

Emilia Zaremska

Praca magisterska wykonana w Katedrze i Zakładzie Biochemii i Farmakogenomiki

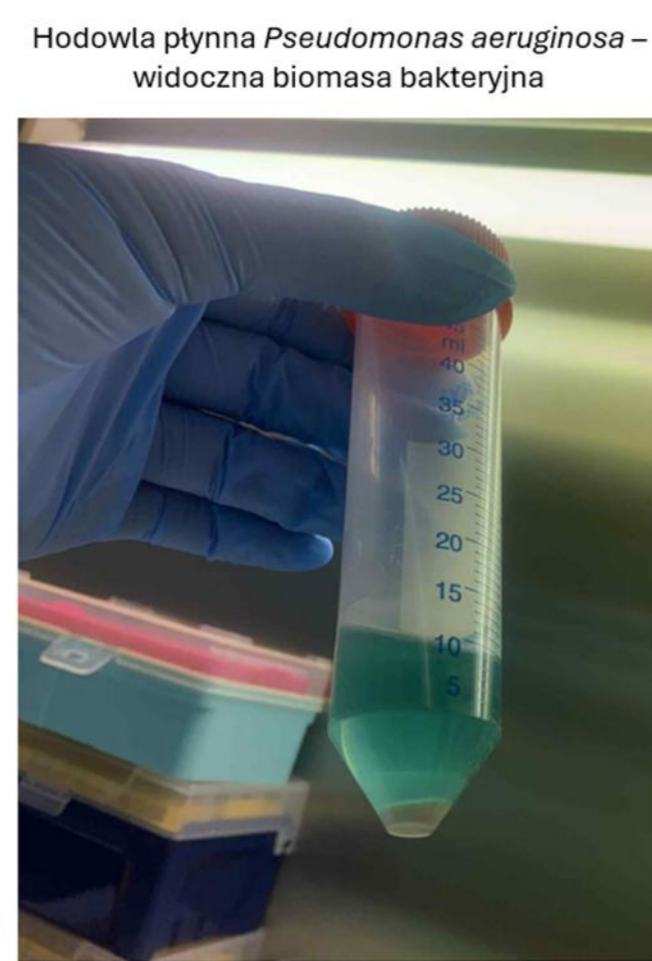
Promotor pracy: dr hab. Małgorzata Wrzosek

System SOS

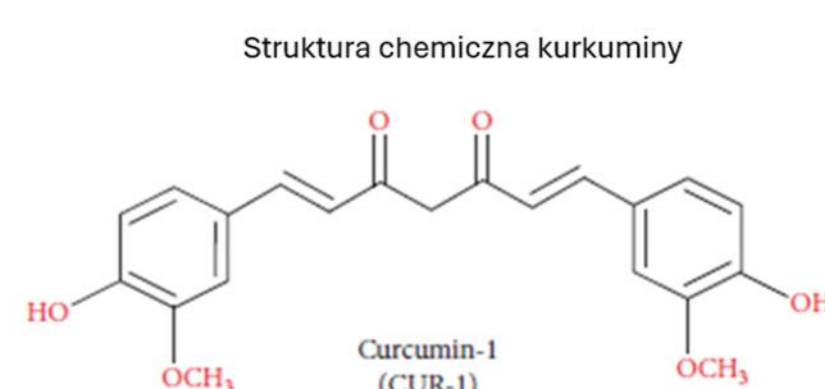
- Stanowi pierwszą linię obrony przed czynnikami stresowymi
 - Szeroko rozpowszechniony wśród bakterii
- Stanowi zbiór genów kodujących białka zaangażowane w naprawę DNA oraz mutagenezę
- Aktywowany pod wpływem niektórych antybiotyków (fluorochinolony)



Allium sativum L.



