

## Raport Stiintific de Faza Unica - Decembrie 2016

**Obiectivele** propuse pentru perioada Ianuarie – Decembrie 2016 au fost urmatoarele:

**1). Sinteza si caracterizarea nanoparticulelor de magnetita functionalizate cu diferiti compusi naturali (eugenol, eucaliptol, carvona, limonen, B-pinen),** in cadrul caruia s-au realizat activitatile: O1.b) Obținerea de sisteme magnetice hibride bionanostructurate utilizând următorii compuși naturali: eugenol, eucaliptol, limonen, carvona și  $\beta$ -pinen si O1.c) Caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor obtinute (activitati initiate in 2015 si finalizate in anul 2016).

**2). Evaluarea efectului nanoparticulelor obtinute asupra profilurilor de virulenta a unor tulpini de laborator și clinice de *Pseudomonas aeruginosa* la nivel fenotipic și molecular,** unde s-au urmarit activitatile O2.b) Analiza calitativă a efectului antimicrobian al nanobiomaterialelor fabricate prin metode optimizate in acest scop (metoda dublului strat, disc-difuzimetrica); O2.c) Analiza cantitativă a efectului antimicrobian al nanobiomaterialelor fabricate cu stabilirea valorii CMI (concentrația minimă inhibitorie) și CMB (concentrație minimă bactericida); si O2.d) Analiza fenotipică a profilurilor de virulență ale tulpinilor de *P. aeruginosa* cultivate în prezența unor concentrații subinhibitorii de nanosisteme bioactive funcționalizate (asupra producerii de factori de virulenta solubili: enzime, toxine formatoare de pori, adevine etc).

**3). Investigarea impactului nanomaterialelor functionalizate asupra rezistentei si persistentei celulelor de *P. aeruginosa* planctonice si organizate in biofilme,** pentru care s-au realizat urmatoarele activitati: O3.a) Analiza fenotipică și cuantificarea celulelor persister obtinute din culturi de *P. aeruginosa* planctonice si din biofilme, cultivate în prezența nanoparticulelor functionalizate, dupa diferite perioade de incubare si O3.b) Investigarea fenotipică a efectului nanobiomaterialelor obtinute asupra mecanismelor de rezistență ale tulpinilor clinice de *P. aeruginosa* (metoda "antibiograma - aromaterapie").

Pe parcursul întregii perioade de implementare a proiectului s-au urmarit si activitatile corespunzatoare obiectivului 5). **Managementul proiectului si diseminarea rezultatelor.**

### Introducere

In conditiile expansiunii fenomenului de rezistenta si multirezistenta la antibiotice, tot mai multe maladii infectioase raman fara o optiune eficienta de tratament. Dezvoltarea de noi tipuri de antibiotice este un process anevoios, companiile farmaceutice facand progrese nesemnificative în dezvoltarea de noi medicamente antimicrobiene, deoarece acestea sunt molecule mici și de multe ori cu elemente functionale si chiralitate extrem de complexe<sup>i,ii</sup>. În prezent, circa 70 % dintre bacteriile care cauzeaza infectii nosocomiale, dar și comunitare sunt rezistente la cel puțin unul dintre antibioticele cel mai frecvent utilizate pentru tratament, cauzand infectii care de multe ori

nu răspund la terapia standard. Acestea conduc la menținerea stării de boală pe o perioadă mai îndelungată, implică aceste cheltuieli de spitalizare și tratament mai crescute și o rată de deces cu aproximativ 50% mai mare comparativ cu cea a pacienților cu infecții provocate de aceleași specii sensibile<sup>iii</sup>. *Pseudomonas aeruginosa*, cel mai versatil oportunist patogen cunoscut, reprezintă una dintre principalele amenințări pentru pacienții spitalizați, în special cei cu arsuri, fibroza chistică și imunocompromisi la nivel mondial. Un studiu recent efectuat de grupul nostru de cercetare a demonstrat că microorganismele cele mai rezistente în spitalele din România sunt reprezentate de tulpini Gram negative non-fermentative de *P. aeruginosa* și *Acinetobacter sp*<sup>iv</sup>. Studiile arată că peste 51% dintre pacienții spitalizați infectați cu *P. aeruginosa* decedea în mai puțin de 30 de zile<sup>v</sup>. Această specie este caracterizată de o sensibilitate naturală foarte scăzută la antibiotice, care poate fi atribuită acțiunii concertate a pompelor de eflux și multitudinii de gene de rezistență codificate cromozomial, precum și permeabilității scăzute a porinelor membranare<sup>vi</sup>, care împreună cu rezistența dobândită prin transferul de elemente genice mobile explică abilitatea *P. aeruginosa* de a dezvolta rapid rezistența în timpul tratamentului cu antibiotice<sup>vii</sup>. Cele mai rezistente tulpini de *P. aeruginosa* sunt capabile să producă microcolonii sau biofilme, ceea ce le face tolerante la cantități mari de substanțe antimicrobiene, precum și la mecanismele de apărare ale gazdei<sup>viii</sup>. Celulele *persistenter*, evidențiate prin apariția unor variante de colonie de mici dimensiuni obținute din infecții cu producere de biofilme, reprezintă unul dintre tipurile cele mai rezistente de celule, deoarece acestea au un metabolism modificat, care permite supraviețuirea lor în prezența unor concentrații mari de antibiotice. În plus, tulpinile de *P. aeruginosa* produc un arsenal extins de factori de virulență atașați celulelor sau secretați în mediu, responsabili de manifestările clinice și persistența infecțiilor cu această specie. Toate fenotipurile de rezistență și virulență ale acestui patogen oportunist sunt strict controlate de un sistem de semnalizare intercelulară dependent de densitate, care acționează în mod autoinductiv, numit Quorum Sensing (QS)<sup>ix</sup>.

