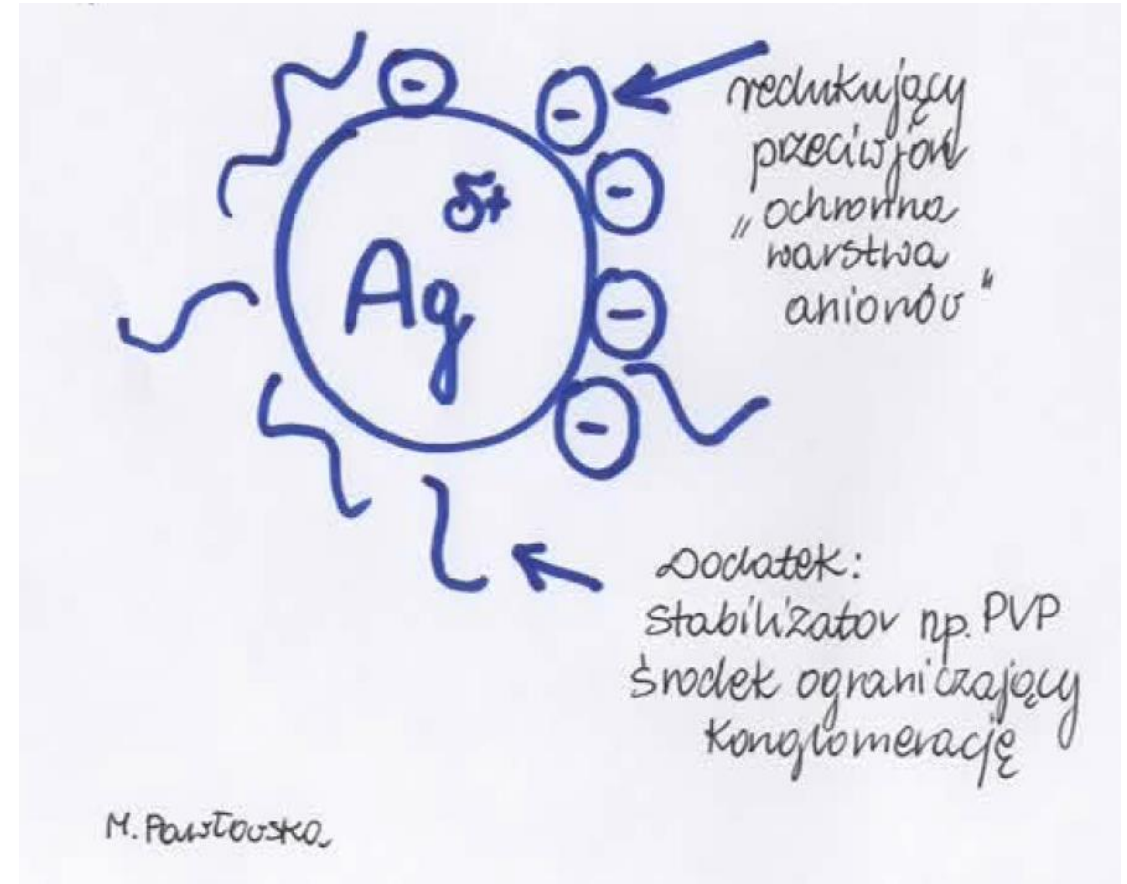
Niestety często jesteśmy tak właśnie wprowadzani w błąd, bo zazwyczaj każdy roztwór srebra tak jest traktowany co absolutnie nie jest prawdą, bo czy koloidem jest sól kuchenna?

Sól (*NaCl*) dysocjuje na jony: kationy i aniony i jest roztworem a nie koloidem.



