

WNIOSEK PROJEKTU DOKTORSKIEGO

Szkoła Doktorska Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu

| | |
|---|---|
| IMIĘ I NAZWISKO AUTORA PROJEKTU | Joanna Kwiecińska-Piróg |
| AFILIACJA AUTORA PROJEKTU (jednostka organizacyjna, telefon kontaktowy, adres e-mail) | Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu ul. Marii Curie Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz tel. 52 585 44 80, e-mail: gospodareke@cm.umk.pl |
| DYSCYPLINA NAUKOWA, W RAMACH KTÓREJ PROJEKT BĘDZIE REALIZOWANY (zaznaczyć właściwą) | <u>NAUKI FARMACEUTYCZNE</u> /NAUKI MEDYCZNE/ NAUKI O ZDROWIU |

CZĘŚĆ A:

OPIS PROJEKTU

| |
|---|
| 1. TEMAT PROJEKTU: |
| Określenie potencjału związków pochodzenia naturalnego wobec komórek planktonicznych i biofilmów szczepów wieloantybiotykoopornych <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 2. CEL NAUKOWY PROJEKTU I ZNACZENIE PODJĘTEGO PROBLEMU BADAWCZEGO (max. 3000 znaków ze spacjami): |
| <p>Zasadniczym celem naukowym projektu jest ocena wpływu związków pochodzenia naturalnego wobec komórek planktonicznych i biofilmów szczepów <i>Pseudomonas aeruginosa</i> o profilu wieloantybiotykooporności (multidrug-resistant, MDR) lub rozszerzonym profilem antybiotykooporności (extensively drug-resistant, XDR) izolowanych z zakażeń skóry i ran, jak również wyjaśnienie ich potencjalnego mechanizmu aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Związki pochodzenia naturalnego włączone do projektu to substancje aktywne występujące w roślinach - fitozwiązki o potencjalnym działaniu eradykującym bakterie, w tym: kwercetyna, kwas galusowy, allicyna, kwas rozmarynowy oraz D-limonen, które wykazują szereg korzystnych właściwości w leczeniu zakażeń skóry i ran. Badanie zostanie przeprowadzone na 100 szczepach gatunku <i>Pseudomonas aeruginosa</i> stanowiącego jeden z najczęstszych czynników etiologicznych zakażeń skóry i ran, szczególnie ran trudnogojących się. Ocena działania fitozwiązków na komórki planktoniczne i biofilm bakteryjny zostanie porównana z wynikami traktowania drobnoustrojów i ich formy biofilmowej antybiotykami należącymi do sześciu grup i stosowanymi w leczeniu zakażeń o etiologii <i>P. aeruginosa</i>, tj.: penicyliny z inhibitorami beta-laktamaz (piperacylina z tazobaktamem), cefalosporyny (ceftazydym), monobaktamy (aztreonam), , karbapenemy (imipenem), aminoglikozydy (gentamicyna) i fluorochinolony (ciprofloksacyna/lewowfloksacyna). Szczepy MDR klasyfikowane będą jako odporne na co najmniej trzy grupy leków przeciwdrobnoustrojowych. Natomiast jako XDR będą identyfikowane szczepy niewrażliwe na jeden z każdej z sześciu klas antybiotyków.</p> <p>Drugi etap badawczy będzie obejmował wybranie z grupy badanych związków roślinnych dwóch odznaczających się największym potencjałem w zakresie działania przeciwbiofilmowego, ocenę ich wpływu</p> |

na komórki planktoniczne i biofilm w połączeniu z dwoma antybiotykami - jednym wobec którego szczepy wykazują wrażliwość oraz drugim, wobec którego są niewrażliwe. W tym celu zostanie dokonana ocena frakcyjnych stężeń inhibicyjnych badanych związków, co pozwoli określić model interakcji pomiędzy nimi (synergizm/ addycja/ brak oddziaływań/ antagonizm).

Kolejny etap projektu badawczego stanowić będzie wyjaśnienie potencjalnego mechanizmu działania badanych związków. Cel realizowany będzie poprzez zestawienia właściwości biochemicznych badanych szczepów, uzyskanych wyników antybiotykowrażliwości, obecności genów związanych z czynnikami wirulencji, biorących udział w tworzeniu biofilmu oraz ocenę zmian pH zawiesiny w trakcie hodowli z badanymi związkami i lekami przeciwdrobnoustrojowymi. Wyniki opracowane zostaną z wykorzystaniem metod statystycznych.