Produsele naturale reprezintă o mare sursă de compuși chimici diverși utili, care au potențialul de a fi folosiți în multe aplicații biomedicale, inclusiv controlul infecțiilor severe<sup>x</sup>, și stau la baza unor noi strategii terapeutice și profilactice naturale și ecologice. Cele mai multe lucrări disponibile se referă la capacitatea acestor compuși derivați din plante de a interfera cu dezvoltarea și viabilitatea bacteriilor<sup>xi, xii</sup>. Studiile noastre recente au arătat că anumite uleiuri esențiale pot avea impact asupra semnalizării QS, modulând expresia unor gene implicate în principalele mecanisme de semnalizare intercelulară la *S. aureus* și *P. aeruginosa*<sup>xiii</sup>. Deși multe substanțe naturale au demonstrat o activitate antimicrobiană semnificativă, anumite proprietăți ale acestora, precum volatilitatea, instabilitatea și doza necesară unei terapii eficiente, limitează în prezent utilizarea lor în practica biomedicală.

Prin îndeplinirea obiectivelor propuse pentru această etapă, studiul realizat și-a propus caracterizarea fizico-chimică și testarea antimicrobiană a nanoparticulelor de magnetită bioactive funcționalizate cu compuși naturali obținuți din plante asupra virulenței și persistenței unor tulpini de laborator și izolate clinice, rezistente de *P. aeruginosa*.

## **Materiale si metode**

Nanoparticulele de magnetita functionalizate cu diferiti compusi de origine vegetala au fost obtinute si caracterizate partial in prima etapa de implementare a proiectului, rezultatele fiind prezentate in raportul stiintific din Decembrie 2015.

### **OB1.**

#### **Caracterizarea fizico-chimica**

Nanoparticulele obtinute au fost caracterizate prin Difractia cu raze X (XRD), Microscopia electronica prin transmisie (TEM) si difractia de electroni pe arie selectata (SAED), rezultatele aferente fiind prezentate in raportarea de la finalul etapei 1 (Dec 2015). In aceasta etapa sunt prezentate rezultatele obtinute dupa analiza termogravimetrica.

#### ***Analiza termogravimetrica***

Analiza termogravimetrica a nanoparticulelor magnetice obtinute s-a realizat cu ajutorul unui instrument Shimadzu DTG-TA-50H. Probele analizate au fost depuse intr-un creuzet de aluminiu si incalzite cu  $10 \text{ K min}^{-1}$  de la temperatura camerei la  $800^\circ\text{C}$ , sub un flux de aer uscat de  $20 \text{ mL min}^{-1}$  (80%  $\text{N}_2$  si 20%  $\text{O}_2$ )<sup>xiv</sup>.

### **OB2.**

#### **Analiza calitativa a efectului antimicrobian**

Tulpinile de *P. aeruginosa* (1 de laborator (PAO1) si 9 izolate clinice) au fost mentinute pe bulion nutritiv cu 20% glicerol la  $-80^\circ\text{C}$ . Pentru testele antimicrobiene microorganismele au fost insamantate pe geloza nutritiva si pe mediu selectiv Cetrimide. Coloniile obtinute au fost utilizate pentru obtinerea de suspensii in AFS (apa fiziologica sterile) de densitate optica 0,5 Mc Farland ( $1-3 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ ).

#### **Metoda dublului strat**

Metoda implica turnare unui strat subtire de geloza nutritiva lichefiata in placi Petri, urmata de solidificarea mediului turnat si de adaugarea unui volum de 10mL de geloza nutritiva lichefiata si racita la aprox  $45^\circ\text{C}$  ce contine 1mL suspensie microbiana de interes de densitate 0,5 Mc Farland. Dupa solidificarea celui de-al doilea strat de geloza, se adauga in picatura un volum de  $5\mu\text{L}$  din fiecare compus/nanosistem analizat diluat pana la o concentratie de 5mg/mL in apa fiziologica sterila. S-au utilizat controlale de dimetil sulfoxide (DMSO = solventul in care au fost diluate initial standardele) diluat 1/30 (pentru a ajunge aproximativ la cantitatea prezenta in probele ce contin standard de compus resuspendate in DMSO), precum si magnetita simpla. Placutele Petri se incubeaza timp de 18-24h la  $37^\circ\text{C}$  si ulterior se cuantifica dimetrele zonelor de inhibitie a cresterii in jurul picaturilor adaugate.

