

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej



**Aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych
wobec biofilmu gronkowcowego w warunkach przepływowych**

Maciej Jaśkiewicz

Praca doktorska wykonana
w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Katedry i Zakładu
Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Kamysz
Promotor
Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Kamysz

Gdańsk 2019

I. STRESZCZENIE

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) jest gatunkiem bakterii chorobotwórczych odpowiedzialnym za szereg infekcji u ludzi i zwierząt. Częstość zakażeń *S. aureus* związany jest przede wszystkim z faktem, że ok. 30% społeczeństwa jest bezobjawowymi nosicielami tych bakterii, które w sprzyjających warunkach mogą powodować infekcje oportunistyczne. Heterogeny charakter tych zakażeń dodatkowo determinowany jest przez występowanie wielu szczepów, zróżnicowanych pod względem posiadanych czynników zjadliwości oraz mechanizmów oporności na antybiotyki. Niewątpliwie do najważniejszych z klinicznego punktu widzenia należą szczepy metycylinooporne (MRSA). Według raportów Światowej Organizacji Zdrowia bakterie te należą do szczególnej grupy patogenów, wobec których wymagane jest opracowanie nowych terapii przeciwdrobnoustrojowych.

Do najważniejszych infekcji powodowanych przez *S. aureus* należą zakażenia skóry i tkanek miękkich, zakażenia kości (*osteomyelitis*), krwi oraz infekcyjne zapalenie wsierdza (*endocarditis*). Ponadto gronkowce złociste wielokrotnie są przyczyną zakażeń szpitalnych będące powikłaniem po zabiegach lub stosowaniem biomateriałów. W ostatnim przypadku szczególną rolę odgrywa zdolność gronkowców do tworzenia biofilmu.

Biofilm jest to struktura, która może być zdefiniowana jako dobrze zorganizowana społeczność drobnoustrojów, związana z powierzchnią i otoczona macierzą pozakomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM). Bakterie związane z biofilmem, wykazują odmienny fenotyp, który zabezpiecza je przed działaniem czynników zewnętrznych takimi jak aktywność układu odpornościowego czy substancje przeciwdrobnoustrojowe. Niewątpliwie z tego względu najważniejszą i zarazem najbardziej kluczową z klinicznego punktu widzenia cechą biofilmu jest jego oporność na antybiotyki. Postuluje się, iż stężenia efektywne wobec tej struktury mogą być nawet 1000-krotnie wyższe w porównaniu do form planktonowych. Ponadto najnowsze dane epidemiologiczne wskazują, że ok. 80% przetrwałych i nawracających infekcji związanych jest z obecnością biofilmu.

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. *antimicrobial peptides*, AMPs) należą do substancji szeroko rozpowszechnionych w naturze i stanowią kluczową składową odporności nieswoistej u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Cechą charakterystyczną tych związków jest szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, która swym zasięgiem obejmuje zarówno bakterie, grzyby, pierwotniaki oraz wirusy. Ponadto, w odróżnieniu od klasycznych antybiotyków charakteryzują się wysoką aktywnością wobec biofilmu. Na ogół związki te posiadają do 50 reszt aminokwasowych i wykazują charakter amfifilowy. Ze względu na dużą zawartość reszt zasadowych takich jak arginina czy lizyna, AMPs wykazują wypadkowy ładunek dodatni co umożliwia m.in. wiązanie się z ujemnie naładowanymi błonami mikroorganizmów, doprowadzać do ich dezintegracji, a w efekcie prowadzić do lizy komórek. Mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego AMPs jest dwukierunkowy i opiera się na bezpośrednim zabijaniu drobnoustrojów oraz stymulacji układu odpornościowego. W wypadku tego pierwszego, niszczenie i dezintegracja błon komórkowych opiera się na początkowych oddziaływaniach AMPs z ich powierzchnią. Dlatego też, postuluje się, że rozwój oporności na peptydy przeciwdrobnoustrojowe może być utrudniony. Dzięki swojej budowie i właściwościom, możliwości syntezy chemicznej oraz łatwości modyfikacji, AMPs stanowią doskonałą matrycę do opracowywania nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych.

