

PROGRAMMA DI RICERCA STM

Il Fruitore: **Dr. Mariagrazia Di Luca**

Istituto di afferenza: **Nanoscienze**

con qualifica **assegnista di ricerca**

Titolo del programma: Evaluation of novel antimicrobial peptides activity for the anti-biofilm prevention and treatment of implant-associated infections

(Italiano): Valutare l'effetto di peptidi antimicrobici contro isolati clinici di funghi e batteri in vitro e in vivo, allo scopo di trattare infezioni associate agli impianti

1. Introduzione

L'argomento del programma di ricerca svolto nel periodo 17 Maggio al 7 Giugno 2015, presso l'Infectious Diseases Research Laboratory diretto dal Prof Andrej Trampuz del Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie at the Charité – University Medicine, Berlino Germania, riguarda l'utilizzo di nuovi peptidi antimicrobici come potenziali farmaci per la prevenzione ed il trattamento delle infezioni associate agli impianti, dovute a biofilm microbici. Il laboratorio del Prof. Trampuz è specializzato nella diagnosi e nel trattamento di tali infezioni, utilizzando metodi innovativi di analisi come la microcalorimetria isoterma. Tale metodica si basa sulla rilevazione del flusso di calore prodotto o assorbito da un determinato sistema biologico. In particolare, nell'applicazione in ambito batteriologico la IMC valuta variazione di calore dovute al metabolismo batterico. Tale metodica è molto sensibile e precisa ed è stata già utilizzata per la valutazione dell'effetto degli antibiotici su batteri sia in forma planktonica (batteri liberi in soluzione) che in forma di biofilm (batteri sessili adesi ad una superficie).

2. Scopo

Scopo del programma della STM è stato quello di valutare: i) l'attività antimicrobica di tre derivati peptidici di CM su batteri planktonici; ii) l'attività antimicrobica di tre derivati peptidici di CM verso biofilm; iii) l'attività antibiofilm dell'ipericina, una molecola foto attivabile, su materiali sostituenti l'osso, normalmente impiegati negli impianti ortopedici, per una eventuale terapia combinata con i peptidi antimicrobici.

3. Risultati

I peptidi selezionati per questo studio sono stati: CM18, CM15 e CM12. I primi due peptidi sono stati selezionati dalla letteratura, mentre CM12 è la versione di 12 aa ottenuta *in silico* ed ottimizzata per una migliore attività antimicrobica, partendo dalla sequenza di CM18.

3.1 Attività dei AMPs verso la forma planktonica di *S. epidermidis*

In primo luogo è stata valutata l'attività antimicrobica dei peptidi CM verso la forma planktonica di *S. epidermidis*. Come si può osservare dalla Figura 1 la MIHC (minima concentrazione inibente il flusso di calore) di CM12 verso *S. epidermidis* planktonico è di 2 μM analogamente a quanto ottenuto per CM15 (Figura 2). Tale concentrazione risulta più bassa rispetto a quella ottenuta per CM18 (>32 μM) come si osserva dalla Figura 3, suggerendo, quindi, che come predetto *in silico*, CM12 ha una migliore attività rispetto al peptide CM18, e mantiene la stessa attività di CM15, pur essendo più corto di tre aminoacidi.

