



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

mgr Karolina Dydak

**Wytworzenie i ocena właściwości prototypowych
produktów z bakteryjnej celulozy do zastosowań
farmaceutycznych i leczniczych**

*Manufacturing and evaluation of properties of prototype bacterial
cellulose products for pharmaceutical and therapeutic applications*

Rozprawa doktorska w oparciu o cykl publikacji naukowych
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Wrocław, 2023 r.

Streszczenie w języku polskim

Celuloza bakteryjna (BC, ang. bacterial cellulose) jest biopolimerem produkowanym przez niektóre bakterie, m. in. rodzaj *Komagataeibacter*. Celuloza wytwarzana przez bakterie różni się od celulozy roślinnej właściwościami fizycznymi i chemicznymi, z czego najistotniejszy jest brak zanieczyszczenia przez woski, ligninę, hemicelulozę i pektyny. W warunkach laboratoryjnych celuloza bakteryjna jest uzyskiwana w płynnych hodowlach na powierzchni płynnego medium i ma postać zwartej, miękkiej błony. Modyfikacja warunków hodowli pozwala na łatwe dostosowywanie parametrów fizyko-chemicznych celulozy do aktualnych potrzeb. BC jest materiałem elastycznym, wytrzymałym mechanicznie i termicznie, nie jest rozkładana przez ludzki organizm z powodu braku syntezy celulaz, cechuje się bardzo wysokim stopniem biokompatybilności, nie wykazuje działania cytotoksycznego ani genotoksycznego oraz jest całkowicie biodegradowalna. BC jest wykorzystywana w licznych i zróżnicowanych gałęziach przemysłu, w tym w przemyśle medycznym i farmaceutycznym. Zakażenia ran przewlekłych oraz zakażenia związane z obecnością implantu stanowią poważny problem współczesnej medycyny. Profilaktyka i leczenie tego typu zakażeń są trudne z uwagi na szybko narastającą lekooporność drobnoustrojów. W związku z powyższym istotne jest poszukiwanie nowoczesnych rozwiązań, które pozwolą na zoptymalizowane leczenie oraz profilaktykę zakażeń ran przewlekłych oraz zakażeń związanych z implantem.

Celem pracy było wytworzenie prototypowych wyrobów medycznych, opartych na bakteryjnej celulozie (implanty kostne z powłoką z BC, siatki celulozowe z powłoką z BC oraz opatrunki z BC), ocena stopnia cytotoksyczności powstałych biomateriałów oraz uzyskanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej poprzez modyfikację powłoki celulozowej *ex situ*.

W przebiegu badań wykorzystano 11 szczepów drobnoustrojów wzorcowych, 45 szczepów klinicznych, pochodzących z zakażeń ran przewlekłych oraz 2 linie wzorcowe komórek fibroblastów i osteoblastów, wchodzących w skład kolekcji Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii. Wykorzystano 7 związków i substancji przeciwdrobnoustrojowych o charakterze nieantybiotycznym, 1 antybiotyk oraz 4 materiały bazowe, stanowiące matrycę dla powłoki celulozowej. Do oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej otrzymanych prototypów wykorzystano m. in. metody oceny minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów, oceny

minimalnego stężenia eradykującego biofilm, typową i zmodyfikowaną metodę dyfuzyjno-krażkową czy metodę oceny przeciwbiofilmowego działania opatrunków. W celu określenia działania wobec fibroblastów i osteoblastów wykorzystano metody oceny cytotoksyczności z czerwienią neutralną oraz test oceniający stopień zasiedlania przez komórki w czasie 60 dni.

Otrzymane w toku badań produkty cechowały się wytrzymałością mechaniczną pozwalającą na sterylizację i przeprowadzenie szeregu doświadczeń, znikomą cytotoksycznością wobec fibroblastów i osteoblastów, wysokim stopniem zasiedlania BC przez fibroblasty, zdolnością do absorpcji środka przeciwdrobnoustrojowego i jego późniejszego uwolnienia do otoczenia, a w konsekwencji działaniem bójącym wobec drobnoustrojów.

Streszczenie w języku angielskim

Bacterial cellulose (BC) is a biopolymer produced by some bacteria genus, e.g., *Komagataeibacter*. Cellulose produced by bacteria differs from plant cellulose in physical and chemical properties. The most important difference is the absence of contamination by waxes, lignin, hemicellulose and pectins. In laboratory conditions, bacterial cellulose is obtained in cultures in the form of a compact, soft film on the surface of a liquid medium. Modification of cultivation conditions allows for easy adjustment of cellulose physicochemical parameters to current needs. BC is a flexible material, mechanically and thermally resistant, it is not degraded by the human body due to the lack of cellulase synthesis, it is characterized by a very high biocompatibility, it does not show cytotoxic or genotoxic effects and is completely biodegradable. BC is used in a wide variety of industries, including the medical and pharmaceutical. Chronic wound infections and implant-related infections are a serious problem in modern medicine. Prevention and treatment of these types of infections are difficult due to the rapidly growing antibiotic resistance of microorganisms. Therefore, it is important to develop modern solutions that will allow for optimization of treatment and prevention of chronic wound infections and implant-related infections.

The aim of presented work was to produce prototype medical devices based on bacterial cellulose (bone implants with BC coating, cellulose surgical meshes with BC coating and bacterial cellulose dressings), to assess the cytotoxicity of these biomaterials and to obtain antimicrobial activity by ex situ modifications of the BC coat.

During the research, 11 reference strains of microorganisms, 45 clinical strains isolated from chronic wound infections and 2 reference lines of fibroblast and osteoblast cells from the collection of the Department of Pharmaceutical Microbiology and Parasitology were used. 7 non-antibiotic antimicrobial compounds and substances, 1 antibiotic were used to test antibacterial properties and 4 base materials were used as a matrix for the BC coating. The minimum inhibitory concentration assay, minimum biofilm eradication concentration assay, the typical and modified disc diffusion method or the antibiofilm dressing's activity measurements assay were used to assess the antimicrobial activity of the obtained prototypes. To determine the effect on fibroblasts and osteoblasts, cytotoxicity assay with neutral red and 60 days cell colonisation measurement assay were used.

The prototype products obtained during the research were characterized by mechanical strength allowing for sterilization and carrying out a number of experiments, negligible cytotoxicity against fibroblasts and osteoblasts, a high degree of BC's colonization by fibroblasts, the ability to absorb the antimicrobial agent, its subsequent release into the environment, and – in consequence – its antimicrobial effect.