



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Lekarski

ROZPRAWA DOKTORSKA

Analiza właściwości fizycznych i biologicznych
prototypowych opatrunków
bionanocelulozowych przeznaczonych do
stosowania na rany przewlekłe

Bożena Mospan

Pracę wykonano w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii
Farmaceutycznej i Parazytologii

Promotor

Dr hab. n.med. Marzenna Bartoszewicz, prof. nadzw.

Wrocław 2018

Pani Promotor
Dr hab. n.med. Marzennie Bartoszewicz
składam serdeczne podziękowania
za poświęcony czas, wyrozumiałość i pomoc
okazaną podczas realizacji tej pracy

Pragnę złożyć podziękowania
Dr n.med. Adamowi Junce oraz
wszystkim pozostałym pracownikom
Katedry i Zakładu Mikrobiologii
Farmaceutycznej za wsparcie oraz
wszechstronną pomoc okazywaną
podczas powstawania rozprawy

Spis treści

1. Spis rycin, tabeli, zdjęć i wykresów.....	1
2. Wstęp.....	5
2.1. Rany przewlekłe.....	5
2.2. Biofilmy medyczne.....	11
2.2.1. Etapy tworzenia biofilmu.....	16
2.2.2. Architektura i metabolizm biofilmu.....	20
2.3. Etapy zakażenia ran przewlekłych i czynniki etiologiczne je wywołujące.....	24
2.3.1. Gronkowiec złocisty - charakterystyka.....	27
2.3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - charakterystyka.....	32
2.3.3. <i>Enterococcus faecalis</i> - charakterystyka.....	35
2.4. Leczenie infekcji rany przewlekłej.....	37
2.4.1. Oczyszczanie rany.....	37
2.4.2. Przemycanie (irygacja) rany.....	38
2.4.2.1. Poliheksanidyna.....	39
2.4.2.2. Dichlorowodorek oktenidyny.....	40
2.4.2.3. Powidon jodu.....	41
2.4.2.4. Chlorheksydyna.....	42
2.4.2.5. Gentamycyna.....	43
2.4.3. Opatrunki do zastosowania na rany przewlekłe.....	44
2.5. <i>Komagataeibacter xylinus</i> – bakteria produkująca celulozę.....	45
2.6. Celuloza bakteryjna.....	45
2.6.1 Medyczne zastosowania bionanocelulozy.....	47

3. Cel pracy.....	49
4. Materiały i Metody.....	50
4.1. Szczepy bakteryjne i linia komórkowa.....	50
4.2. Substancje przeciwdrobnoustrojowe.....	50
4.3. Wytworzenie opatrunków (błon, mat, dysków) celulozowych.....	51
4.4. Charakterystyka nośnika celulozowego.....	52
4.4.1. Szybkość pochłaniania wody przez nośnik celulozowy.....	52
4.4.2. Zdolność do utrzymania wody przez nośnik celulozowy.....	53
4.4.3 Impregnacja nośnika substancjami przeciwdrobnoustrojowymi.....	53
4.4.4 Uwalnianie substancji przeciwdrobnoustrojowych z nośnika celulozowego.....	54
4.5. Wyznaczenie Minimalnego Stężenia Hamującego (MIC) badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych względem <i>S.aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>E.faecalis</i>	55
4.6. Wyznaczenie Minimalnego Stężenia Eradykującego Biofilm (MBEC) badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych względem <i>S.aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>E.faecalis</i>	56
4.7. Ocena aktywności impregnowanego substancjami przeciwdrobnoustrojowymi dysku celulozowego za pomocą zmodyfikowanej metody dyfuzyjno-krążkowej.....	57
4.8. Określenie aktywności przeciwbiofilmowej badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych za pomocą metody Antimicrobial Dressing Activity Measurement [A.D.A.M.].....	57
4.9. Określenie aktywności przeciwbiofilmowej badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych za pomocą zmodyfikowanej metody Antimicrobial Dressing Activity Measurement [A.D.A.M.].....	60
4.10. Wizualizacja biofilmu tworzonoego przez badane drobnoustroje za pomocą Skaningowej Mikroskopii Elektronowej	61
4.11. Ocena cytotoksyczności substancji przeciwdrobnoustrojowych uwolnionych z nośnika względem linii fibroblastów L929.....	62

4.12. Analiza statystyczna.....	63
5. Wyniki.....	64
6. Dyskusja.....	109
7. Wnioski.....	116
8. Streszczenie.....	117
9. Abstract.....	119
120. Literatura.....	120

1. SPIS RYCIN, ZDJĘĆ, WYKRESÓW I TABELI

Rycina 1. Biofilm tworzony w patogenezie zakażeń	[str.15]
Rycina 2. Wzór strukturalny poliheksanidyny	[str.39]
Rycina 3. Wzór strukturalny dichlorowodorku oktenidyny	[str.40]
Rycina 4. Wzór strukturalny jodopowidonu	[str.41]
Rycina 5. Wzór strukturalny chlorheksydyny	[str.42]
Rycina 6. Wzór strukturalny gentamycyny	[str.43]
Rycina 7. Schemat wykonania metody A.D.A.M.	[str.59]
Zdjęcie 1. Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[str.23]
Zdjęcie 2. Dyski celulozowe oczyszczone z medium HS i komórek <i>K.xylinus</i>	[str.64]
Zdjęcie 3. Mikrostruktura bakteryjnej celulozy	[str.65]
Zdjęcie 4. Strefy zahamowania wzorcowego szczepu <i>S.aureus</i> 6538 dookoła dysku BC nasączonego PHMB	[str.101]
Wykres 1. Porównanie masy mokrej i suchej celulozy bakteryjnej	[str.66]
Wykres 2. Porównanie szybkości absorpcji płynów przez nośnik celulozowy	[str.67]
Wykres 3. Określenie wartości parametru zdolności do utrzymania wody przez nośnik celulozowy	[str.68]
Wykres 4. Zawartość związku przeciwdrobnoustrojowego zawierającego dichlorowodorek oktenidyny w nośniku celulozowym oraz w roztworze impregnacyjnym	[str.69]
Wykres 5. Zawartość związku przeciwdrobnoustrojowego zawierającego powidon jodu w nośniku celulozowym oraz w roztworze impregnacyjnym	[str.70]
Wykres 6. Zawartość związku przeciwdrobnoustrojowego zawierającego chlorheksydynę w nośniku celulozowym oraz w roztworze impregnacyjnym	[str.70]
Wykres 7. Zawartość związku przeciwdrobnoustrojowego zawierającego poliheksanidynę w nośniku celulozowym oraz w roztworze impregnacyjnym	[str.71]

Wykres 8. Zawartość związku przeciwdrobnoustrojowego zawierającego siarczan gentamycyny w nośniku celulozowym oraz w roztworze impregnacyjnym	[str.71]
Wykres 9. Uwalnianie OCT z nośnika biocelulozowego w czasie	[str.73]
Wykres 10. Uwalnianie PVP-I z nośnika biocelulozowego w czasie	[str.73]
Wykres 11. Uwalnianie CHX z nośnika biocelulozowego w czasie	[str.74]
Wykres 12. Uwalnianie PHMB z nośnika biocelulozowego w czasie	[str.74]
Wykres 13. Uwalnianie gentamycyny z nośnika biocelulozowego w czasie	[str.75]
Wykres 14AB. Minimalne Stężenie Hamujące OCT i PVP-I względem komórek planktonicznych <i>S.aureus</i> 6538	[str.76]
Wykres 14CD. Minimalne Stężenie Hamujące CHX i PHMB względem komórek planktonicznych <i>S.aureus</i> 6538	[str.77]
Wykres 14.E. Minimalne Stężenie Hamujące Gentamycyny względem komórek planktonicznych <i>S.aureus</i> 6538	[str.78]
Wykres 14FG. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm OCT i PVP-I względem biofilmu <i>S.aureus</i> 6538	[str.79]
Wykres 14HI. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm CHX i PHMB względem biofilmu <i>S.aureus</i> 6538.	[str.80]
Wykres 14J. Minimalne Stężenie Eradykujące gentamycyny względem biofilmu <i>S.aureus</i> 6538	[str.81]
Wykres 15AB. Minimalne Stężenie Hamujące OCT i PVP-I względem komórek planktonicznych <i>S.aureus</i> 33591	[str.82]
Wykres 15CD. Minimalne Stężenie Hamujące CHX i PHMB względem komórek planktonicznych <i>S.aureus</i> 33591	[str.83]
Wykres 15.E. Minimalne Stężenie Hamujące Gentamycyny względem komórek planktonicznych <i>S.aureus</i> 33591	[str.84]

Wykres 15FG. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm OCT i PVP-I względem biofilmu <i>S.aureus</i> 33591	[str.85]
Wykres 15HI. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm CHX i PHMB względem biofilmu <i>S.aureus</i> 33591	[str.86]
Wykres 15J. Minimalne Stężenie Eradykujące gentamycyny względem biofilmu <i>S.aureus</i> 33591	[str.87]
Wykres 16AB. Minimalne Stężenie Hamujące OCT i PVP-I względem komórek planktonicznych <i>P.aeruginosa</i> 15442	[str.88]
Wykres 16CD. Minimalne Stężenie Hamujące CHX i PHMB względem komórek planktonicznych <i>P.aeruginosa</i> 15442	[str.89]
Wykres 16.E. Minimalne Stężenie Hamujące Gentamycyny względem komórek planktonicznych <i>P.aeruginosa</i> 15442	[str.90]
Wykres 16FG. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm OCT i PVP-I względem biofilmu <i>P.aeruginosa</i> 15442	[str.91]
Wykres 16HI. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm CHX i PHMB względem biofilmu <i>P.aeruginosa</i> 15442	[str.92]
Wykres 16J. Minimalne Stężenie Eradykujące gentamycyny względem biofilmu <i>P.aeruginosa</i> 15442	[str.93]
Wykres 17AB. Minimalne Stężenie Hamujące OCT i PVP-I względem komórek planktonicznych <i>E.faecalis</i> 29212	[str.94]
Wykres 17CD. Minimalne Stężenie Hamujące CHX i PHMB względem komórek planktonicznych <i>E.faecalis</i> 29212	[str.95]
Wykres 17.E. Minimalne Stężenie Hamujące Gentamycyny względem komórek planktonicznych <i>E.faecalis</i> 29212	[str.96]

Wykres 17FG. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm OCT i PVP-I względem biofilmu <i>E.faecalis</i> 29212	[str.97]
Wykres 17HI. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm CHX i PHMB względem biofilmu <i>E.faecalis</i> 29212	[str.98]
Wykres 17J. Minimalne Stężenie Eradykujące gentamycyny względem biofilmu <i>E.faecalis</i> 29212	[str.99]
Wykres 18. Strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów dookoła krążków celulozowych impregnowanych substancjami przeciwdrobnoustrojowymi	[str.102]
Wyk.19. [%] redukcja biofilmu <i>S.aureus</i> 6538 – zmodyfikowana metoda A.D.A.M.	[str.106]
Wyk.20. [%] redukcja biofilmu <i>S.aureus</i> 33591 – zmodyfikowana metoda A.D.A.M.	[str.106]
Wyk.21. [%] redukcja biofilmu <i>P.aeruginosa</i> 15442 – zmodyfikowana metoda A.D.A.M.	[str.107]
Wyk.22. [%] redukcja biofilmu <i>E.faecalis</i> 29212 – zmodyfikowana metoda A.D.A.M.	[str.107]
Wyk.23. [%] przeżywalność fibroblastów poddanych działaniu badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych	[str.108]
Tabela 1. % redukcja biofilmu <i>S.aureus</i> 6538 na dyskach agarowych B, M, C w metodzie A.D.A.M.	[str.103]
Tabela 2. % redukcja biofilmu <i>S.aureus</i> 33591 na dyskach agarowych B, M, C w metodzie A.D.A.M.	[str.104]
Tabela 3. % redukcja biofilmu <i>P.aeruginosa</i> 15442 na dyskach agarowych B, M, C w metodzie A.D.A.M.	[str.104]
Tabela 4. % redukcja biofilmu <i>E.faecalis</i> 29212 na dyskach agarowych B, M, C w metodzie A.D.A.M.	[str.105]

2. WSTĘP

2.1. Rany przewlekłe

Rany przewlekłe stanowią narastający, multidyscyplinarny i złożony problem medyczny. Świadczy o tym już sam fakt braku jednej ich definicji. Co więcej, pomiędzy specjalistami różnych dziedzin brak jest nawet jednolitej nazwy dla tego charakterystycznego stanu zaburzeń ciągłości skóry i tkanek miękkich. W trakcie konferencji specjalistycznych czy w piśmiennictwie naukowym spotkać się można z tak różnorodnymi określeniami jak „owrzodzenie przewlekłe”, „rana chroniczna”, „rana niegojąca się” lub „trudno gojąca” oraz – używane w dalszej części tej pracy określenie – „rana przewlekła”. Brak jest także zgodności odnośnie czasu, po upływie którego ranę można definiować jako „przewlekłą”, choć większość badaczy i klinicystów zgadza się, że okres ten zawiera się pomiędzy 4 a 8 tygodniami [1].

Dyskusje te mają charakter raczej akademicki i nie powinny odwracać uwagi od faktu, że częstość występowania ran przewlekłych i związane z tym powikłania dotyczą coraz większej liczby mieszkańców kuli ziemskiej, szczególnie wśród dobrze sytuowanych społeczeństw tak zwanego „świata zachodniego”, pod którym pojęciem rozumiem Europę Zachodnią, Stany Zjednoczone Ameryki Północnej, ale także kraje Europy Centralnej. Należy także zwrócić uwagę na fakt, że wraz z faktem szybkiego przyjmowania zachodniego trybu życia przez mieszkańców Dalekiego Wschodu, szczególnie Chin, problem związany z narastaniem liczby ran przewlekłych zaczyna być kwestią globalną w dosłownym znaczeniu tego słowa.