## **Metoda disc difuzimetrica adaptata**

Metoda deriva de la metoda standardizata a antibiogrammei (Kirby Bauer)<sup>xv</sup>. Pe scurt, pe un mediu agarizat turnat in placi Petri se insamanteaza microorganismul de testat in panza cu tamponul. Ulterior se dispun la distante egale (aprox 3cm) discuri de hartie sterile cu diametrul de 6mm. Se adauga in picatura un volum de 5 $\mu$ L din fiecare compus/nanosystem analizat diluat 1/30 in apa fiziologica sterila. S-au utilizat controlale de dimetil sulfoxide (DMSO = solventul in care au fost diluate initial standardele) diluat 1/30, precum si magnetita simpla. Placutele Petri se incubeaza timp de 18-24h la 37°C si ulterior se cuantifica dimetrele zonelor de inhibitie a cresterii in jurul picaturilor adaugate.

## **Analiza cantitativa a efectului antimicrobian**

**Metoda CMI** (stabilirea concentratiei minime inhibitorii) si **CMB** (stabilirea concentratiei minime bactericide)

Pentru stabilirea CMI si CMB s-a utilizat o metoda cantitativă, bazata pe realizarea unor microdiluții seriale binare în mediu lichid (bulion simplu), repartizat steril în plăci cu 96 de godeuri. In primul godeu al fiecarui sir s-a adaugat o cantitate de compus/nanosistem bioactiv corespunzatoare unei concentratii de 5mg/mL. Ulterior, cu ajutorul unei micropipete s-au 12 realizat dilutiile binare, pornind de la godeul 1 (concentratie 5mg/mL) pana la godeul 12 (unde concentratia finala va fi de 0.002441406 mg/mL). Dupa realizarea microdiluțiilor, in fiecare godeu s-au adaugat 15  $\mu$ L suspensie microbiana de densitate 0.5 McFarland. Placutele insamantate au fost incubate 24h la 37°C, iar dupa incubare valoarea CMI pentru fiecare compus/nanosistem in parte s-a stabilit macroscopic, ca fiind ultima concentrație a acestuia la care nu s-a mai observat apariția creșterii microbiene, respectiv apariția turbidității mediului, dar și prin citire spectrofotometrică a absorbanței culturii microbiene dezvoltate în mediul lichid la 620 nm si prin numarare de Unitati viabile (UFC/mL = unitati formatoare de colonii/mL)<sup>xvi</sup> pentru discriminarea concentratiei minime care inhiba multiplicarea microorganismelor (CMI) de cea bactericida (CMB).

## **Evaluarea producerii de factori de virulenta solubili**

Mediile destinate evidențierii indirecte a unor factori de virulență solubili au la bază agar LB și sunt îmbogățite cu diverse ingrediente necesare evidențierii producerii unor factori enzimatici capabili să degradeze/utilizeze/modifice substratul respective (ex. Mediu cu cazeina pentru evidentierea cazeinazelor, mediu cu gelatina pentru evidentierea gelatinazelor, mediu cu sange pentru evidentierea hemolizinelor, mediu cu Tween 80 pentru evidentierea lipazelor, mediu cu galbenus de ou pentru evidentierea lecitinazelor, mediu cu ADN pentru evidentierea DN-azelor etc). Inainte de cultivarea pe mediile mentionate microorganismele au fost cultivate in mediu nutritiv lichid in prezenta unor concentratii subinhibitorii ale nanosistemelor/compusilor testate timp de 4h. Dupa inocularea in picatura pe mediile specifice, placutele au fost incubate (24-72h la 37°C) si s-a urmarit formarea unui precipitat, aparitia unei zone opace sau a unui halou transparent

in jurul coloniilor microbiene<sup>xvii</sup>. Inaintea insamantarii pe mediile specific, tulpinile microbiene au fost tratate timp de 6h la 37°C cu nanosistemele/compusii analizati.

### **OB3.**

#### **Antibiograma – aromaterapie**

Pe o placa Petri ce contine mediu Mueller Hinton însămânțată în panza cu tamponul, utilizand ca inocul o suspensie microbiană de densitate  $1-3 \times 10^8$  UFC/mL (UFC – unități formatoare de colonii) (corespunzătoare standardului 0.5 MacFarland), urmand procedura descrisa de standardul CLSI 2015 pentru tehnica antibiogramei se dispun discuri impregnate cu antibiotic la distante si in pozitiile recomandate de standard. In capacul placutelor Petri insamantate se depun discuri sterile de hartie de filtru impregnate cu 50μL suspensie concentrata de compus/nanosistem iar placile se incubeaza timp de 20 de ore, la 37°C cu capacul in jos. Rezultatele se citesc prin masurarea zonei de inhibitie a cresterii cu ajutorul unei rigle gradate.

