Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Marta Bauer

Próba zastosowania peptydów przeciwdrobnoustrojowych w prewencji infekcji bakteryjnych związanych z wykorzystaniem biomateriałów

Praca doktorska wykonana

w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik Katedry i Zakładu:

Prof. dr hab. Wojciech Kamysz

Promotor pracy:

Prof. dr hab. Wojciech Kamysz

Gdańsk 2019

Streszczenie

Intensywny rozwój medycyny przyczynia się do wprowadzania nowych strategii ratowania oraz wspierania ludzkiego zdrowia i życia. Cel ten osiągany jest przede wszystkim poprzez zastosowanie materiałów medycznych oraz projektowanie biomateriałów o nowych, lepszych właściwościach.

Szerokie wykorzystanie różnego rodzaju biomateriałów w postaci implantów, systemów dostarczania substancji leczniczych lub jako środka mającego poprawić komfort życia człowieka (np. cewniki urologiczne, soczewki kontaktowe, specjalistyczne opatrunki) przyczyniło się do powstania problemu jakim są infekcje związane z zastosowaniem biomateriałów. W dobie rosnącej antybiotykooporności występowanie zakażeń bakteryjnych wiąże się z ryzykiem niepowodzenia terapii, a w przypadku kolonizacji materiałów medycznych może skutkować koniecznością reoperacji pacjenta. Problem występowania infekcji bakteryjnych związanych z zastosowaniem biomateriałów jest poważny także ze względu na obecność biofilmu. Udowodniona podatność materiałów medycznych na kolonizację bakteryjną oraz wielokrotnie większa oporność drobnoustrojów tworzących biofilm na konwencjonalną antybiotykoterapię spowodowały, że obecnie jednym z głównych kierunków badań na świecie jest opracowywanie nowych biomateriałów lub modyfikacje ich powierzchni w taki sposób, aby zapobiegały zjawisku adhezji bakteryjnej.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie możliwości zastosowania peptydów przeciwdrobnoustrojowych, jako związków mogących zmieniać właściwości powierzchni materiałów medycznych tak, aby zapobiegały powstawaniu biofilmu. Związki wykorzystane w czasie doświadczeń otrzymano metodą syntezy na nośniku stałym w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej GUMed. Do testów włączono także polimyksynę B (lipopeptyd, wykorzystywany w terapii infekcji wywołanych obecnością drobnoustrojów Gram-ujemnych) w celu porównania aktywności wybranych związków.

Grupa wybranych AMPs składała się z 8 krótkich lipopeptydów (od 2 do 4 reszt aminokwasowych) zawierających w sekwencji różne połączenia lizyny i argininy oraz resztę kwasu tłuszczowego. We wstępnych badaniach wykorzystano także citropinę 1.1 oraz wspomnianą wcześniej polimyksynę B. Testy mikrobiologiczne prowadzono

wykorzystując szczepy referencyjne drobnoustrojów: *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 2532, *E. coli* ATCC 25922 oraz *P. aeruginosa* ATCC 9027. Na podstawie oznaczeń minimalnego stężenia hamującego wzrost, wpływu związków na tworzenie się biofilmu, ich aktywności w stosunku do dojrzałej struktury oraz wyników testu toksyczności względem ludzkich krwinek czerwonych wybrano 6, które zastosowano w procesach modyfikacji powierzchni materiałów: Palm-KK-NH_2, Palm-KR-NH_2, Palm-KRKK- NH_2, K-Dap(Palm)-K- NH_2, K-Orn(Palm)-K- NH_2, polimyksyna B.

Doświadczenia przeprowadzano wykorzystując komercyjnie dostępne wyroby medyczne: silikonowo-lateksowy cewnik urologiczny oraz hydrożelowe jednodniowe soczewki kontaktowe. Wybrane związki łączono z powierzchnią materiałów za pomocą inkubacji w roztworze (zarówno fragmenty cewnika jak i soczewki) oraz poprzez wiązanie kowalencyjne (soczewki). Obecność peptydów na powierzchni materiałów została zweryfikowana na podstawie spektroskopii w podczerwieni (ATR-FTIR). Przeprowadzono także próbę obserwacji procesu uwalniania związków z powierzchni.

Aktywność mikrobiologiczną zmodyfikowanych materiałów sprawdzono poprzez umieszczanie ich w inokulum bakteryjnym i weryfikację redukcji wzrostu drobnoustrojów (m.in. pomiar gęstości optycznej inokulum, posiew na agarze). Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy obejmowały także testy toksyczności wyżej wymienionych związków względem komórek mysich fibroblastów.