Powszechny dostęp szerokich mas ludności w społeczeństwach uprzemysłowionych do przetworzonej żywności o niskiej zawartości błonnika a wysokiej zawartości cukrów prostych, siedzący tryb życia, niska aktywność fizyczna prowadzą do nadwagi, a następnie otyłości. Przypadłość ta, nazywana jedną z najgroźniejszych chorób XXI wieku, sprzyja rozwojowi cukrzycy oraz prowadzi między innymi do zaburzeń funkcjonalnych układu krwionośnego. Jednym z efektów ubocznych otyłości jest upośledzenie aktywności układu immunologicznego, przekładające się na ograniczoną zdolność komórek efektorowych do przenikania w miejsce rozwoju zakażenia oraz na obniżenie aktywności makrofagów, neutrofilów i limfocytów we krwi o podwyższonym, w stosunku do wartości referencyjnych, stężeniu cukrów [2]. Otyłość prowadzi także do zmian jakościowych i ilościowych w metabolomie jelitowym ludzi cierpiących od tej przypadłości, co przekłada się nie tylko na bezpośrednie efekty niekorzystne związane ze zmniejszoną zdolnością mikrobioty do ochrony jelit przed inwazją patogenów, ale także do potencjalnie groźniejszych efektów długoterminowych, takich jak na przykład depresja [3]. Wykazano, że zróżnicowana mikrobiota jelitowa stymuluje najdłuższy nerw czaszkowy w ciele człowieka (nerw błędny, „*nerus vagus*” zaczynający się w mózgu, a kończący właśnie w jelitach) poprzez sekrecję prekursorów dla takich istotnych dla dobrego samopoczucia hormonów, jak kwas gamma-amino-masłowy GABA (ang. gamma-amino-butric acid) oraz endorfiny [4]. Długotrwałe zaburzenie sekrecji wyżej wspomnianych hormonów prowadzić może do depresji, z kolei u pacjentów z tą przypadłością wykazano podwyższone stężenia mediatorów stanu zapalnego, których przewlekła obecność podnosi ryzyko wystąpienia zaburzeń komórkowych, aktywacji procesów apoptotycznych i ogólnego osłabienia organizmu [5]. Podobne efekty wywołuje także między innymi stres, nieregularne odżywianie, przebywanie w zanieczyszczonym środowisku oraz nadużywanie substancji

odurzających, czyli główne wykładniki życia zapracowanego, walczącego o byt mieszkańca współczesnej metropolii.

W długim procesie ko-ewolucji nasze ciało (i jego wnętrze) stało się miejscem życia i rozwoju licznych gatunków drobnoustrojów. Zdecydowana większość z nich nie cechuje się wysoką zdolnością do wywoływania zakażeń, chyba że przedostaną się z właściwych dla siebie nisz do jałowych z natury obszarów ciała człowieka. W przypadku osób o obniżonej odporności, których organizm znajduje się w stanie przewlekłego stresu i związanym z tym podwyższonym stężeniem mediatorów stanu zapalnego, do takich translokacji dochodzi stosunkowo częściej.

Rozwój zdecydowanej większości ran przewlekłych jest efektem braku gojenia się rany ostrej, która powstaje na skutek działania sił/czynników zewnętrznych. Wśród ran ostrych wyróżniamy rany urazowe, będące efektem mechanicznego uszkodzenia tkanek; rany termiczne będące efektem ekspozycji ciała na bardzo wysokie lub niskie temperatury; rany popromienne (powstałe po kontakcie z promieniowaniem ultrafioletowym czy jonizującym) bądź rany będące efektem ekspozycji na czynniki chemiczne (np. kwasy i zasady) [6]. W większości przypadków, u zdrowych ludzi, względem ran których zastosowano odpowiednie procedury profilaktyczne i lecznicze, rany takie ulegają zagojeniu. Niestety, na skutek występowania chorób współtowarzyszących (często będących efektem otyłości i cukrzycy, ale także chorób autoimmunologicznych), rany ostre są w wysokim stopniu zagrożone przejściem w stan chroniczny i stają się ranami przewlekłymi [1].

Głównymi typami ran przewlekłych są [7]:

- owrzodzenia żyłne goleni,
- owrzodzenia tętnicze goleni,
- owrzodzenia goleni żylnno-tętnicze,
- odleżyny,
- rozległe rany oparzeniowe
- zespół stopy cukrzycowej

Z wyjątkiem oparzeń oraz odleżyn, wszystkie z wyżej wymienionych typów ran są efektem chorób towarzyszących opisanych w powyższej części manuskryptu.

Niezależnie od etiologii, każdą ranę przewlekłą zdefiniować można jako nieciągłość skóry i błon śluzowych, w której występują uszkodzone komórki oraz zmieniono chorobowo tkanki, a która nie ulega procesowi gojenia w czasie między 4-8 tygodni od powstania mimo zastosowania właściwych procedur leczniczych oraz profilaktycznych.

Jak wspomniałam wcześniej, na skutek chorób współtowarzyszących, aktywność fibroblastów oraz keratynocytów, głównych typów komórek odpowiedzialnych za gojenie się rany, ulega istotnemu zmniejszeniu. W ranach ostrych, gojenie się przebiega w trzech, kolejnych etapach, w których pierwszy określany jest mianem fazy zapalnej lub wysiękowej, podczas której dochodzi do zatrzymania krwawienia i autolitycznego oczyszczenia rany. Następnym etapem jest faza rozrostu, w której powstaje tkanka ziarninowa, a następnie w fazie epitelializacji dochodzi do przebudowy łożyska rany obejmującego dojrzwianie, bliznowacenie i pokrycie zamkniętej rany powierzchnią nabłonka (*epithelium*) [7].

W odróżnieniu od ran ostrych, w ranach przewlekłych proces gojenia zatrzymuje się zazwyczaj w fazie pierwszej, czyli przedłużającego się stanu zapalnego spowodowanego obecnością wysokich stężeń cząsteczek sygnałowych stymulujących na zasadzie sprzężenia zwrotnego (autoindukcji) komórki układu immunologicznego do uwalniania bakteriobójczych (ale i niszczących tkanki) reaktywnych form tlenu, fagocytozy, indukowania apoptozy w zmienionych chorobowo komórkach tworzących tkanki oraz sekrecji metaloproteinaz i przeciwciał. Efektami tej destruktywnej aktywności układu immunologicznego są liczne antygeny (pochodzące ze zniszczonych komórek różnej etiologii), które na zasadzie wspomnianego sprzężenia zwrotnego pobudzają układ odpornościowy do odpowiedzi prowadząc do zapętlonej reakcji typu „błędne koło” (ang. vicious circle) [8].

Należy zatem odpowiedzieć na dwa ważne w aspekcie klinicznym i naukowym pytania.

Po pierwsze - co pobudza układ immunologiczny do chronicznej reakcji; a po drugie – dlaczego reakcja jest chroniczna, to znaczy, dlaczego układ immunologiczny nie jest w stanie zwalczyć przeciwnika, co doprowadziłoby do przejścia rany w kolejne etapy gojenia się i w efekcie jej zamknięcia.

Od kilkunastu lat znamy już odpowiedź na oba z wyżej postawionych pytań – przewlekły stan zapalny w ranie chronicznej wywołany jest przez biofilm tworzony przez drobnoustroje, a nieskuteczność układu immunologicznego w walce z tą formą organizacji przestrzennej drobnoustrojów wiąże się z unikalnymi cechami, które zapewniają tej strukturze przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiskowych oraz z osłabieniem układu immunologicznego, którego przyczyną są opisywane już wcześniej w tej pracy choroby cywilizacyjne bądź wrodzone [2,3,5]. Poznanie i pokonanie biofilmów oraz opracowanie skutecznych procedur profilaktycznych jest jednym z głównych wyzwań zarówno naukowców, jak i klinicystów zajmujących się

problematyką ran przewlekłych. Dlatego też w następnym rozdziale opiszę zarówno budowę, cechy charakterystyczne jak i funkcjonalne biofilmów medycznych.

2.2. Biofilmy medyczne

Należy zdać sobie sprawę z tego, że jesteśmy nie tylko otoczeni przez drobnoustroje, pokryci nimi, ale i z tego, że drobnoustroje wypełniają wnętrza naszych ciał.

Szacuje się, że liczba drobnoustrojów na planecie ziemskiej wynosi około pięciu kwintylionów komórek (5×10^{30}) [9]. Liczba drobnoustrojów zasiedlająca centymetr kwadratowy gleby przewyższać może zatem całkowitą populację ludzi zamieszkujących Chiny. Drobnoustroje dominują liczebnie nad wszystkimi innymi formami życia, zarówno na ziemi, w wodzie jak i w powietrzu. Biorąc pod uwagę jeden z dwóch głównych wyznaczników sukcesu ewolucyjnego [10], mianowicie licznosc organizmów danego gatunku w określonym interwale czasowym, można by zauważyć, że 8 miliardów ludzi zamieszkujących Ziemię w roku 2019, stanowi w porównaniu do liczby komórek tworzących populację dowolnego gatunku bakteryjnego, wartość zupełnie marginalną. Biorąc pod uwagę drugi z wyznaczników sukcesu ewolucyjnego, czyli zdolność do adaptacji [10] zauważyć należy także, że drobnoustroje dostosowują się do zmieniających się warunków środowiskowych znacznie szybciej niż ludzie.

Za każdym razem, gdy w procesie ewolucyjnym pojawiała się nowa grupa organizmów, bakterie (ale także inne drobnoustroje - grzyby, wirusy i pierwotniaki) przystępowały do kolonizacji zewnątrz i wnętrza ich ciał. Znalezione dowody, że już około 300 milionów lat temu bakterie z gatunku *Blattabacterium cuenoti* zasiedlały jelita prymitywnych karaluchów (*Blatta orientalis*) [11]. Bakterie trawiły pokarm spożywany przez karaczany i rozkładając części tłuszczowe pożywienia dostarczały insektom cennego źródła azotu. Bakterie w zamian uzyskały nie tylko niszę rozwojową bogatą w cząsteczki pokarmowe, ochronę przed niesprzyjającymi czynnikami środowiskowymi, ale także zdolność do szybkiego przemieszczania się wraz ze swoimi

nosicielami i rozprzestrzeniania się wraz z wydalanymi przez *Blatta orientalis* odchodami.

W tym miejscu należy wspomnieć, że szacuje się, że całkowita masa drobnoustrojów żyjących w naszych jelitach waha się między 1-2 kg, i że drobnoustroje te pełnią w naszych ciałach taką samą funkcję jak w ciałach karaluchów (to znaczy rozkładają niestrawione resztki pokarmowe, ale też syntetyzują witaminy, wspomniane już prekursorzy hormonów, czy chronią jelita przed inwazją patogenów) [12].

Aby człowiek (oraz inne organizmy) mogły pełnić dla bakterii rolę „mobilnych rusztowań”, drobnoustroje musiały dysponować przynajmniej jedną istotną cechą – mianowicie przyczepnością. Co więcej, musiała to być przyczepność odwracalna, to znaczy taka, która umożliwiała drobnoustrojowi (a raczej agregatom drobnoustrojów) oderwanie się od zajmowanej powierzchni w przypadku gdyby ta z jakiś powodów przestała być atrakcyjna dla ich dalszego rozwoju. Ta zdolność do przylegania do powierzchni wspólna jest wszystkim drobnoustrojom zamieszkującym ciało człowieka, niezależnie czy występują na skórze, w układzie oddechowym czy jelitach. Właśnie takie osiadłe (w większości przypadków), przylegające społeczności drobnoustrojów nazywane są biofilmami. Można zakładać, że drobnoustroje zasiedlając pierwsze makro-organizmy posiadały już tę zdolność w wysokim stopniu rozwiniętą. Wiadomym jest, że wszystkie mikroorganizmy preferują środowisko wodne (lub przynajmniej wilgotne) do rozwoju. Kolonie drobnoustrojów pokrywające kamienie w strumieniach czy rzekach (lub wnętrza rur kanalizacyjnych) są dobitnym przykładem siły i odporności na mechaniczne rozrywanie struktury tworzonej przez komórki, których rozmiary wahają się między kilkoma a kilkunastoma mikrometrami.

Kolejne pokolenia bakterii i makro-organizmów tworzących układ gość-gospodarz cechowały się coraz bardziej zaawansowanymi specjalizacjami umożliwiającymi

sprawne funkcjonowanie tej formy koegzystencji. Przykładem mogą być specyficzne receptory enterocytów (komórek jelitowych) dla wypustek strukturalnych (fimbrii) określonych gatunków bakterii umożliwiające tym ostatnim sprawną kolonizację jelita i zasiedlanie go w tempie szybszym i nieosiągalnym dla innych gatunków drobnoustrojów [13]. Mikroorganizmy zasiedlające nasze ciało „nauczyły się” także nie pobudzać w nadmierny sposób układu immunologicznego oraz dostarczać makroorganizmowi istotnych dla funkcjonowania mikro- i makroelementów. W teorii gier, takie rozwiązanie określane jest mianem strategii „win-win”. O przeciwnym zjawisku mówimy w sytuacji, gdy nasze ciała są zasiedlane (a następnie infekowane) przez drobnoustroje bezwzględnie patogenne. Te z kolei wykształciły szereg cech wirulencji umożliwiające im niszczenie tkanek, szybką propagację, maskowanie się przed komórkami układu immunologicznego (zarówno poprzez zmiany molekularne swoich struktur zewnętrznych, jak i poprzez wnikanie do cytoplazmy komórek pacjenta) [14]. Ich celem jest jak najszybsze namnożenie się w organizmie człowieka a następnie opuszczenie go w jak największej liczbie kopii - poprzez odchody, ślinę, krew, tkanki (rozkładające się ciało człowieka jest także skutecznym propagatorem dyseminacyjnym).

Zaskakujące jest, że mimo istnienia odpowiednich narzędzi poznawczych (mikroskopy, techniki hodowli) z istnienia biofilmu, a przede wszystkim jego znaczenia, zaczęto zdawać sobie sprawę dopiero w latach 80-tych ubiegłego wieku. W latach poprzedzających ten punkt zwrotny dla współczesnej mikrobiologii, specjaliści z różnych dziedzin (począwszy od stoczniowców, na lekarzach kończąc) borykali się z problemem biofilmu, nie wiedząc kim jest przeciwnik, ani jakie są jego mocne i słabe (choć tych nie ma za wiele) strony.