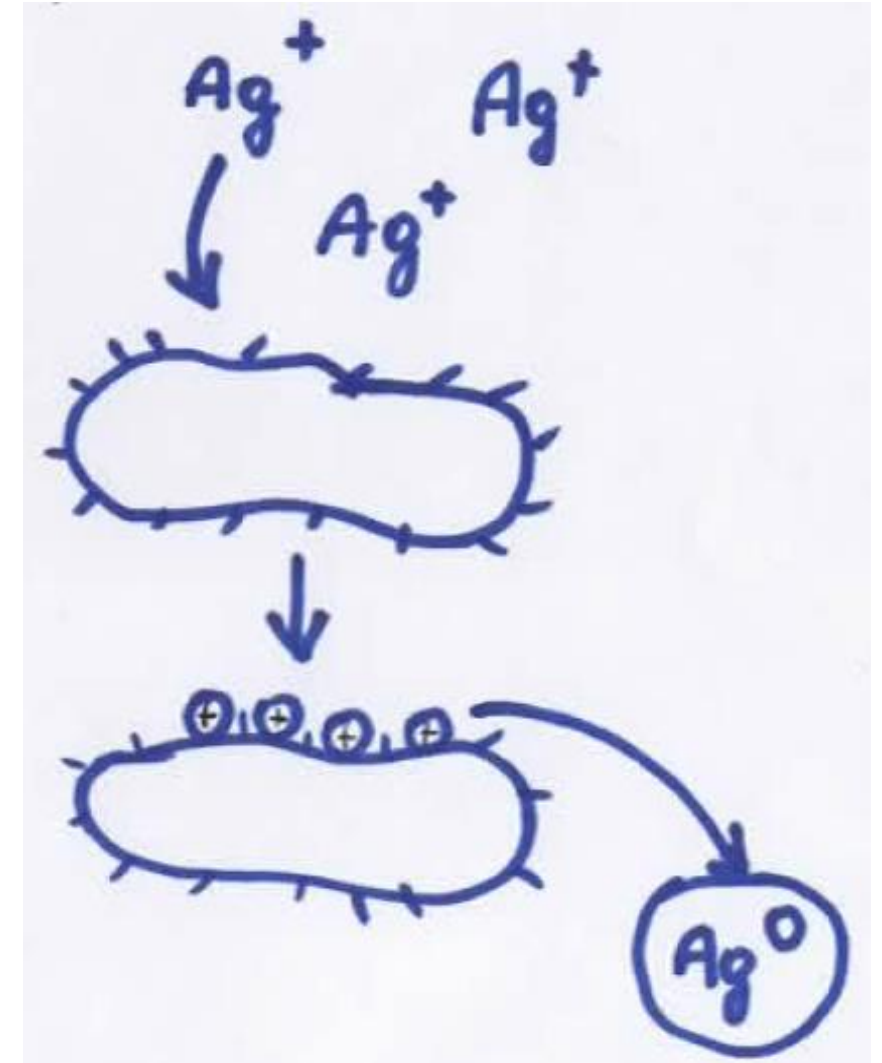
Synteza nanocząstek srebra

Synteza nanocząstek srebra odbywa się najczęściej przez redukcję jonów (kationów) srebra pozyskanych z reakcji **AgNO₃** (azotanu srebra) przy użyciu silnego reduktora **NaBH₄** (borowodorku sodu) w obecności stabilizatora takiego jak PVP (poliwinylopirolidon), który zapobiega agregacji.



