
TEZA DE DOCTORAT

Nanoparticule polimerice încărcate cu antibiotice în vederea combaterii antibioticorezistenței în medicina veterinară

Doctorand **Emilia Ungureanu (Trif)**

Conducător de doctorat **Prof.univ. dr. Gheorghe Florinel
Brudașcă**



Introducere

Pe durata unui secol, antibioticele au făcut un salt impresionant de la a fi considerate una dintre cele mai mari și importante descoperiri în medicina modernă, la una dintre cele mai mari amenințări la adresa sănătății publice. Conform rapoartelor guvernamentale din Marea Britanie (Hutchings et al., 2019; Shankar, 2016), se estimează faptul că 10 milioane de oameni mor în fiecare an din cauza infecțiilor cauzate de bacterii rezistente la antibiotice, fenomen descris ca rezistență antimicrobiană (AMR). Deși cauzele sunt multiple, foarte variate și totodată larg dezbătute în literatura de specialitate, un factor cauzal important în accelerarea acestui proces este abuzul de substanțe antimicrobiene în medicina veterinară, aspect raportat pentru prima dată în anul 2015 de către Centrul European pentru Prevenirea și Controlul Bolilor (ECDC), Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară (EFSA) și de către Agenția Europeană a Medicamentului (EMA) (Prestinaci et al., 2015a). Acest fenomen a dus la apariția rapidă a bacteriilor de origine animală care sunt rezistente la o gamă largă de substanțe antimicrobiene (Economou & Gousia, 2015).

Având în vedere faptul că descoperirea și dezvoltarea de noi substanțe antimicrobiene este un proces relativ lent (Miethke et al., 2021), nanotehnologia a deschis noi posibilități pentru îmbunătățirea eficacității antibioticelor care sunt deja utilizate ca terapeutice umane și veterinare (Cerbu et al., 2021; Dupuis et al., 2022; Patra et al., 2018). Definită ca fiind studiul materialelor cuprinse între dimensiunile 1 și 1000 nm, nanotehnologia face posibilă reducerea semnificativă a dozei de substanță antimicrobiană folosită prin îmbunătățirea biodisponibilității acesteia. Consecutiv, reușește să contribuie la combaterea uneia dintre principalele cauze ale AMR, respectiv supradozajul. Totodată, aceasta contribuie și la îmbunătățirea proprietăților farmacocinetice ale antibioticelor, contracarând astfel anumite limitări ale acestora în utilizarea clinică.

Florfenicolul (d-treo)-1-(methylsulfonylphenyl)2-dichloroacetamide-2-fluoro-1-propanol) (FFC) este un antibiotic cu spectru larg, cu acțiune bacteriostatică, utilizat exclusiv în medicina veterinară (Park et al., 2008). FFC este un analog derivat al chloramfenicolului și thiamfenicolului (Mechesso et al., 2018), este nevolatil, cu o bună penetrare tisulară, cunoscut ca fiind eficient împotriva grupurilor de bacterii Gram pozitive și Gram-negative (Shuang et al., 2011). Prin utilizarea excesivă a acestuia în terapia veterinară și în acvacultură, precum și ca aditiv alimentar în scopuri profilactice, mai multe gene de rezistență împotriva FFC au fost identificate inițial la pești în 1990 (Kim & Aoki, 1996) și, ulterior, la diverse alte specii de animale, cum ar fi bovine, păsări și porci (Arcangioli et al., 1999; Bolton et al., 1999; Fang et al., 2020). De asemenea, a fost raportată prezența unui izolat de *E.coli* rezistent la FFC la om (Fernández-Alarcón et al., 2011), evidențiind relația cauzală între AMR în medicina umană și veterinară, deoarece FFC este utilizat exclusiv în medicina veterinară.

Structura tezei

Teza de doctorat intitulată **“Nanoparticule polimerice încărcate cu antibiotice în vederea combaterii antibioticorezistenței în medicina veterinară”** cuprinde un număr de 139 de pagini și conține un număr de 49 de figuri și 13 tabele. Teza este realizată conform normelor de redactare ale IOSUD Cluj Napoca, structurată așadar în două părți principale: stadiul actual al cunoașterii și contribuția personală.

Stadiul actual al cunoașterii

Prima parte a tezei, stadiul actual al cunoașterii, cuprinde 28 de pagini și este structurat în cadrul a trei capitole.