Przyczyną tego faktu jest coś, co można nazwać błędem założycielskim mikrobiologii i którego początku należy szukać w latach, w których powstała ta nauka, czyli na początku XX-ego wieku. W tym okresie, w krótkich odstępach czasowych, dochodziło do fundamentalnych odkryć związanych nie tylko z wykazaniem faktu istnienia drobnoustrojów, ale i z zależnością między występowaniem określonych chorób a obecnością w ciele chorego specyficznych drobnoustrojów (jeszcze niecałe sto lat wcześniej wierzono, że za choroby odpowiedzialne jest na przykład „zepsute” czy „morowe” powietrze). Dla ojców-założycieli mikrobiologii wyzwaniem było wyizolowanie patogenów oraz stworzenie optymalnych warunków hodowlanych obejmujących zapewnienie odpowiedniej temperatury, atmosfery oraz podłoża namnażających i różnicujących, które umożliwiłyby powtarzalną hodowlę oraz detekcję patogenów. Opracowane wtedy i używane do dziś podłoża (oczywiście, wraz z rozwojem mikrobiologii tworzone nowe bądź udoskonalano skład już znanych mediów) charakteryzowały się optymalnym składem i zawartością składników odżywczych. Sprawilo to, że mikroorganizmy w nich kultywowane preferowały bytowanie w formie skupisk pojedynczych komórek, a nie biofilmu. Należy pamiętać, że tworzenie przez bakterie biofilmu jest przede wszystkim adaptacją umożliwiającą im przetrwanie w niesprzyjających warunkach zewnętrznych [15]. W środowisku naturalnym, takich warunków jak te, zapewnione przez mikrobiologów, nie ma. Jednak już wtedy, zaobserwowano, że bakterie hodowane w płynnych podłożach przez dłuższy czas (tak zwane „stare hodowle”) tworzą na ściankach probówek różnego rodzaju błony czy zgęstnienia. Wywołane było to różnymi czynnikami, z których wtedy – na skutek braku odpowiednich metod analitycznych – nie zdawano sobie w pełni sprawy (między innymi właśnie „starzeniem się” populacji, zmniejszonym dostępem do tlenu, wydzielaniem szkodliwych dla bakterii metabolitów). Drobnoustroje „wyczuwając” (o

systemach adaptacyjnych bakterii przeczytać będzie można w dalszej części manuskryptu), że warunki ich bytowania przestają być optymalne, przekształcały się w formę, w której występują w środowisku naturalnym, czyli w biofilm. Obecnie uważa się, że – poza laboratorium – bytowanie drobnoustrojów w formie planktonicznej jest jedynie krótkotrwałym etapem przejściowym poprzedzającym adhezję i tworzenie biofilmu [16]. Niemniej jednak mikrobiologom różnych specjalności zajęło ponad pół wieku, by dojść do tej konkluzji, nazwać przeciwnika jednolitym mianem (poprzednie określenia obejmowały takie nazwy jak „śluz bakteryjny”, „agregaty komórkowe”, „skupiska osiadłe”) i zacząć z nim walczyć (poza rzadkimi, choć istotnymi, wyjątkami obecność biofilmu jest zazwyczaj niekorzystna dla człowieka).

Obecnie, biofilm definiowany jest jako „społeczność drobnoustrojów o wysokiej oporności/tolerancji względem czynników szkodliwych: komponentów komórkowych i humoralnych układu odpornościowego, środków przeciwdrobnoustrojowych – antybiotyków i antyseptyków, niesprzyjających warunków środowiskowych”. W odniesieniu do biofilmów medycznych, nie stosowany jest już zwrot „społeczność osiadła”. Biofilmy określonych patogenów zdolne są bowiem do tworzenia agregatów na styku fazy wodnej i powietrza - biofilmów pływających (ang. „floating biofilms”) [17]. Jednakże większość biofilmów istotnych w znaczeniu klinicznym to społeczności przylegające (adherujące) do określonej powierzchni, na przykład do zmienionej chorobowo tkanki lub implantu (siatki chirurgicznej, rury intubacyjnej, cewnika krwi lub moczowego albo śruby ortopedycznej). Obecna definicja nie uwzględnia nawet tak istotnej komponenty biofilmu, jaką jest zewnątrzkomórkowa macierz (matrix) polimerowa, która stanowi rusztowanie, mur, „spichlerz” oraz sieć komunikacyjną wielu społeczności biofilmowych. Wiąże się to z faktem, że określone typy biofilmu w warunkach *in vivo* mogą nie wytwarzać (lub nie mają zdolności) wytwarzania

macierzy. Obecnie uważa się, że nawet 99% biomasy bakteryjnej występuje w formie biofilmu, a społeczność biofilmowa odpowiedzialna jest za 80% wszystkich zakażeń szpitalnych [18].

2.2.1. Etapy tworzenia biofilmu

Biofilm tworzy się, niezależnie od gatunku drobnoustrojów, na skutek serii kolejnych, w chronologicznym znaczeniu tego słowa, zdarzeń obejmujących: adhezję – rozwój mikrokolonii, dojrzewanie biofilmu – biofilm dojrzwały – dyspersję szczytowych części biofilmu i ponowną adhezję [19].

Pierwszym etapem formowania biofilmu jest adhezja komórek do powierzchni, która dzieli się na adhezję niespecyficzną (zachodzącą za pomocą oddziaływań elektrostatycznych) oraz adhezję specyficzną, w której pośredniczą fimbrie lub inne zewnętrzne, wyspecjalizowane struktury komórkowe. Ważnym czynnikiem, od którego zależy siła adhezji zarówno specyficzej, jak i niespecyficzej, jest tzw. kondycjonowanie powierzchni (ang. surface conditioning) [20]. Obecność jakiegokolwiek ciała obcego w roztworze koloidalnym prowadzi do natychmiastowych interakcji między powierzchnią tego ciała a składnikami fazy ciekłej. W warunkach klinicznych, powierzchnia wprowadzonych do organizmu ciał obcych, takich jak np. cewniki moczowe czy naczyniowe, ulega pokryciu solami nieorganicznymi oraz cząsteczkami organicznymi, np. białkami, czy glikoproteinami. Do kondycjonowania powierzchni dochodzi gwałtownie, znaczne ilości związków organicznych wykrywane są już po 15min od wprowadzenia ciała obcego do roztworu koloidalnego. Grubość warstwy depozytywnej wynosić może od 30 do 80nm. Zatem w przypadku osadzających się bakterii, wpierw dochodzi do kontaktu z warstwą kondycjonowaną, a nie z biomateriałem/tkanką. Fakt ten w znaczny sposób ogranicza możliwość określenia, w

jaki sposób (kiedy, w jakim stopniu) bakterie pokryją powierzchnię, ponieważ rodzaj depozytu w znaczny sposób zmienia tak istotne dla procesu adhezji właściwości powierzchni, jak ich hydrofobowość [21].

Interakcje, do jakich dochodzi między komórką bakteryjną a kondycjonowaną powierzchnią, warunkowane są przez zmienne fizykochemiczne. Uważa się, że adhezja niespecyficzna jest możliwa, jeśli zbliżanie się bakterii do powierzchni zmniejsza całkowitą swobodną energię układu. Jednak hipoteza ta cechuje się wysokim poziomem ogólności, nie bierze bowiem pod uwagę zachodzących w środowisku interakcji elektrostatycznych, które opisuje tzw. rozszerzona teoria DLVO (od nazwisk jej twórców Derjaguina, Landaua, Verwaya, i Overbeeka). Zgodnie z teorią DLVO, zjawisko adhezji mikrobiologicznej opisywane jest przez pryzmat punktu równoważności (ang. equilibrium point), którego wypadkowymi są siły Van der Waalsa (o charakterze przyciągającym), siły elektrostatyczne (zazwyczaj o charakterze odpychającym, jako że większość bakterii oraz powierzchni kondycjonowanych charakteryzuje się ujemnym ładunkiem), oddziaływania Lewisa (kwasowo-zasadowe) oraz siły będące wynikiem ruchów Browna. Na wielkość tych sił wpływa odległość od powierzchni i siła jonowa (miara występujących w roztworze oddziaływań jonowych). Według teorii DLVO, wypadkowa tych sił tworzy dwa obszary, w których siła przyciągania jest największa. Określane są one mianem pierwszego i drugiego minimum i występują w odległości $<1\text{nm}$ oraz $5\text{-}10\text{nm}$ od powierzchni. Pomędzy tymi dwoma rejonami oddziałuje tzw. bariera energii odpychającej. Obecnie uważa się, że bakterie wiążą się odwracalnie (adhezja niespecyficzna) znajdując się w obszarze energetycznym drugiego minimum (większej odległości), a pierwsze minimum ($<1\text{nm}$) przewyciężają za pomocą adhezyn, wiążąc się z powierzchnią w sposób nieodwracalny (adhezja specyficzna) [22].

Powyższe rozważania w jasny sposób uwidaczniają znaczenie składu fizykochemicznego struktur zewnętrznych w procesie adhezji. Nie można jednak zapominać, że fimbrie, które oddziałują w sposób specyficzny (poprzez wiązanie adhezyna właściwa – receptor), także charakteryzują się określonym ładunkiem powierzchniowym, stąd powinny wywierać wpływ na zdolność bakterii do adhezji niespecyficznej. Niestety, większość badań nad fimbriami dotyczy głównie ich podstawowych funkcji związanych z adhezją specyficzną, stąd brak jest doniesień dotyczących oceny wpływu fimbrii na pierwszy chronologicznie, typ adhezji niespecyficznej.

Za adhezję specyficzną odpowiadają głównie włosowate zewnętrzne struktury określane mianem fimbrii, a u bakterii które fimbrii nie posiadają inne białkowe struktury zewnętrzne, na przykład grupa gronkowcowych białek CWA zakotwiczonych w ścianie komórkowej (ang. cell wall-anchored proteins) [23]. Adhezja ta z reguły rozpoczyna się syntezą należących do nich bakteryjnych powierzchniowych substancji rozpoznających adhezyjne molekuly macierzy (ang. Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules, MSCRAMMs). Umożliwiają one kowalencyjne i niekowalencyjne przyłączenie komórek do tkanki lub powierzchni abiotycznych opłaszczonych białkami gospodarza.

Kolejnym, następującym po adhezji specyficznej, etapem rozwoju biofilmu jest formowanie mikrokolonii, czyli niewielkich skupisk bakterii przylegających do powierzchni, które jeszcze nie są pokryte zewnątrzkomórkową macierzą lub dopiero zaczynają go wytwarzać. Fenotyp mikrokolonii znajduje się pomiędzy fenotypem bakterii planktonicznych a biofilmowych [24]. Rozwój mikrokolonii odbywa się poprzez podział komórek już przylegających do określonego miejsca biomateriału/tkanki (rozwój klonalny), a nie poprzez przyłączanie kolejnych komórek

migrujących z zawiesiny. Już w latach 90-tych ubiegłego wieku wykazano, że istnieje mechanizm, który sprawia, że sedymentujące komórki nie osiedlają się na już istniejących skupiskach bakteryjnych osiadłych na powierzchni biomateriału. Mechanizmem tym jest opisane w dalszej części manuskryptem zjawisko „wyczuwania liczebności”, czyli Quorum Sensing.

Dojrzewanie biofilmu polega na pokrywaniu się warstw komórek macierzą zewnątrzkomórkowa składająca się (w zależności od gatunku tworzącego biofilm, ale i warunków środowiskowych) z eozopolisacharydu i/lub białek i/lub zewnątrzkomórkowego DNA (e-DNA, extracellular DNA). W przypadku pałeczki ropy błękitnej, *Pseudomonas aeruginosa*, w skład macierzy wchodzić może alginian, u *Escherichia coli* - kwas kolaninowy. W przypadku gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus*, macierz biofilmowa tworzona może być przez międzykomórkowe, wielocukrowe adhezyny, zewnątrzkomórkowe DNA, przynajmniej 105 różnych białek oraz – jeśli gronkowiec rozwija się w środowisku zawierającym krew – przez rozłożone przez bakterie składniki morfotyczne krwi lub fibrynę [25].

Okresowo, w biofilmie dochodzi do rozluźniania struktury macierzy i odrywania się od niej agregatów komórkowych. Proces ten (ang. biofilm dispersal) jest inicjowany przez samą społeczność biofilmową i odbywa się z udziałem różnego rodzaju cząsteczek, głównie enzymów – np. dysperyzy B, proteinazy K lub mutanazy. Uwolnione bakterie dryfują z prądem cieczy (np. krwi) i zasiedlają, kolonizują oraz infekują kolejne obszary ciała [25].