Redukcja do nanocząstek

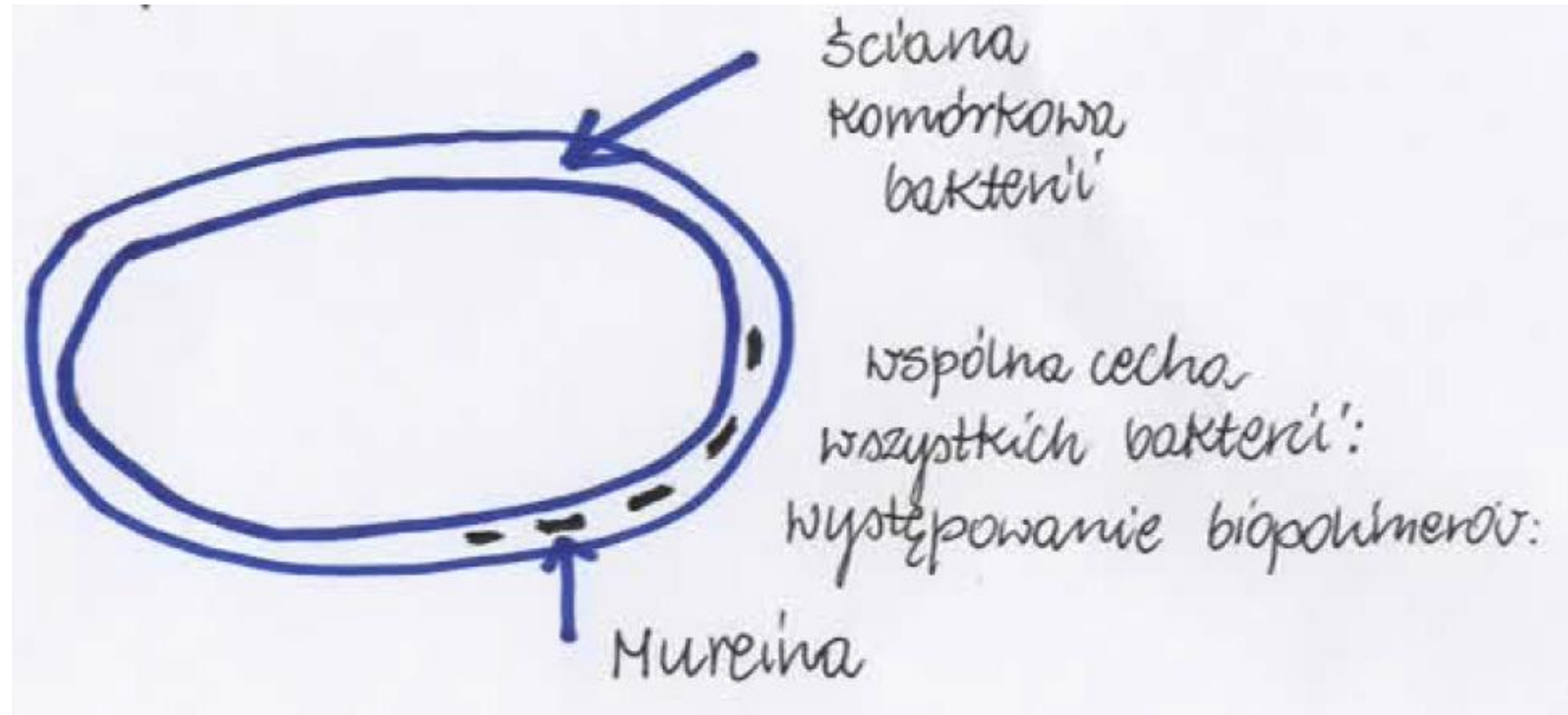
Taka również zależność jest widoczna w procesie w którym otrzymujemy nanocząstki chemicznie i biotechnologicznie czyli do produkcji nano cząstek zaprężone są bakterie, które poprzez czynniki redukujące na swojej powierzchni mają możliwość uzyskania nanocząstek



Działanie nanosrebra na bakterie

Ścian komórkowa bakterii zbudowana jest z wielu substancji, jednak wspólną cechą jest występowanie w ścianie komórkowej biopolimerów, tworzących szkielet:

- celuloza
- chityna
- mureina



Srebro działa wielokierunkowo

Mechanizm antymikrobowy polega na wielu procesach fizycznych:

- nanosrebro o strukturze bardzo rozdrobnionej daje możliwość działania na poziomie atomowym,
- posiada zdolność pochłaniania tlenu, zaabsorbowany tlen tworzy wgłębienia w błonach komórkowych przez co zwiększa się ich przepuszczalność
- generuje również wolne rodniki, które niszczą ściany komórkowe i doprowadza do śmierci bakterii
- nanosrebro reaguje z mureiną, uniemożliwiając procesy tzw. łańcucha oddechowego (przenoszenie ładunków i informacji), blokuje komórkowy system przepływu energii co dezaktywuje bakterie i doprowadza do jej śmierci.

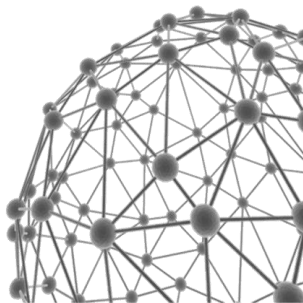
Srebro działa wielokierunkowo

Ponieważ komórki ssaków posiadają zupełnie inną powłokę (nie ma mureiny - peptydoglikanów), nanosrebro nie reaguje z komórkami człowieka, przez co są całkowicie bezpieczne.