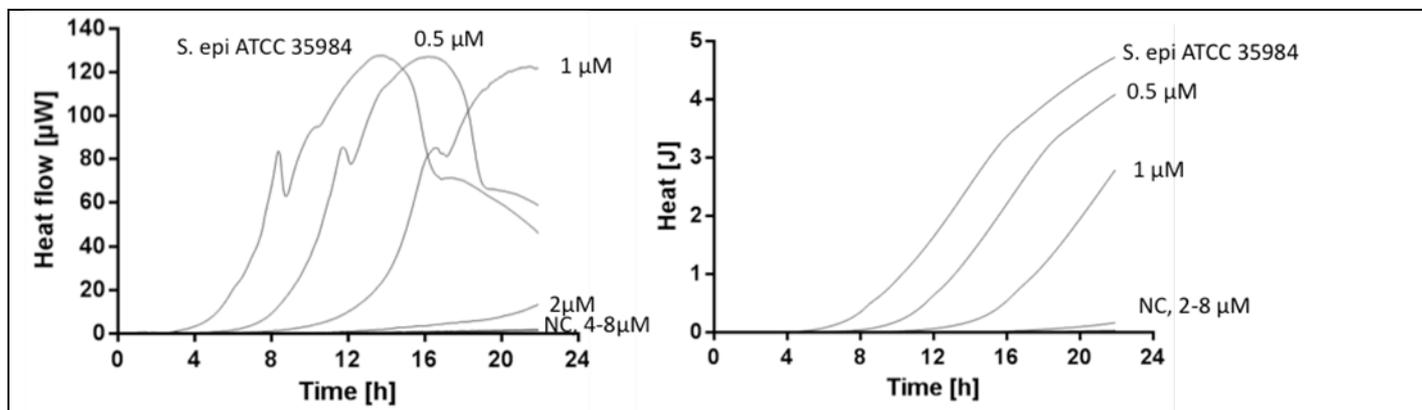


Figura 1. Attività antimicrobica di CM12 verso *S. epidermidis* ATCC 35984 in forma planktonica valutata mediante microcalorimetria isoterma.

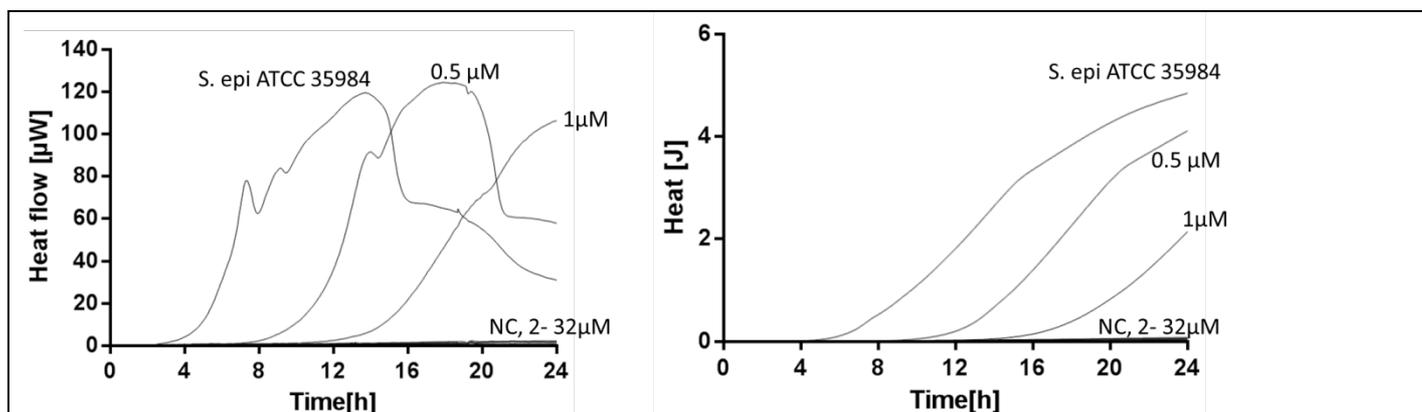


Figura 2. Attività antimicrobica di CM15 verso *S. epidermidis* ATCC 35984 in forma planktonica valutata mediante microcalorimetria isoterma.