Hodowla płynna *Pseudomonas aeruginosa* – widoczna biomasa bakteryjna



I. Cele pracy i metody

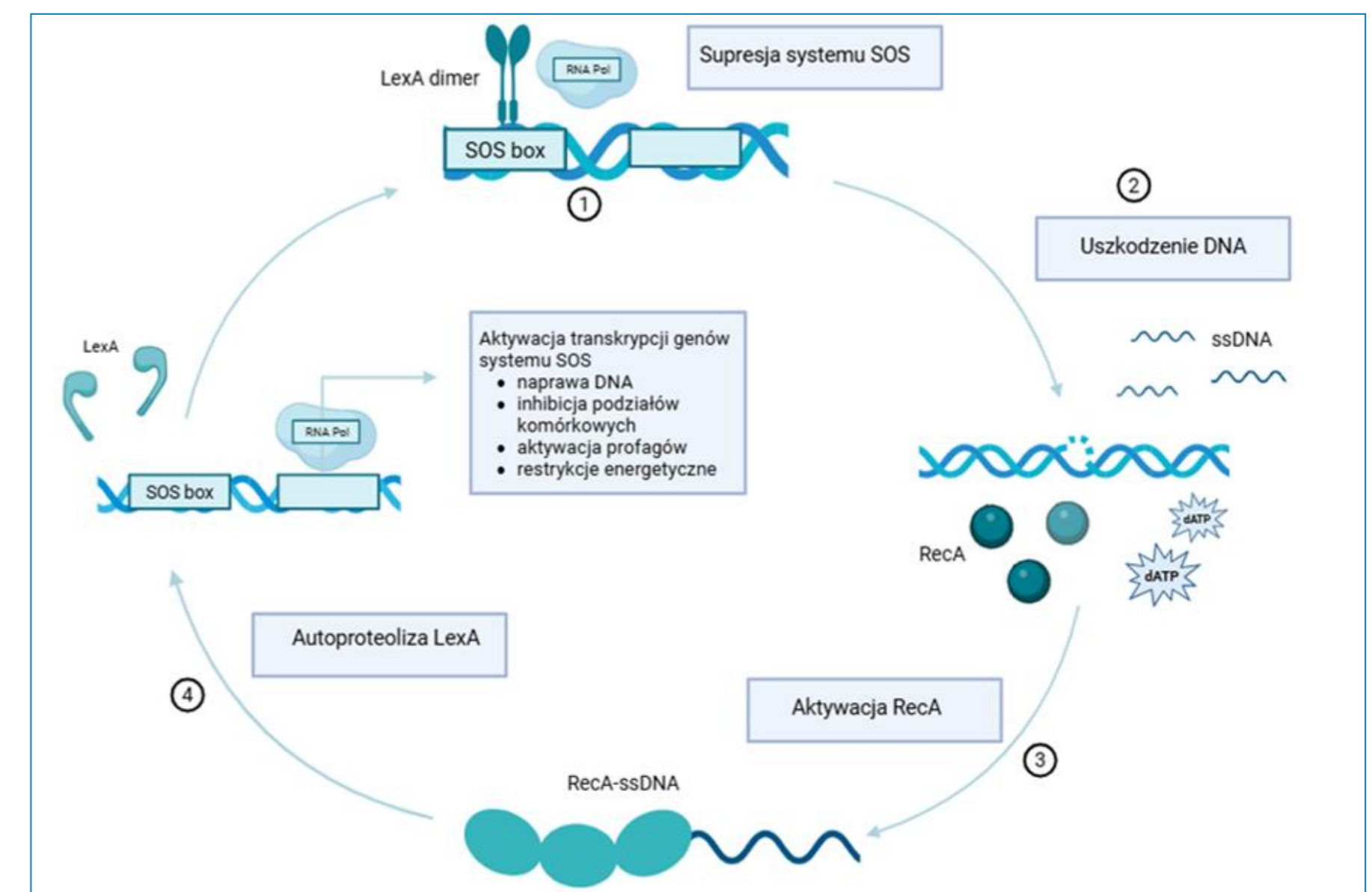
- 1) Ocena profilu lekowrażliwości szczepu *Pseudomonas aeruginosa* wyizolowanego z zakażonego owrzodzenia stopy cukrzycowej na antybiotyki standardowo wykorzystywane w terapii
 - Zastosowanie systemu automatycznego i metody manualnej (oznaczenie MIC; ang. Minimal inhibitory concentration)
 - Porównanie uzyskanych wyników z profilem lekowrażliwości szczepu referencyjnego ATCC BAA-1744
- 2) Ocena potencjału przeciwdrobnoustrojowego naturalnych związków bioaktywnych – **allicyny i kurkuminy** metodą mikroplótkową
- 3) Analiza ekspresji genów związanych z odpowiedzią SOS, naprawą rekombinacyjną oraz mutagenezą indukowaną stresem genotoksycznym
 - Ocena ekspresji genów: *lexA*, *dinB* oraz *recN* w komórkach *Pseudomonas aeruginosa* ATCC BAA-1744
 - Ekspozycja na ciprofloksacynę ($\frac{1}{4}$ MIC=0,0625mg/L) oraz kurkuminę (62mg/L)
 - Zastosowanie ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym i metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$