- kolejnym z mechanizmów inaktywowania bakterii w kontakcie z nanosrebrem jest zdolność do wiązania srebra z DNA bakterii co hamuje replikację, a tym samym uniemożliwia rozmnażanie

Multiaktywny mechanizm dezaktywacji bakterii

- denaturacja białka
- uszkodzenie ściany komórkowej; zwiększenie przepuszczalności
- blokada łańcucha oddechowego
- wywołanie wstrząsu oksydacyjnego ROS (reaktywne formy tlenu)
- dezaktywacja enzymów
- hamowanie aktywności enzymatycznej i syntezy DNA



O złocie

- ▶ Znane od tysięcy lat jako symbol bogactwa i władzy
- ▶ W Chinach znane i stosowane od 4500 lat (od 2500 p.n.e)
- ▶ Od starożytności przypisywano mu cudowną moc uzdrawiania
- ▶ Właściwości bakterio-, wiruso- i grzybobójcze, odbudowuje kolagen
- ▶ Cenione jako surowiec w kosmetyce
- ▶ W organizmie ludzkim mamy ok. 10 mg, głównie w kościach
- ▶ Złoto jest obecne w plemnikach
- ▶ Wydalane jest z organizmu głównie z moczem (ok. 70 %),



O srebrze

- ▶ XVII w. używane do dezynfekcji wody, opisywane jako uniwersalny środek leczniczy
- ▶ 1901 r. pierwszy raz użyto koloidu srebra jako wewnętrzny środka antyseptycznego.
- ▶ Podczas I wojny światowej używane w celu zapobiegania infekcjom (przed antybiotykami)
- ▶ 1920 r. FDA (Food and Drug Administration) zatwierdziła używanie koloidów srebra jako środka antybakteryjnego.
- ▶ 2008 r. opublikowano antymikrobowe działanie nano srebra na węgliku.
- ▶ 2011 r. otrzymano eksperymentalny kompozyt dentystyczny,
- ▶ 2012 r. wykazano ponad wszelką wątpliwość działanie przeciwpóchnicowe
- ▶ Bywa składnikiem opatrunków i bandaży
- ▶ Działa również stymulująco na wzrost i rozwój komórek.



Badania cząstek aXonnite®

Nanocząstki otrzymywane w technologii aXonnite są wykorzystywane do badań w czołowych polskich placówkach naukowych takich jak:

Uniwersytet Warszawski - Wydział Biologii, Instytut Mikrobiologii, Zakład Genetyki Bakterii,

Narodowy Instytut Leków - dział badań cytotoksyczności i genotoksyczności

Śląska Akademia Medyczna - Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii,