#### **Evaluarea selectarii de celule persister in culturi planktonice si biofilme**

Pentru aceasta s-a utilizat o metoda cantitativă, bazata pe realizarea unor microdiluții seriale binare în mediu lichid (bulion simplu), repartizat steril în plăci cu 96 de godeuri. Dupa repartizarea mediului s-au adaugat diferite concentratii de nanoparticule/compusi purificati (astfel incat concentratia acestora sa fie subinhibitorie – valoarea CMI/2) si mediul a fost inoculat cu  $10^7$  CFU/mL suspensie *P. aeruginosa*. Placutele au fost incubate la 37°C pentru a permite cresterea microorganismelor, iar cand acestea au atins etapa exponentiala tarzie de crestere (~12h) s-a adaugat antibioticul Norfloxacin ( $15 \mu\text{g/mL}$ )<sup>xviii</sup> timp de 6h. Dupa incubarea cu antibiotic din culturile microbiene obtinute s-au realizat dilutii zecimale care au fost ulterior insamantate pe mediu cetrimide pentru cuantificarea de UFC/mL. Pentru evaluarea impactului asupra biofilmelor si a selectiei de celule persistente in stare aderata, se analizeaza biofilmele formate pe peretii godeurilor, care dupa indepartarea culturilor planktonice sunt spalate cu grija de 3 ori cu apa fiziologica sterila (AFS) si fixate cu Metanol rece timp de 5 minute. Dupa indepartarea metanolului, placutele uscate au fost colorate cu solutie cristal violet 1% timp de 20 minute. Dupa colorare, excesul de colorant a fost spalat cu apa de robinet, iar colorantul inclus in celulele biofilmului format pe peretii godeului a fost solubilizat cu o solutie de acid acetic 33%. Suspensiile astfel obtinute au fost utilizate pentru interpretarea rezultatelor, bazata pe citirea spectrofotometrica a absorbantei suspensiei colorate la 492nm.

#### **Analiza statistica**

Rezultatele au fost interpretate statistic utilizand testul ANOVA (One way analysis of variance) si Student T. Valori ale lui  $P < 0.05$  au fost considerate semnificative.

### **OB5.**

#### **Managementul proiectului si diseminarea rezultatelor**

Pe parcursul acestui an s-au realizat 2 întâlniri de lucru (mese rotunde) la care au participat membrii echipei proiectului, în cadrul cărora s-au discutat protocoalele de lucru și rezultatele obținute. În această perioadă s-au publicat 3 articole cu cotație ISI, 1 articol BDI, 3 capitole de carte la edituri internaționale și 2 postere, care au fost prezentate în cadrul unor manifestări științifice internaționale.

## Rezultate

### OB1.

Analiza termogravimetrică s-a utilizat pentru a estima cantitatea de compus activ ce interacționează cu suprafața nanostructurilor de magnetită. Rezultatele au arătat că valorile concentrațiilor de standard ce se găsesc pe suprafața nanoparticulelor variază între 1% și 4%. Această estimare este utilă pentru realizarea și interpretarea experimentelor *in vitro*.

### OB2.

#### Analiza antimicrobiană calitativă

Evaluarea rezultatelor obținute în urma testelor calitative de analiză a efectului antimicrobial al nanoparticulelor testate a arătat că nanoparticulele magnetice funcționalizate prezintă efect antimicrobial diferit în funcție de tipul de compus conținut, dar și de tulpina testată. Nanoparticulele de magnetită funcționalizate cu eugenol au prezentat cel mai semnificativ efect inhibitor asupra creșterii microorganismelor testate, după cum s-a observat prin metodele calitative utilizate. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-eug inhibă mult mai eficient creșterea tulpinii de laborator PAO1, precum și a tulpinii Pa7, care prezintă o sensibilitate crescută comparativ cu celelalte tulpini. Nanoparticulele de magnetită funcționalizate cu eugenol s-au dovedit mult mai eficiente în inhibarea creșterii comparativ cu controlul de compus (eugenol) în cazul a 5 tulpini, iar în cazul tulpinii Pa2 diametrul zonei de inhibiție obținut pentru Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-eug este identic cu cel obținut pentru controlul de eugenol.

Nanoparticulele funcționalizate cu eucaliptol au demonstrat un efect antimicrobial mai crescut comparativ cu standardul de eucaliptol pentru 5 dintre tulpinile de *P. aeruginosa* testate, în timp ce în cazul a 3 tulpini, diametrele zonelor de inhibiție pentru Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-euc și pentru standardul de eucaliptol sunt identice. Doar în cazul tulpinii *P. aeruginosa* 4 s-a observat un diametru de inhibiție al creșterii mai redus după tratamentul cu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-euc, comparativ cu standardul de eucaliptol.

Pentru magnetită funcționalizată cu carvona s-au obținut diametre ale zonelor de inhibiție a creșterii superioare comparativ controlului de carvona doar în cazul tulpinilor PAO1, P.a 5, P.a 6 și P.a 7. Două dintre aceste tulpini, și anume P.a 5 și P.a 6 sunt tulpini multirezistente la antibiotice.

Nanoparticulele functionalizate cu limonen s-au dovedit a fi foarte eficiente asupra inhibarii cresterii *P. aeruginosa*, rezultatele obtinute  $Fe_3O_4$  – lim prezentand diametre ale zonelor de inhibitie a cresterii mai mari comparativ cu controlul reprezentat de limonen pentru 8 tulpini analizate.