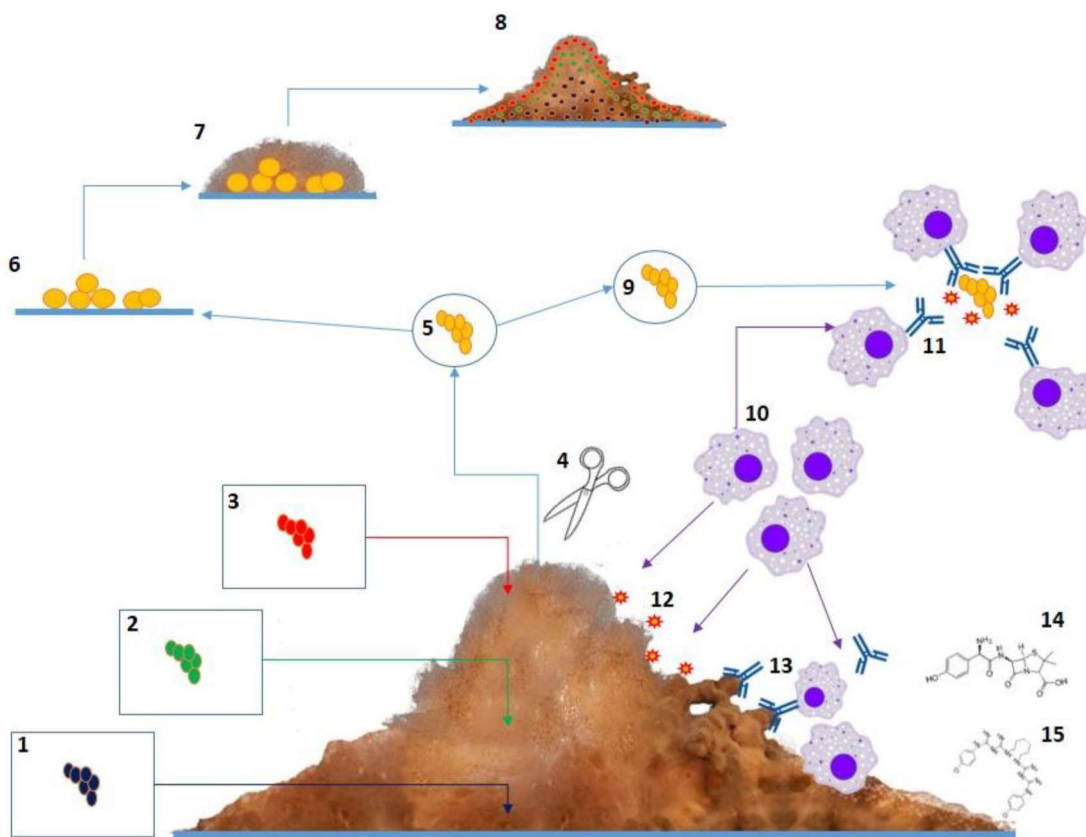
2.2.2. Architektura i metabolizm biofilmu

Struktura biofilmu tworzona jest przez warstwy komórek drobnoustrojów pokryte zewnątrzkomórkową macierzą o zróżnicowanym składzie (w rzadkich wypadkach przez same warstwy komórek). Budowa chemiczna oraz strukturalna macierzy biofilmowej zależy od gatunku (bądź gatunków drobnoustrojów) ją tworzących oraz od warunków zewnętrznych (czynników stresogennych, dostępności oraz rodzaju składników odżywczych, aktywności układu immunologicznego). Drobnoustroje tworzące podstawną warstwę biofilmu, charakteryzują się spowolnioną bądź zatrzymaną aktywnością metaboliczną (stan anabiozy metabolicznej) [26]. Część populacji drobnoustrojów w warstwie podstawnej tworzą komórki martwe, których komponenty wykorzystywane są przez żywe komórki w obrębie biofilmu jako źródło substancji odżywczych oraz do budowy macierzy zewnątrzkomórkowej (charakterystycznym przykładem cząsteczki służącej jako budulec macierzy jest wspomniane już wcześniej e-DNA). Bakterie tworzące wyższe warstwy biofilmu cechują się natomiast wysokim poziomem aktywności metabolicznej, oddychaniem tlenowym (w przypadku bakterii posiadających tę zdolność) oraz krótkim czasem podziału dzięki dostępowi do substancji odżywczych. Zdolność biofilmu do przetrwania w organizmie człowieka wiąże się z określonymi, współistniejącymi czynnikami. Pierwszym z nich to cechy samego drobnoustroju tworzącego biofilm, przede wszystkim - posiadane przez komórki mikroorganizmu mechanizmy oporności na antybiotyki i antyseptyki oraz systemy unikania/zwalczania mechanizmów oporności immunologicznej makro-organizmu. Nie bez znaczenia, w aspekcie zdolności do przetrwania w organizmie człowieka, są czynniki wirulencji związane z cechami gatunkowo charakterystycznymi drobnoustrojów jak choćby zdolność do produkcji peroksydazy, dysmutazy ponadtlenkowej (chroniącej przed reaktywnymi formami tlenu generowanymi przez makrofagami), wytwarzanie otoczki czy zdolność do mimikry

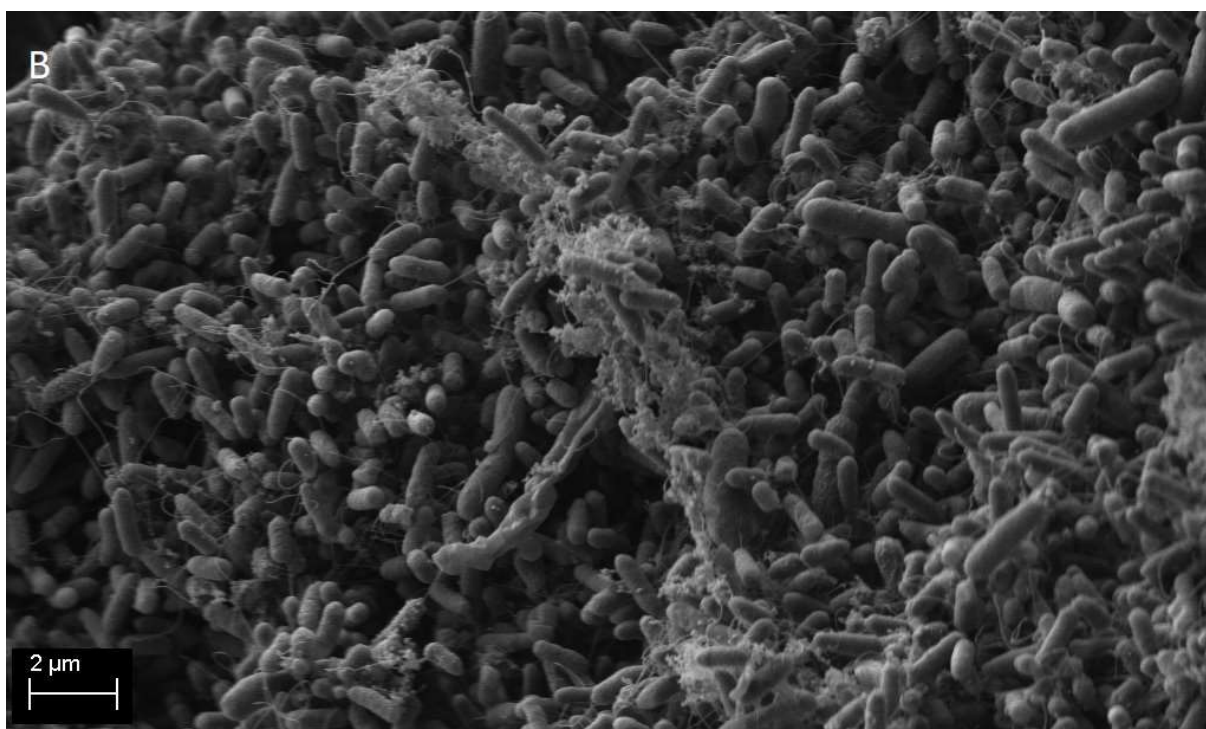
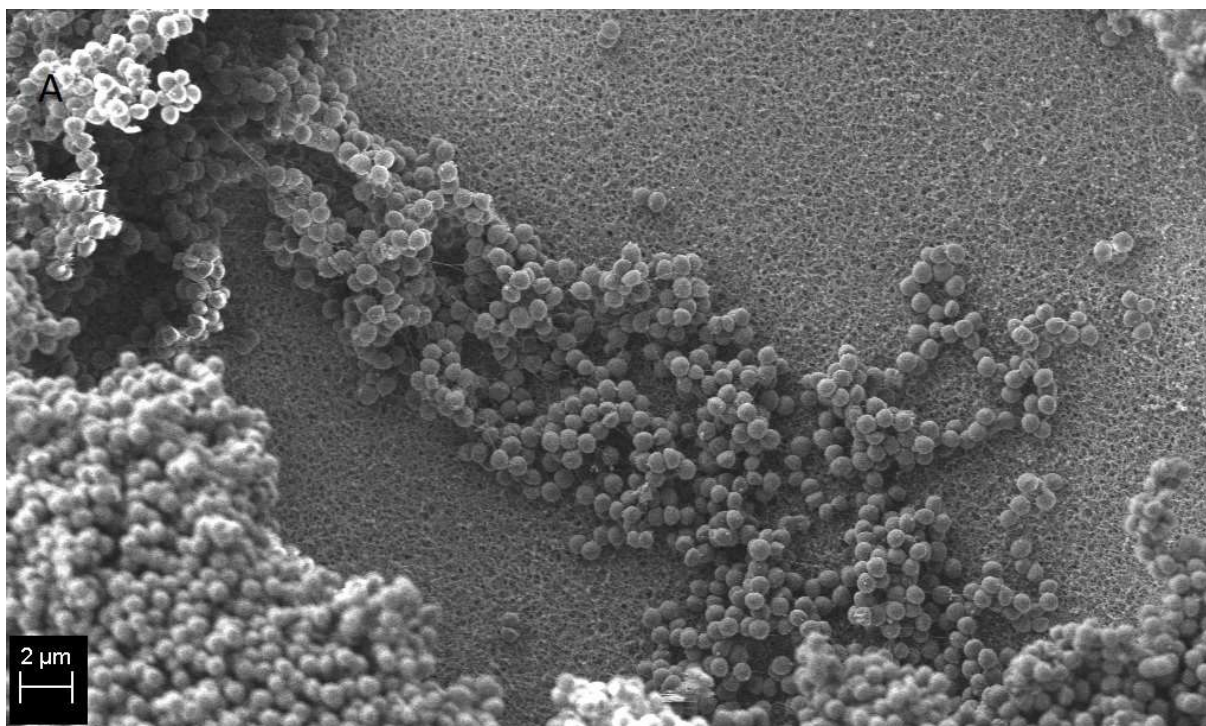
molekularnej (chroniącej przed aktywnością przeciwciał i opsonizacją) oraz wiele innych. Inną cechą umożliwiającą przetrwanie biofilmu w organizmie ludzkim jest zdolność do jednoczesnej (symultanicznej) odpowiedzi na bodźce (ang. *stimula*), określana mianem systemu wyczuwania liczebności (ang. *Quorum Sensing System, QS*). Jest to złożony mechanizm pozwalający drobnoustrojom na koordynację aktywności komórkowej. *Quorum Sensing* reguluje każdy aspekt życia mikroorganizmu oraz bytowania w formie biofilmowej – inicjuje przyleganie do powierzchni, wytwarzanie *matrix*, odrywanie się agregatów komórkowych. Ponadto, odgrywa istotną rolę w koordynacji procesu syntezy i sekrecji enzymów, w tym toksyn czy enzymów rozkładających poszczególne elementy tkanki gospodarza [27]. Należy mieć także na uwadze fakt, że biofilmy *in vivo* tworzone są zazwyczaj przez wielogatunkowe konsorcja drobnoustrojów, w których dochodzi do częstego i szybkiego przekazywania plazmidów kodujących mechanizmy oporności.

Biofilm jest zatem formą bytowania, która zapewnia liczne korzyści drobnoustrojom. Bakterie żyjące w tej strukturze mają znaczną przewagę nad formami planktonicznymi (zwanymi też niezwiązanymi lub wolnopływającymi). Oporność bakteryjnego planktonu na antybiotyki i inne środki przeciwdrobnoustrojowe opiera się na mechanizmach oporności naturalnej, komórkowo-zależnej, a w przypadku bakterii tworzących biofilm dodatkowymi czynnikami ochronnymi są macierz oraz niska (bądź całkowicie zatrzymana) aktywność metaboliczna komórek warstw podstawnych tej struktury.

Procesy opisane w tym oraz dwóch poprzednich podrozdziałach przedstawione są zbiorczo na **Rycinie 1.**; na **Zdj.1A.** oraz **Zdj.B.** uwidoczniono natomiast biofilm tworzony przez *Staphylococcus aureus* oraz *Pseudomonas aeruginosa*, odpowiednio.



Ryc.1. Biofilm tworzony w patogenezie zakażeń. W centralnej części ryciny przedstawiony jest dojrzały, pokryty zewnątrzkomórkową macierzą, biofilm utworzony na schematycznie uwidocznionej powierzchni [błękitna linia]. W zależności od umiejscowienia w strukturze biofilmu, komórki drobnoustroju cechują się niską/wstrzymaną [1], umiarkowaną [2], wysoką [3] aktywnością metaboliczną. Okresowo, ze szczytowej warstwy biofilmu dochodzi do enzymatycznego rozcięcia [4] macierzy i uwolnienia się agregatów komórkowych [5], które dają początek nowemu biofilmowi tworzącemu się na skutek adhezji komórek do powierzchni [6] i syntezy macierzy [7]. Efektem tych procesów jest dojrzały, wielowarstwowy biofilm [8]. Uwolnione agregaty komórek [9], pozbawione ochronnej warstwy macierzy, są podatne na eradykację na skutek aktywności komórek efektorowych układu odpornościowego [10] – m.in. wydzielania opsonin [11] oraz reaktywnych form tlenu ROS [12]. Te same mechanizmy działania systemu immunologicznego [13] są nieskuteczne względem biofilmu. Na skutek obecności ochronnej macierzy oraz niskiej aktywności metabolicznej komórek warstw podstawnych biofilmu, aktywność środków przeciwdrobnoustrojowych – antybiotyków [14] oraz antyseptyków [15] ulega znacznemu osłabieniu. Rycina ze zbiorów własnych dr Adama Junki, z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu udostępniona za jego zgodą.



Zdj.1. A – biofilm *Staphylococcus aureus*; **B** – biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. W obu przypadkach widoczna jest zarówno złożona struktura ułożenia komórek, jak i macierz tworzona przez drobnoustroje. Zdjęcie ze Skaningowego Mikroskopu Elektronowego, Evo Zeis 25. Magn.10000x i 11000x, odpowiednio. Zdjęcie z kolekcji Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

2.3. Etapy zakażenia ran przewlekłych i czynniki etiologiczne je wywołujące

W poprzednich podrozdziałach wymieniono szereg czynników, których obecność związana jest z podwyższonym ryzykiem wystąpienia zakażeń ran przewlekłych. Najczęściej dochodzi do nich na skutek kolonizacji ran drobnoustrojami ze środowiska poprzez przeniesienia drobnoustrojów do łożyska rany przez personel medyczny. Bakterie do rany przedostawać się mogą także z założonych pacjentowi cewników, drenów lub innych biomateriałów [28]. Niewłaściwa opieka nad raną, brak monitorowania mikrobiologicznego, nieprawidłowo wdrożone procedury antyseptyczne są kolejnymi czynnikami zwiększającymi prawdopodobieństwo wystąpienia zakażenia.

