

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL IX: CHRURGIE I
OTO-RINO-LARINGOLOGIE

ALINA ANDREEA TISCHER (TUCUINA)



TEZĂ DE DOCTORAT

NOI PERSPECTIVE DE ABORDARE A
BIOFILMULUI ÎN AFECȚIUNILE DIN SFERA ORL

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. MARIOARA POENARU

REZUMAT

Timișoara
2019

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ.....	1
I. BIOFILMUL	1
I.1 Introducere	1
I.2 Biologia biofilmului.....	2
I.3 Formarea biofilmului	6
II. BIOFILMUL ÎN AFECȚIUNILE OTO-RINO-LARINGOLOGICE	9
II.1 Otita medie cronică	11
II.2 Rinosinuzita cronică.....	13
III. ABORDĂRI TERAPEUTICE ACTUALE ALE BIOFILMULUI	14
III.1 Tehnici native de identificare a biofilmului	15
III.2 Mecanisme de rezistență la toleranța biofilmului	19
III.2.1. Toleranța fizică	21
III.2.2. Toleranța fiziologică	21
III.2.3. Toleranța adaptivă	22
III.3 Strategii de combatere a biofilmului	23
III.3.1 Prevenirea biofilmului.....	24
III.3.2 Slăbirea biofilmului.....	26
III.3.2.1 Interferența cu factorii virulenți	27
III.3.2.2 Interferența cu sensibilizarea cvorumului	28
III.3.2.3 Interferența cu metabolismul fierului.....	29
III.3.2.4 Interferența cu sARN-urile.....	30
III.3.3 Perturbarea/dispersarea biofilmului.....	31
III.3.4 Distrugerea directă a biofilmului	33
III.3.4.1 Terapiile simple.....	33
III.3.4.2 Terapiile combinate.....	34
PARTEA SPECIALĂ.....	36
I. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA AGENȚILOR BIOCHIMICI DE INTERES TERAPEUTIC ÎN COMBATEREĂ BIOFILMULUI	36
I.1 Introducere	36
I.1.1 Nanoparticulele în domeniul medical	40
I.1.2 Plantele medicinale.....	44
I.1.2.1 Aspecte generale	44
I.1.2.2 <i>Rosmarinus officinalis</i>	46
I.1.2.3 Extractele și rolul de catalizator în obținerea nanoparticulelor metalice	47
I.2 Materiale și metode	48
I.2.1 Materiale.....	48
I.2.2 Prepararea și caracterizarea extractelor	48
I.2.3 Obținerea și caracterizarea nanoparticulelor metalice.....	51
I.2.4 Evaluarea activității antimicrobiene (AAM)	51
I.2.5 Evaluarea activității citotoxice	52
I.2.6 Date statistice	52

I.3 Rezultate și discuții	53
I.1.3.1 Caracterizarea extractelor.....	53
I.1.3.2 Caracterizarea nanoparticulelor metalice	55
I.1.3.3 Activitatea antimicrobiană	57
I.1.3.4 Activitatea citotoxică	60
II. ANTIBIOTICELE ȘI EXTRACTELE DIN PLANTE. SINERGISM, ANTAGONISM ȘI POTENȚARE.....	68
II.1 Noțiuni introductive	68
II.2 Materiale și metode.....	71
II.2.1 Teste preclinice.....	71
II.2.1.1 Metoda de difuzie pe disc	72
II.2.1.2 Formarea biofilmului	73
II.2.1.3 Inhibarea biofilmului la diferite concentrații de sușă bacteriană.....	74
II.2.1.4 Activitatea anti-biofilm a nanoparticulelor de argint obținute prin biosinteză	74
II.2.1.5 Activitatea nanoparticulelor de argint biosintetizate în combinație cu antibiotice.....	75
II.2.1.6 Teste clinice asupra bacteriilor din sfera ORL	77
II.3 Rezultate și discuții	77
II.3.1 Activitatea antibacteriană	77
II.3.2 Formarea biofilmelor	80
II.3.3 Inhibarea formării de biofilme de către nanoparticulele de argint	81
II.3.4 Asocierea dintre antibiotice și nanoparticulele de argint	86
II.3.5 Comportamentul bacteriilor în teste clinice.....	93
III. DATE STATISTICE ȘI RELEVANȚA ABORDĂRII CLINICE ÎN AREALUL BIOFILMULUI CORELAT AFECȚIUNILOR DIN SFERA ORL	94
III.1 Aspecte generale	94
III.2 Materiale și metode.....	98
III.2.1 Designul studiului.....	98
III.2.2 Participanții la studiu	98
III.3 Rezultate și discuții	98
CONCLUZII	110
BIBLIOGRAFIA	113