II. Wyniki

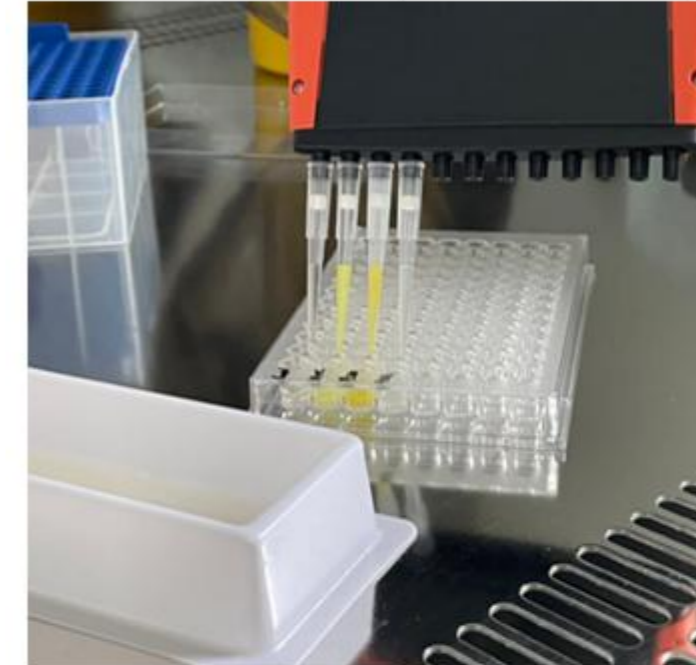
- Ocena wrażliwości na ciprofloksacynę i substancje naturalne
- Ocena ekspresji genów systemu SOS

III. Wnioski

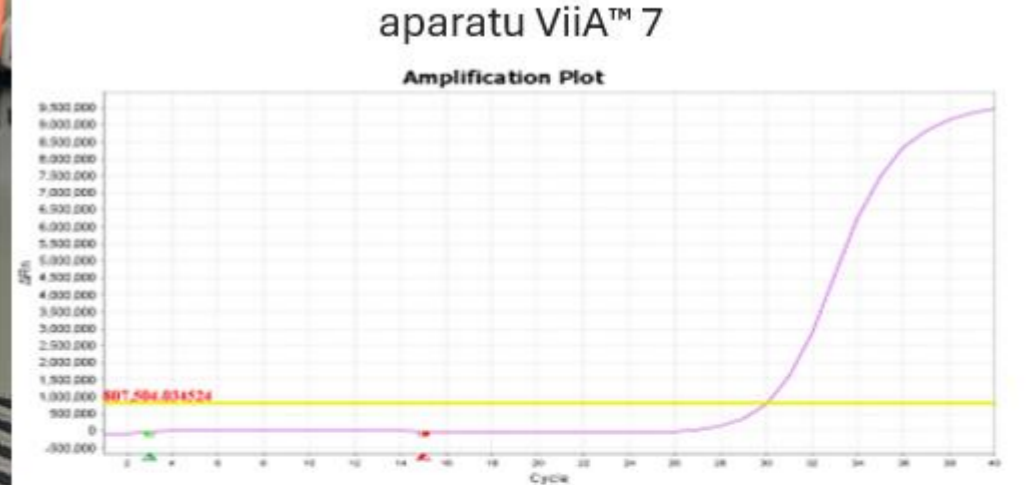
- Szczep kliniczny *Pseudomonas aeruginosa* wyizolowany z infekcyjnego owrzodzenia stopy cukrzycowej oraz szczep referencyjny ATCC BAA-1744 wykazały zmniejszoną wrażliwość na ciprofloksacynę (MIC=0,25mg/L) i według standardów klinicznych EUCAST zaklasyfikowane zostały do kategorii wrażliwy, zwiększona ekspozycja
 - Allicyna w stężeniu 250mg/L skutecznie zahamowała wzrost 90% populacji szczepu klinicznego i referencyjnego *Pseudomonas aeruginosa*
- System SOS u *Pseudomonas aeruginosa* ulega aktywacji pod wpływem ciprofloksacyny
- Kurkumina w badanym stężeniu nie wywiera wpływu na aktywację systemu SOS, ani nie modyfikuje odpowiedzi SOS indukowanej przez ciprofloksacynę