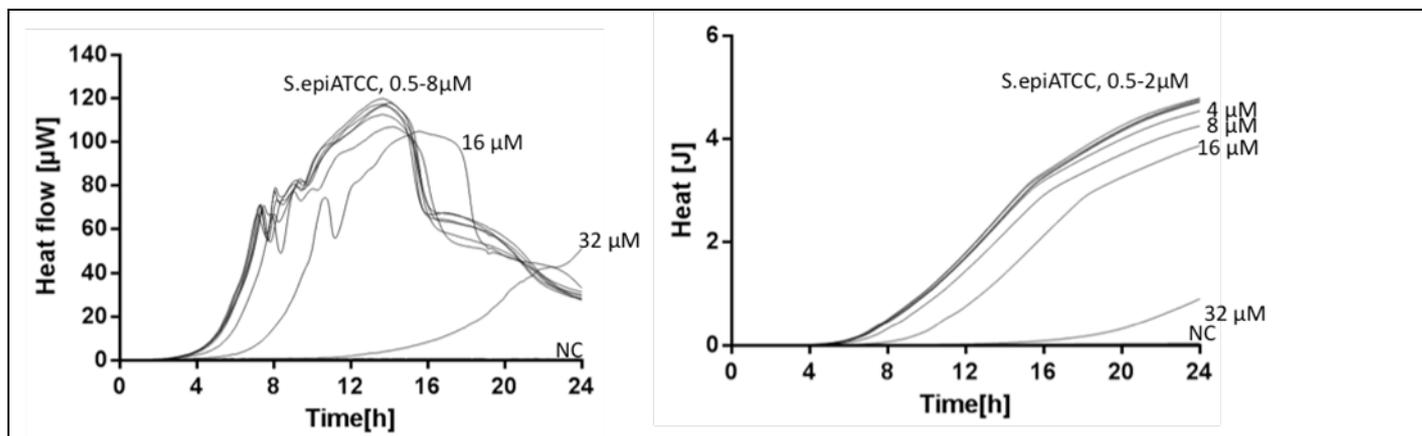


Figura 3. Attività antimicrobica di CM18 verso *S. epidermidis* ATCC 35984 in forma planktonica valutata mediante microcalorimetria isoterma.

3.2 Attività dei AMPs verso la forma biofilm di *S. epidermidis*

In seguito all'analisi dell'attività dei CMs verso *S. epidermidis* in forma planktonica, è stata valutata anche l'attività di tali peptidi verso batteri in forma di biofilm.

Come si può osservare dalle curve ottenute dall'analisi in microcalorimetria, CM12 era in grado di eradicare il biofilm ad una concentrazione di 32 µM (Figura 4). La stessa concentrazione è stata osservata anche

per CM15 (Figura 5). Al contrario CM18 non mostrava alcuna attività eradicante il biofilm anche alla massima concentrazione saggata (64 μM), come mostrato in Figura 6.

Tali risultati suggeriscono che analogamente a quanto riportato in letteratura per altri peptidi antimicrobici la concentrazione eradicante il biofilm di CM12 risulta più alta rispetto al concentrazione capace di inibire la crescita dei batteri in forma planktonica, da parte dello stesso peptide. Tuttavia, l'attività antibiofilm di CM12 risulta analoga a quella di CM15 e migliore rispetto a quella di CM18, per la quale non è stata osservata alcuna attività alle concentrazioni saggate.

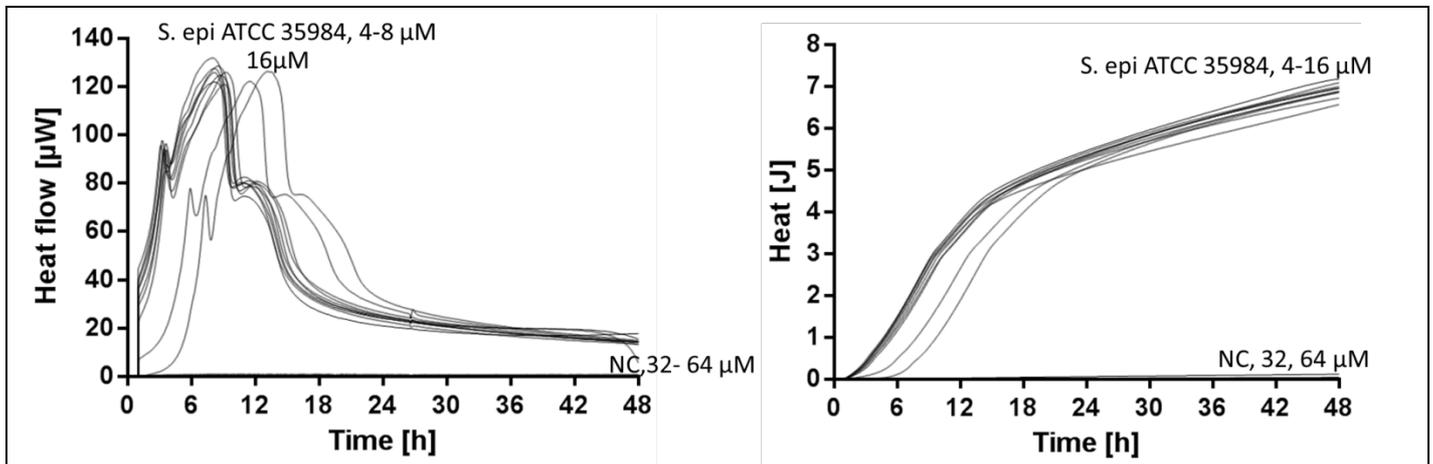


Figura 4. Attività antibiofilm di CM12 verso *S. epidermidis* ATCC 35984 in forma sessile valutata mediante microcalorimetria isoterma.