Capitolul I, intitulat **“Rezistența la substanțele antimicrobiene în medicina veterinară”** cuprinde 4 subcapitole și aprofundează conceptul de rezistență antimicrobiană și implicațiile acestuia în medicina veterinară. Acest capitol prezintă totodată mecanismele de dezvoltare a rezistenței antimicrobiene, atât cele intrinseci cât și cele extrinseci, împreună cu strategiile de combatere a acestora.

Capitolul II, intitulat **“Florfenicolul, utilizările lui în medicina veterinară și metode de îmbunătățire ale acestuia”** oferă o privire de ansamblu asupra florfenicolului, discutând atât aspecte generale referitoare la structură și proprietăți biochimice, cât și diversele utilizări în medicina veterinară. Un subcapitol intitulat **“Rezistența antimicrobiană la florfenicol și alte limitări ale utilizării acestuia”** abordează problematica rezistenței antimicrobiene dar și alte impedimente ale utilizării florfenicolului în terapia veterinară.

Capitolul III, intitulat **“Nanotehnologia în medicina veterinară”** evidențiază aplicarea nanotehnologiei în medicina veterinară, inițial prin definirea conceptului de nanotehnologie, iar mai apoi prin explorarea diferitelor tipuri de nanostructuri. Se aprofundează ulterior nanostructurile cu florfenicol, evidențiind potențialul acestora în medicina veterinară.

Contribuția personală

Partea a doua a tezei, contribuția personală în domeniul tezei de doctorat, cuprinde 80 de pagini și este structurată în cadrul a 8 capitole. Cuprinde informații detaliate despre ipoteza testată, metodologia cercetării (materiale și metode), precum și sinteza nanostructurilor încărcate cu florfenicol, caracterizarea și testarea acestora în ceea ce privește potențialul antimicrobian, potențialul anti-biofilm și efectul citopatic prezentat.

Ipoteza studiului

Ipoteza studiului a fost reprezentată de faptul că eficacitatea florfenicolului poate fi îmbunătățită prin încărcarea acestuia într-un sistem de nanostructuri polimerice, care permite utilizarea cantității minime de substanță activă, printr-o eliberare controlată și prelungită. Astfel, se presupune faptul că această tehnologie ar

putea îmbunătăți antibioticul atât în ceea ce privește eficacitatea, prin utilizarea unor doze mai mici, cât și în ceea ce privește farmacocinetica, prin facilitarea formulării unei soluții apoase cât și reducerea frecvenței administrărilor.

Obiectivele studiului și metodologia cercetării:

În urma efectuării amănunțite a cercetării bibliografice, care s-a concretizat prin expunerea stadiului actual al cunoașterii, a fost evidențiată și subliniată importanța identificării factorilor care contribuie activ la perpetuarea fenomenului de antibioticorezistență. Unul dintre acești factori este reprezentat de utilizarea necorespunzătoare a unor substanțe antimicrobiene, care sunt deseori supradozate pentru a atinge efectul terapeutic dorit, însă fără a fi luate în considerare farmacocinetica și biodisponibilitatea agentului activ implicat. Atenția a fost concentrată astfel pe florfenicol, un antibiotic cu spectru larg, intens utilizat în medicina veterinară, a cărui îmbunătățire ar avea un impact imens în terapeutila veterinară atât din punct de vedere clinic cât și economic. Au fost urmate așadar câteva etape în vederea efectuării experimentelor prezentate în cadrul acestei teze de doctorat, etape care s-au concretizat prin formularea unor obiective clare și a unor etape de lucru bine definite.

Obiectivele studiului pot fi așadar prezentate astfel:

1. Sinteza nanostructurilor încărcate cu florfenicol (alegere polimer, alegere solvent, alegere metoda de sinteză în funcție de limitările identificate anterior);
2. Caracterizarea nanostructurilor obținute (dimensiuni, formă, mod de dispunere, potențial zeta, indice de polidispersitate, profil de eliberare a substanței active din nanostructuri);
3. Testarea potențialului antimicrobian și de inhibare a biofilmului bacterian;
4. Testarea efectului citotoxic, în vederea verificării biocompatibilității nanostructurilor obținute;

Capitolul VI, intitulat "*Sinteza nanostructurilor încărcate cu florfenicol*", cuprinde două subcapitole, fiecare abordând aspecte referitoare la sinteza nanostructurilor pe bază de PLGA-FFC respectiv PLGA-Lignină-FFC.