Nanoparticulele magnetice functionalizate cu  $\beta$ -pinen au demonstrat un efect antimicrobian mai pronuntat comparativ cu standardul de compus purificat pentru 4 dintre tulpinile analizate. Comparand diametrele zonelor de inhibitie ale cresterii, precum si eficienta in functie de standardul de compus, acest tip de nanoparticule a avut un efect antimicrobian mai redus fata de celelalte variante testate.

In toate cazurile, s-a observat ca nanoparticulele de magnetita simpla si solventul (DMSO diluat 1/30) nu prezinta efect antimicrobian semnificativ pentru tulpinile de *P. aeruginosa* testate.

### **Analiza cantitativa a efectului antimicrobian**

Pentru a analiza calitativ efectul nanoparticulelor magnetice functionalizate s-a realizat testul stabilirii concentratiei minime inhibitorii si ulterior a fost stabilita concentratie minima bactericida.

Rezultatele obtinute in urma analizei concentratiei minime inhibitorii (CMI) au aratat ca nanoparticulele de magnetita functionalizate cu eugenol si cele cu cucalptol au prezentat cele mai reduse valori CMI pentru majoritatea tulpinilor testate, concentratiile minime inhibitorii fiind sub 1mg/mL. Cele mai frecvente valori CMI pentru aceste doua tipuri de nanosisteme au fost cuprinse intre 0.312 si 0.625 mg/mL, cu aproximativ 50% mai reduse comparativ cu valorile CMI obtinute in cazul unor concentratii similare ale controlurilor de compusi purificati. Rezultatele arata variatii semnificative intre tulpinile analizate, observandu-se ca pentru tulpinile PAO1 si P.a 7 (sensibile) valorile CMI sunt in medie mai scazute pentru majoritatea nanoparticulelor si controalelor de compus testate. In plus, valorile CMI sunt influentate de tipul de compus utilizat pentru functionalizarea nanoparticulelor de magnetita, controlul reprezentat de nanoparticulele de  $Fe_3O_4$  simple avand un slab efect antimicrobian (valorile CMI fiind mai mari sau egale cu 5mg/mL).

Pentru stabilirea concentratiei minime bactericide (CMB) la 24h de incubare s-a urmarit viabilitatea microorganismelor cultivate in prezenta unor concentratii egale sau cu pana la de 10 ori mai mari comparativ cu valoarea CMI. Rezultatele au aratat ca pentru majoritatea tulpinilor testate, valorile CMB sunt cu peste 50% mai mari comparativ cu valorile CMI ale aceluasi tip de nanosistem/compus purificat. Si in acest caz nanoparticulele magnetice functionalizate cu eug au prezentat valorile CMB cele mai reduse.

### **Evaluarea producerii de factori de virulenta solubili**

Pentru a analiza efectul nanobiomaterialelor utilizate asupra capacității microorganismelor de a produce factori de virulență solubili s-a utilizat o metoda bazată pe însămânțarea acestora pe medii de cultivare speciale ce conțin în componenta lor diferite substraturi asupra carora vor acționa diferite molecule/enzime din echipamentul biochimic al tulpinii testate cu rol în virulență. Evidențierea factorilor de virulent s-a realizat fie în mod direct prin aprecierea unor modificari ale

culorii, aspectului, transparentei sau aparitia unor precipitate, fie după adaugarea unor reactivi în mediu în vecinătatea coloniilor microbiene. Rezultatele obținute au aratat ca nanomaterialele pe baza de magnetită funcționalizată prezinta efecte diferite asupra virulentei microbiene, in functie de tulpina de *P. aeruginosa* testata. Cele mai afectate fenotipuri au fost: producerea de gelatinaze si cazeinaze (producerea acestor factori fiind diminuata de toate variantele experimentale utilizate pentru cateva, pana la toate tulpinile testate), urmata de producerea de esculina si lipaza. Producerea de Dn-aze, Amilaze si Lecininaze nu a fost semnificativ afectata de variantele de nanoparticule/compusi purificati utilizati in studiu.

### **OB 3.**

#### **Antibiograma-aromaterapie**

Analiza efectului nanomaterialelor functionalizate si a compusilor naturali asupra mecanismelor de rezistenta la antibiotice a tulpinilor testate, a demonstrat ca volatilitatea compusilor utilizati joaca un rol important in reducerea rezistentei tulpinilor de *P. aeruginosa* la antibiotice, acestea avand un effect sinergic cu antibioticele, aspect exprimat prin obtinerea unor diametre ale zonelor de inhibitie a cresterii mai crescute, comparativ cu cazul in care tulpinile au fost incubate in absenta compusilor volatili/nanosistemelor. Datorita faptului ca nanosistemele determina stabilizarea compusilor naturali la nivelul nanoparticulelor si limiteaza efectele datorate volatilitatii ridicate a acestora, rezultatele obtinute au aratat ca efectul acestora nu este semnificativ asupra mecanismelor de rezistenta la tulpinile de *P. aeruginosa* testate.