Źródłami drobnoustrojów w ranach mogą być: skóra rąk personelu szpitalnego (drobnoustroje przenoszą się na ranę na skutek nieodpowiedniej dezynfekcji rąk przed wykonywaniem zabiegów i innych czynności medycznych); drobnoustroje pochodzące od osób wizytujących pacjenta (przyjaciele, rodzina); ciało pacjenta – na skutek przeniesienia fizjologicznej mikroflory pacjenta na ranę); drobnoustroje szpitalne zasiedlające wilgotne powierzchnie, np. łazienek i toalet szpitalnych.

Pierwszą fazą rozwoju zakażenia jest kontaminacja, która ma miejsce, gdy bakterie przedostają się do rany. Przebieg procesu gojenia w tej fazie nie ulega jeszcze zakłóceniu.

Drugą fazą rozwoju zakażenia jest kolonizacja. Bakterie namnażają się wówczas w obrębie rany, ale nie występują wtedy kliniczne objawy zakażenia rany, chyba że rana zasiedlona jest przez drobnoustroje zdolne do wytwarzania toksyn, na przykład: *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* [29]. Obecność toksyn pobudza silnie układ odpornościowy do reakcji, stąd dochodzi do wcześniejszego niż w przypadku bakterii nietoksynogennych wystąpienia objawów. W czasie kolonizacji w posiewie mikrobiologicznym wykrywane jest zazwyczaj wysokie miano drobnoustrojów. Populacja bakterii jest jednak kontrolowana przez układ odpornościowy gospodarza i nie wymaga

zazwyczaj wdrożenia leczenia przeciwbakteryjnego. Kolejną fazą rozwoju zakażenia jest kolonizacja krytyczna. Na tym etapie dochodzi do zaburzenia równowagi mikrobiologicznej rany. W posiewach mikrobiologicznych obserwuje się wysokie miano bakterii oraz dochodzi do zaburzeń gojenia. Zaobserwować można wtedy zwiększoną ilość wydzieliny sączącej się z rany, nieprzyjemny zapach, a pacjent odczuwa wzmożony ból. W fazach kolonizacji i kolonizacji krytycznej wskazanym postępowaniem profilaktycznym i leczniczym jest stosowanie antyseptyków. Dalszy rozwój drobnoustrojów określany jest już mianem infekcji rany; przyjmuje się, że liczba mikroorganizmów/gram tkanki wynosi $>10^5$ CFU (ang. colony-forming unit – jednostek tworzących kolonię). Cechami charakterystycznymi infekcji mogą być silne zaczerwienienie, ból i ropny wysięk [30].

Typowe objawy zakażenia miejscowego rany miejscowej to nasilający się ostry ból, zmiana zabarwienia rany, silny obrzęk wokół rany, silny ropny wyciek, krwawienie lub krucha ziarnina, opóźnienie (lub zatrzymanie) procesu gojenia, nieprzyjemny zapach (ang. malodor) oraz stwardnienie tkanek.

W przypadku infekcji rozprzestrzeniającej się wyróżnić można także następujące objawy: zapadnięcie się rany, rozprzestrzenienie się zaczerwienienia dookoła brzegów rany, trzeszczenie, podwyższona temperatura, zmiana zabarwienia rozprzestrzeniające się na tkanki przyranne, zapalenie naczyń chłonnych. Należy jednak pamiętać, że bardzo często obecność zakażenia jest maskowana przez dłuższy czas na skutek mechanizmów adaptacyjnych drobnoustrojów, które unikają wykrycia przez układ immunologiczny a jednocześnie nieustannie namnażają się w obrębie rany [31].

Do drobnoustrojów często izolowanych z zakażeń ran przewlekłych zalicza się Gram-dodatnie ziarniaki z rodzaju *Staphylococcus* (najczęściej *Staphylococcus aureus*), *Enterococcus* (najczęściej *Enterococcus faecalis*) oraz *Streptococcus pyogenes*. W przypadku bakterii Gram-ujemnych: pałeczki z rzędu *Enterobacterales* – *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*,

Klebsiella pneumoniae i *Escherichia coli* oraz pałeczki niefermentujące – *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*. Za infekcje ran przewlekłych odpowiedzialne są także bakterie beztlenowe, na przykład *Fingoldia magna*, *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.* oraz *Clostridium spp.* Zastosowanie zaawansowanych metod analiz genetycznych pozwala na coraz to pełniejsze zrozumienie roli, jaką drobnoustroje beztlenowe (których hodowla i identyfikacja wciąż nastrocza trudności mikrobiologom), odgrywają w procesie tworzenia złożonych, wielogatunkowych biofilmów mieszanych [32]. Wśród grzybów, infekcje ran przewlekłych wywołują najczęściej grzyby z rodzaju *Candida spp.* (głównie *Candida albicans*) oraz pleśnie z rodzaju *Aspergillus spp.* [30].

W badaniach zespołu Katedry Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (w której miałam przyjemność wykonywać doświadczenia opisane w tym manuskrypcie), wykazano, że w zakażeniach owrzodzeń goleni (grupa badawcza liczyła 80 pacjentów) dominowały pałeczki Gram-ujemne, w tym *P.aeruginosa*, *Proteus mirabilis* i *Escherichia coli* oraz ziarniaki Gram-dodatnie takie jak *S.aureus* i *Enterococcus faecalis* [33].

W przypadku zakażeń ran oparzeniowych, początkowo dochodzi do rozprzestrzeniania się ziarniaków Gram-dodatnich, w tym *S.aureus*, w kolejnych dobach dominować zaczynają pałeczki Gram-ujemne, najczęściej *P.aeruginosa*. Gronkowiec złocisty oraz pałeczka ropy błękitnej jest niezwykle często izolowana także z zakażeń stopy cukrzycowej oraz z odleżyn.

Biorąc pod uwagę powyższe dane, w kolejnym podrozdziale manuskryptu przedstawiona została charakterystyka 3 istotnych, w kontekście wywoływania zakażeń, bakterii – gronkowca złocistego, pałeczki ropy błękitnej oraz paciorkowca kałowego.

2.3.1. Gronkowiec złocisty - charakterystyka

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) jest najważniejszym z klinicznego punktu widzenia przedstawicielem swojego rodzaju. Zdolny jest do wywoływania szerokiego spektrum infekcji, posiada także liczne mechanizmy oporności na antybiotyki w znaczny sposób utrudniające jego eradykację. Bakteria ta kolonizuje przede wszystkim skórę człowieka i dlatego zdolna jest do przeżycia w środowisku zawierającym wysokie stężenie soli (np. na pokrytej potem skórze) oraz w szerokim spektrum pH (4,2-9,3), przy optimum tego parametru wynoszącym 7,0-7,5 [34]. *S. aureus* jest zdolny do wzrostu w zakresie temperatur wynoszącym 6,5-46° C, przy czym optymalne warunki rozwoju dostarcza mu temperatura między 30 a 37° C. Ściana komórkowa *S. aureus* cechuje się budową typową dla bakterii Gram-dodatnich. Tworzona jest w 90% z peptydoglikanu (mureiny), czyli polimeru, który utrzymuje strukturę komórki, jest też niezbędny do rozmnażania bakterii oraz przeżycia w trudnych warunkach środowiskowych. W skład ściany komórkowej gronkowców złocistych wchodzi kwas teichojowy i lipoteichojowy, a także wielocukry C. Kwasy teichojowe są jednym z czynników warunkujących adhezję, natomiast kwasy lipoteichojowe stanowią antygeny powierzchniowe, które umożliwiają serotypowanie bakterii oraz stanowią wyznacznik zjadliwości gronkowców (biorąc między innymi udział w procesie adhezji). Z peptydoglikanem rodzaju *Staphylococcus* związane jest też białko R, a w przypadku *S. aureus* do ściany komórkowej przyłączone jest również białko A. Zewnętrzna warstwa ściany komórkowej około 10% gronkowców pokryta jest polisacharydową otoczką. Różnicowanie tych struktur powierzchniowych umożliwia wyodrębnienie 11 serotypów *S. aureus*. Szczepy o serotypie 5 i 7 uważane są za cechujące się najwyższą zjadliwością [35]. Większość gronkowców, nie tylko gronkowiec złocisty, wytwarza warstwę zwnątrzkomórkową złożoną z monosacharydów, małych peptydów i białek. Umożliwia im ona przyleganie do tkanek i ciał obcych (implantów, zastawek, cewników, itp.). Produkcja takiej warstwy pozwala im także na przeżycie w obrębie ciała pacjenta oraz w

środowisku szpitalnym – dotyczy to zwłaszcza niewirulentnych koagulazoujemnych gatunków *Staphylococcus* [34]. Gronkowce złociste, jak i inne gronkowce, rosną na pożywkach selekcyjnych w warunkach tlenowych i beztlenowych. Ich stosunkowo niskie wymagania wzrostowe zaspokajane mogą być przez takie proste podłoża, jak woda peptonowa czy agar odżywczy. Na agarze z krwią baranią *S. aureus* tworzy duże, gładkie kolonie, przyjmujące zabarwienie od białego do pomarańczowego. Z upływem czasu zmieniają one kolor na złoty. Dookoła kolonii widoczna jest wyraźna strefa przejaśnienia określana mianem hemolizy typu β . Izolację gronkowców złocistych w próbce, w której znajduje się wiele gatunków bakterii, można przeprowadzić na podłożach wybiórczych, np. podłożu Chapmana, podłożu z mannitolem i NaCl, podłożu Baird-Parkera, podłożu Zebovitza. Pomocne w identyfikacji bywa także podłoże Hugh-Leifsona.

Staphylococcus aureus, poza wytwarzaniem typowej dla rodzaju *Staphylococcus* katalazy, wydziela również koagulazę, co pozwala odróżnić go od innych gronkowców izolowanych u człowieka. Należy jednak zaznaczyć, że zdolnością do wytwarzania tego enzymu mogą cechować się gatunki gronkowca izolowane od zwierząt (np. *S. hyicus* lub *S. intermedius*). Ponadto udokumentowano występowanie szczepów *S. aureus* nie wytwarzających koagulazy. Do identyfikacji gronkowców złocistych służyć mogą tzw. „szybkie testy” na obecność czynnika CF (ang. clumping factor) na powierzchniach komórek bakterii. CF oznacza się poprzez zmieszanie kolonii bakteryjnej z kroplą osocza (CF jest receptorem wiążącym fibrynogen osocza). Pojawienie się kłaczków potwierdza przynależność badanego szczepu bakterii do gatunku *S. aureus*. Analogicznie badana jest obecność białka A na powierzchni komórek gronkowców.

W skład czynników zjadliwości gronkowca wchodzi między innymi elementy struktur powierzchniowych tego drobnoustroju. Pokrywająca bakterię otoczka hamuje proliferację neutrofilów, a także przyczynia się do zahamowania chemotaksji i fagocytozy. Warstwa śluzowa

ułatwia przyleganie do powierzchni. Budujący ścianę komórkową peptydoglikan zapewnia stabilność osmotyczną, hamuje fagocytozę, stymuluje produkcję endogennych czynników ropotwórczych oraz odpowiada za tworzenie się ropni. Kwasy tejchojowe wiążą się do fibronektyny. Białko A, zakotwiczone między peptydoglikanem a błoną cytoplazmatyczną, hamuje odpowiedź immunologiczną związaną z przeciwciałami – wiąże się z receptorami Fc przeciwciał IgG1, IgG2 i IgG4, a także hamuje działanie białek dopełniacza [36]. Odrębną grupą czynników wirulencji gronkowca złocistego stanowią enzymy. Należy do nich koagulaza, która odpowiada za ścinanie osocza. Do działania wymaga ona obecności w osoczu aktywatora koagulazy. Wspomniany uprzednio CF to koagulaza związana, nie wymagająca obecności aktywatora. Kolejnym enzymem jest katalaza – odpowiada ona za rozkład nadtlenu wodoru do wody i tlenu. Z kolei hialuronidaza hydrolizuje kwasy hialuronowe tkanki łącznej, a także ułatwia *S. aureus* rozprzestrzenianie się w organizmie. Fibrylizyna (stafylokinaza) rozpuszcza skrzepy fibrynowe. Lipazy hydrolizują lipidy i odgrywają szczególną rolę w tworzeniu się ropni na skórze. Nukleazy hydrolizują DNA. Proteazy są odpowiedzialne za chorobotwórczość poprzez hydrolizę wiązań peptydowych. Leukocydyna niszczy leukocyty i chroni bakterie przed fagocytozą. Fosfataza determinuje patogenność. Acetoina i fosfolipaza decydują o zjadliwości. Penicylinaza rozkłada antybiotyki z grupy penicylin. Do czynników chorobotwórczych *S. aureus* należy także szereg toksyn. Jedną z grup wytwarzanych przez gronkowca złocistego toksyn stanowią cytotoksyny: α , β , γ i δ . Toksyna alfa powoduje uszkodzenia mięśni gładkich naczyń krwionośnych, a także krwinek i komórek wątroby. Toksyna beta wywołuje lizę m.in. dla erytrocytów, fibroblastów, leukocytów i makrofagów. Toksyna gamma, tak samo jak leukocydyna, wywołuje lizę neutrofilii i makrofagów, ponadto posiada aktywność hemolityczną. Z kolei toksyna delta cechuje się niską specyficznością – potrafi zniszczyć szerokie spektrum typów komórek eukariotycznych poprzez rozerwanie ich błony komórkowej [37]. Enterotoksyny A-F odpowiadają za zatrucia pokarmowe. Należą do

superantygenów – oznacza to, że są zdolne do nieswoistej aktywacji limfocytów T i uwolnienia cytokin. Mogą również działać pobudzająco na ośrodek wymiotny w ośrodkowym układzie nerwowym poprzez interakcję z receptorami neuronalnymi w jelicie [34]. Inny rodzaj toksyn produkowany przez *S. aureus* to toksyny eksfoliatywne – ETA i ETB (ang. exfoliative toxin A i B). Wywołują one zespół poparzonej skóry – SSSS (ang. staphylococcal scalded skin syndrome) – i powodują powstawanie dużych, płaskich pęcherzy, które szybko pękają i pozostawiają po sobie rozległe powierzchnie skóry bez naskórka. Toksyny te należą do grup proteaz serynowych. Nie wywołują stanu zapalnego [35]. Wśród toksyn należy wymienić także toksyny TSST-1 i TSST-2 (ang. toxic shock syndrome toxin-1 i -2), wywołujące zespół wstrząsu toksycznego. Jest ona superantygenem, który również prowadzi do proliferacji limfocytów T i wydzielania cytokin, a także prowadzi do przerwania ciągłości błon komórek nabłonka (w niskich stężeniach) i wywołuje efekt cytotoksyczny (w wysokich stężeniach).