Sinteza PLGA-FFC: a fost efectuată prin metoda emulsifierii prin evaporarea solventului. Principiul metodei se bazează pe formarea unui amestec dintre două tipuri de substanțe cunoscute a fi heretogene, nemiscibile una cu cealaltă, cu ajutorul unui compus tensioactiv potrivit, capabil să scadă tensiunea de suprafață dintre acestea, făcând ulterior posibil amestecul în cadrul unei soluții omogene stabile. Metoda presupune așadar emulsificarea soluției organice de polimer și substanța activă care se dorește a fi înglobată (reprezentând faza organică), într-o fază apoasă, urmată de evaporarea soluției organice (Mallakpour & Behranvand, 2016). Metoda folosită a presupus astfel formarea inițială a unui amestec de tip apă în ulei (W/O- water/oil), folosind substanță activă și polimer în raport de 1/10, acesta reprezentând **faza organică**. Au fost adăugate astfel 440 mg PLGA și 44 mg FFC, dizolvat în solvent organic reprezentat de 10 ml de acetat de etil. Solventul a fost ales prin raportare la datele preexistente în literatura de specialitate, întrucât acesta a favorizat obținerea unor

nanoparticule cu aspect omogen și de dimensiuni mai mici față de cele obținute folosind alți solvenți organici precum diclorometan sau cloroform (Karp et al., 2019). **Faza aposă** a fost obținută prin dizolvarea a 2 g de alcool polivinilic (PVA) în 100 ml de apă deionizată. Faza organică a fost turnată în 80 de ml de fază aposă și omogenizată timp de 15 minute la temperatura camerei, cu ajutorul unui agitator magnetic. A urmat apoi o etapă de omogenizare la presiune înaltă cu ajutorul unui echipament (omogenizator la presiune înaltă) provenit de la Microfluidics Corp, Westwood, MA. Omogenizarea a fost efectuată la presiunea de 30.000 psi, cu patru pasaje la 4°C. Ulterior, solventul a fost evaporat folosind un rotaevaporator R-300- ilustrat în figura 2 (Buchi Corporation, Switzerland) sub vid, la 33°C, timp de 100 de minute. Purificarea a fost realizată prin ultracentrifugare la 30.000 rpm (150.000 RCF- forța centrifugă relativă) folosind o ultracentrifugă Beckman Coulter Optima XPN 80 (Danaher Corporation, Brea, CA). Depozitul obținut după eliminarea supernatantului a fost resuspendat în 60 ml de apă ionizată și s-au adăugat 950 ml de trehaloză. Proba obținută astfel a fost împărțită în 10 fiole și păstrată la temperatura de -80°C timp de 24 de ore.

Sinteza PLGA-Lignină-FFC: metoda de lucru folosită în vederea obținerii acestor tipuri de nanostructuri polimerice este cea menționată de Carlos și colab. într-un studiu efectuat în anul 2020 (Astete et al., 2020), și presupune trei etape de lucru.

Prima etapă a presupus adăugarea a 4 g de PLGA într-un vas de reacție cu un agitator magnetic. Ulterior, a fost adăugat solventul organic reprezentat de 100 ml diclorometan (DCM), cu grijă sporită (a fost introdusă seringă sub presiune, pentru a asigura eliberarea treptată a DCM). A fost omogenizat amestecul la temperatura camerei timp de 5-10 minute la 500 rpm. A fost conectat un barboter cu porțiunea de ieșire către vasul de reacție și porțiunea de intrare către dozatorul de argon. A fost adăugat ulterior 110 μl de clorura de oxalil (păstrată la temperatura de refrigerare). Au fost adăugați 4 ml de dimetilformamidă (DMF) ca și catalizator al reacției. După 30 de minute, a fost oprit fluxul de argon iar reacția a fost lăsată la temperatura camerei timp de 5 ore. Cu răcitorul din rotaevaporator pornit cu o oră înainte, a fost crescut fluxul de argon din vasul de reacție timp de 1 minut pentru a elimina toate gazele acumulate în interior în urma reacțiilor chimice. Polimerul obținut a fost astfel centrifugat în rotaevaporator într-un balon cu fund rotund, la presiunea de 300 mbar și 32 °C, până când în vas a rămas jumătate din volumul inițial de polimer. În acest moment al reacției, s-a putut observa o depunere pe pereții vasului, depunere care a fost cuantificată prin cântărirea vasului folosit în paralel cu cântărirea unui vas identic și măsurarea diferenței dintre acestea. Polimerul astfel obținut a fost adăugat peste un alt solvent organic și anume eterul etilic, folosind o pipetă de 10 ml, procedură reperată de 4-5 ori, acesta reprezentând procesul de spălare a polimerului, și a fost ulterior incubat pentru 24 h la 30°C și vacuum de 25.