Celem pracy doktorskiej było zbadanie aktywności wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs) wobec biofilmu gronkowcowego w warunkach przepływowych. Przewagą tego podejścia jest to, iż pozwalają na formowanie oraz badanie biofilmu w warunkach kontrolowanych. Możliwe jest regulowanie m.in. temperatury, dostępu do substancji odżywczych (pożywki) oraz szybkości przepływu. Ponadto udowodniono, że cyrkulacja cieczy indukuje powstanie sił ścinających na granicy ciecz-biofilm, co wpływa na wielkość biofilmu, jego kształt oraz ilość ECM. W rezultacie, to w jakich warunkach zostanie on uformowany może przekładać się na jego oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe. Modulowanie charakterystyki biofilmu poprzez

zastosowanie przepływu cieczy w znacznym stopniu pozwala na odtworzenie warunków spotykanych *in vivo*. Realizacja celu pracy poprzedzona została dokładnymi analizami mikrobiologicznymi wobec szeregu syntetycznych związków, a do badań wykorzystano referencyjne jak i kliniczne szczepy *S. aureus*.

W pierwszym etapie scharakteryzowano szeroki wachlarz szczepów klinicznych pod kątem wrażliwości na antybiotyki konwencjonalne oraz wybrane AMPs takie jak CAMEL, Citropina 1.1, LL-37, Pexiganan oraz Temporyna A. Udowodniono, że wrażliwość szczepów *S. aureus* na AMPs jest niezależna od mechanizmów oporności na antybiotyki, dzięki czemu zasadne było wytypowanie reprezentatywnej grupy szczepów, wobec których realizowane były dalsze prace. W kolejnym etapie zweryfikowano wpływ wymiany przeciwjonów w peptydach oraz oceniono aktywność analogów o odwróconej sekwencji. Na podstawie badań mikrobiologicznych oznaczeń cytotoksyczności wobec ludzkich erytrocytów (stopień hemolizy) oraz linii komórkowej keratynocytów ludzkich (HaCaT) udało się wytypować AMPs o najwyższym potencjale. Związkami wykazującymi najlepsze właściwości okazał się Omiganan, analog Indolicydyny – peptydu pozyskanego z ziarnistości neutrofilów bydłęcych oraz jego analog o odwróconej sekwencji (retro-Omiganan).

W ramach pracy doktorskiej dodatkowo opracowano unikalne układy przepływowe z poli(dimetylosiloksanu) (PDMS), które umożliwiły ocenę eradykacji biofilmu utworzonego w przepływie, realizację badań wpływu długotrwałej ekspozycji peptydów na profil wrażliwości *S. aureus* oraz weryfikację czy inkorporacja Omigananu i retro-Omigananu do wnętrza kanału zahamuje rozwój biofilmu *S. aureus* w przepływie. Wyniki badań mikrobiologicznych ostatecznie potwierdziły wysoki potencjał obu związków oraz opracowana została metodyka badawcza pozwalająca na realizację badań w przepływie dla innych związków.

II. SUMMARY

Staphylococcus aureus is considered one of the leading pathogens responsible for a number of infections in humans and animals. The incidence of *S. aureus* is mainly related to the fact that about 30% of the population is asymptomatic carriers of these bacteria, which in favorable conditions can cause opportunistic infections. The heterogeneous nature of these infections is further determined by the occurrence of multiple strains, differentiated by several virulence factors and mechanisms of antibiotic resistance. Undoubtedly, the most important of the clinical point of view are the methicillin-resistant strains (MRSA). According to reports of the World Health Organization, the MRSA belong to a particular group of pathogens, which require the development of new antimicrobial therapies.

Skin and soft-tissue infections (SSTIs) are the most frequent ones associated with the presence of *S. aureus*. However, these bacteria can lead to osteomyelitis, bacteremia, bloodstream infections, endocarditis, or even sepsis. Moreover, *S. aureus* is responsible for several nosocomial infections which often occur as a complication of surgery or use of biomaterials. Furthermore, in the latter case, the ability to form biofilm plays a pivotal role.