Badanie wrażliwości na substancje naturalne metodą mikroplótkową



Wykres amplifikacji w czasie rzeczywistym (qPCR) – analiza fluorescencji w kolejnych cyklach z aparatu ViiA™ 7

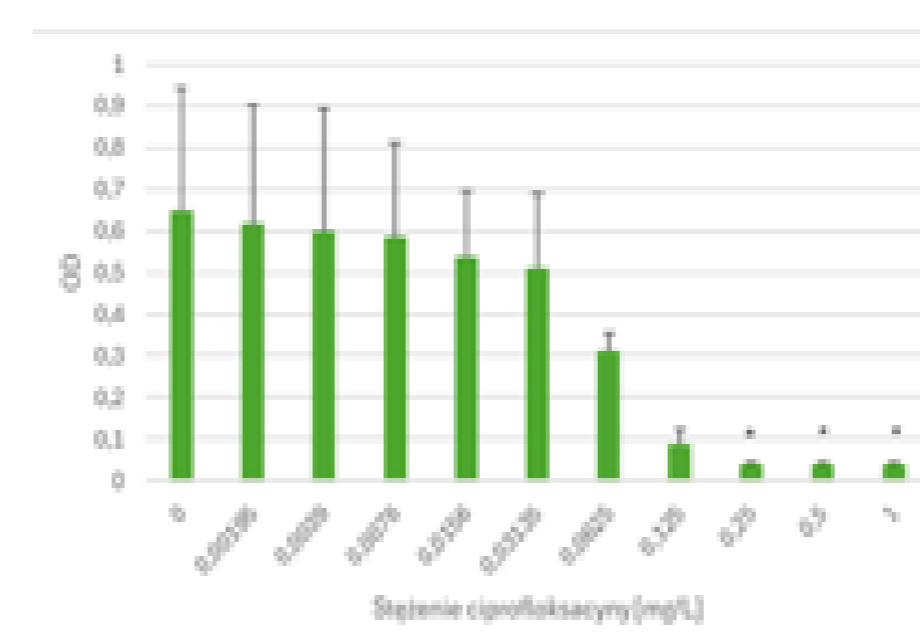


Karty do oceny lekowrażliwości w systemie VITEK® 2

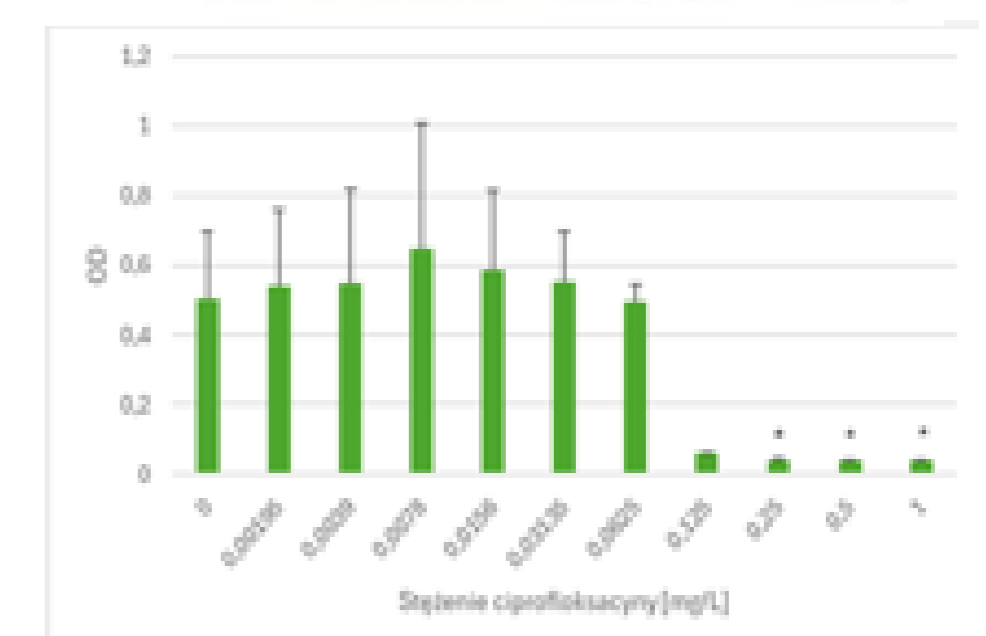


Sekwencje starterów dla badanych genów

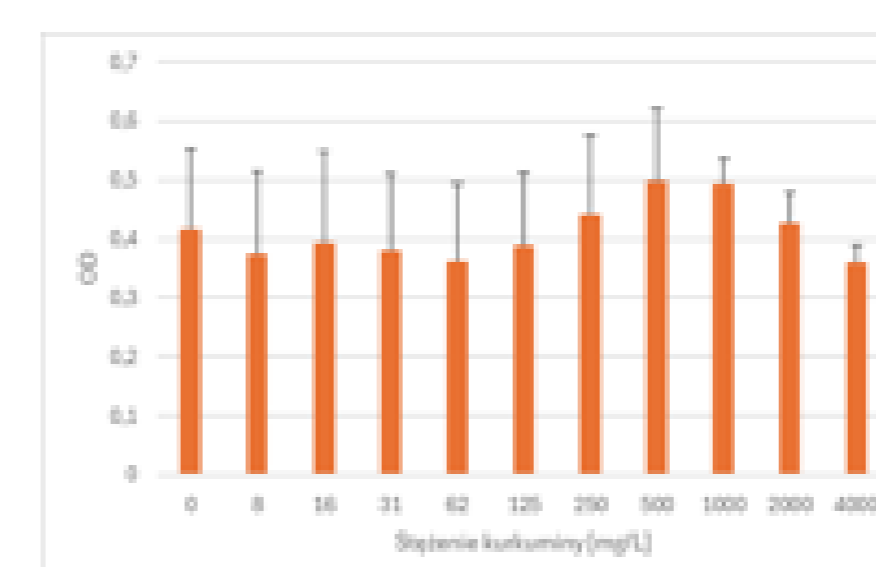
Badany gen	Sekwencja starterów
