

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ NAUKI O ZDROWIU

**Ocena przeciw-amebowego działania *in vitro*
wybranych czynników fizyko-chemicznych
na wykryte w Polsce szczepy *Acanthamoeba*,
stanowiące narastające zagrożenie zdrowia publicznego**

Wanda Baltaza

Rozprawa na stopień doktora nauk o zdrowiu



Warszawa 2019



Rozprawa na stopień doktora nauk o zdrowiu

Autor rozprawy:

Mgr Wanda Baltaza

Promotor:

Prof. n. med. Lidia Chomicz,

Zakład Biologii Medycznej, WNoZ, WUM

Promotor pomocniczy:

Dr n. med. Dorota Kopacz

Klinika Okulistyki .I Wydz.Lekarski, WUM

Recenzenci:

Prof. n. med. Jerzy Szaflik

Centrum Mikrochirurgii Oka Laser w Warszawie

Prof. n. med. Jacek Dutkiewicz

Instytut Medycyny Wsi w Lublinie

Słowa kluczowe:

szczepy *Acanthamoeba*: środowiskowy, patogeniczne rogówkowe, genotyp T4, *Acanthamoeba* keratitis, *in vivo* mikroskopia konfokalna, kultury *in vitro*, temperatura, płyny do dezynfekcji soczewek kontaktowych, Octenisept, Aerodesin®2000, Mediarine, wpływ dwuglukonianu chlorheksydyny, jodku powidonu, tojokamycyny

Ocena przeciw-amebowego działania *in vitro* wybranych czynników fizyko-chemicznych na wykryte w Polsce szczepy *Acanthamoeba*, stanowiące narastające zagrożenie zdrowia publicznego

Streszczenie

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowi cykl 7 oryginalnych prac naukowych, które zostały opublikowane w czasopismach anglojęzycznych o zasięgu międzynarodowym.

Wstęp

Tematyka badań dotyczy narastających w Świecie w ciągu ostatniego dwudziestolecia, a także w Polsce, zagrożeń zdrowia publicznego, powodowanych przez ameby z rodzaju *Acanthamoeba*. Zagrożenie dla zdrowia, a nawet życia człowieka mogą stanowić gatunki z rodzaju: *Acanthamoeba*, bytujące w środowisku naturalnym i stworzonym przez człowieka jako kosmopolityczne mikroorganizmy wolnożyjące. Wykrywano je w glebie, w zbiornikach naturalnych słono- i słodko-wodnych, w wodzie wodociągowej, a także w wodzie mineralnej, w ściekach, kurzu, urządzeniach klimatyzacyjnych i grzewczych, w żywności nieprzetworzonej np.: w grzybach, surowych warzywach oraz w ich przetworach. Trofozoity i cysty tych pełzaków występują w powietrzu, izolowano je z aparatów do dializy, zestawów stomatologicznych, płynów do przemywania oczu, komórkowych i tkankowych hodowli, także w środowisku szpitalnym. Przypadkowa transmisja tych ameb do wnętrza ludzkiego organizmu w określonych warunkach może ujawnić ich potencjalną zdolność do rozwoju jako pasożyty o różnej patogeniczności.

Ameby amfizoiczne stanowią czynnik etiologiczny pełzakowego zapalenia rogówki *Acanthamoeba keratitis* (AK), prowadzącego do nieodwracalnych zmian w narządzie wzroku, a nawet do utraty zdolności widzenia. Najczęstszym czynnikiem ryzyka rozwoju zapalenia rogówki o tej etiologii u osób dorosłych jest noszenie soczewek kontaktowych, a szczególnie nie przestrzeganie zaleceń higienicznych podczas ich stosowania.

Niedokładne lub błędne początkowe, opóźnione właściwe rozpoznanie, pomimo postępów w chemioterapii, sprawia, że leczenie wciąż jest trudne, a jego rezultaty niezadowalające; Łatwość rozprzestrzeniania się tych amfizoicznych ameb w środowisku człowieka, oporność ich cyst na środki dezynfekcyjne oraz leki wpływają na trudności w diagnostyce i terapii oraz znacznie ograniczają skuteczność możliwych działań prewencyjnych.