SGGW - Wydział Nauk o Zwierzętach, Katedra Fizjologii Roślin

PAN - Instytut Fizyki

ITA TEST - Specjalistyczne Laboratorium Badawcze

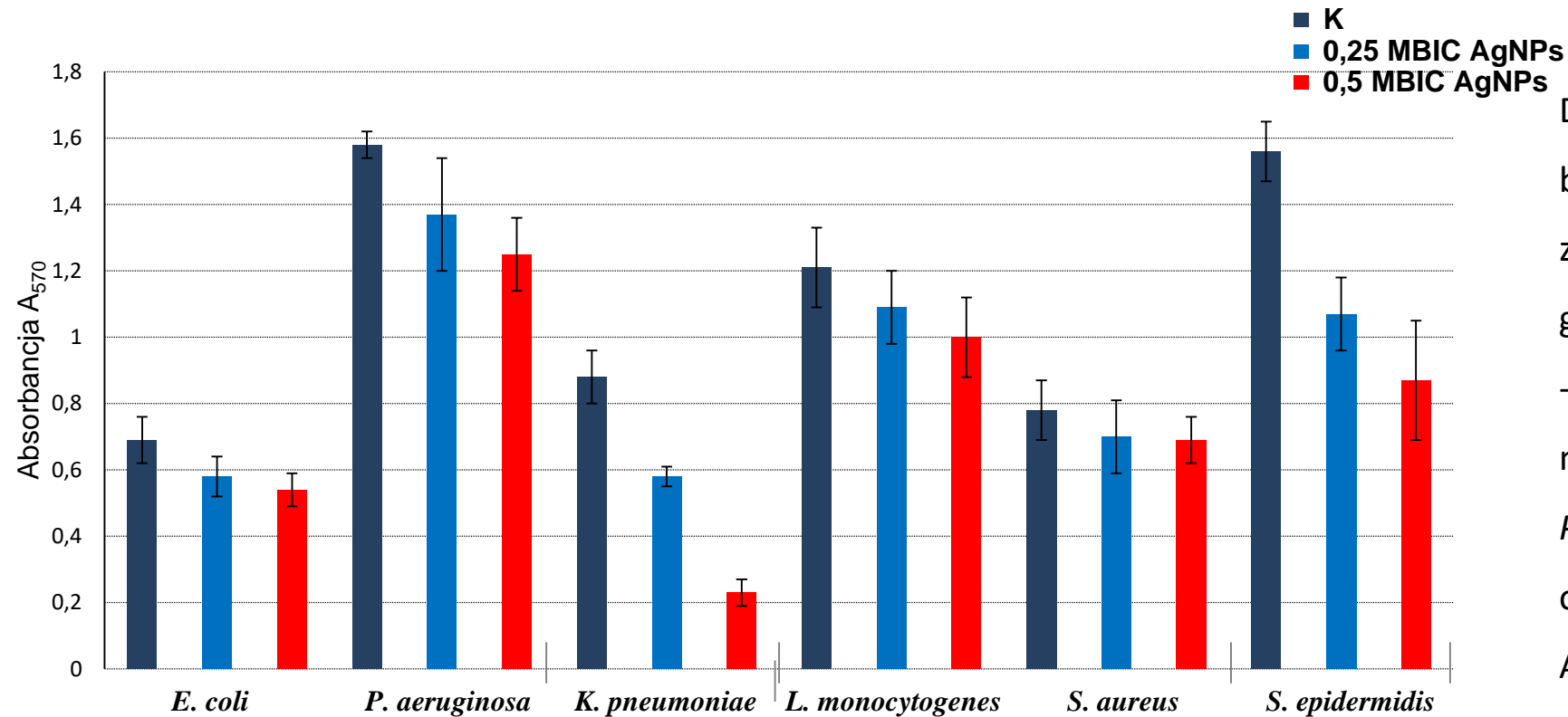


Badania Wrażliwości Bakterii na aXonnite Silver

/MIC oznaczono metodą klasyczną w podłożu odpowiednim dla bakterii / *

Bakteria	MIC µg/ml		
	aXonnite Silver	Tetracyklina	Streptomycyna
Escherichia coli (pałeczka okrężnicy)	12,5	180	128
Klebsiella pneu. (pałeczka zap. płuc)	5		120
Shigella sonnei (czerwonka, dyzenteria)	10		
Staphylococcus epidermidis (gronkowiec)	7,5	100	210
Staphylococcus aureus (gronkowiec zł.)	5		
Bacillus subtilis (lasecznik sianowy)	1	220	230

AgNPs hamują wzrost komórek w postaci biofilmu



Działanie hamujące tworzenie biofilmów zaobserwowano zarówno w przypadku bakterii gramu -jemnych, jak również gram -dodatnich przy czym efekt ten był najsilniej zanaczony u *P. aeruginosa*, *K.pneumoniae* oraz *S. epidermidis*.

Analizy przeprowadzono przy dawkach AgNPs 0,25 MBIC oraz 0.5MBIC

Biofilm bakterii wybarwiony fioletem krystalicznym. Czas inkubacji z **AgNPs 24h**

BEZPIECZEŃSTWO aXonnite[®] – cząstki przebadane in vitro pod kątem cyto- i genotoksyczności

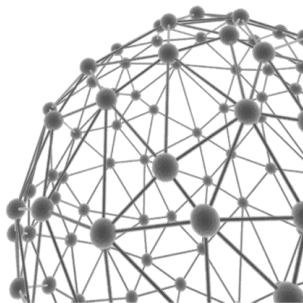
NARODOWY INSTYTUT LEKÓW W WARSZAWIE

ZAKŁADIE BIOCHEMII I BIOFARMACEUTYKÓW

*Linia komórkowa wykorzystana w badaniach: fibroblasty mysie NCTC klon 929, ATCC; zgodnie z normą
PN-EN ISO 10993-5, -3 i OECD 487*

Badaniom zostały poddane wszystkie cztery rodzaje nanocząstek:

- aXonnite[®] Gold
- aXonnite[®] Platinum
- aXonnite[®] Silver
- aXonnite[®] Copper



Wyniki Badań Genotoksyczności

badania symulujące metabolizm komórki

genotoksyczność metodą testu mikrojądrowego zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-3:2014 oraz PN-EN ISO 10993-12:2012

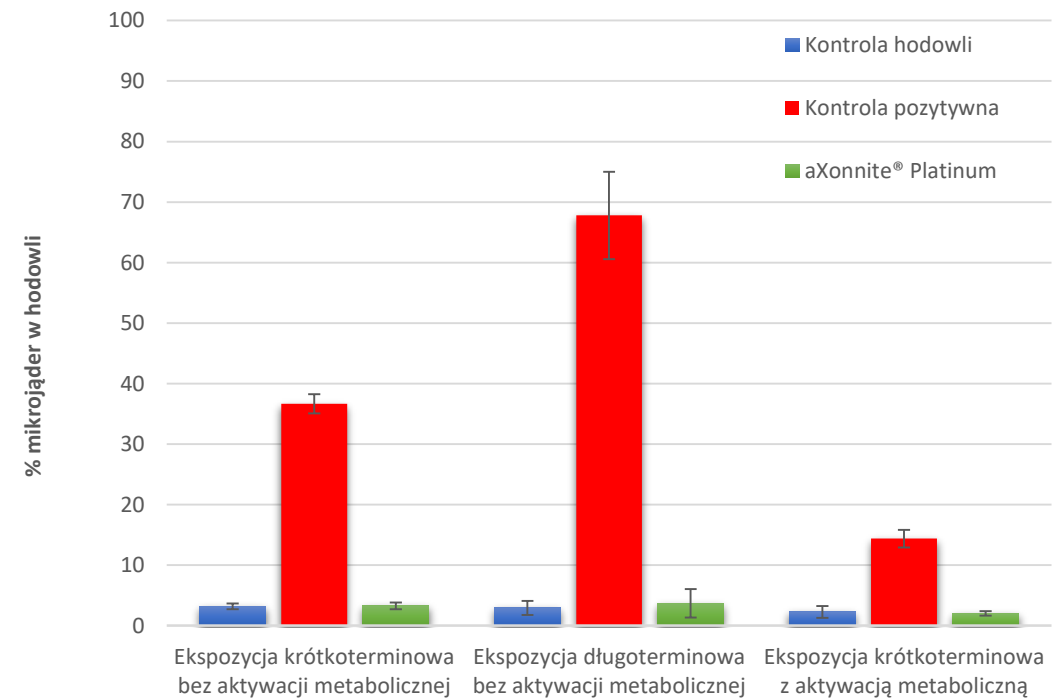
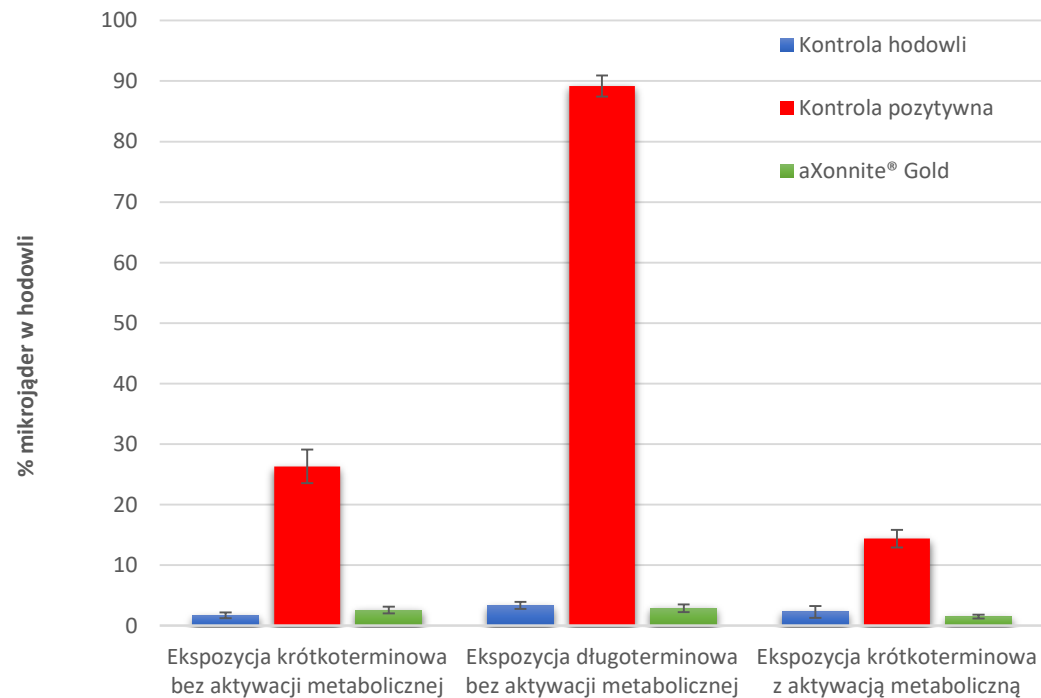
Badana próbka	% komórek zawierających mikrojądra	Wynik
aXonnite® Gold	1,51% ± 0,31%	Próbka niegenotoksyczna
aXonnite® Platinum	2,04% ± 0,36%	Próbka niegenotoksyczna
aXonnite® Silver	2,51% ± 0,50%	Próbka niegenotoksyczna
aXonnite® Copper	1,97% ± 0,23%	Próbka niegenotoksyczna