<i>lexA</i>	Forward: TATCAATCCCGCCCTTCTC Reverse: AGCGTTTACCCTGACCT
<i>dinB</i>	Forward: GACTGTTTCTATGCCGCCCT Reverse: CAGATCGGGACACAGCTTGA
<i>recN</i>	Forward: AGGAGCAGAAGACCTGAGC Reverse: GTTGAGGCTGGCATTGAG
<i>rpoD</i>	Forward: GGGGCGAAGAAGAAATGGTC Reverse: CAGGTGGCTAGGTGGAGAA



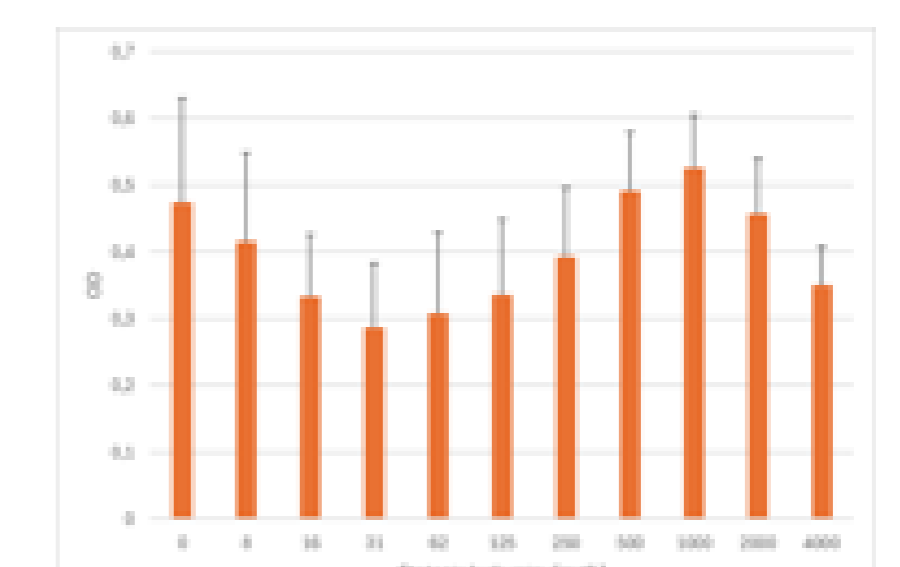
Ciprofloksacyna w stężeniu 0,25mg/L skutecznie zahamowała wzrost 90% populacji szczepu klinicznego *Pseudomonas aeruginosa*