Od wielu lat bada się dyspersję szczepów o potencjalnej patogeniczności i poszukuje substancji o aktywności przeciw-amebowej. Badania nad tym ważnym problemem zdrowia publicznego podjęto w Zakładzie Biologii Medycznej w 2003r. W ciągu ostatnich 10 lat w wielu krajach Świata, również w Polsce nastąpiła znaczna intensyfikacja takich badań, wskazująca na dużą wagę problemu; badania te prowadzone są na szerszą skalę z powodu wzrastającego ryzyka zarażenia struktur oka przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba*, a w efekcie

wzrostu liczby przypadków akantamebowego zapalenia rogówki, obciążonego perspektywą utraty zdolności widzenia.

Założenia i cel badań

W badaniach, podjętych przeze mnie w ramach studiów doktoranckich, założone zostały aspekty poznawcze, naukowe i praktyczne. Głównym celem tych badań było poznanie i ocena przeciw-amebowego oddziaływania wybranych czynników fizyko-chemicznych na wykrywane w Polsce szczepy *Acanthamoeba*, pozyskiwane we współpracy z klinicystami, w szczególności powodujące zagrażające utratą zdolności widzenia, zapalenie rogówki *Acanthamoeba keratitis*.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły szczepy ameb amfizoicznych: szczep środowiskowy, *Acanthamoeba castellanii* Neff, pasażowany w Zakładzie Biologii Medycznej, prowadzony jako wzorcowy oraz patogeniczne, pozyskane we współpracy z klinicystami różne, rogówkowe szczepy *Acanthamoeba*, nie badane wcześniej pod względem uwarunkowań ich dyspersji i reakcji na czynniki fizyko-chemiczne.

Po wstępnej identyfikacji morfologicznej i genotypowej izolatów zakładano z nich hodowle *in vitro* na różnych podłożach - półpłynnych i stałych. Materiał z tych pozyskanych szczepów był sukcesywnie pasażowany *in vitro* w równoległych hodowlach kontrolnych i testowych w założonych warunkach temperatury, pH, czynników biotycznych. Badano wpływ czynników fizycznych i aplikowanych substancji chemicznych zależnie od ich rodzaju, stężenia i czasu działania poprzez systematyczne monitorowanie dynamiki populacji ameb odpowiednio do faz rozwoju hodowli.

Oceniono różnego rodzaju substancje chemiczne: Octenisept, stosowany powszechnie do dezynfekcji, także około-zabiegowej w placówkach opieki zdrowotnej i laboratoriach: preparaty: na bazie alkoholu Aerodesin ©2000 oraz uwalniający aktywny chlor Medicarine; preparat stosowany w okulistyce jodek powidoku; znaną z aktywności przeciw-pierwotniaczej tojokamycynę nie stosowaną wcześniej przeciw amebom; substancję o potwierdzonych właściwościach amebo-statycznych dwuglukonian chlorheksydyny stosowaną *in vivo* jako chemioterapeutyk w AK. Podjęto także badania płynów do soczewek koniugowanych z nanocząstkami srebra i złota w celu podniesienia skuteczności tych płynów przeciwko trofozoitom *Acanthamoeba*.

Monitorowano dynamikę kultur *in vitro*, oceniając liczebność populacji ameb, uwzględniając proporcję stadiów troficznych do cyst, charakterystykę morfo- fizjologiczną i genotypową dyspersyjnych form z zastosowaniem metod /technik mikroskopowych oraz biologii molekularnej (PCR).

Podsumowanie wyników

Porównawcza ocena wyników badań wykazała różnice w dynamice populacji *in vitro* pomiędzy szczepami pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*, pojawiające się wskutek działania czynników fizycznych i chemicznych.