Etapa a doua a presupus uscarea ligninei la 60°C pentru 24-72 de ore. A fost cântărit polimerul PLGA obținut în incubator (masa obținută a fost de 4128.3 mg). S-a cântărit 2.1 g de lignină, solubilizat în apă și menținut în desicator. Ulterior a fost încărcată o seringă de sticlă cu argon și injectată în dimetilsulfoxid (DMSO) (sigilat și în condiții controlate, fără umiditate). Seringa a fost astfel umplută de DMSO ca urmare a diferenței de presiune dintre cele două, cu 25 de ml. A fost injectat DMSO în vasul de reacție iar în alt vas de reacție (vas cu 3 căi de acces) a fost pusă lignina și 30 ml DMSO.

Ambele vase au fost puse pe un agitator magnetic pentru 1 oră. PLGA a fost adăugat în vasul care conținea lignina folosind o pipetă. A fost conectat barbotorul și fluxul de argon la vasul de reacție. Au fost adăugați 4 ml de DMF iar reacția a avut loc timp de 24 de ore. Fluxul de argon a fost oprit după 30 de minute.

Etapa a treia a presupus (conform reprezentării adăugarea a 200-300 de ml de eter etilic într-un vas de reacție. A fost turnat polimerul obținut peste acesta și lăsat să reacționeze timp de 10 minute, urmat apoi de câteva spălări succesive (4-5 spălări la fiecare 15 minute) cu acest solvent organic pentru a îndepărta toate urmele de DMSO. Polimerul a fost turnat ulterior cu DCM în vasul de decantare și a fost adăugată apă în vederea omogenizării și curățării pereților vasului. Ulterior, a fost colectat supernatantul iar apa de la suprafață a fost eliminată, proces repetat de 3 ori. Supernatantul obținut a fost centrifugat la rotaevaporator la o presiune de 350-400 mbar la 32°C până când a crescut vâscozitatea acestuia (proces care a durat aproximativ o oră). Într-un vas cu pereții groși, cântărit anterior, a fost adăugat polimerul rezultat, recuperat cu grijă inclusiv de pe pereții vasului, obținându-se astfel o masă de polimer de 1287.99 mg. A fost pus la frigider ușor înclinat pentru a se evita spargerea vasului și a fost congelat prin uscare.

Încărcarea nanoparticulelor de PLGA-lignină cu florfenicol: reprezintă etapa finală a obținerii nanoparticulelor pe bază de PLGA-lignină încărcate cu florfenicol (PLGA-lignina-FFC NPs). Acestea au fost sintetizate folosind 900 mg de polimer PLGA-lignină și 90 mg FFC dizolvat în 14 ml de eter etilic la temperatura camerei prin amestecare continuă. După dizolvare, faza organică a fost turnată în 150 de ml de apă nanopură (faza apoasă) saturată în prealabil cu acetat de etil și amestecată timp de 15 minute la temperatura camerei, urmată de o etapă de omogenizare la presiune înaltă (Microfluidics Corp., Westwood, MA) la 30.000 psi cu patru pasaje la 4°C.

Ulterior, evaporarea acetatului de etil a fost efectuată prin utilizarea unui rotaevaporator R-300 (Buchi Corporation, Switzerland) la 33°C sub vacuum, timp de 100 de minute. 1g de trehaloză a fost adăugat pentru crioprotecție. Proba obținută a fost împărțită în mod egal în 14 recipiente, menținute la -80°C pentru 24 de ore și ulterior liofilizate (Labconco, Corp, Kansas City, MO).