#### **Producere de persisteri**

Infecțiile persistente și dificil de tratat au cauze multiple. De cele mai multe ori acestea au ca și agenți etiologici microorganisme rezistente, ce prezintă diferite gene de rezistență sau au capacitatea de a se organiza în comunități microbiene multicelulare, numite biofilme. În urma unei presiuni externe ce afectează fitnessul populației microbiene, atât în culturile planctonice, plutitoare, cât și în biofilme poate avea loc un fenomen de selecție al unor celule microbiene ce se vor comporta diferit față de restul populației<sup>xix</sup>. Aceste celule ce rezistă acțiunii substanțelor microbiene au metabolism modificat, aflându-se într-o stare metabolică lentă și se numesc persisteri sau celule persistente. Selecția de celule persistente poate avea loc în orice populație microbiană dacă există un factor de selecție adecvat (spre exemplu în urma expunerii microorganismelor la anumite concentrații de antibiotice), însă acest fenomen poate fi influențat de mecanismele genetice de rezistență ale celulelor microbiene respective<sup>xx</sup>. Persisterii pot rezista acțiunii antibioticelor atât în culturi microbiene planctonice, dar mai ales în biofilme și reprezintă principalul factor de eșec al terapiei anti-infecțioase. În urma încetării acțiunii factorului ce a produs selecția persisterilor și a apariției unor condiții de dezvoltare optime, celulele microbiene pot trece la starea metabolică ce a caracterizat persisterii și să revină la starea de celule active metabolic, capabile de creștere și diviziune activă, celule ce vor genera o nouă populație microbiană în urma multiplicării<sup>xxi</sup>.

Rezultatele de evaluare a producerii de celule persister au demonstrat ca nanomaterialele utilizate pot influența în mod diferit acest fenotip, în funcție de tipul de compus antimicrobian



activ conținut, atât în culturile planctonice, cât și în biofilme. Astfel, pentru culturile planctonice de *P. aeruginosa* cultivate în prezența unei concentrații de 15 μg/mL Norfloxacin, nanoparticulele de magnetite funcționalizate au produs inhibiția producerii de persisteri în grade diferite, cel mai semnificativ efect fiind înregistrat în cazul utilizării Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@eugenol. De asemenea, inhibiția producerii de celule persister a fost influențată de rezistența diferită a tulpinilor microbiene, astfel, rezultatele cele mai semnificative au fost obținute în cazul tulpinilor Pa1, Pa7 și Pa10, care sunt mai sensibile la antibiotice comparativ cu celele tulpini, sau sunt tulpini de laborator (ex. PA10).

În mod similar, evidențierea selectării de celule persister în biofilmele formate de *P. aeruginosa* a arătat că tratamentul cu Norfloxacin și nanomaterialele sintetizate influențează în mod diferit acest fenotip, în funcție de tulpina testată, dar și de tipul de compus utilizat pentru funcționalizarea nanoparticulelor magnetice.

Metoda utilizată, cea de colorare a biofilmului cu cristal violet, fiind o metodă semicantitativă nu permite neapărat evidențierea celulelor viabile din structura biofilmului, ci doar celulele microbiene aderate ce compun biofilmul. Analiza la microscop a structurii biofilmelor, dar și analiza spectrofotometrică ulterioară adăugării de acid acetic 33% (adăugat pentru scoaterea colorantului din celulele aderate și constituirea unei suspensii omogene) au indicat faptul că nanoparticulele de magnetita funcționalizate cu eugenol și cele funcționalizate cu carvona au inhibat cel mai semnificativ dezvoltarea biofilmului, pentru majoritatea tulpinilor testate. În mod similar cu observațiile obținute pentru culturile planctonice, și în cazul biofilmelor, tratamentul concomitant cu Norfloxacin 15 μg (antibiotic și concentrație documentată ca permit selecția de celule persister) și nanomateriale magnetice funcționalizate, s-a observat că inhibiția este mai pronunțată în cazul tulpinilor Pa 1, Pa 7, Pa 10, dar și Pa 9, în cazul biofilmelor.

## Concluzii

Studiul realizat pe parcursul acestui an și-a propus finalizarea testelor de caracterizare fizico-chimică, precum și analiza antimicrobiană a nanoparticulelor de magnetită bioactive funcționalizate cu compuși naturali obținuți din plante asupra virulenței și persistenței unor tulpini de laborator și izolate clinice, rezistente de *P. aeruginosa*.

Rezultatele obținute au demonstrat că nanomaterialele obținute prezintă diferite proprietăți antimicrobiene și antibiofilm, în funcție de tipul de compus natural conținut.

Activitatea antimicrobiană a fost, de asemenea, diferită în rândul tulpinilor microbiene testate, rezistența acestora la acțiunea nanomaterialelor corelandu-se cu rezistența la antibiotice a acestora.

Receptivitatea cea mai pronunțată la acțiunea nanomaterialelor a fost observată în cazul tulpinilor Pa 1, Pa 7 și Pa 10 (PAO1), acestea fiind fie tulpini de laborator (ex PAO1), fie izolate clinice cu rezistență la antibiotice mai scăzută, comparativ cu restul tulpinilor analizate.