Cytotoksyczność *in vitro* metodą dyfuzji na agarze zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-5:2009 – wyniki badań:

aXonnite[®] Gold	próbka niecytotoksyczna	brak zmian morfologicznych w hodowlach
aXonnite[®] Platinum	próbka niecytotoksyczna	brak zmian morfologicznych w hodowlach
aXonnite[®] Silver	próbka niecytotoksyczna	brak zmian morfologicznych w hodowlach
aXonnite[®] Copper	próbka niecytotoksyczna	brak zmian morfologicznych w hodowlach

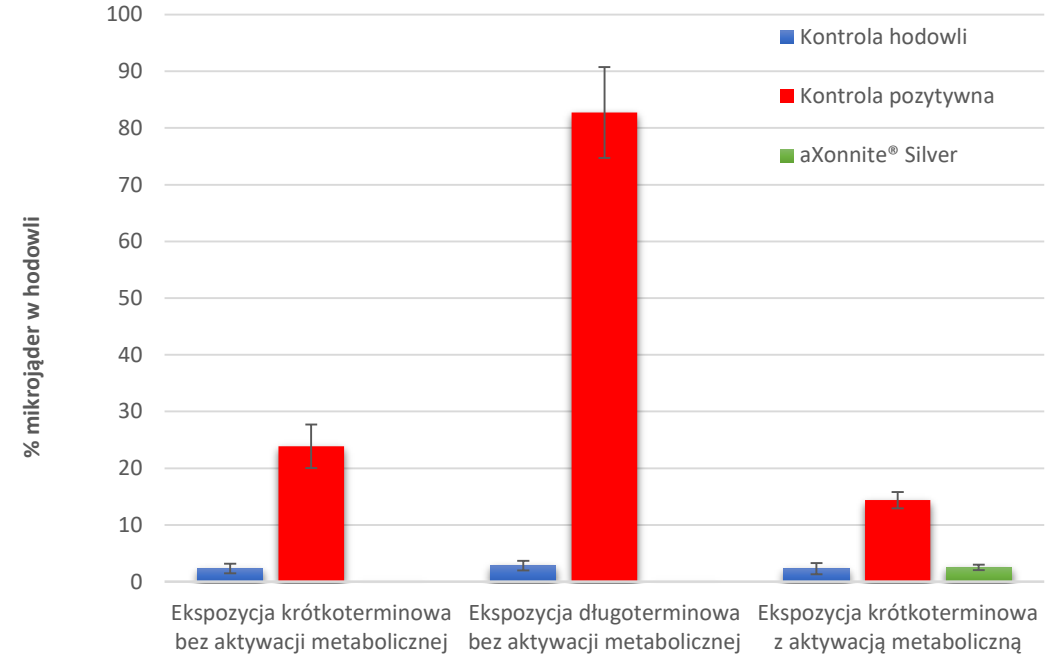
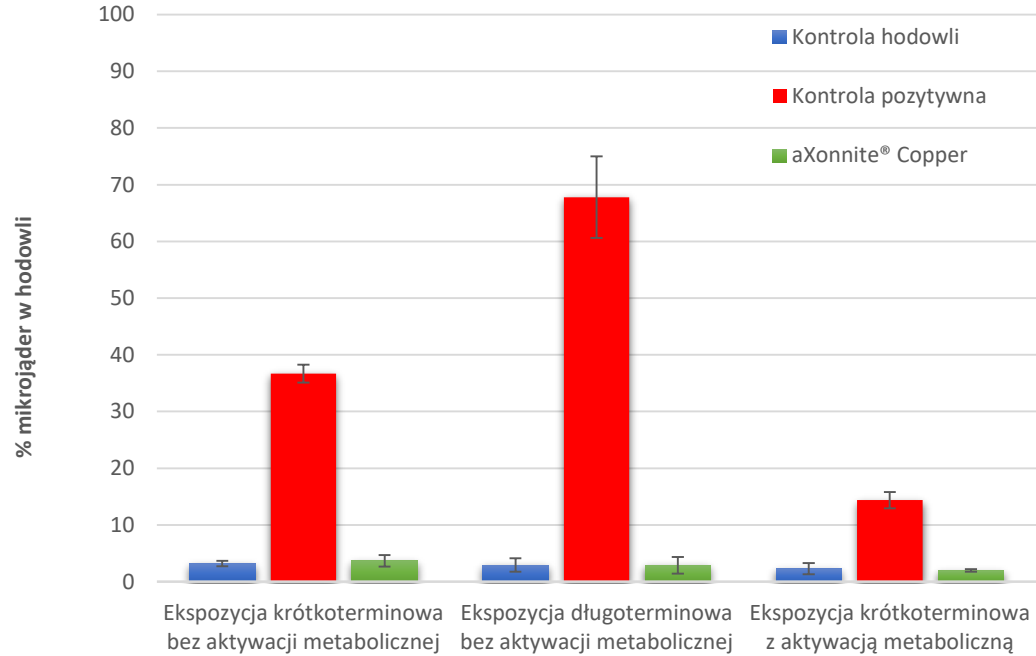
Wyniki Badań Genotoksyczności *in vitro*