Folosind aceleași proceduri menționate, însă fără încărcarea cu FFC, au fost obținute nanoparticule polimerice pe bază de PLGA și PLGA-lignină.

Capitolul VI, intitulat „Descrierea și caracterizarea nanostructurilor obținute”, cuprinde informații despre morfologia și dimensiunile nanostructurilor obținute, evaluarea modului de eliberare a florfenicolului din nanostructuri și descrierea parametrilor de bază. Toate nanoparticulele sintetizate au o formă sferică, cu o distribuție neregulată a dimensiunilor și un diametru mediu de 100.2 nm pentru PLGA-NPs, 100.7 nm pentru PLGA-FFC-NPs și 84.99 nm pentru PLGA-lignină și 86.30 nm pentru PLGA-Lignină-FFC NPs. Dimensiunea nanoparticulelor obținute a fost încadrată în media necesară pentru ca nanoparticulele să poată rezista în urma procesului fiziologic de endocitoza. Valorile obținute pentru indicii de polidispersitate (PDI) (conform buletinului de analiză eliberat Malvern Zetasizer- ilustrat în figurile 13,14, 15 și 16) au fost de 0.061 ± 0.019 pentru PLGA-FFC NPs, 0.089 ± 0.020 pentru

PLGA-lignină-FFC, iar valorile obținute pentru PLGA NPs și PLGA-lignină NPs, fără substanță activă încărcată, au fost de 0.087 ± 0.014 și 0.089 ± 0.020 . Pentru potențialul zeta, valorile obținute au fost de -26.80 ± 1.30 și -55.97 ± 3.43 mV pentru PLGA-FFC NPs și PLGA-lignină-FFC NPs și de -35.20 ± 1.64 și -55.33 ± 2.32 mV pentru PLGA NPs și PLGA-lignină NPs fără substanță activă încărcată. Profilul de eliberare al florfenicolului din nanostructuri a ilustrat o eliberare completă pe parcursul a 6 ore pentru nanostructurile pe bază de PLGA, pe când pentru cele pe bază de PLGA-lignină a fost evidențiată o eliberare completă abia după 24 de ore.

Capitolul VII, intitulat **“Evaluarea activității antimicrobiene a nanostructurilor obținute”** cuprinde atât materialele și metoda utilizată în vederea evaluării proprietăților antimicrobiene ale nanostructurilor cât și tehnica evaluării capacității de inhibare a biofilmului împreună cu evaluarea SEM a biofilmului inhibat de către nanoparticulele încărcate cu florfenicol.

În urma cultivării tulpinilor bacteriene selectate (*S.aureus*- ATCC 29213, *E.coli*- ATCC 25922 și *P.aeruginosa*- ATCC), nanoparticulele pe bază de PLGA au prezentat reducerea concentrației minime inhibitorii cu $\sim 97.13\%$ pentru *S. aureus*, 99.33% pentru *E.coli* și cu 64.1% pentru *P. aeruginosa* în comparație cu florfenicolul liber. Așadar, prin înglobarea florfenicolului în sisteme de nanostructuri, acesta este îmbunătățit în ceea ce privește eficiența prin utilizarea unei doze semnificativ mai scăzute, conform datelor obținute prin studiile efectuate in vitro. Testele de evaluare a sensibilității la substanțele antimicrobiene, inclusiv evaluarea MIC calitativă sau cantitativă se bazează pe interacțiunea directă a patogenului izolat sau al tulpinii standard utilizate, cu substanța activă testată. Aceasta interacțiune nu ia însă în considerare alți factori care influențează eficacitatea substanței antimicrobiene în organismul animal. Factori precum volumul de distribuție, buna funcționare a tuturor sistemelor organismului sau activitatea sistemului imunitar pot influența semnificativ efectul final al antibioticului la care microorganismul este susceptibil. În mod evident, un grad ridicat de susceptibilitate a tulpinii și implicit, o valoare a MIC sub limitele minime cunoscute reprezentate prin ECOFF (Epidemiological cut-off value), cresc șansele obținerii unui succes microbiologic dar și clinic. Totodată, este fundamental greșită orientarea dozajului unei substanțe microbiene doar prin evaluarea MIC, întrucât, pe lângă aspectele menționate anterior, acesta se dovedește a fi un parametru inconstant în ceea ce privește reproductibilitatea (un studiu din 2011 afirmă faptul că o evaluare a MIC repetată de două ori, chiar și de același membru al personalului de laborator, poate produce valori de MIC prezentând o diferență statistic semnificativă).