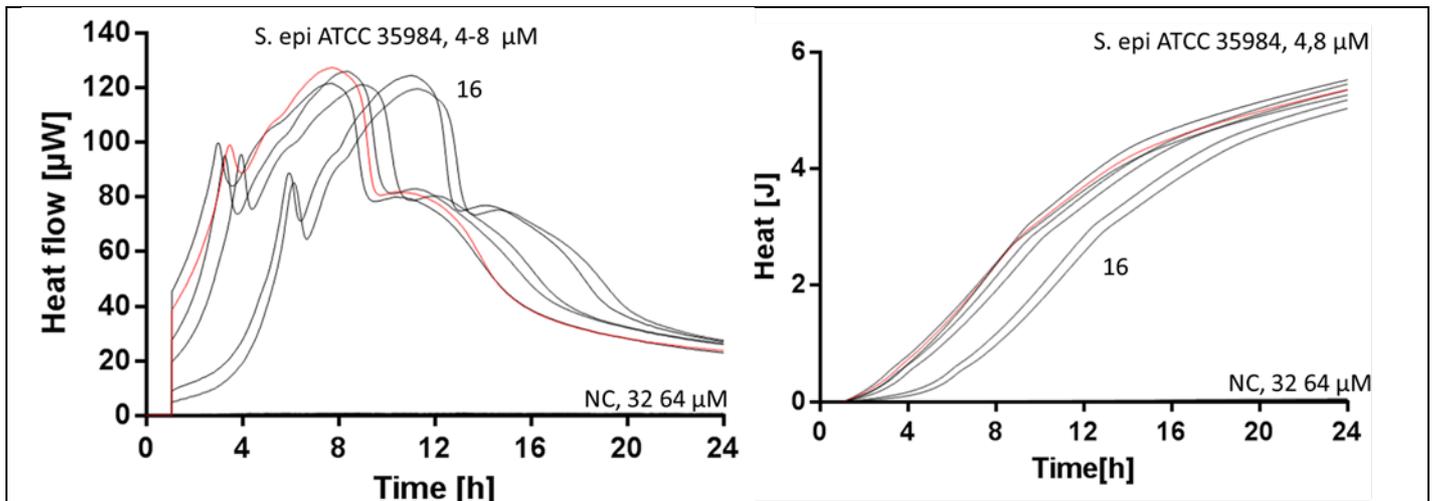


Figura 5. Attività antibiofilm di CM15 verso *S. epidermidis* ATCC 35984 in forma sessile valutata mediante microcalorimetria isoterma.