Nanoparticulele de magnetita functionalizate cu eugenol sau cu limonen au dovedit cel mai pronuntat effect antimicrobial, fiind eficiente atat in cazul tulpinilor de *P. aeruginosa* sensibile, cat si in cazul celor rezistente, eficienta acestui nanosistem fiind observata in culture planctonice si in biofilme.

In plus, concentratii subinhibitorii ale acestor nanomateriale/compusi vegetali purificati au modulata fenotipuri microbiene cheie, precum virulenta, persistenta si implicit rezistenta microorganismelor analizate.

Rezultatele obtinute sugereaza ca nanoparticulele de magnetita functionalizate cu compusi de origine vegetala ar putea fi utilizate cu success in dezvoltarea de noi strategii antimicrobiene, fiind capabile sa limiteze multiplicarea microorganismelor si sa inhibe dezvoltarea de biofilme, dar sa interfereze cu fenotipuri cheie de virulenta, atunci cand sunt utilizate in concentratii subinhibitorii.

Pe parcursul acestui an s-au realizat 2 intalniri de lucru (mese rotunde) la care au participat membrii echipei proiectului, in cadrul carora s-au discutat protocoalele de lucru, dar si rezultatele preliminare obtinute. In cadrul acestei etape au fost publicate/communicate 9 lucrari cu acknowledgement-ul proiectului: 3 articole cu cotatione ISI, 1 articol BDI, 3 capitole de carte la edituri internationale si 2 postere, care au fost prezentate in cadrul unor manifestari stiintifice internationale.

### **Publicatii cu acknowledgement-ul proiectului**

#### ***Articole ISI:***

Alina Maria Holban, Monica Cartelle Gestal, Alexandru Mihai Grumezescu. Control of biofilm-associated infections by signaling molecules and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, doi:10.1016/j.ijpharm.2016.02.044. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517316301491>

Eva Torres-Sangiao, Alina Maria Holban and Monica Cartelle Gestal. Advanced Nanobiomaterials: Vaccines, Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases. *Molecules* 2016, 21, 867; doi: 10.3390/molecules21070867. <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/7/867>

Alexandra Elena Oprea, Loredana Mihaela Pandel, Ana Maria Dumitrescu, Ecaterina Andronescu, Valentina Grumezescu, Mariana Carmen Chifiriuc, Laurentiu Mogoanta, Tudor-Adrian Balaseanu, George Dan Mogosanu, Gabriel Socol, Alexandru Mihai Grumezescu, Florin Iordache, Horia Maniu, Mariana Chirea and Alina Maria Holban. Bioactive ZnO Coatings Deposited by MAPLE—An Appropriate Strategy to Produce Efficient Anti-Biofilm Surfaces. *Molecules* 2016, 21(2), 220; doi: 10.3390/molecules21020220. <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/2/220>

#### ***Articole BDI:***

Ioannis L. Liakos, Alexandru Mihai Grumezescu, Alina Maria Holban, Iordache Florin, Francesca D'Autilia, Riccardo Carzino, Paolo Bianchini and Athanassia Athanassiou. Polylactic Acid—Lemongrass Essential Oil Nanocapsules with Antimicrobial Properties. *Pharmaceutics* 2016, 9, 42; doi: 10.3390/ph9030042, <http://www.mdpi.com/1424-8247/9/3/42>.

### **Capitole de carte:**

Alina Maria Holban, Ecaterina Andronescu, Carmen Curutiu, Lia-Mara Ditu, Mariana Carmen Chifiriuc and Veronica Lazar. Bioactive nanomaterials for cartilage and muscle regeneration. Pag 261 – 297, in the volume Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering, Elsevier, Editor Alexandru Grumezescu, 2016, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-42865-1.00010-6>. Print Book ISBN :9780323428651

Ecaterina Andronescu, Alexandru Mihai Grumezescu, Mădălina-Ionela Gușă, Alina Maria Holban, Florina-Cristina Ilie, Alexandra Irimia, Irina-Florentina Nicoara and Mihaela Tone. Nano-hydroxyapatite: novel approaches in biomedical applications. Pag 189-213, in the volume Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials, Elsevier, edited by Alexandru Grumezescu, 2016, ISBN 9780323428620. <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780323428620>.

Florin Iordache, Irina Gheorghe, Veronica Lazar, Carmen Curutiu, Lia Mara Ditu, Alexandru Mihai Grumezescu, Alina Maria Holban. Nanostructured materials for prolonged and safe food preservation. Food Preservation, Chapter 9, p. 305-331, edited by Alexandru Grumezescu, 2016, ISBN 978-0-12-804303-5. <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780128043035>.

### **Participari la conferinte:**

A.M. Holban, E. Andronescu, A.M. Grumezescu, L.M. Ditu, C. Curutiu, V. Lazar, V. Grumezescu, Otilia Vasile, C.M. Chifiriuc. Magnetite nanoparticles functionalized with plant derived compounds reduce the resistance and persistence of opportunistic pathogens. ECCMID 9-12.04.2016, 2016, Amsterdam, Netherlands, P1287.