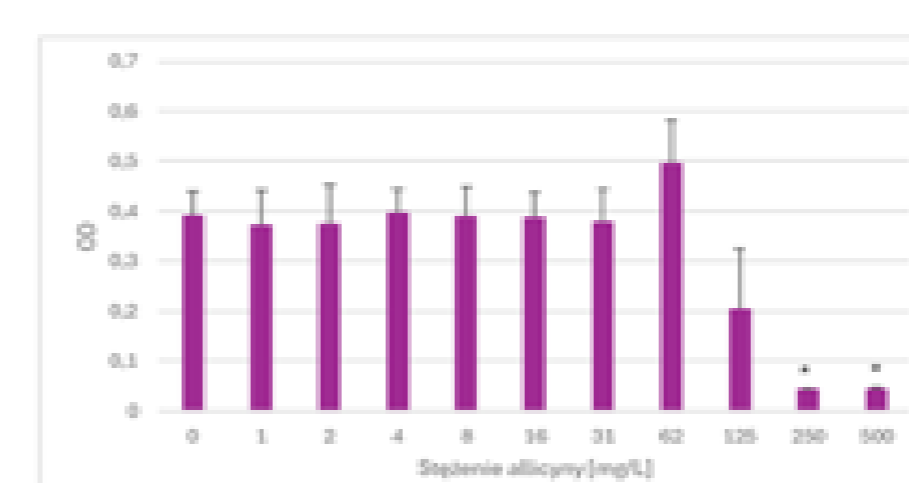
Ciprofloksacyna w stężeniu 0,25mg/L skutecznie zahamowała wzrost 90% populacji szczepu referencyjnego ATCC BAA-1744



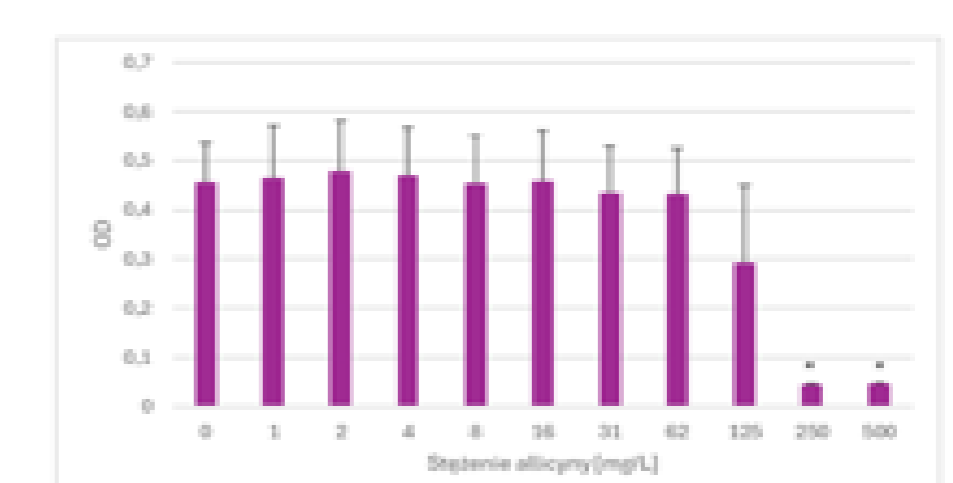
Kurkumina w badanym stężeniu nie wpłynęła istotnie na wzrost szczepu klinicznego *Pseudomonas aeruginosa*