TEZA DE DOCTORAT

Noi perspective de abordare a biofilmului în afecțiunile din sfera ORL

Rezumat

Biofilmele sunt structuri eterogene compuse din celule bacteriene înconjurate de o matrice și atașate la suprafețe solide. Deoarece biofilmele sunt deosebit de problematice în medicină, schimbul de cunoștințe despre modul în care diferite organisme se formează și se dispersează din biofilme și despre modul în care microbii de biofilm diferă de cei planctonici sunt critice pentru următoarea generație de soluții creative.

Rezistența la antibiotice înseamnă, în general, o creștere a valorii concentrației inhibitorii minime (MIC) a unui antibiotic datorită unei schimbări permanente a bacteriilor, de exemplu, mutație sau rezistență dobândită prin transfer de gene orizontal. În schimb, toleranța la antibiotice este capacitatea celulelor de a supraviețui efectului unui antibiotic datorită unei stări fenotipice reversibile. Aplicabilitatea acestor definiții este potrivită pentru celulele planctonice, în timp ce pentru biofilme, situația este diferită. În biofilme, toleranța antimicrobiană este legată de modul de creștere al biofilmului. Acest lucru este în contrast cu bacteriile care cresc în cultura planctonică, care, de obicei, va arăta susceptibilitatea la antimicrobiene. Trebuie recunoscut faptul că formarea biofilmului este starea naturală pentru marea majoritate a bacteriilor *in vivo*. Prin urmare, toleranța la antibiotice este o stare naturală a biofilmelor. De asemenea, rezistența la antibiotice este un fenomen natural, deoarece bacteriile au evoluat pentru a rezista la acțiunea produselor antibacteriene naturale timp de miliarde de ani în absența activității umane.

Obținerea și caracterizarea agenților biochimici de interes terapeutic în combaterea biofilmului

Există mai multe strategii pentru depășirea rezistenței la antibiotice, inclusiv reducerea utilizării extinse a antimicrobienilor, colectarea și analiza datelor, dezvoltarea de medicamente noi și nanotehnologia.

Progresele în nanotehnologie au dus la sinteza moleculelor organice și anorganice de dimensiune nano cu aplicații potențiale în industrie, ambalarea produselor alimentare, textile, medicină și terapeutică. Dezvoltarea de noi agenți antimicrobieni / nanocompozite nanometrice poate fi folosită ca o strategie alternativă pentru depășirea rezistenței antimicrobiene. Apariția nanotehnologiei, cea mai mare inovație tehnologică din ultimii ani, a modernizat medicina. Cererea pentru produsele derivate din nanotehnologie este în continuă creștere. Nanotehnologia, care este tehnologia inovatoare în scenariul prezent, poate avea o influență profundă asupra îmbunătățirii sănătății umane. Durabilitatea sporită, performanța, rezistența, flexibilitatea și proprietățile fizico-chimice inovatoare ale nanomaterialelor au fost explorate în domeniul sănătății.