A.M. Holban, E.Andronescu, A.M.Grumezescu, L.M.Ditu, C.Curutiu, V. Lazar, V. Grumezescu, B. Vasile, C.M.Chifiriuc. Magnetite nanoparticles functionalized with  $\beta$ -pinene modulate virulence, attachment and biofilm formation of opportunistic pathogens. 10TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON PHOTOEXCITED PROCESSES AND APPLICATIONS (ICPEPA), Aug 29 – Sept 2, 2016, Brasov, Romania.

## **Bibliografie**

---

<sup>i</sup> Emmerson AM and Jones AM. The quinolones: decades of development and use. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51(S1): 13–20, 2003, DOI: 10.1093/jac/dkg208

<sup>ii</sup> Nikolaou KC and Montagnon T. Molecules that changed the world. Wiley VCH, Weinheim, Germany, 2008.

<sup>iii</sup> <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>

<sup>iv</sup> Gheorghe I, Czobor I, Chifiriuc MC, Borcan E, Ghiță C, Banu O, Lazăr V, Mihăescu M, Mihăilescu DF, Zhiyong Z. Molecular screening of carbapenemase - producing Gram negative strains in Roumanian intensive care units during one year survey. J Med Microbiol. 63: 1303-1310, 2014.

<sup>v</sup> Pinheiro MRS, Lacerda HL, Melo RGL and Maciel MA. *Pseudomonas aeruginosa* Infections: Factors Relating to Mortality with Emphasis on Resistance Pattern and Antimicrobial Treatment. Risk Factors for Mortality in *P. aeruginosa* Infections. BJID 12(6):509-515, 2008.

<sup>vi</sup> Poole K. "Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria". Clinical Microbiology and Infection 10(1): 12–26, 2004.

<sup>vii</sup> Lister PD, Wolter DJ and Hanson ND. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. Clin. Microbiol. Rev. 22(4): 582–610, 2009.

<sup>viii</sup> Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J. R. Soc. Med. 95 (41):22–2, 2002.

<sup>ix</sup> Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, McKay G, Siehnel R, Schafhauser J, Wang Y, Britigan BE, Singh PK. Active Starvation Responses Mediate Antibiotic Tolerance in Biofilms and Nutrient-Limited Bacteria. Science 334 (6058): 982–6, 2011.

- 
- <sup>x</sup> Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, Jabbar A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep.* 27, 238-54, 2010.
- <sup>xi</sup> Anghel AG, Grumezescu AM, Chirea M, Grumezescu V, Socol G, Iordache F, Oprea AE, Anghel I, Holban AM. MAPLE fabricated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@*Cinnamomum verum* antimicrobial surface for improved gastrostomy tubes. *Molecules* 19: 8981-8994, 2014.
- <sup>xii</sup> Holban AM, Grumezescu AM, Fikai A, Chifiriuc MC, Lazar V, Radulescu R. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C18- carvone to prevent *Candida tropicalis* biofilm development. *Rom. J. of Mat.* 43: 300-305, 2013.
- <sup>xiii</sup> Saviuc C, Cotar AI, Holban AM, Banu O, Grumezescu AM, Chifiriuc MC. Phenotypic and molecular evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* virulence patterns in the presence of some essential oils and their major compounds. *Letters in Applied NanoBioScience* 2: 91-96, 2013.
- <sup>xiv</sup> Grumezescu AM, Gestal MC, Holban AM, Grumezescu V, Vasile BS, Mogoantă L, Iordache F, Bleotu C, Mogoșanu GD. Biocompatible Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Increases the Efficacy of Amoxicillin Delivery against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Molecules* 19, 5013-5027, 2014.
- <sup>xv</sup> James HJ and Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin Infect Dis.* 49 (11): 1749-1755, 2009.
- <sup>xvi</sup> Chifiriuc C, Grumezescu V, Grumezescu AM, Saviuc C, Lazăr V, Andronescu E. Hybrid magnetite nanoparticles/*Rosmarinus officinalis* essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. *Nanoscale Res Lett.* 7(1): 209, 2012.
- <sup>xvii</sup> Holban AM, Chifiriuc MC, Cotar AI, Bleotu C, Grumezescu AM, Banu O, Lazar V. Virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital-acquired infections occurred in patients with underlying cardiovascular disease. *Romanian Biotechnological Letters* 18(6): 8843- 8854, 2013.
- <sup>xviii</sup> Knudsen GM, Yin N, Gram L. Survival of Bactericidal Antibiotic Treatment by a Persister Subpopulation of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(23): 7390–7397, 2013.
- <sup>xix</sup> Wood TK, Knabelc SJ, Kwan BW. Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(23): 7116-7121, 2013.
- <sup>xx</sup> Ying Z. Persisters, persistent infections and the Yin–Yang model. *Emerging Microbes & Infections* 3, e3, 2014 doi:10.1038/emi.2014.3
- <sup>xxi</sup> Holban AM, Gestal MC, Grumezescu AM. New molecular strategies for reducing implantable medical devices associated infections. *Curr. Med. Chem.* 21(29):3375-82, 2014.