Biofilm is a structure that can be defined as a well-organized microbial community, associated with the surface and surrounded by an extracellular matrix (ECM). Biofilm-associated bacteria exhibit a different phenotype that protects them from external factors such as activity of immune system or antimicrobial substances. Nevertheless, the most important and at the same time the most critical characteristic of the biofilm is enhanced resistance to antibiotics. It is indicated that the concentrations effective against this structure can be up to 1000-times higher compared to planktonic forms. In addition, the latest epidemiological data highlight that approximately 80% of persistent and recurrent infections are associated with the presence of the biofilm.

Antimicrobial peptides (*antimicrobial peptides*, AMPs) are compounds widely distributed in nature being a key component of non-specific immunity in prokaryotic

and eukaryotic organisms. They are characterized by wide spectrum of antimicrobial activity, which covers both bacteria, fungi, protozoa and viruses. Moreover, they are characterized by high activity against biofilm. Naturally occurring AMPs can vary in size and most of them do not have more than 50 amino acids in sequence. The majority are cationic molecules containing about 50% of hydrophobic amino acids. Such properties allow them to electrostatically interact with a negatively charged bacterial surface, which leads to disruption of a cell membrane, and thus cell lysis. The antimicrobial mechanism of AMPs is bidirectional and is based on the direct killing of microorganisms and stimulation of the immune system. Therefore, it is postulated that the development of resistance to the AMPs may be hindered. As a matter of fact, the amino acid-based structure as well as approaches of chemical synthesis indicate that AMPs are an excellent matrix for new antimicrobials development.

The aim of the doctoral thesis was to investigate the activity of selected (AMPs) against *S. aureus* under flow conditions. The advantage of this approach is that it allows the formation and examination of the biofilm under controlled conditions. It is possible to regulate the temperature, access to nutrients (culture medium) and flow velocity. In addition, it is proved that the circulation of liquids induces the formation of shear forces at the boundary of the liquid-biofilm, which influences the size of the structure, its shape and the quantity of the ECM as well. This should be noted that above mentioned factors are critical for antimicrobial resistance. Moreover, the modulation of the biofilm characteristics by flow conditions allows to reproduce the conditions encountered in *vivo*. The objective of the work was preceded by thorough microbiological analyses of a number of synthetic compounds, and the reference as well as clinical strains of *S. aureus*.

In the first phase, a wide range of clinical strains was characterized in terms of susceptibility to conventional antibiotics and selected AMPs such as CAMEL, Citropin 1.1, LL-37, Pexiganan and Temporin A. This should be noted that the susceptibility profile of tested strains has indicated that the bactericidal activity of AMPs is independent of mechanism of resistance. As a result, it was easier to predict a representative group of strains for which further experiments has been carried out. In

the next stage, the effect of counter-ion exchange in peptides was verified and the activity of analogs with reversed-sequence was evaluated (*retro analog concept*).

Based on previous microbiological studies and the cytotoxicity determinations against human erythrocytes and cell line of keratinocytes (HaCaT), it was possible to choose the compounds AMPs with the highest potential. Among all peptides, the Omiganan, an analogue of Indolicin, a peptide derived from bovine neutrophil granules and its retro analog (retro-Omiganan) were indicated as the most potent ones.

During the experiments carried out for the doctoral thesis the unique flow systems made of polydimethylsiloxane (PDMS) were developed. These systems enabled the evaluation of biofilm eradication under flow conditions and the implementation of the effect of long-term exposure of peptides as well as its impact on susceptibility profile of *S. aureus*. Moreover, it allowed verification whether the incorporation of Omiganan and retro-Omiganan into the channels will inhibit the development of *S. aureus* biofilm under flow conditions.

The results of the microbiological tests ultimately confirmed the high potential of the Omiganan and retro-Omiganan against *S. aureus* and its biofilm. Moreover, the developed research methodology allows the implementation of the studies under flow conditions for other compounds.