Argintul a fost folosit încă din antichitate pentru efectele sale terapeutice, însă mecanismul exact de acțiune, în ciuda progreselor, se află încă în stadiul de dezbatere. Se recunoaște că potențialul antimicrobian se datorează încărcării pozitive a ionului de argint, prin urmare forma utilizată trebuie ionizată. Chiar dacă în această formă este inert, atunci când vine în contact direct cu mediul biologic, eliberează ioni de argint care interacționează cu acizi nucleici.

În lucrarea de față s-au sintetizat pe cale biochimică, folosind extracte totale de rozmarin, nanoparticule de argint care au fost caracterizate prin metode specifice și au fost testate pentru evaluarea activității antimicrobiene și siguranței citotoxice. Astfel, activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de argint biosintetizate a fost evaluată împotriva bacteriilor gram-pozitive, a bacteriilor gram-negative și a ciupercilor prin metoda difuziei pe disc. În urma testării celor două tipuri de extracte s-a constatat o activitate neglijabilă, la

concentrațiile testate (între 10-500 $\mu\text{g/mL}$), în schimb în cazul testării nanoparticulelor de argint, obținute pe cale biochimică, cu ajutorul extractelor din frunze de rozmarin, activitatea antimicrobiană a fost una semnificativă.

Expunerea la nanoparticule de argint ca agenți antimicrobieni pentru combaterea biofilmului implică contactul intact cu țesuturile sau administrarea; prin urmare, înțelegerea proprietăților acestora și evaluarea citotoxicității este importantă pentru utilizarea eficientă pentru aplicațiile clinice. Studiile de citotoxicitate ale nanoparticulelor se desfășoară pe scară largă pe modele *in vitro* datorită ușurinței în execuție, controlului și interpretării, fiind studiile inițiale care imită condițiile *in vivo*. Citotoxicitatea poate fi studiată *in vitro* prin intermediul mai multor teste calitative și cantitative; cu toate acestea, testele cantitative sunt cele mai potrivite deoarece cuantifică numărul de celule vii.

Pentru a evalua siguranța nanoparticulelor biosintetizate în studiul de față, s-au realizat teste preliminare suplimentare. Astfel, a fost evaluată morfologia și viabilitatea a două tipuri de celule normale în prezența extractelor și a nanoparticulelor de argint. La concentrații scăzute, keratinocitele și fibroblastele umane gingivale nu au fost afectate, în schimb la concentrațiile cele mai mari s-au observat modificări ale formei celulelor și desprinderea în unele cazuri de placa de cultură.

Testele de viabilitate a celulelor sunt o etapă importantă în evaluările toxicologice ale noilor metode de tratament și pot oferi date semnificative privind moartea celulară, activitatea metabolică și supraviețuirea celulară. Nanoparticulele de argint, împreună cu extractele folosite drept biocatalizatori în sintezele de obținere, au fost testate pentru a stabili efectul în termeni de celule viabile, pe două linii celulare sănătoase gingivale, keratinocite și fibroblaste. Aceste linii se utilizează de cele mai multe ori în evaluările preliminare ale compușilor care au o legătură directă cu mucoasa bucală și mucoasele din sfera ORL. Efectul exercitat depinde de doza testată: la concentrații scăzute nu există un efect notabil asupra viabilității celulare în timp ce cu creșterea dozei, se poate observa o creștere a procentului de celule

moarte, în special la cea mai mare concentrație utilizată (exemplificare – figura 1).

