

**Uniwersytet Medyczny**  
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu  
Wydział Farmaceutyczny  
z Oddziałem Analityki Medycznej



**Aktywność mikrobiologiczna metabolitów amoksycyliny  
względem przedstawicieli mikrobioty jelitowej  
i wybranych patogenów**

Magdalena Okoniewska

Rozprawa doktorska

streszczenie

Promotor: dr hab. nauk med. Marzenna Bartoszewicz, prof. nadzw.

Promotor pomocniczy: dr nauk med. Adam Junka

**Wrocław 2019**

Amoksycylina jest stabilnym w kwaśnym środowisku antybiotykiem powszechnie stosowanym w terapii infekcji bakteryjnych u ludzi i zwierząt. Jej wysokie zużycie odnotowywane jest na całym świecie. Obecnie w Polsce do obrotu dopuszczonych jest 41 produktów leczniczych zawierających w swoim składzie tą substancję. W weterynarii amoksycylina stosowana jest przede wszystkim w leczeniu chorób drobiu i trzody chlewnej. Roczna podaż antybiotyków w Polsce wśród zwierząt stanowi ponad 500 ton przy czym 25% stanowią penicyliny. W organizmie antybiotyk ulega transformacji prowadząc do powstania licznych metabolitów. Ze względu na mniejszą cząsteczkę powstałe związki ulegają wolniejszej eliminacji z organizmu, pozostając dłuższy czas w tkankach zwierząt i człowieka. Podczas wyliczania okresów karencji dla tkanek jadalnych zwierząt uwzględniana jest tylko pozostałość w nich amoksycyliny bez uwzględnienia powstałych metabolitów. Taki sposób obliczania okresów karencji może doprowadzić do konsumpcji związków obecnych w pożywieniu pochodzenia zwierzęcego. Powstałe metabolity mogą zostać również uwolnione do środowiska wraz z odchodami zwierząt stanowiąc poważne zagrożenie dla organizmów wodnych oraz roślin. Zarówno substancje pozostające w tkankach jadalnych zwierząt jak i te wydalane do środowiska mogą prowadzić do indukcji oporności bakteryjnej. Narastanie oporności bakterii na antybiotyki stanowi obecnie bardzo poważny problem. W sprzyjających warunkach powstałe mutacje są wzmacniane i powielane, co w konsekwencji prowadzi do niepowodzenia terapii.

Celem pracy było określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej dla trzech metabolitów amoksycyliny: piperazyno-2,5-dionu amoksycyliny, kwasu amoksycylinowego i kwasu amoksylinowego. Dodatkowo dokonano oceny wpływu długotrwałego oddziaływania metabolitów na bakterie pod kątem wytwarzania przez nie mechanizmów oporności na związek macierzysty oraz określono udziału metabolitów w aktywności przeciwdrobnoustrojowej związku macierzystego.

Badaniem objęto 4 szczepy wzorcowe wchodzące w skład przedstawicieli naturalnej mikrobioty jelitowej oraz bakterii patogennych: *Bifidobacterium bifidum* ATCC 35914, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 oraz *Escherichia coli* ATCC 25922. Metabolity amoksycyliny, których aktywność badano, zostały otrzymane samodzielnie w skutek rozkładu antybiotyku w kontrolowanych warunkach środowiska. Za pomocą technik identyfikacyjnych takich jak spektrometria mas,  $^{13}\text{C}$  NMR oraz  $^1\text{H}$  NMR potwierdzono prawidłowość struktur otrzymanych związków.

W badaniu wpływu metabolitów na wybrane bakterie pokazano, że jednym związkami, który wykazywał aktywność przeciw *Bifidobacterium bifidum* oraz formom planktonicznym pozostałych patogenów był kwas amoksycylinowy. Żaden z metabolitów nie wpłynął na zahamowanie wzrostu form biofilmowych w warunkach stacjonarnych. Zaobserwowano natomiast istotny statystycznie wpływ kwasu amoksycylinowego na redukcję ilości biofilmu *Escherichia coli* tworzonych w warunkach przepływowych.

W pracy wykazano istotny wpływ metabolitów na nabywanie oporności przez *Staphylococcus aureus* na amoksycylinę. Po 90 pasażach bakterii na podłożu zawierającym kwas amoksycylinowy wartość MIC antybiotyku wzrosła od 0,094 mg/L do 0,5 mg/L. W przypadku pozostałych związków również odnotowano wzrost parametru. Dodatkowo, pokazano bardzo duży wpływ substancji na aktywność przeciwdrobnoustrojową antybiotyku. Żaden z metabolitów nie wykazywał własnego działania hamującego wzrost bakterii w zastosowanym stężeniu 0,5 mg/mL jednak strefy zahamowania wzrostu wokół krążków nasączonych antybiotykiem i metabolitem były znacznie większe od tych wokół krążków z samą amoksycyliną.