S. aureus może wytwarzać także toksynę pirogeną, odpowiedzialną za wystąpienie gorączki [37]. Istotną rolę w chorobotwórczości gronkowca złocistego odgrywają również białka powierzchniowe wiążące fibronektynę, elastynę, lamininę, witronektynę czy plazminogen oraz białka wiążące macierz glikoproteinową. Są one niezbędne w procesie adhezji gronkowców do wyżej wymienionych białek i ułatwiają infekcję. Do innych czynników chorobotwórczych należą hemaglutyniny, białko Map (ang. MHC class II analog protein), czynnik hamujący agregację płytek, FAME (ang. fatty acid modifying enzyme), EDIN (ang. epidermal cell differentiation inhibitor) czy siderofory [38]. Za wysoką zjadliwość gronkowca złocistego odpowiedzialne są także liczne mechanizmy adaptacyjne umożliwiające bakterii przetrwanie i rozwój w często wrogim środowisku. Jednym z takich mechanizmów jest zdolność do adhezji (przylegania) komórek do powierzchni (biotycznych lub abiotycznych). Kluczową rolę w tym procesie odgrywają kwasy tejchojowe i lipotejchojowe oraz grupa białek powierzchniowych związanych kowalencyjnie z peptydoglikanem. Białka te są określane jako MSCRAMM

(microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) i należy do nich między innymi wspomniane uprzednio białko A, białka wiążące kolagen czy białka wiążące fibronektynę [39]. Z kolei przed wrodzoną odpornością gospodarza komórki gronkowcowe chroni otoczka oraz warstwy śluzowe, które są w stanie zneutralizować działanie opsonin i utrudnić neutrofilom fagocytozę. Omawiane wcześniej białko A ma zdolność wiązania się z przeciwciałami, dzięki czemu zapobiega usuwaniu komórek gronkowca złocistego z organizmu [34].

2.3.2. *Pseudomonas aeruginosa* – charakterystyka

Pseudomonas aeruginosa (pałeczka ropy błękitnej) to Gram-ujemna bakteria, powszechnie występująca w środowisku naturalnym, przede wszystkim w glebie i w wodzie; stanowi także część mikrobiomu wielu roślin i zwierząt. Jest patogenem oportunistycznym, wywołującym ostre i przewlekłe infekcje, na które szczególnie narażeni są pacjenci po przeszczepach, cierpiący od ran oparzeniowych, chorzy na mukowiscydozę czy AIDS (ang. autoimmunodeficiency syndrome) [40]. *P. aeruginosa* wywołują może: zakażenia tkanek miękkich, układu moczowego, zapalenie dróg oddechowych, zapalenie rogówki oraz błony śluzowej ucha zewnętrznego, bakteriemię, sepsę, zapalenie kości i wsierdza. Często przyczynia się także do powikłań stopy cukrzycowej i zakażeń ran oparzeniowych, może być jednak czynnikiem etiologicznym zakażeń ran przewlekłych każdego typu.

Bakteria zaopatrzona jest w zlokalizowane biegunowo: pojedynczą wic oraz kilka krótszych rzęsek typu czwartego. Są to główne, poza lipopolisacharydem, czynniki wirulencji związane ze ścianą komórkową. Ułatwiają one drobnoustrojowi poruszanie, zarówno po powierzchniach stałych, jak i w środowisku płynnym, umożliwiają adhezję do komórek, wywołują odpowiedź zapalną. Ponadto wic bierze udział w chemotaksji; rzęski natomiast, w agregacji i tworzeniu biofilmu. Lipopolisacharyd odpowiada za antygenowość bakterii, aktywację układu odpornościowego, usuwanie cząsteczek oraz za wrażliwość bakterii na działanie antybiotyków [34]. *Pseudomonas aeruginosa* posiada również pięć systemów, których funkcją jest wydzielanie toksyn poza komórkę. Poprzez typ I i II uwalniane są enzymy proteolityczne-alkalina, proteaza IV, oraz elastaza LasB. Hamują one aktywację dopełniacza, niszczą komórki nabłonkowe, przeciwciała i surfaktant pęcherzyków płucnych. Przyczyniają się więc do infekcji układu oddechowego, a także rozsiewania zakażenia w organizmie. Typ III sekrecji pozwala nie tylko na wydzielanie związków poza bakterię, ale także na wprowadzenie ich do wnętrza komórki gospodarza [41]. Przy jego pomocy toksyny ExoS, ExoT, ExoU, ExoY

uszkadzają cytoszkielet, powodują nekrozę i apoptozę w zainfekowanych komórkach oraz chronią drobnoustroj przed fagozytozą. Innym czynnikiem zjadliwości pałeczki ropy błękitnej jest egzotoksyna A, która hamuje syntezę białek w komórkach gospodarza. Z kolei fosfolipazy rozkładają warstwę lipidową i powodują lizę erytrocytów [41]. Siderofory takie, jak piowerdyna i piochelina chelatują i transportują istotne dla wzrostu mikroorganizmów żelazo w przypadku braku w środowisku jego łatwo przyswajalnych form [42]. Piocyjanina jest to barwnik nadający niebiesko-zielone zabarwienie koloniom *P. aeruginosa*. Unieczynnia ona katalazę i zaburza transport elektronowy w komórkach człowieka, co potęguje stan zapalny wywołany obecnością drobnoustroju. Broni też bakterię przed fagocytozą.

Pseudomonas aeruginosa posiada również mechanizmy oporności na antybiotyki; zarówno naturalne, jak i nabyte, a także zdolność tworzenia biofilmu. Wszystkie te cechy sprawiają, że pałeczka ropy błękitnej jest jednym z najgroźniejszych patogenów szpitalnych [42].

Pseudomonas aeruginosa ma zdolność tworzenia biofilmu zarówno na powierzchniach stałych, jak i na granicy faz ciecz- powietrze. Biofilm *Pseudomonas* może występować w formie niemukoidalnej oraz mukoidalnej. Druga z wymienionych form izolowana jest głównie z zakażeń płuc u pacjentów z mukowiscydozą. Charakterystycznymi elementami macierzy biofilmu pałeczki ropy błękitnej są trzy polisacharydy: alginian, Psl, Pel. W odróżnieniu od pozostałych dwóch polisacharydów, alginiany wytwarzane są w większości przez szczepy o fenotypie mukoidalnym. Zapewniają one stabilność i ochronę, zarówno przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi, jak i przed zwalczaniem przez komórki układu odpornościowego. Alginiany niszczą reaktywne formy tlenu i makrofagi, a także hamują opsonizację przez fagocyty. Ponadto zatrzymują wewnątrz drobnoustroju wodę i substancje odżywcze. Polisacharydy Pel i Psl ułatwiają tworzenie biofilmu, przede wszystkim na etapie adhezji; Pel głównie na powierzchniach stałych oraz pomiędzy fazami [43]. Zmniejszają wrażliwość *P. aeruginosa* na działanie antybiotyków. Dodatkowo Pel przyczynia się do agregacji komórek bakteryjnych,

natomiast Psl aktywuje komórki zapalne i utrudnia rozpoznawanie pałeczek przez system immunologiczny człowieka. Może również oddziaływać z eDNA, tworząc strukturę przypominającą rusztowanie, która zwiększa stabilność biofilmu. Co więcej, Psl działa jako cząsteczka sygnałowa, powodująca nasilenie syntezy wewnątrzkomórkowego przekaźnika, jakim jest c-di-GMP [44]. Poza wspomnianymi wcześniej rzęskami i wicią, które biorą udział w adhezji, ważnymi elementami macierzy biofilmowej są również: adhezyna Cdr biorąca udział w autoagregacji bakterii oraz fimbrie Cup umożliwiające tworzenie mikrokolonii.

2.3.3. *Enterococcus faecalis* – charakterystyka

Względnie beztlenowe bakterie z rodzaju *Enterococcus* nie wytwarzają przetrwalników, ale posiadają ważną dla patogenezы zakażeń zdolność do proliferacji w zmiennych warunkach [34]. Są w stanie przeżyć i rozwijać się w wysokich stężeniach soli (6,5% NaCl), cechują się również szerokim zakresem wytrzymałości temperaturowej wynoszącym od 5 °C do 60°C [35]. Enterokoki tolerują także względnie szeroki zakres wartości pH pomiędzy około 4 a 10, z optimum rozwojowym wynoszącym 7.5. Cechy te wynikają z trwałości i szczelności ściany komórkowej będącej efektem przystosowania *Enterococcus* do życia w układzie pokarmowym i moczowo-płciowym człowieka. Czynniki wirulencji u *Enterococcus* są przykładem mechanizmu adaptacyjnego do środowiska zajmowanego przez tę bakterię - zdolność adhezji do białek macierzy zewnątrzkomórkowej (trombospondyny, laktorefyny i witronektyny), nabłonka dróg moczowych i jamy ustnej oraz zdolność do translokacji z komórek nabłonka jelita do węzłów chłonnych a stamtąd do i innych komórek ciała - zwiększając szansę *Enterococcus* do przeżycia i proliferacji w organizmie człowieka. Istotnym elementem wpływającym na patogenezę zakażeń wywołanych przez *Enterococcus* i na wyniki leczenia jest oporność naturalna i nabyta tych bakterii na antybiotyki. Oporność naturalna obejmuje: β -laktamy (brak wiązania z cefalosporynami), klindamycynę, aminoglikozydy (oporność niskiego stopnia) oraz trimetoprim w połączeniu z sulfametoksazolem [45]. *Enterococcus* jest ważnym składnikiem mikrobioty jelit (choć pod względem ilościowym stanowi > 0,1% populacji drobnoustrojów zasiedlającej tę niszę).

W drogach moczowych *Enterococcus* może wywoływać zapalenie pęcherza moczowego, gruczołu krokowego i najądrzy. *Enterococcus* są również izolowane z zakażeń jamy brzusznej, miednicy i tkanek miękkich, w tym ran przewlekłych - szczególnie gołeni, ale także z odleżyn i owrzodzeń stopy u chorych na cukrzycę. Zdolność *Enterococcus* do tworzenia biofilmu jest podstawowym czynnikiem infekcji dróg moczowych, endodontycznych, zapalenia wsierdzia

oraz ran przewlekłych. Tendolkar i wsp., zaobserwowali, że *Enterococcus faecalis* tworzy silniejsze struktury biofilmu w obecności podwyższonych stężeń osmolarnych glukozy [46], inny zespół badawczy wykazał, że wprowadzenie do środowiska hodowlanego 10% osocza z krwi ludzkiej podwyższa istotnie zdolność *Enterococcus faecalis* do adhezji i produkcji macierzy biofilmowej [47]. Wraz z narastającą częstością występowania u ludzi ran przewlekłych, rośnie także częstość zakażeń tych obszarów ciała wywoływanych przez bakterie z gatunku *Enterococcus faecalis*.

2.4. Leczenie infekcji rany przewlekłej

2.4.1. Oczyszczanie rany

„Oczyszczenie rany (ang. „Wound Bed Preparation”, „debridement”) to proces prowadzący do uzyskania czystego, podatnego na leczenie, łożyska rany poprzez usunięcie czynników kontaminujących ranę. Czynniki te mogą mieć charakter endogenny (obfity wysięk, złogi martwicy i włókniny oraz biofilm) bądź egzogenny (pozostałości opatrunków, zanieczyszczenia pochodzące z gleby czy odzieży pacjenta). Obecnie stosowane są różne techniki oczyszczania, dostosowane do typu, rozmiaru, stanu oraz etiologii rany. Wyróżnić można między innymi:

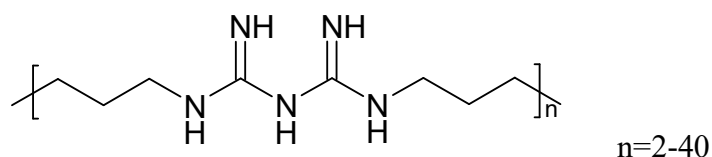
- oczyszczanie chirurgiczne polegające na opracowaniu brzegów rany i usunięciu martwicy narzędziami chirurgicznymi – ta metoda zalecana jest między innymi w wytycznych „Opieka nad ranami zainfekowanymi przez drobnoustroje w formie biofilmowej” [48].
- Nekrektomia enzymatyczna – wykonywana z użyciem miejscowo działających preparatów zawierających enzymy proteolityczne upłynniających tkanki martwicze
- Larwoterapia, w której wykorzystywane są larwy muchy plujki *Lucilia sericata*, które usuwają martwą tkankę a nawet biofilm tworzony przez drobnoustroje w łożysku rany [49].
- Opatrunki oczyszczające – wysokochłonne, absorbujące wysięk, pobudzające do ziarninowania nowoczesne systemy opatrunkowe.