În ciuda acestor aspecte, scăderea semnificativă a valorii MIC pentru tulpinile bacteriene testate este deosebit de relevantă pentru aplicabilitatea nanostructurilor ca sisteme de livrare a florfenicolului în medicina veterinară, deoarece utilizarea unei doze mai mici ar putea reduce sau încetini dezvoltarea genelor de rezistență împotriva florfenicolului, contribuind activ la reducerea antibioticorezistenței în medicina veterinară. Obținerea unei eficiențe terapeutice cu o doză mai mică este de asemenea relevantă în medicina veterinară aplicată întrucât florfenicolul ar putea interfera, într-

un mod dependent de doza, cu un răspuns imun optim în urma instituirii unor acțiuni imunoprofilactice la animalele de rentă (Shuang, Yu, Weixiao, & Dacheng, 2011).

În ceea ce privește activitatea nanostructurilor încărcate cu florfenicol asupra biofilmului bacterian produs de *S.aureus*, *E.coli* și *P.aeruginosa*, rezultatele obținute au fost favorabile întrucât au fost testate concentrații mici de nanostructuri și implicit de substanță activă implicată, observându-se o inhibiție parțială a biofilmului bacterian. Totodată, florfenicolul este cunoscut ca fiind un antibiotic bacteriostatic, acționând prin inhibarea sintezei proteice, fără o acțiune asupra biofilmului, așadar lipsa inhibării totale a acestuia nu a reprezentat un rezultat complet neașteptat. Rezultatele obținute prin evaluarea cantitativă a biofilmului pentru cele trei tulpini testate au fost confirmate prin evaluarea acestuia prin microscopie electronică, ilustrând porțiuni parțial inhibitate de biofilm, prin comparație cu biofilmul format în vederea controlului pozitiv.

În ceea ce privește abilitatea acestor nanostructuri încărcate cu florfenicol de a inhiba biofilmul format anterior de către tulpinile bacteriene testate, nu a fost observat niciun efect, întrucât valorile măsurate pentru biofilmul tratat cu antibiotice nu au prezentat diferențe statistic semnificative raportate la controlul pozitiv. Rezultatele sunt conforme cu datele regăsite în literatura de specialitate (X. Yuan et al., 2020), întrucât florfenicolul a fost raportat anterior ca fiind inefficient în vederea inhibării unui biofilm preexistent.

Capitolul VIII, intitulat **“Evaluarea citotoxicității”**, cuprinde date referitoare la modul de obținere al liniilor celulare primare utilizate în vederea evaluării efectului citotoxic, metoda MTT de evaluare a citotoxicității împreună cu rezultatele obținute. Nanostructurile pe bază de PLGA și PLGA-lignină încărcate cu florfenicol au prezentat un potențial citotoxic foarte scăzut, diferențele dintre proliferarea celulară observată în cazul martorului pozitiv și celulele primare tratate cu concentrațiile specifice de antibiotic fiind ne semnificative din punct de vedere statistic. Deși au fost folosite doze mult mai mari decât cele identificate în vederea evaluării concentrației minime inhibitorii, nu au fost observate efecte nocive asupra proliferării celulelor primare testate. În ciuda faptului că sunt considerate necesare studii suplimentare, până în acest moment, prin rezultatele obținute la testările in vitro, nanostructurile polimerice încărcate cu florfenicol pot fi considerate sigure în ceea ce privește potențialul citotoxic la doza maximă testată de 4 mg/ml.

Capitolul IX, intitulat **“Concluzii generale”** cuprinde o sinteză a tuturor informațiilor obținute în urma efectuării studiilor cuprinse în cercetare. Chiar dacă florfenicolul este un antibiotic destul de nou, este utilizat exclusiv în medicina veterinară datorită spectrului său larg de acțiune împotriva unui număr mare de grupe bacteriene (Wei et al., 2016). Luând în considerare toate avantajele sale cât și utilizarea intensivă în medicina veterinară, se poate afirma faptul că este doar o chestiune de timp până când dezvoltarea rezistenței bacteriene va limita acțiunea acestuia (Li et al., 2020). Totodată, perpetuarea fenomenului de dezvoltare a genelor de rezistență bacteriană împotriva florfenicolului în rândul bacteriilor cu potențial zoonotic poate avea un impact negativ asupra sănătății publice. Toate aceste aspecte întăresc ideea menționată anterior și

anume faptul că limitarea fenomenului de dezvoltare a antibioticorezistenței prezintă un impact deosebit în medicină. Așadar, orice modalitate de a îmbunătăți un antibiotic preexistent folosit cu succes în terapia veterinară poate să contribuie la reducerea dezvoltării genelor de rezistență antimicrobiană.