Otrzymane wyniki sugerują, że wybrane lipopeptydy mogą mieć zastosowanie w modyfikacji powierzchni biomateriałów, a w przypadku wykorzystanych wyrobów medycznych osiągają wyższą aktywność niż citropina 1.1. Dla większości związków redukcja wzrostu drobnoustrojów była widoczna dla materiałów modyfikowanych w stężeniach 16–32 µg/ml (inkubacja w roztworze) zarówno w przypadku fragmentów cewnika jak i przy wykorzystaniu soczewek kontaktowych.

Spośród zastosowanych metod najbardziej uniwersalna okazała się modyfikacja poprzez inkubację, a największą redukcję wzrostu bakterii osiągnięto dla soczewek kontaktowych (w zakresie stężeń aktywnych redukcja była równa bądź bliska 100%).

Badania cytotoksyczności peptydów względem linii komórkowej mysich fibroblastów potwierdziły, że związki te nie powodują spadku przeżywalności komórek poniżej 70% od stężenia 128 µg/ml (przy niższych wartościach przeżywalność wynosiła ok. 90–100%). Nie zaobserwowano także działania hemolitycznego peptydów w zakresie ich aktywności mikrobiologicznej.

Otrzymane wyniki potwierdzają, że warto rozwijać tematykę związaną z możliwościami wykorzystania AMPs w technologii biomateriałów charakteryzujących się właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Dla lepszego określenia ich biomedycznego przeznaczenia oraz wartości aplikacyjnych niezbędne są dalsze badania.

Abstract

Intensive development in medicine contributes to the implementation of new strategies for saving and supporting human health and life. This purpose is achieved by designing of medical materials with improving properties.

Extensive use of various types of plastics in the form of implants, drug delivery systems caused the problem called biomaterials–related infections. In the era of increasing antibiotic resistance, the occurrence of bacterial infections is connected with the risk of therapy failure. Bacterial colonization of medical materials may result in the necessity of the patient's reoperation. The problem of bacterial infections related to the use of biomaterials is also serious because of the presence of biofilm. Proven susceptibility of medical materials to bacterial colonization and much greater resistance of biofilm-forming microorganisms to conventional antibiotic therapy resulted in need of developing new biomaterials or modifying their surface to prevent the phenomenon of bacterial adhesion.

The aim of this PhD thesis was to investigate the possibility of using antimicrobial peptides (AMPs) as compounds that may change the properties of surfaces of medical materials in order to prevent the development of biofilm. The compounds used in the experiments were obtained by solid-phase peptide synthesis protocol in the Department of Inorganic Chemistry, MUG. Polymyxin B (lipopeptide, used in the therapy of Gram-negative bacterial infections) was also included in the tests in order to compare the activity of selected compounds.

The group of selected AMPs consisted of 8 short lipopeptides containing in a sequence different combinations of lysine/arginine and fatty acid residue. Citropin 1.1 and the polymixin B were also used in the preliminary studies. Microbiological tests were carried out using reference strains of bacteria: *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 2532, *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 9027. Based on the determination of the minimum inhibitory concentration, the effect of compounds on the formation of biofilm, their activity against mature structure and the results of the human red blood cell toxicity test, following lipopeptides were chosen: Palm-KK-NH_2, Palm-KK-KR-NH_2, Palm-KRKK-NH_2, K-Dap(Palm)-K-NH_2, K-Orn(Palm)-K-NH_2, Polymyxin B. They were used in the processes of material surface modifications.

The experiments were conducted using commercially available medical devices: silicone-latex urinary catheter and hydrogel, daily disposable contact lenses. Selected compounds were combined with the surface of materials by incubation in solution (both catheter fragments and lenses) and by covalent bonding (lenses). The presence of peptides on the surface of the materials was verified by infrared spectroscopy (AT-FTIR). The degree of release of compounds from the surface of materials was also evaluated.

Antimicrobial activity of modified materials was examined by incubation in bacterial inoculums. Reduction of bacterial growth was observed using e.g. spectrophotometric measurement of inoculum density, agar culture. The studies carried out during this study included also tests of toxicity of the above mentioned compounds to mice fibroblast cells.

Obtained results suggest that selected lipopeptides may be useful in the reduction of microbial growth on medical materials. Modified surfaces were effective in concentration 16–32 µg/ml (incubation in solution) for both catheter fragments and contact lenses.

Among the methods which were used, modification by incubation proved to be more effective and the greatest reduction of bacterial growth was achieved for contact lenses (in the range of active concentrations the reduction was equal or close to 100%).

Studies on the toxicity of peptides to mice fibroblast line confirmed that these compounds do not cause a decrease in cell survival below 70% from 128 µg/ml (at lower concentration survival values were about 90–100%).

The results obtained in this study show that it is worthwhile to develop the following topics with the potential use of antimicrobial peptides in biomaterials technology. Further research is needed to better define their biomedical application values.