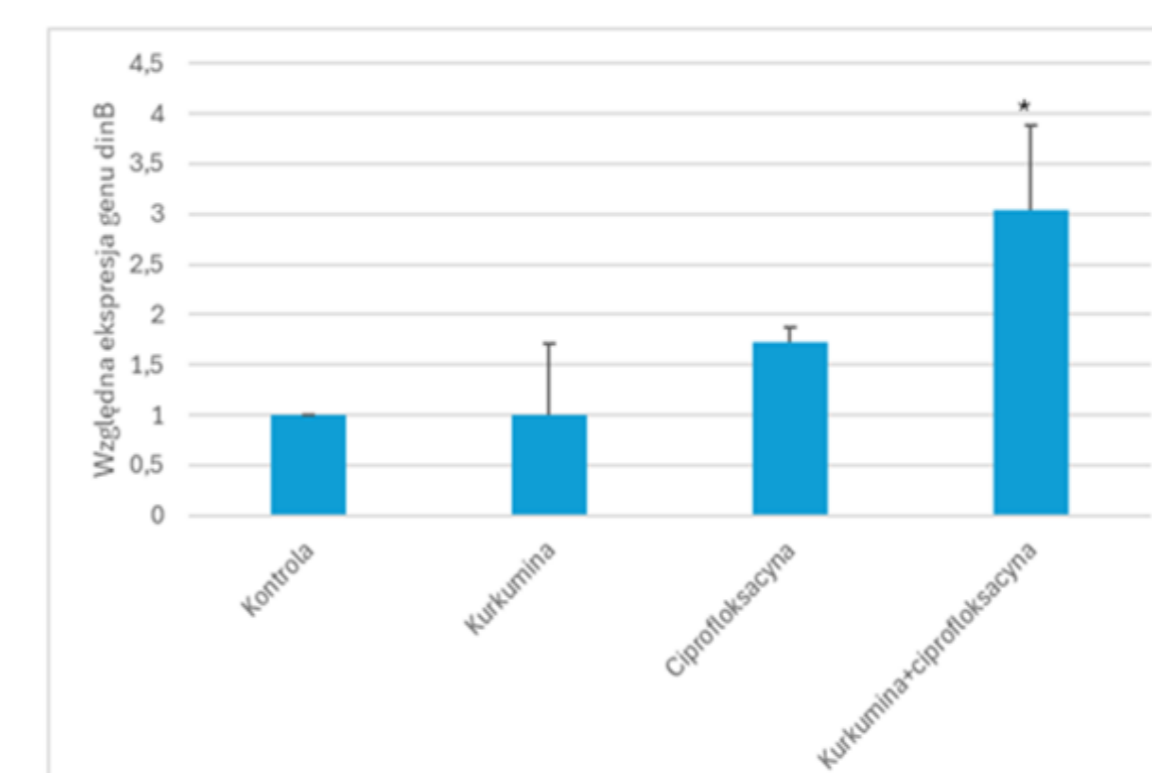
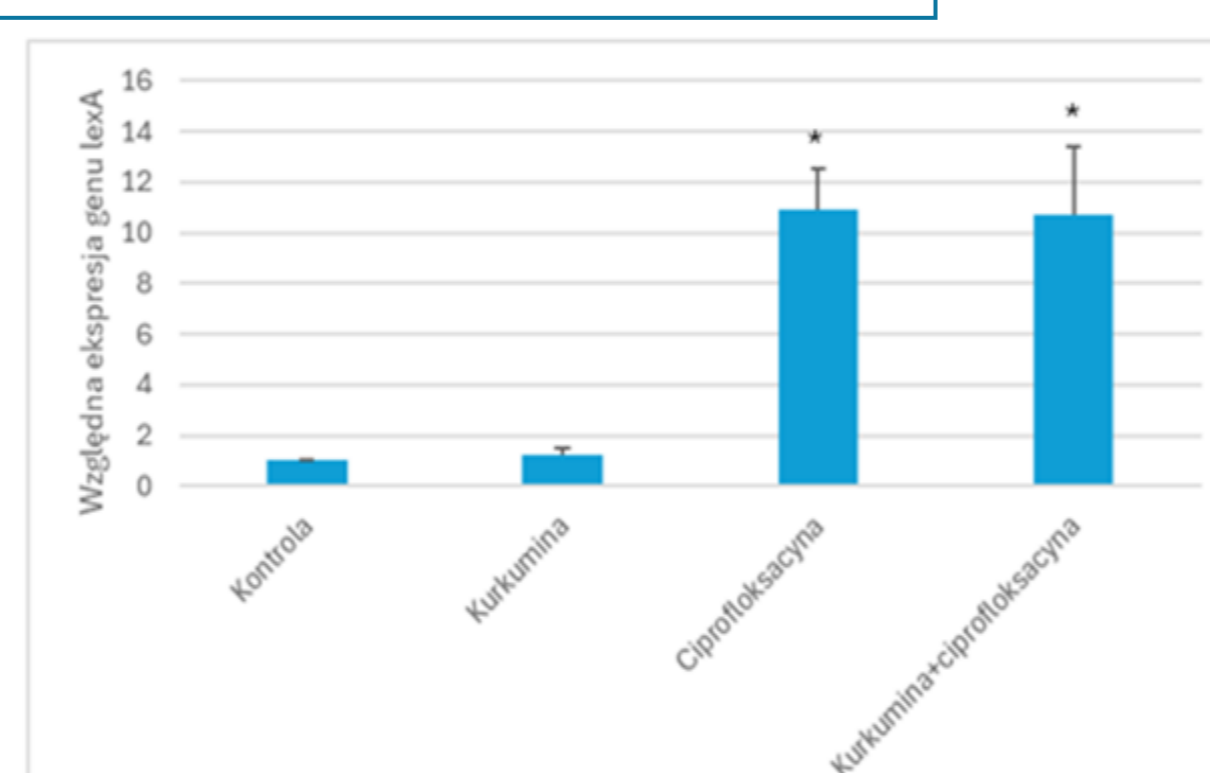
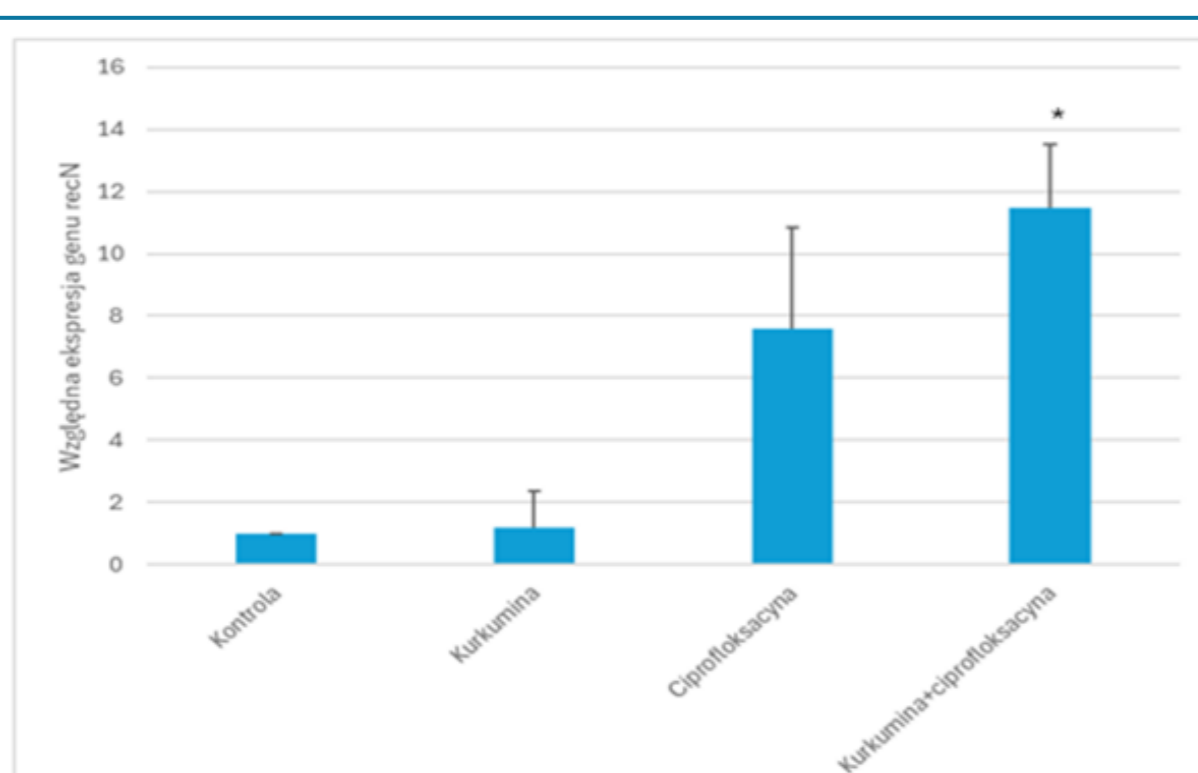
Kurkumina w stężeniu 31mg/L zahamowała wzrost 40% populacji szczepu referencyjnego ATCC BAA-1744



Allicyna w stężeniu 250mg/L skutecznie zahamowała wzrost 90% populacji szczepu klinicznego *Pseudomonas aeruginosa*



Allicyna w stężeniu 250mg/L skutecznie zahamowała wzrost 90% populacji szczepu referencyjnego ATCC BAA-1744



Wpływ kurkuminy i ciprofloksacyny na ekspresję genów systemu SOS u *Pseudomonas aeruginosa* ATCC BAA-1744