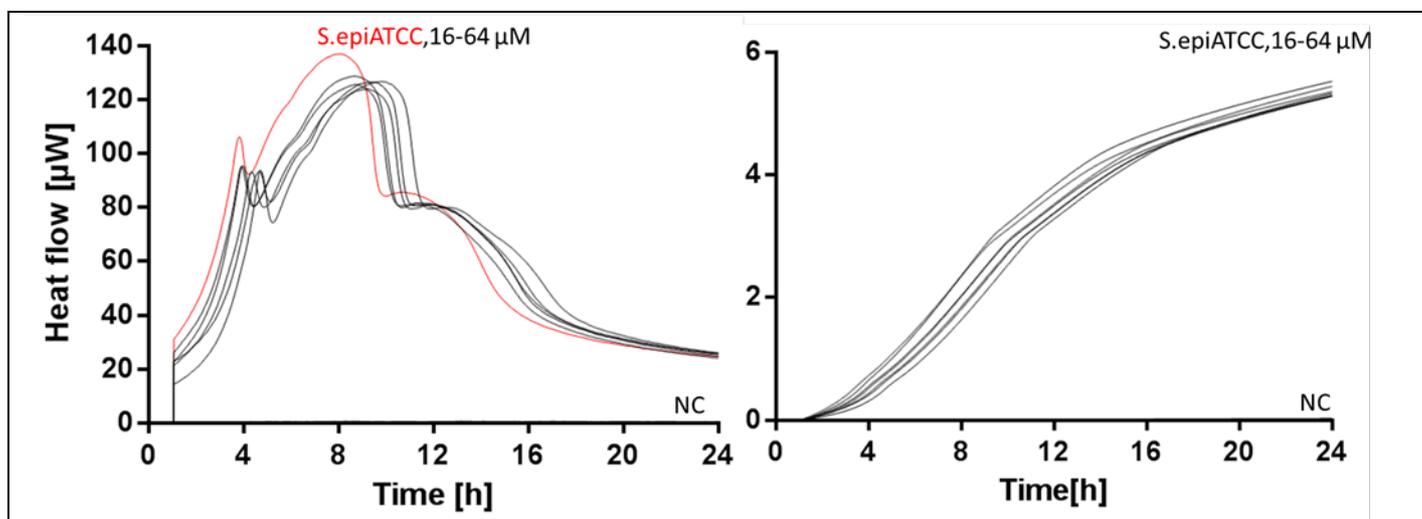


Figura 6. Attività antibiofilm di CM18 verso *S. epidermidis* ATCC 35984 in forma sessile valutata mediante microcalorimetria isoterma.

3.3 Attività antibiofilm dell'ipericina verso biofilm di *S. aureus*

Parallelamente all'analisi dell'attività antimicrobica e antibiofilm dei AMPs è stata investigata la capacità dell'ipericina di inibire la formazione di biofilms di *S. aureus*, coinvolti nelle infezioni degli impianti protesici articolari. A tale scopo ho condotto alcuni studi di valutazione dell'attività antibiofilm, verso isolati clinici di *S. aureus*, di ipericina adsorbita a blocchetti di idrossiapatite, che vengono normalmente utilizzati come sostituenti l'osso durante gli interventi di impianto di protesi ortopediche.

Mediante misure di microcalorimetria isoterma è stata valutata in primo luogo la capacità dell'ipericina di inibire la crescita batterica in seguito ad irraggiamento con luce blu. Concentrazioni scarsi in ragione due di ipericina (range: 0.5-16 µM) venivano da prima incubate al buio a RT in PBS con $1-5 \times 10^5$ CFU/ml e successivamente in presenza di una luce LED blu (circa 18 J/cm^2). Come controllo negativo un secondo gruppo di campioni venivano allestiti in maniera identica ai precedenti, ma non subivano il trattamento alla luce, rimanendo per altri 15 minuti al buio. Tali campioni venivano poi inoculati in terreno di crescita per batteri e incubati nel microcalorimetro per 24 ore. Come mostrato in Figura 7 dopo 24h nessuna crescita batterica era riscontrata in presenza di tutte le concentrazioni di ipericina saggiate, dopo il trattamento con la luce rispetto al controllo senza ipericina (Figura 7 B).

Al contrario quando l'ipericina era saggiata ma senza il trattamento con la luce si osservava crescita in presenza di tutte le concentrazioni di ipericina. (Figura 7 A). Indicando, analogamente a quanto precedentemente dimostrato, anche a basse concentrazioni l'ipericina è in grado di inibire la crescita di *S. aureus*