2.4.2. Przemywanie (irygacja) rany

Po zakończeniu oczyszczenia rany, konieczne jest ich przemycie za pomocą miejscowo działających preparatów płynnych, które bądź wypłukują mechanicznie pozostałości po oczyszczaniu opisanym w podrozdziale 2.4.1., bądź wypłukują oraz zabijają drobnoustroje w formie biofilmowej znajdujące się w łożysku rany. Produkty takie, w zależności od ich rejestracji oraz typu działania nazywane są lawa- lub antyseptykami, odpowiednio. Praktyczne rozróżnienie między tymi dwoma rodzajami preparatów jest trudne, ponieważ zarówno lawa-, jak i antyseptyki, posiadają w swoim składzie substancje (często te same) przeciwdrobnoustrojowe, różni je jedynie zastosowane ich stężenie. Niezależnie od nazwy, produkty takie powinny cechować się przede wszystkim niską cytotoksycznością, brakiem negatywnego wpływu na gojenie się rany, zgodnością farmaceutyczną z materiałami i substancjami zawartymi w opatrunkach oraz brakiem indukcji oporności drobnoustrojów [1].

Poniżej, przedstawiono charakterystykę czterech substancji aktywnych, stosowanych zarówno do celów lawaseptycznych, jak i antyseptycznych (oraz jednego antybiotyku, gentamycyny), wykorzystanych w części doświadczalnej niniejszej pracy do impregnacji prototypowych opatrunków celulozowych.

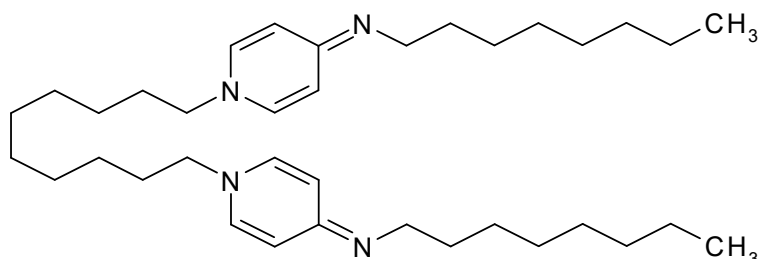
2.4.2.1 Poliheksanidyna (poliheksametylenbiguanid, PHMB)



Ryc.2. Wzór strukturalny poliheksanidyny

Poliheksanidyna to mieszanina polimerów syntetycznych, przypominająca strukturalnie peptydy przeciwdrobnoustrojowe produkowane przez keratynocyty i neutrofile w ranie. PHMB oddziałuje selektywnie nie tylko na cytoplazmę, ale i struktury powierzchniowe drobnoustrojów oraz uszkadza ich DNA. Szerokie spektrum działania PHMB obejmuje bakterie Gram (-) i Gram (+), zarówno w formie planktonicznej, jak i biofilmowej; bakterie zdolne do rozwoju wewnątrz komórek ssaczy, a także grzyby oraz ludzki wirus niedoboru odporności (ang. HIV, Human Immunodeficiency Virus). Podwyższone pH w ranie stymuluje aktywność przeciwdrobnoustrojową PHMB i jej penetrację przez biofilm. W praktyce klinicznej najczęściej stosowane są produkty zawierające PHMB (środek o aktywności przeciwdrobnoustrojowej) oraz betainę (związek powierzchniowo czynny, surfaktant), zmniejszającą napięcie powierzchniowe, oraz prawdopodobnie zwiększający porowatość macierzy biofilmowej [50], co umożliwia antyseptykowi szybszą penetrację.

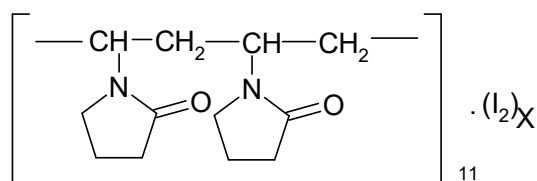
2.4.2.2. Dichlorowodorek oktenidyny (oktenidyna, dichlorowodorek [N,N' (1,10 dekanedildi-1[4H]-pirydinylo-4-ilideno) bis-91-oktanaminowy, OCT).



Ryc. 3. Wzór strukturalny dichlorowodoru oktenidyny

Dichlorowodorek oktenidyny (N,N'-(1,10 dekanediyldi-1[4H]-pyridinylo-4-ilideno) bis-(1-oktanamino) dichlorowodorek), OCT to bispirydina, która posiada dwa kationowe centra aktywne znajdujące się na dwóch końcach hydrofobowego łańcucha cukrowego. OCT wiąże się z bakteryjną ścianą komórkową o ładunku ujemnym zaburzając jej integralność, co prowadzi do letalnego dla komórki „wycieku” składników cytoplazmy do środowiska. Dichlorowodorek oktenidyny cechuje się stabilnością w szerokim zakresie pH (między 1.6 a 12.2), nie rozkłada się na skutek ekspozycji na światło słoneczne ani na skutek ekspozycji na temperaturę sięgającą 130°C. Oktenidyna charakteryzuje się bardzo szerokim spektrum aktywności przeciwbakteryjnej względem bakterii Gram(-) oraz Gram(+), a także grzybów i wirusów bezotoczkowych [51].

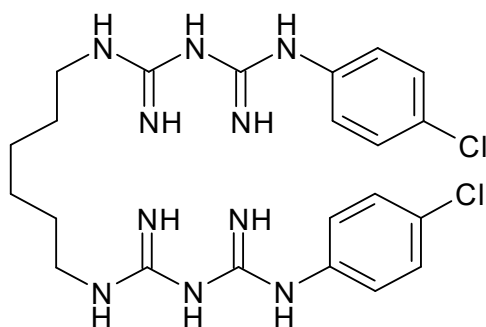
2.4.2.3. Powidon jodu (PVP-I)



Ryc. 4. Wzór strukturalny jodopowidonu

Substancją aktywną tej złożonej molekuly jest jod, a nośnikiem - poliwinylpirolidon. W roztworach wodnych jod uwalnia się z nośnika i penetruje do komórek, gdzie utleniając aminokwasy, tworząc mostki dwusiarczkowe, zmienia strukturę trzecio- i czwartorzędową białek. Prowadzi to do ich denaturacji. Dodatkowo, jod wiąże się z nukleotydami zaburzając replikację maszyneryi komórkowej, a wiążąc się z resztami lipidowymi ścian komórkowych zwiększa ich przepuszczalność, co prowadzi do wycieku wnętrza cytoplazmy do środowiska zewnętrznego. PVP-I wykazuje skuteczność względem bakterii Gram (-), Gram (+), przetrwalników bakteryjnych, mykobakterii, grzybów oraz zarodników grzybów, wirusów, pasożytów i pierwotniaków [52].

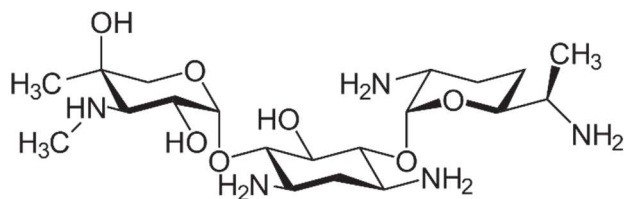
2.4.2.4 Chlorheksydyna Chlorheksydyna (1,1'-heksametylen-bid (5-[p-chlorfenyl] biguanid, CHX)



Ryc.5. Wzór strukturalny chlorheksydyny

CHX to zmodyfikowana biguanidyna stosowana w postaci wodnych roztworów glukonianu bądź octanu. Mechanizm aktywności przeciwdrobnoustrojowej antyseptyku polega na gwałtownym łączeniu się CHX ze ścianami komórkowymi drobnoustrojów i ich uszkodzeniu. [52]. Prowadzi to do, wykazywanego już przez inne wspomniane wcześniej antyseptyki, „molekularnego wycieku”. CHX wykazuje skuteczność przeciwdrobnoustrojową względem bakterii Gram (+), Gram (-), grzybów, wirusów otoczkowych i pierwotniaków.

2.4.2.5. Gentamycyna



Ryc.6. Wzór strukturalny gentamycyny

Gentamycyna to antybiotyk aminoglikozydowy znajdujący szerokie zastosowanie w leczeniu ciężkich zakażeń, w tym infekcji kości oraz ran. Według danych EARSS, oporność na ten antybiotyk takich istotnych klinicznie gatunków bakteryjnych jak *P.aeruginosa* czy *S.aureus* jest stosunkowo niska [61]. Co więcej, gentamycyna wprowadzona do kolagenowego nośnika (gąbka garamycynowa) stosowana jest powszechnie do leczenia infekcji ran przewlekłych. Zgodnie z danymi piśmienniczymi cechuje się ona w tej postaci wysoką siłą bójcą, długim czasem uwalniania oraz niską cytotoksycznością [62]

2.4.3 Opatrunki przeznaczone do zastosowania na rany przewlekłe

Zgodnie z aktualnymi zasadami i rekomendacjami, opatrunki do stosowania na ranę przewlekłą powinny cechować się zdolnością do utrzymania wilgotnego środowiska rany, nie prowadzić do jej maceracji, chłonać nadmiar wysięku, zapewnić optymalne pH, termoregulację, umożliwić wymianę gazową oraz ściśle wypełniać łożysko rany chroniąc je przed kolonizacją bakteryjną. Istnieją liczne podziały opatrunków, w zależności od ich budowy, przeznaczenia czy typu wykazywanej aktywności [53]. W przypadku zakażenia rany przewlekłej, konieczne jest zastosowanie, w myśl obowiązujących wytycznych [1], opatrunków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Cechami, którymi powinny charakteryzować się opatrunki przeciwdrobnoustrojowe są:

- zdolność do wydzielania (najlepiej przedłużonego) substancji przeciwdrobnoustrojowej,
- zdolność do sekwestracji wysięku zawierającego drobnoustroje,
- zdolność do uśmiercania szerokiego spektrum mikroorganizmów
- zdolność do absorpcji nieprzyjemnego zapachu z rany będącego efektem toczącego się procesu infekcyjnego [30].

Do substancji przeciwdrobnoustrojowych stosowanych w tego typu opatrunkach zalicza się przede wszystkim węgiel aktywny, nano-srebro oraz wspomniane już wcześniej antyseptyki: poliheksanidynę, oktenidynę, chlorheksydynę czy powidon jodu.

W ostatnim czasie prowadzone są badania nad opracowaniem nośnika, który spełniałby wszystkie z wyżej wymienionych cech oraz umożliwiającego przedłużone uwalnianie się substancji przeciwdrobnoustrojowych ze swojej struktury (co jest istotną składową skuteczej eradykacji drobnoustrojów infekujących łożysko rany). Dlatego też swoją uwagę zwróciłam na materiał określany mianem „najbardziej obiecującego biopolimeru ostatniego dziesięciolecia”, czyli bakteryjną bio-nano-celulozę (ang. bio-nano-cellulose, lub bio-cellulose, BC) tworzoną przez niepatogenny gatunek bakterii octowej *Komagataeibacter xylinus*,

ponieważ zdaje się on spełniać większość (lub nawet wszystkie) wymagania stawiane „opatrunkowi idealnemu”.

2.5. *Komagataeibacter xylinus* – bakteria produkująca celulozę

Komagataeibacter xylinus to Gram-ujemna, ściśle tlenowa, nieprzetrwalnikująca pałeczka należąca do grupy bakterii określanej mianem bakterii kwasu octowego (ang. Acetic Acid Bacteria, AAB). Bakterie kwasu octowego są szeroko rozpowszechnione w środowisku naturalnym. Występują w klimacie umiarkowanym, śródziemnomorskim i tropikalnym. *Komagataeibacter xylinus*, podobnie jak pozostałe AAB izolowane są z różną częstotliwością z roślin, miodów, wód smakowych, octów naturalnych oraz przede wszystkim w bogatych w sacharydy części roślin - owoców (w tym winogron), ale także kwiatów [54]. Do lat 70-tych ubiegłego wieku, bakterie AAB wykorzystywane były przede wszystkim do produkcji różnych odmian octów, do produkcji azjatyckiego napoju „kombucha”, w procesie obróbki ziaren kakawca, do wytwarzania deseru „ nata de cocco” i w przemyśle biotechnologicznym do produkcji dihydroksyacetonu. Jednak obecnie, coraz częściej bakterie AAB, szczególnie *Komagateibacter xylinus*, wykorzystywane są do produkcji czystej chemicznie, specyficznej pod względem strukturalnym, nano-celulozy.

2.6. Celuloza bakteryjna

Celuloza jest materiałem szeroko wykorzystywanym w różnych gałęziach przemysłu. Ten nierozgałęziony biopolimer składa się z cząsteczek β -D-glukopiranozy, połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Cząsteczki β -D-glukopiranozy są obrócone o 180° względem sąsiadujących cząstek i tworzą jednostkę strukturalną celulozy – celobiozę. Celuloza jest materiałem naturalnym, produkowanym głównie przez organizmy roślinne, algi, osłonice, organizmy grzybopodobne oraz określone gatunki bakterii. W przemyśle najpowszechniej wykorzystywana jest wciąż celuloza roślinna, zawierająca zanieczyszczenia – hemicelulozę,

pektyny, woski oraz ligninę, które wymagają usunięcia. W celulozie bakteryjnej brak jest tego typu zanieczyszczeń [55].

Komagataeibacter xylinus jest uważany za modelowy mikroorganizm wytwarzający celulozę. Bakteria ta, hodowana w płynnej pożywce, tworzy na jej powierzchni grubą, zwartą, elastyczną strukturę, dopasowującą się swoim kształtem do naczynia hodowlanego. Błona ta jest macierzą biofilmową chroniącą bakterie przed promieniowaniem UV oraz wysychaniem i szkodliwym wpływem czynników środowiska zewnętrznego, ułatwia także bakterii w środowisku naturalnym translokację z powierzchni owoców do układu pokarmowego owadów [56].