- Wszystkie aplikowane substancje powodowały efekt przeciw-amebowy, zależny od ich rodzaju, stężenia oraz czasu oddziaływania.
- Amebo-statyczny wpływ tych substancji na dynamikę populacji ameb przejawiał się w warunkach *in vitro* jako spadek liczebności populacji pelzaków.
- Szczepy rogówkowe *Acanthamoeba* po kilku dniach ekspozycji na chemioterapeutyki były *in vitro* bardziej odporne na te substancje niż wzorcowy szczep środowiskowy.
- Zróznicowanie przeciw-amebowej skuteczności poszczególnych związków, przejawiające się w odniesieniu do tego samego patogenicznego szczepu ameb jako zmienione proporcje form troficznych i cyst, ujawniało się po dłuższym czasie aplikacji.
- Jodek powidonu oraz tojokamycyna, nie stosowane w terapii AK, okazały się skuteczne porównywalnie do chlorheksydyny, stosowanej w terapii AK; jednak, przeciwnie niż chlorheksydyna, nie indukowały encystacji.
- Octenisept, antyseptyk o uznanej skuteczności bakteriobójczej wykazał *in vitro* efekt amebo-statyczny jako czynnik redukujący liczebność populacji *A. polyphaga*.
- Obydwie substancje, stosowane do szybkiej dezynfekcji urządzeń i powierzchni, preparat Aerodesin®2000 oraz Medicarine wykazały efekt amebo-statyczny i cystobójczy, jednak różnił je czas potrzebny do ujawnienia właściwości cystobójczej; preparat na bazie alkoholu działał szybciej niż uwalniający chlor.
- W badaniach nad aktywnością płynów do soczewek, koniugowanych z nanocząstkami, skuteczność przeciw-amebowa została wykazana przy koniugacji płynu Solo Care Aqua z nanocząstkami srebra.
- Porównanie wpływu *in vitro* temperatury 20°C i 37°C wykazało podwyższoną dynamikę populacji szczepów pochodzenia rogówkowego po przeniesieniu do 37°C, podczas gdy liczebność szczepu *A. castellanii* Neff była znacząco niższa w tej temperaturze niż w 20°C.

Podsumowując wyniki, zwraca uwagę ich aspekt praktyczny, w większości stanowią nowe dane o czynnikach przeciw-amebowych, istotnych dla zmniejszenia zagrożenia zdrowia publicznego.

Wnioski

Wieloaspektowe, interdyscyplinarne badania, wykonane w ramach przedstawionego tematu, z zastosowaniem metod parazytologicznych, mikrobiologicznych, hodowli *in vitro*, mikroskopii świetlnej, elektronowej, techniki biologii molekularnej umożliwiły dostarczenie nowych dla Polski i wiedzy ogólnej danych o fizyko-chemicznych uwarunkowaniach dyspersji ameb amfizoicznych w środowisku człowieka, a także na temat inhibicji procesu encystacji, który ma decydujące znaczenie w występowaniu remisji i nawrotów w przebiegu *Acanthamoeba* keratitis.

- Przeciw-amebowy wpływ jodku powidonu - środka antyseptycznego o szerokim przeciw-bakteryjnym i antywirusowym działaniu - wykazany przeciw szczepom rogówkowym powinien być brany pod uwagę w badaniach nad jego terapeutycznym potencjałem w AK.

- Analiza danych, uzyskanych z monitorowania kultur *in vitro* wykazała swoistą korelację między podwyższoną dynamiką populacji a cięższym klinicznie przebiegiem AK; potwierdza to przydatność wyników monitorowania *in vitro*, wykazaną w pracy z wcześniejszych badań, jako narzędzia przydatnego w ocenie przebiegu leczenia.
- Przy krótkotrwałym stosowaniu dezynfektantów Aerodesin®2000 i Medicarine pewny jest ich efekt amebostatyczny. Wobec uzyskanych wyników byłoby uzasadnione zalecenie dłuższego czasu stosowania tych substancji do szybkiej dezynfekcji np. w laboratoriach, aby wykorzystać ich efekt cystobójczy,
- Dynamiczny wzrost i większa żywotność w wyższej temperaturze izolatów *A. castellanii* oraz *A. polyphaga*, pozyskanych do tych badań z klinicznie ciężkich przypadków AK, uzasadnia traktowanie termo-torelancji jako markera, przydatnego w prospektywnej ocenie chorobotwórczości ameb. Wykrycie takiej reakcji na czynnik fizyczny u kolejnych rogówkowych szczepów tych pelzaków jest szczególnie istotne wobec pojawiających się w piśmiennictwie kontrowersji co do znaczenia tej właściwości jako wskaźnika zdolności tych egzozoitów do pasożytnictwa.
- Konieczność poszerzenia dotychczasowej wiedzy o możliwościach poprawy diagnostyki i terapii AK stanowi nadal aktualny problem zdrowia publicznego, wymagający kontynuowania badań.
- Oczekiwania dotyczą zwiększenia skuteczności zapobiegania dyspersji w środowisku człowieka potencjalnie patogenicznych szczepów *Acanthamoeba*. Równocześnie konieczne jest zwiększenie świadomości zagrożeń, generowanych przez ameby amfizoiczne z rodzaju *Acanthamoeba* zarówno wśród personelu medycznego jak i w grupach podwyższonego ryzyka.