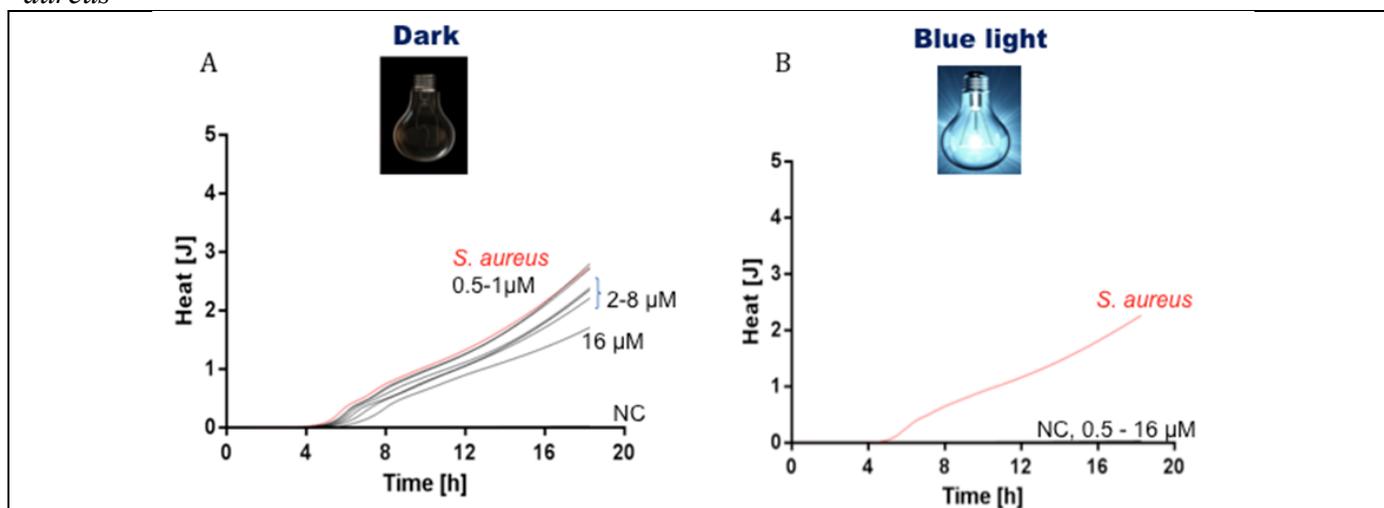


Figura 7. Grafico del calore totale rilevato mediante microcalorimetria. *S. aureus* in fase planktonica con ipericina al buio (A) e in seguito al trattamento con la luce (B). In rosso è riportata la curva di *S. aureus* che veniva incubato al buio, ma senza ipericina (A) e in seguito al trattamento con la luce, sempre senza ipericina (B). NC: Negative control, solo terreno senza batteri.

Nel secondo esperimento, l'ipericina a due concentrazioni (8-16 μ M) veniva fatta adsorbire a blocchetti di idrossiapatite sostituenti l'osso in seguito a coincubazione in PBS overnight. Successivamente i sostituenti l'osso venivano incubati con *S. aureus* (1×10^6 CFU/ml) per permettere la formazione di biofilm. Dopo 24 ore, i campioni venivano inseriti nel microcalorimetro e ne veniva valutata la capacit  dell'ipericina di inibire l'adesione e la formazione del biofilm. Come indicato in figura 8 , in seguito a trattamento con la luce l'ipericina, sia a 8 μ M che a 16 μ M ritardava di 6 e 12 ore, rispettivamente, la formazione di biofilm. Tali dati risultano promettenti suggerendo che l'ipericina e la terapia fotodinamica potrebbe essere presto utilizzate per il trattamento, pre e post impianto, di protesi articolari. Ulteriori esperimenti saranno necessari per comprendere a quale concentrazione si potr  avere una totale inibizione della formazione del biofilm e soprattutto valutare l'utilizzo di peptidi antimicrobici per meglio rilasciare l'ipericina anche *in vivo*.

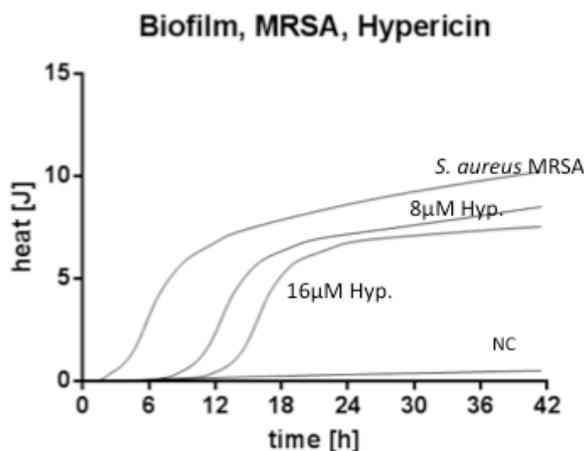


Figura 8. Grafico del calore totale rilevato mediante micro calorimetria. *S. aureus* in fase di biofilm, formato su sostituenti l'osso adsorbiti con ipericina (8 e 16 μ M), in seguito al trattamento con la luce. NC: Negative control, solo sostituenti l'osso con ipericina, ma senza batteri.