Încărcarea florfenicolului în cadrul sistemelor de livrare pe bază de nanostructuri polimerice (PLGA și PLGA-lignină) prezintă un potențial crescut în vederea îmbunătățirii acestei substanțe antimicrobiene. Implicit, acest fenomen poate încetini procesul de AMR prin reducerea dozei de FFC și îmbunătățirea proprietăților sale farmacologice. Deși scăderea dozei de substanță activă ar duce aparent la o subdozare a medicamentului, testele in vitro prezintă o dovadă a eficacității acestui antimicrobian la o concentrație minimă inhibitorie cu un procent mult mai mic decât cea cunoscută și identificată ulterior prin testarea florfenicolului liber. Înglobarea florfenicolului oferă, prin urmare, nu doar posibilitatea de a utiliza o doză semnificativ mai scăzută dar și avantajele unei eliberări controlate care va duce ulterior la o utilizare economică și practică a antibioticului. MIC redusă pentru florfenicol, corelat cu lipsa efectelor citotoxice indica faptul că, prin intermediul nanotehnologiei, FFC poate fi îmbunătățit în ceea ce privește performanța și eficacitatea, prezentând totodată efectele antimicrobiene dorite împotriva agenților patogeni bacterieni la multiple specii de animale.

În ciuda faptului că, prin mecanismul său de acțiune anterior cunoscut, florfenicolul este un antibiotic de tip bacteriostatic și nu prezintă un efect documentat asupra biofilmului bacterian, atunci când acesta este încărcat în sistemele de nanostructuri polimerice, prezintă capacitatea de a inhiba parțial formarea biofilmului bacterian. Însă, eficacitatea acestuia, atât a antibioticului liber cât și a celui încărcat în sistemele de nanostructuri, este minimă în situațiile în care există un biofilm anterior format.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza de doctorat conține atât contribuții inovative în domeniul medicinei veterinare cât și elemente de originalitate.

Deși anterior regăsite în literatura de specialitate, nanostructurile pe bază de PLGA încărcate cu florfenicol au fost sintetizate după un protocol adaptat și modificat, oferind date suplimentare referitoare la testarea acestora care nu au fost anterior regăsite în literatură. Testările realizate precum evaluarea efectului antimicrobian prin determinarea MIC și a efectului asupra biofilmului dar și în ceea ce privește efectul citotoxic reprezintă contribuții inovative în medicina veterinară, întrucât aceste rezultate favorabile obținute pot reprezenta un bun punct de pornire în vederea îmbunătățirii florfenicolului. Au fost obținute astfel informații noi referitoare la acest sistem de livrare bazat pe nanostructuri, prin evidențierea avantajelor dar și a limitărilor acestuia.

Totodată, teza conține ca element de originalitate sintetizarea unor nanostructuri pe bază de PLGA-lignină încărcate cu florfenicol, descrierea acestora în ceea ce privește morfologia, caracteristicile structurale dar și activitatea antimicrobiană, activitatea anti-biofilm și potențialul citotoxic. Rezultatele obținute constituie informații

noi și originale în vederea sintetizării unui nou sistem de livrare care prezintă caracteristici superioare celor testate anterior și ar putea aduce un aport semnificativ în terapeutila veterinară.

Toate aceste experimente de laborator confera tezei un caracter inovativ, întrucât prezintă un real potențial de a contribui la îmbunătățirea florfenicolului în vederea utilizării acestuia în medicina veterinară și implicit reducerea dezvoltării antibioticorezistenței în medicina veterinară, având implicații directe în sănătatea publică.