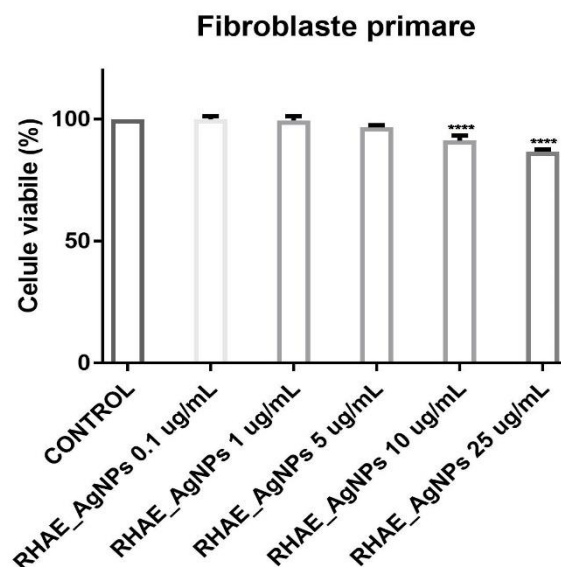


Figura 1. Procentele de fibroblaste viabile rezultate în urma stimulării cu nanoparticulele de argint biosintetizate cu extract hidroalcoolic de frunze de rozmarin

Antibioticele și extractele din plante. Sinergism, antagonism și potențare

Acest studiu a vizat testarea activității antimicrobiene a nanoparticulelor de argint biosintetizate comparativ cu antibioticele utilizate pentru infecțiile produse în special de *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* și *Streptococcus pneumoniae* prin diferite metode, și anume: a) testarea preclinică - pe tulpinile bacteriene prin metoda difuzimetrică și a activității anti-biofilm și b) teste clinice - antibiotice clasice pe probe biologice provenite din activitatea clinică curentă. În testarea preclinică s-a studiat de asemenea și activitatea anti-biofilm a nanoparticulelor de argint obținute prin biosinteză; activitatea nanoparticulelor de argint în combinație cu antibiotice; activitatea antimicrobiană și sinergismul.

Formarea biofilmelor a fost investigată *in vitro* prin monitorizarea legării de violet de cristal 0.1% la celulele bacteriene aderate la o placă de microtitrare.

Valoarea densității optice a fost utilizată ca un indice pentru a observa capacitatea de a forma biofilm în acest organism. Din datele obținute s-a putut observa că biofilmul s-a format la celulele bacteriene cu o concentrație medie, care este asociată cu o valoare ridicată a densității optice (exemplificare – figura 2).

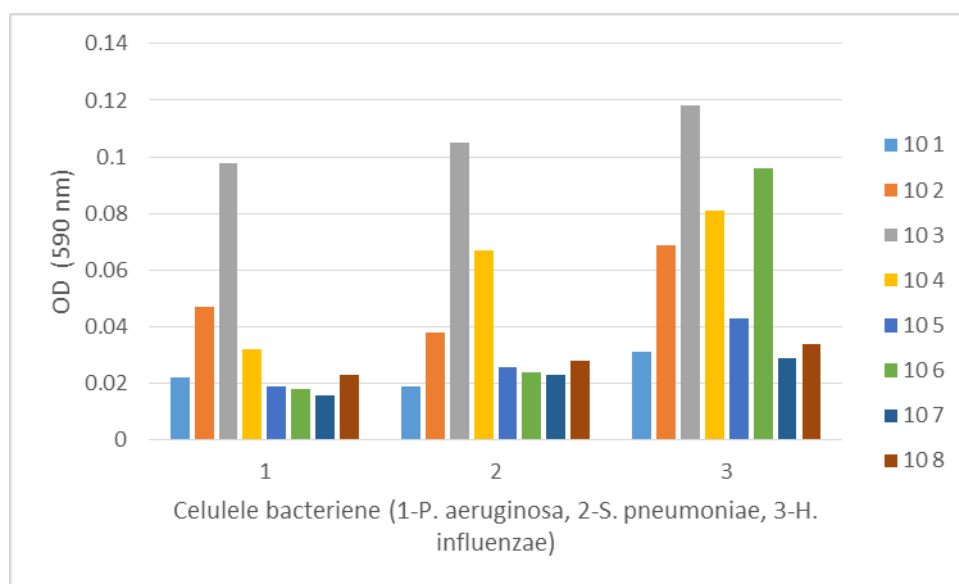


Figura 2. Formarea biofilmului în cazul bacteriilor *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* și *H. influenzae*. Se poate observa că biofilmul este format la celule bacteriene cu o concentrație de aproximativ 10^3 cfu / mL, după cum indică valoarea ridicată a OD.