Leczenie zakażeń skóry i tkanki podskórnej staje się rosnącym problemem w społeczeństwie, które coraz częściej dotyczy problem chorób przewlekłych, w tym chorób metabolicznych. Choroby te, m.in. cukrzyca, są istotnym podłożem do tworzenia się trudnogojących się ran. Zakażenie rany może prowadzić do bardzo poważnych powikłań, do których najgroźniejszych należą amputacje kończyn, wstrząs septyczny czy zgon. W profilaktyce zakażeń ran trudnogojących się stosuje się przede wszystkim zabiegi oczyszczające miejsce rany, środki antyseptyczne stosowane miejscowo, które nie wykazują cytotoksyczności i nie zakłócają procesów ziarninowania skóry. Miejscowe stosowanie antybiotyków nie jest wskazane, m.in. ze względu na utrudnioną penetrację antybiotyków w głąb biofilmu czy ich ograniczoną skuteczność wobec komórek bakteryjnych zorganizowanych w strukturę biofilmu jest znacznie ograniczona. Perspektywę w profilaktyce zakażeń ran trudnogojących się stanowią związki pochodzenia naturalnego, które nie zakłócają fizjologicznych procesów gojenia się ran, a mogą jednocześnie wykazywać działanie przeciwdrobnoustrojowe. Podjęcie badań przedstawionych jako cel niniejszego projektu służy określeniu potencjału fitozwiązków w profilaktyce, a być może również – leczeniu ran trudnogojących się o nieznacznym stopniu zaawansowania klinicznego.

3. KONCEPCJA I PLAN BADAŃ Z UWZGLĘDNIENIEM METODYKI (max. 4000 znaków ze spacjami):

Pierwszy etap badań stanowić będzie scharakteryzowanie dostępnych w kolekcji Katedry Mikrobiologii Collegium Medium im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu szczepów *P. aeruginosa* izolowanych z zakażeń skóry i ran, które zostały klinicznie rozpoznane jako rany trudnogojące się. Zostaną ocenione właściwości biochemicznych oraz zostaną zdefiniowane profile antybiotykowrażliwości – MDR lub XDR.

Z kolekcji wybranych zostanie 100 szczepów *P. aeruginosa* o fenotypie MDR lub XDR. U każdego szczepu zostanie oceniona obecność genów kodujących czynniki wirulencji biorące udział w tworzeniu biofilmu, np. otoczki alginianowej, elastazy czy fimbrii.

Wobec badanych szczepów planowane jest określenie minimalnego stężenia hamującego wzrost komórek planktonicznych drobnoustrojów (ang. minimal inhibitory concentration, MIC) wskazanych związków naturalnych (kwercetyny, kwasu galusowego, allicyny, kwasu rozmarynowego i D-limonenu) oraz wymienionych wcześniej antybiotyków: piperacylina z tazobaktamem, ceftazydym, aztreonam, imipenem, gentamycyna, ciprofloksacyna/lewofloksacyna. Wyniki inkubacji z fitozwiązkami będą odczytywane w punktach czasowych: 24, 48 i 72 godziny. Wykorzystana zostanie metoda mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym lub stałym w zależności od rozpuszczalnika badanego związku.

Uzyskane wartości MIC wybranych związków zostaną wykorzystane w dalszych etapach prac. Na podstawie wartości MIC oraz stężeń badanych związków, odpowiadających stężeniom osiąganym we krwi po doustnej suplementacji diety produktami spożywczymi, które charakteryzują się wysoką zawartością badanych fitozwiązków, zostaną ustalone stężenia tych związków, którymi będzie poddany biofilm badanych szczepów w celu określenia wartości minimalnego stężenia eradykującego biofilm (ang. minimal

biofilm eradication concentration, MBEC). Podczas analizy wpływu na biofilm zastosowane będą metody kolorymetryczne pozwalające ocenić parametry takie, jak masa i aktywność metaboliczna. Będzie podjęta próba analizy macierzy biofilmu z wykorzystaniem metod spektroskopowych we współpracy z Wyższą Szkołą Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Na podstawie otrzymanych wyników wybrane zostaną dwa fitozwiązki wykazujące największy potencjał przeciwbiofilmowy. Biofilm bakteryjny będzie poddawany działaniu badanych związków naturalnych, dwóch antybiotyków w tym jednego, na który szczep nie będzie wykazywał wrażliwości i drugiego wobec którego będzie wrażliwy, w celu sprawdzenia potencjalnej addycji działania oraz połączenia związku naturalnego z antybiotykiem w celu określenia oddziaływań pomiędzy nimi. W badaniu tym zostanie wykorzystana metoda „szachownicy”, która stanowi metodą referencyjną w badaniach oddziaływań pomiędzy różnymi związkami wobec drobnoustrojów.