Jakkolwiek aktywność metabolitów amoksycyliny jest zbyt niska, by mogły one funkcjonować jako samodzielne środki przeciwdrobnoustrojowe, wyniki przedstawione w tej pracy wskazują, że wspomagają w znacznym stopniu aktywność związku macierzystego. Ponad to, zastosowanie metabolitów w dawkach poniżej wartości MIC przyczynia się do nabywania oporności przez drobnoustroje na amoksycylinę. Kolejne kroki jakie należałoby podjąć dotyczą dokładnych badań nad mechanizmem wspomagania aktywności amoksycyliny przez metabolity. Na podstawie uzyskanych wyników należy również zastanowić się nad uwzględnieniem metabolitów pozostających w tkankach jadalnych zwierząt podczas obliczania okresów karencji i ponowne wyliczenie tej wartości.

## Streszczenie w języku angielskim – abstract

Amoxicillin is an acid-stable antibiotic commonly used in the treatment of bacterial infections in humans and animals. Its high consumption is recorded all over the world. Currently, 41 medicinal products containing this substance are authorized for marketing in Poland. In veterinary medicine, amoxicillin is used primarily in the treatment of poultry and pig diseases. The annual supply of antibiotics among animals in Poland is more than 500 tons, wherein 25% are penicillins. In the body, the antibiotic is transformed leading to the formation of numerous metabolites. Due to the smaller molecule, arised compounds undergo slower elimination from the body, remaining longer in the tissues of animals and humans. When calculating the maximum residue limits for edible tissues, only the amount of amoxicillin is taken into account. This way of calculating maximum residue limits may lead to the consumption of metabolites present in animal tissues. The metabolites can also be released into the environment with animal droppings, posing a serious threat to aquatic organisms and plants. Substances remaining in the tissues of edible animals as well as those released into the environment may lead to the induction of bacterial resistance. The growing resistance of bacteria to antibiotics is now a very serious problem. Under favorable conditions, the resulting mutations are amplified and reproduced, which in turn leads to therapy failure.

The aim of the study was to determine the antimicrobial activity of three metabolites of amoxicillin: amoxicillin piperazine-2,5-dione, amoxicillin acid and amoxillin acid. In addition, the effect of long-term metabolite interactions on bacteria in the generation of mechanisms of resistance to the parent compound was assessed and the metabolite content in the antimicrobial activity of the parent compound was determined.

The study included 4 reference strains of the representatives of natural intestinal microbiota and pathogenic bacteria: *Bifidobacterium bifidum* ATCC 35914, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The metabolites of amoxicillin, whose activity was investigated, were obtained as a result of antibiotic decomposition in controlled environmental conditions. Identification of structures of the compounds was confirmed by techniques such as mass spectrometry, <sup>13</sup>C NMR and <sup>1</sup>H NMR.

In the study of the effect of metabolites on selected bacteria, it was shown that one compound that had activity against *Bifidobacterium bifidum* and the other pathogenic planktonic form was amoxicillin acid. None of the metabolites inhibited the growth of biofilm formed under stationary conditions. However, a statistically significant effect of amoxicillin

acid on the reduction of *Escherichia coli* biofilm formed under flow conditions was observed. The study showed a significant effect of metabolites on the acquisition of *Staphylococcus aureus* resistance to amoxicillin. After 90 passages of bacteria on the medium containing amoxicillin acid, the MIC value of the antibiotic increased from 0.094 mg/L to 0.5 mg/L. In the case of other compounds, an increase in this parameter was also noted. In addition, a very high impact of the substance on the antibiotic activity was shown. None of the metabolites had their own bacterial growth inhibitory effect at the applied concentration of 0.5 mg/mL, however the zones of growth inhibition around the antibiotic and metabolite treated discs were significantly larger than those around the discs with amoxicillin alone.

Although, the activity of amoxicillin metabolites is too low to be an independent antimicrobial agents, the results presented in this study indicate that they support the activity of the parent compound. In addition, the use of metabolites in sub-therapeutic doses contributes to the acquisition of microbial resistance to amoxicillin. The next steps to be taken concern the precise research on the mechanism of supporting the activity of amoxicillin by metabolites. On the basis of the obtained results, should also be consider taking into account the metabolites remaining in the animal's edible tissues while calculating their grace periods and recalculating this value.