

Badania aktywności biologicznej jonów lantanowców i jonów metali przejściowych oraz nanomateriałów na bazie hydroksyapatytu współdomieszkowanych tymi jonami wobec *Pseudomonas aeruginosa*

Streszczenie

Pseudomonas aeruginosa to groźny patogen oportunistyczny człowieka, którego charakteryzuje obecność wielu czynników wirulencji, wysoka antybiotykooporność oraz zdolność do wywoływania infekcji w miejscach wszczepów. Z tego względu istnieje konieczność poszukiwania materiałów implantacyjnych wykazujących dodatkowo działanie antybakteryjne. Dobrym kandydatem jest hydroksyapatyt wapnia ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) – nietoksyczny, wysoce biokompatybilny materiał o potencjale osteoregeneracyjnym, który naturalnie występuje w organizmie człowieka jako składnik kości i zębów. Struktura tego związku umożliwia jego modyfikację poprzez zastąpienie jonów wapnia (Ca^{2+}) innymi jonami, co pozwala na otrzymanie związków o określonych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych. Wprowadzenie do struktury jonów metali przejściowych (jonów srebra (Ag^+), cynku (Zn^{2+}) czy miedzi (Cu^{2+})) daje możliwość otrzymania materiałów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Materiały mogą być również modyfikowane strukturalnie jonami lantanowców (Ln^{3+}) ze względu na ich zdolność do luminescencji wykorzystywaną w bioobrazowaniu. O ile wpływ jonów metali przejściowych na komórki bakteryjne jest dosyć dobrze opisany w literaturze, tak niewiele wiadomo jak wpływają na nie jony lantanowców.

Jednym z głównych celów badań była ocena, czy subinhibicyjne stężenia jonów lantanowców (Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , Lu^{3+}) wpływają na wirulencję *P. aeruginosa* (biofilm, wytwarzanie plicjaniny, piowerdyny, elastazy, ruch typu *swimming*, *swarming* i *twitching*). Zbadano również wpływ wybranych jonów na właściwości powierzchniowe komórki (ładunek powierzchniowy, hydrofobowość, przepuszczalność osłon) oraz określono ich cytotoksyczność na modelu erytrocytów. Dodatkowo sprawdzono wpływ obecności tych jonów na efekt antybakteryjny ciprofloksacyny i gentamycyny oraz jonów miedzi (Cu^{2+}). W badaniach wykazano, że obecność jonów lantanowców w stężeniach subinhibicyjnych istotnie zwiększała produkcję biofilmu

bakteryjnego, nieznacznie zmieniała właściwości powierzchniowe komórek oraz powodowała zmianę przepuszczalności osłon komórkowych. Ponadto wykazano, że stosowane stężenia (0,5MIC) były cytotoksyczne i powodowały widoczne zmiany w morfologii erytrocytów oraz ich aglomerację, bez wycieku hemoglobiny.

W drugiej części rozprawy doktorskiej zbadano aktywność antybakteryjną hydroksyapatytu wapnia domieszkowanego i współdomieszkowanego jonami metali przejściowych i jonami Eu^{3+} . Sprawdzone wpływy obecności poszczególnych form (materiał sproszkowany, koloid, materiał prasowany (tabletki), materiały wprowadzone do matrycy hydrożelowej oraz ich eluaty) na przeżywalność, wzrost i formowanie biofilmów przez *P. aeruginosa*. Określono również jak wstępne uwalnianie jonów z wybranych materiałów do podłoża wpływa na ich aktywność antybakteryjną. Dla wybranych związków określono również cytotoksyczność na modelu erytrocytów oraz linii komórkowej osteoblastów mysich. W badaniach wykazano wysoką aktywność antybakteryjną nanomateriałów domieszkowanych jonami Ag^+ , szczególnie w formie tabletek. W przypadku jonów Zn^{2+} jako domieszki wykazano obniżenie liczebności bakterii po inkubacji w obecności koloidów wykonanych z materiałów modyfikowanych przez substytucję grup fosforanowych grupami krzemianowymi. Aktywność antybakteryjną wykazano również dla materiałów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Cu^{2+} . W przypadku nanomateriałów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Cu^{2+} i Eu^{3+} wykazano różnice w rzeczywistej ilości wbudowanych jonów, w porównaniu z ilością teoretyczną oraz różnice w uwalnianiu jonów do podłoża, z czego wynikają prawdopodobnie różnice w ich aktywności antybakteryjnej oraz cytotoksyczności. Wykazano, że wstępne uwolnienie jonów do podłoża hodowlanego poprawia ich aktywność, co może wyjaśniać zwiększone działanie eluatów w porównaniu z materiałami sproszkowanymi. Badane nanomateriały, szczególnie te domieszkowane jonami Cu^{2+} , wykazywały toksyczność wobec erytrocytów oraz osteoblastów. Nie wykazano natomiast istotnego wpływu jonów Eu^{3+} na aktywność antybakteryjną jonów Cu^{2+} .

Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować, że pomimo, że obecność jonów lantanowców istotnie wpływa na wirulencję i właściwości powierzchniowe komórek *P. aeruginosa* to mogą być one wykorzystywane jako domieszki w nanomateriałach o potencjalnym zastosowaniu w implantologii. Przemawia za tym zwłaszcza fakt, że ich stężenia w hydroksyapatycie wapnia są dużo niższe niż stężenia 0,5MIC, dla których obserwowano efekty przedstawione w niniejszej rozprawie.