genotoksyczność metodą testu mikrojądrowego *in vitro* zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-3:2014 oraz OECD 487



Wyniki Badań Genotoksyczności *in vitro*

genotoksyczność metodą testu mikrojądrowego *in vitro* zgodnie z normą PN-EN ISO 10993-3:2014 oraz OECD 487



NARODOWY INSTYTUT LEKÓW

NARODOWE LABORATORIUM KONTROLI PRODUKTÓW LECZNICZYCH, WYROBÓW
MEDYCZNYCH I PRODUKTÓW BIOBÓJCZYCH

ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOFARMACEUTYKÓW

aXonnite[®] Silver	- cytotoksyczność	- brak
	- genotoksyczność	- brak
aXonnite[®] Copper	- cytotoksyczność	- brak
	- genotoksyczność	- brak
aXonnite[®] Gold	- cytotoksyczność	- brak
	- genotoksyczność	- brak

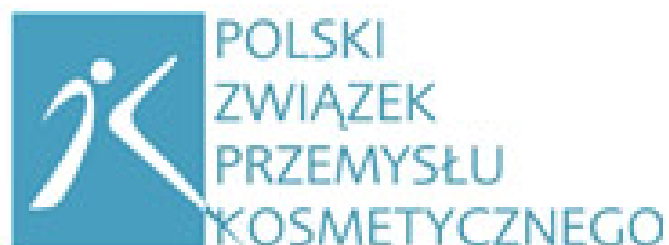
Jedynie cząstki przebadane na genotoksyczność i cytotoksyczność

WYNIKI BADAŃ POTWIERDZIŁY BIOZGODNOŚĆ *IN VITRO*

NANOCZĄSTEK AXONNITE[®].

Gwarancja jakości

Nano-Tech Polska jako jedyny producent nanocząstek wytwarza je zgodnie z normą dla wyrobów medycznych



Dane kontaktowe Nano-Tech Polska:

Dr Inż. Marta Pawłowska – m.pawlowska@nano-tech.pl

Jarosław Małek – j.malek@nano-tech.pl - +48 502 200 989