Activitatea nanoparticulelor de argint biosintetizate cu extract hidroalcoolic din frunze de rozmarin, este cea mai ridicată la concentrația de $10 \mu\text{g} / \text{mL}$, cu o rată de inhibare crescută în cazul celor trei tipuri de bacterii testate.

Recent, mai multe studii au indicat că nanoparticulele de argint pot îmbunătăți efectul antibioticelor împotriva bacteriilor sensibile și rezistente, precum și reducerea aderenței bacteriene în stadiile incipiente ale formării biofilmului. În acest studiu, activitatea sinergică a nanoparticulelor a fost evaluată cu antibiotice convenționale (ampicilină și amikacină) împotriva bacteriilor gram-pozitive și gram-negative. Rezultatele prezentate aici arată că nanoparticulele, în combinație cu antibiotice, cresc efectul antimicrobian într-un mod aditiv sau sinergic. Mai mult, testele de citotoxicitate sugerează că la concentrații scăzute

nanoparticulele de argint și combinațiile lor nu prezintă efecte citotoxice în celulele sănătoase.

Date statistice și relevanța abordării clinice în areaul biofilmului corelat afecțiunilor din sfera ORL

Managementul infecțiilor urechii, nasului și gâtului necesită un diagnostic clinic și bacteriologic precis, urmat de o terapie antimicrobiană empirică inițială, care poate fi ajustată odată ce identificarea organismelor cauzale este disponibilă. Rezistența crescândă la antimicrobiene a multor agenți patogeni a făcut ca tratamentul acestor infecții să fie mai dificil.

Un studiu privind prescrierea tiparului de antibiotice este un mod eficient de a reflecta consumul adecvat de antibiotice. Studiul de față s-a concentrat în principal pe modelul de prescriere a antibioticelor în Secția ORL din cadrul Spitalului Clinic Municipal Timișoara. Toți pacienții care au prezentat infecții ORL au primit rețete de medicamente. Combinația de amoxicilină și acid clavulanic a fost cel mai frecvent antibiotic prescris în cazul afecțiunilor care nu au necesitat intervenție chirurgicală. Profilul și bacteriile predominante izolate evidențiază necesitatea supravegherii și raportării continue a microbiologiei infecțiilor din sfera ORL pentru a ghida clinicienii să utilizeze antimicrobiene adecvate pentru etiologiile incriminate. Aproape toate bacteriile izolate, de la pacienții care au necesitat intervenție chirurgicală, au arătat un nivel considerabil de rezistență în special la antibioticele utilizate frecvent, cum ar fi ampicilina, amoxicilina și trimetoprim-sulfametoxazolul. Ciprofloxacina, amikacina și gentamicina sunt eficiente împotriva tuturor izolatelor bacteriene din studiul de față.

Rezultatul acestui studiu a relevat faptul că bacteriile rezistente la antibiotice recuperate de la pacienții cu infecții devin o problemă majoră de sănătate publică în gestionarea cazurilor din punct de vedere socio-economic. Datorită creșterii rezistenței la antibiotice, se poate pleda pentru așteptarea rezultatelor, mai ales dacă pacientul a avut deja tratament, ceea ce este adesea cazul. Se recomandă cu tărie supravegherea antimicrobiană la nivel național pentru a

face recomandarea corectă a antibioticelor, împreună cu respectarea strictă a politicii de utilizare a antibioticelor pentru a reduce răspândirea microbilor rezistenți la medicamente și a complicațiilor asociate în țară. Prin urmare, în paralel cu tratamentul empiric al infecțiilor, executarea culturii și testul de sensibilitate antimicrobiană trebuie să fie luate ca practică de rutină și obligatorie pentru a gestiona în mod corespunzător infecțiile, a reduce complicațiile asociate (individuale și în sistemul de sănătate) și pentru a reduce rezistența la medicamente.