Bibliografie

- Arcangioli, M. A., Leroy-Sétrin, S., Martel, J. L., & Chaslus-Dancla, E. (1999). A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. *FEMS Microbiology Letters*, *174*(2), 327–332. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00161-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00161-5)
- Astete, C. E., de Mel, J. U., Gupta, S., Noh, Y. R., Bleuel, M., Schneider, G. J., & Sabliov, C. M. (2020). Lignin-Graft-Poly(lactic- co-glycolic) Acid Biopolymers for Polymeric Nanoparticle Synthesis. *ACS Omega*, *5*(17), 9892–9902. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00168>.
- Bolton, L. F., Kelley, L. C., Lee, M. D., Fedorka-Cray, P. J., & Maurer, J. J. (1999). Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(5), 1348–1351. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.5.1348-1351.1999>
- Dupuis, V., Cerbu, C., Witkowski, L., Potarniche, A. V., Timar, M. C., Żychska, M., & Sabliov, C. M. (2022). Nanodelivery of essential oils as efficient tools against antimicrobial resistance: a review of the type and physical-chemical properties of the delivery systems and applications. In *Drug Delivery* (Vol. 29, Issue 1, pp. 1007–1024). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2056663>
- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 8, pp. 49–61). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S55778>
- Fang, Y., Li, S., Ye, L., Yi, J., Li, X., Gao, C., Wu, F., & Guo, B. (2020). Increased bioaffinity and anti-inflammatory activity of florfenicol nanocrystals by wet grinding method. *Journal of Microencapsulation*, *37*(2), 109–120. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1701115>
- Fernández-Alarcón, C., Singer, R. S., & Johnson, T. J. (2011). Comparative genomics of multidrug resistance-encoding *incA/C* plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. *PLoS ONE*, *6*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023415>
- Kim, E. H., & Aoki, T. (1996). Sequence analysis of the florfenicol resistance gene encoded in the transferable R-plasmid of a fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiology and Immunology*, *40*(9), 665–669. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1996.tb01125.x>
- Mechesso, A. F., Lee, S. J., Park, N. H., & Park, S. C. (2018). Pharmacokinetic parameters and optimal dosage of a florfenicol and tylosin mixture in beagle dogs. *Veterinarni Medicina*, *63*(7), 329–334. <https://doi.org/10.17221/165/2017-VETMED>
- Miethke, M., Pieroni, M., Weber, T., Brönstrup, M., Hammann, P., Halby, L., Arimondo, P. B., Glaser, P., Aigle, B., Bode, H. B., Moreira, R., Li, Y., Luzhetskyy, A., Medema, M.

- H., Pernodet, J. L., Stadler, M., Tormo, J. R., Genilloud, O., Truman, A. W., ... Müller, R. (2021). Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. In *Nature Reviews Chemistry* (Vol. 5, Issue 10, pp. 726–749). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>
- Park, B. K., Lim, J. H., Kim, M. S., Hwang, Y. H., & Yun, H. I. (2008). Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in dogs. *Research in Veterinary Science*, *84*(1), 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.04.001>
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, *16*(1), 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>
- Paudel, S., Cerbu, C., Astete, C. E., Louie, S. M., Sabliov, C., & Rodrigues, D. F. (2019). Enrofloxacin-Impregnated PLGA Nanocarriers for Efficient Therapeutics and Diminished Generation of Reactive Oxygen Species [Research-article]. *ACS Applied Nano Materials*, *2*(8), 5035–5043. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b00970>
- Pinto A. Rayen, Torres M. Pablo, Luengo E. Javiana, Gomez P. Carolina, Troncoso M. Jose, Schneider Marc, C. G. V. P. (2015). *Development and characterization of PLGA nanoparticles loaded with Florfenicol*. September.
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015b). Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. In *Pathogens and Global Health* (Vol. 109, Issue 7, pp. 309–318). Maney Publishing. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>
- Shankar, Pr. (2016). Book review: Tackling drug-resistant infections globally. *Archives of Pharmacy Practice*, *7*(3), 110. <https://doi.org/10.4103/2045-080x.186181>
- Shuang, G., Yu, S., Weixiao, G., Dacheng, W., Zhichao, Z., Jing, L., & Xuming, D. (2011). Immunosuppressive activity of florfenicol on the immune responses in mice. *Immunological Investigations*, *40*(4), 356–366. <https://doi.org/10.3109/08820139.2010.551434>