W przypadku otrzymania wyników potwierdzających potencjał badanego połączenia, tj. związek naturalny i antybiotyk, kolejnym etapem będzie sprawdzenie skuteczności względem biofilmów utworzonych na powierzchni opatrunków koloidowych, które są stosowane w praktyce klinicznej podczas pielęgnacji zakażonych ran. Opatrunki będą suplementowane wybranym fitozwiązkiem w stężeniu, które będzie wykazywało właściwości hamujące tworzenie biofilmu *P. aeruginosa*. Opatrunki będą nakładane na skażone w kontrolowany sposób fragmenty uszkodzonych skór królików (symulacja warunków panujących w ranie). Po czasie 24, 48 i 72 godzin od założenia biofilmu będzie oceniana liczba bakterii izolowanych z rany. Stosunek ilościowy komórek bakterii w biofilmach utworzonych na powierzchni rany zostanie poddany ocenie z zastosowaniem metody ilościowego posiewu na podłoża stałe i zliczaniu wyrosłych kolonii.

Ostatnim etapem badań będzie analiza statystyczna uzyskanych wyników oraz próba scharakteryzowania korelacji pomiędzy zdolnością badanych szczepów do tworzenia biofilmu, ich właściwościami biochemicznymi, profilem antybiotykooporności MDR/XDR, obecnością określonych genów a podatnością na działanie związków pochodzenia naturalnego oraz wrażliwość na fitozwiązki w zależności od występowania drobnoustrojów w formie planktonicznej lub w strukturze biofilmu.

4. SPODZIEWANE ZNACZENIE WYNIKÓW BADAŃ Z OKREŚLENIEM WPŁYWU NA ROZWÓJ DYSCYPLINY (max. 1500 znaków ze spacjami):

Wyniki przeprowadzonego projektu badawczego pozwolą ocenić wpływ związków pochodzenia naturalnego wobec biofilmu tworzonego przez szczepy *P. aeruginosa*. Szczepy tego gatunku bardzo łatwo nabywają oporność na antybiotyki oraz związki antyseptyczne. Do wzrostu wymagają niewielkich ilości substancji odżywczych. Z uwagi na wytwarzane przez nie czynniki wirulencji, mają duży potencjał wywoływania zakażeń, przede wszystkim zakażeń skóry i tkanki podskórnej. Jednym z nich jest elastaza, która rozkłada elastynę obecną w strukturze skóry, jak również otoczka alginianowa, ułatwiająca tworzenie struktury biofilmu.

W związku z dużym udziałem pałeczek *P. aeruginosa* w zakażeniach ran trudnogojących się, w szczególności u pacjentów po oparzeniach termicznych, oraz potencjał generowania oporności na antybiotyki, konieczne jest poszukiwanie związków, które mogą być pomocne w profilaktyce czy leczeniu zakażeń o nieznacznym stopniu zaawansowania klinicznego. Rozwiązaniem mogą być fitozwiązki, które są powszechnie stosowane w medycynie ludowej w leczeniu oraz pielęgnacji zakażeń skóry i ran. Dokładne mechanizmy działania i zakres działania przeciwdrobnoustrojowego fitozwiązków nie są znane. Plan badań niniejszego projektu zakłada ocenę interakcji związków roślinnych z antybiotykami, co stwarza możliwości w dobie narastającej antybiotykooporności drobnoustrojów na odnalezienie nowej strategii terapeutycznej. Potwierdzenie aktywności skojarzenia antybiotyków z fitozwiązkami tworzy perspektywę

wprowadzenia ich do praktyki klinicznej, chociażby jako substancji wspomagających działanie antybiotyków. Planowane badania mają również na celu powiązanie uzyskanych wyników oceny przeciwdrobnoustrojowej badanych fitozwiązków z czynnikami wirulencji *P. aeruginosa* oraz ich profilem oporności na antybiotyki, co może stanowić podstawę do wyjaśnienia ich mechanizmu działania.

Wyniki otrzymane w niniejszych badaniach znacznie przyczynią się do rozwoju wiedzy w dyscyplinie nauk farmaceutycznych. Mogą stanowić etap przedklinicznej oceny przydatności działania badanych związków w leczeniu zakażeń skóry i ran.

PROJECT DESCRIPTION

| |
|---|
| 1. TITLE OF THE PROJECT: |
| Determination of the potential of natural origin compounds against planktonic cells and biofilms of MDR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains |
| 2. RESEARCH OBJECTIVE AND SIGNIFICANCE OF THE RESEARCH PROBLEM ADDRESSED: (max. 3000 characters with spaces) |
| |
| 3. CONCEPT, PLAN AND METHODOLOGY OF THE RESEARCH PROJECT (max. 4000 characters with spaces): |
| |
| 4. EXPECTED SIGNIFICANCE OF RESEARCH RESULTS AND IMPACT ON THE DEVELOPMENT OF THE DISCIPLINE (max. 1500 characters with spaces): |
| |