Największą zaletą membran celulozowych tworzonych przez bakterie jest ich wysoka czystość i brak zanieczyszczeń hemicelulozą, ligniną i pektynami, co eliminuje potrzebę dodatkowego oczyszczania i jest korzystne z punktu widzenia ekonomii i ekologii. W porównaniu do roślinnej, celuloza bakteryjna cechuje się wyższym stopniem polimeryzacji oraz krystaliczności [57]. Cząsteczki glukozy obecne w BC tworzą spójną strukturę trójwymiarową, przez co materiał ten jest bardzo wytrzymały mechanicznie i elastyczny. Do niewątpliwych zalet celulozy bakteryjnej należy również to, że nie wywiera toksycznego wpływu na komórki i tkanki oraz cechuje się wysoką biokompatybilnością. Błony z celulozy bakteryjnej charakteryzują się wysoką zdolnością retencji wody (sucha, ale nie przesuszona błona jest w stanie wchłonąć ilość wody znacznie przekraczającą swoją własną masę). BC jest także całkowicie biodegradowalna [57].

2.6.1 Medyczne zastosowania bionanocelulozy

Wysoka czystość, biogodność oraz brak zanieczyszczeń, a także wysoka wytrzymałość i zdolność adsorpcji dużej ilości płynu sprawiają, że celuloza bakteryjna jest coraz częściej stosowana w medycynie. Oczyszczone z komórek bakterii i pożywki błony celulozowe, są gotowym do wykorzystania biomateriałem [58]. Co więcej, takie cechy BC, jak ich grubość, wielkość, chłonność, gęstość, można modyfikować poprzez zastosowanie odpowiednich warunków hodowlanych, modyfikację genomu bakterii (metodami biologii molekularnej) oraz samych mat (z wykorzystaniem procesów chemicznych i enzymatycznych). Dodatkową zaletą BC jest jej nanofibrylarna budowa, brak działania teratogennego i mutagennego oraz hipoalergicznosc [58].

Bakteryjne błony celulozowe wykorzystywane mogą być w medycynie jako opatrunki stosowane do leczenia i pielęgnacji ran przewlekłych – odleżyn, owrzodzeń goleni, owrzodzeń stopy cukrzycowej a także ran oparzeniowych [59].

Opatrunki z BC mają zdolność do utrzymania wysokiego uwodnienia, umożliwiają swobodną wymianę gazową między raną a otoczeniem oraz cechują się zdolnością do wiązania wysięku z rany. BC przylega ściśle do ciała (a więc także do rany), jednak w postaci uwodnionej nie przykleja się do niego. Zmiana opatrunku z BC jest zatem bezbolesna i nie prowadzi do zniszczenia znajdującej się pod opatrunkiem ziarniny [60]. Rany pokryte opatrunkami z BC są dobrze nawilżone oraz odizolowane od środowiska zewnętrznego przy jednoczesnym zachowaniu wymiany gazowej.

Maty z bakteryjnej celulozy przyjmują kształt naczyń hodowlanego, co oznacza że stosując naczynia o kształcie i wielkości dopasowanej do rany pacjenta, można otrzymać jeden fragment opatrunku o wielkości pokrywającej całą powierzchnię rany. W leczeniu ran przewlekłych zaletą opatrunków z celulozy bakteryjnej jest także ich transparentność (przejrzystość). Pozwala ona na kontrolę postępów gojenia rany bez konieczności ściągania (często bolesnego)

opatrunku. Biorąc pod uwagę wymienione wyżej, korzystne cechy opatrunków biocelulozowych, celem mojej pracy była impregnacja tego biomateriału antyseptykami i antybiotykiem oraz ocena skuteczności tak zaimpregnowanej BC w eradykacji biofilmu tworzonego przez patogeny izolowane z zakażeń ran przewlekłych: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterococcus faecalis*.

3. Cel pracy

Celem pracy była analiza właściwości fizycznych i biologicznych, przeznaczonych do stosowania na rany przewlekłe, prototypowych opatrunków bionanocelulozowych

wysyconych antyseptykami:

dichlorowodorkiem oktenidyny,

powidonem jodu

chlorheksydyną

poliheksanidyną

lub antybiotykiem:

- gentamycyną

oraz ocena ich skuteczności w eradykacji biofilmu tworzonoego przez *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* oraz *Pseudomonas aeruginosa*

4. Materiały i Metody

4.1. Szczepy bakteryjne i linia komórkowa

W badaniu wykorzystano 2 szczepy gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* z Amerykańskiej Kolekcji Szczepów Wzorcowych American Tissue and Cell Culture, z których szczep o numerze 33591 charakteryzował się opornością na metycylinę, a szczep o numerze 6538 był metycylino-wrażliwy. Ponadto, badaniem objęto szczep *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 oraz *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Do wytworzenia opatrunków celulozowych zastosowano szczep *Komagataibacter xylinus* 53524. Wyżej wymienione szczepy bakteryjne wchodzi w skład Kolekcji Szczepów Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Do określenia cytotoksyczności wywieranej przez związki przeciwdrobnoustrojowe wydzielane z nośnika celulozowego użyto linii komórkowej immortalizowanych fibroblastów z kolekcji ATCC o numerze L929.

4.2. Substancje przeciwdrobnoustrojowe

Do celów eksperymentalnych zastosowano:

a) preparat antyseptyczny zawierający w swym składzie: 0,1% undecylenamidopropylobetainę, 0,1% biguanid poliaminopropyłowy oraz wodę oczyszczoną - w dalszej części manuskryptu okreśłany mianem „PHMB”.

b) preparat antyseptyczny zawierający w swym składzie 0,1% dichlorowodorek oktenidyny 2% fenoksyetanol, kokamidopropylbetainę - roztwór 30 %, sodu D-glukonian, glicerol 85 %, sodu wodorotlenek, sodu chlorek, wodę oczyszczoną - w dalszej manuskrypcie okreśłany mianem „OCT”.

c) preparat antyseptyczny zawierający w swym składzie 0,05% octan chlorheksydy - w dalszej części manuskrypcie okreśłany mianem „CHX”.

d) preparat antyseptyczny zawierający w swym składzie 7,5g powidonu jodu (10% dostępnego jodu), substancje pomocnicze: dwuwodnian fosforanu monosodowego, jodan sodowy, eter makro-golu laurylu 9 EO (Ph.Eur.), wodorotlenek sodu, woda oczyszczona – w dalszej części manuskrypcie okreśłany mianem „PVP-I”.

e) wodny roztwór siarczanu gentamycyny przygotowany z antybiotyku *in substantio* (Alchem, Polska) – w dalszej części okreśłany mianem „G”.

4.3. Wytworzenie opatrunków (błon, mat, dysków) celulozowych

Do hodowli *Komagateibacter xylinus* ATCC 53524 wykorzystano płynne medium Hestrin-Shramm [H-S], zawierające:

- 2 % glukozę (POCH Polska)
- 0,5% baktopeptonu (Graso Biotech)
- 0,5% ekstraktu drożdżowego (Graso Biotech)
- 0,27% wodorofosforanu sodu (Chempur)
- 0,115% kwasu cytrynowego (Stanlab)
- 0,05% heptahydratu siarczanu magnezu (Stanlab)
- 1% etanolu (POCH Polska)

Szczep znajdujący się w zamrożeniu w temperaturze -80°C wprowadzano do podłoża płynnego HS i inkubowano w temperaturze 28°C przez 7 dni do wytworzenia błony celulozowej. Następnie, w celu rozpuszczenia biopolimeru i uzyskania żywych komórek *K.xylinus*, BC umieszczano w jałowym naczyniu, zalewano buforem cytrynianowym 0,1 M o $\text{pH}= 4,8$ i dodawano celulazę [enzym z klasy hydrolaz (E.C 3. 2. 1. 4.)]. Maty celulozowe z zawierającym enzym buforem inkubowano w 37°C w łaźni wodnej do czasu rozpuszczenia BC. Następnie, otrzymaną zawiesinę wirowano przez 15 min przy 5000 rpm (wirówka Schuttigen 96). Po zakończonym wirowaniu supernatantu usuwano, a osad dwukrotnie przepłukiwano solą fizjologiczną, za każdym razem wirując mieszaninę. Uzyskany pelet bakteryjny, zawieszony w medium HS wprowadzano w objętości 2 mL do polistyrenowych płytek 24-dółkowych, których średnica studzienek wynosiła 15 mm. Bakterie w płynnej pożywce HS inkubowano w temperaturze 28°C przez 7 dni do wytworzenia maty celulozowej. Następnie BC wprowadzano do 0.1 M roztworu NaOH i inkubowano w temperaturze 80°C w łaźni wodnej w celu usunięcia komórek bakteryjnych. Po inkubacji, krążki celulozowe oczyszczano poprzez przemywanie jałową wodą. Proces kontynuowano do ustabilizowania się pH, co mierzono za pomocą indykatora paskowego. Tak przygotowane krążki celulozowe poddawano kolejnym badaniom.

4.4. Charakterystyka nośnika celulozowego

Wagę mokrej (natywnej) i suchej masy celulozy (proces suszenia obejmował wprowadzenie na okres 6 godzin mokrych krążków celulozowych do suszarki typu Binder AP, w temperaturze 60°C) określono na wadze analitycznej PA Pioneer OHAUS PA114C/1. Wszystkie pomiary przeprowadzono w 6 powtórzeniach technicznych, w 3 niezależnych pomiarach.

4.4.1. Szybkość pochłaniania wody przez nośnik celulozowy

Natywne (mokre) krążki celulozowe pocięto na fragmenty o długości 1 cm i poddano suszeniu w 60 °C przez 6 godzin w suszarce Binder AP. Wagę suchego fragmentu BC określono na wadze analitycznej PA Pioneer OHAUS PA114C/1 . Następnie, w aseptyczny sposób, fragment wprowadzono na 1 minutę do wody destylowanej w temperaturze pokojowej. Próbkę wyjęto po minucie, delikatnie otarto bibułą filtracyjną i zważono. Proces ten powtarzano do momentu braku przyrostu wagi. Nasączenie próbek wodą i ważenie wykonywano w 6 powtórzeniach. Wyniki przedstawiono w postaci procentowego poziomu szybkości pochłaniania wody przez celulozę [%SR, ang. Swelling Rate], który obliczono według wzoru: **% SR = [(mokra masa próbki celulozy - sucha masa próbki celulozy) / sucha masa próbki celulozy] × 100%.**

Pomiary tak jak te, opisane w **4.4.1** wykonywano także dla nośników celulozowych impregnowanych badanymi substancjami przeciwdrobnoustrojowymi (proces impregnacji opisano w sekcji manuskryptu o numerze **4.4.3**)

4.4.2. Zdolność do utrzymania wody przez nośnik celulozowy

Oczyszczone z komórek dyski celulozowe poddano zanurzeniu w wodzie destylowanej na 24h w celu uzyskania maksymalnej absorpcji cieczy przez nośnik. Następnie, BC wyjmowano z naczynia zawierającego wodę, ostrożnie przecierano bibułą filtracyjną i ważono na wadze analitycznej PA Pioneer OHAUS PA114C/1. Następnie, celulozę pozostawiano na 60 min. w temperaturze 60°C i ważono ponownie. Obliczenia zdolności utrzymania wody przez nośnik celulozowy dokonywano stosując następujący wzór:

Zdolność do utrzymania wody przez nośnik [% WHC, ang. water-holding capacity] = $(W_m - W_p) / W_s * 100\%$;

Gdzie:

W_m - waga mokrej celulozy;

W_p – waga celulozy suszonej przez 300minut/60°C;

W_s – waga całkowicie wysuszonej celulozy.

Pomiary tak jak te, opisane w 4.4.2 wykonywano także dla nośników celulozowych impregnowanych badanymi substancjami przeciwdrobnoustrojowymi (co opisano w sekcji manuskryptu o numerze 4.4.3)

4.4.3. Impregnacja nośnika substancjami przeciwdrobnoustrojowymi

W celu impregnacji, dyski BC wprowadzano do 5ml badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych znajdujących się w szczelnie zamkniętym, uniemożliwiającym parowanie, pojemniku na czas 96h. Proces impregnacji przebiegał w temperaturze pokojowej. W interwałach czasowych wynoszących 24h, pobierano 200µL roztworu zawierającego związek przeciwdrobnoustrojowy i dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali odpowiedniej dla każdego z badanych związków przeciwdrobnoustrojowych. Równoległe do tych analiz, przeprowadzano w każdym punkcie czasowo-pomiarowym badanie polegające na

zwirowaniu (1200 RPM, 10min, wirówka Schuttiken, Niemcy) nasączonej środkiem przeciwdrobnoustrojowym celulozy i zmierzeniu absorbancji odwirowanego płynu. Tym sposobem mierzono zarówno stężenie uwalnianego do supernatantu, jak i zatrzymanego w celulozie, związku o charakterze przeciwdrobnoustrojowym. Badanie wykonano w 3 niezależnych eksperymentach, każdy w 3 powtórzeniach technicznych. Kontrolę doświadczenia stanowiły dyski BC inkubowane jak dyski BC grupy badanej z tym że zamiast substancji przeciwdrobnoustrojowej, nasączano je jałowym roztworem 0.9% soli fizjologicznej.

4.4.4. Uwalnianie substancji przeciwdrobnoustrojowych z nośnika celulozowego

W celu oceny uwalniania badanych środków przeciwdrobnoustrojowych z dysków BC, zastosowano metodę spektrometryczną z wykorzystaniem spektrometru MultiScan Go. Dyski BC inkubowano przez 300 minut w 37 ° C w zamkniętych zlewkach zawierających 5 mL czystej, jałowej wody. W czasach 5,15,30,45,60,90,120,180,300 min 200 µL otrzymanego roztworu przeniesiono do studzienek na przezroczystej, mikro płytce UV (Becton Dickinson and Company, USA). Absorbancję określano spektrometrycznie przy odpowiednich dla każdej z substancji badanych długościach fali. Zastosowano stężenia robocze antyseptyku, wyjątkiem był PVP-I, którego intensywnie brązowa barwa wymusiła 10xkrotne rozcieńczenie antyseptyku w celu przeprowadzenia pomiaru. Po wykonaniu analizy, 200 µL badanych roztworów wprowadzano ponownie do zlewek zawierających antyseptyki.

4.5. Wyznaczenie Minimalnego Stężenia Hamującego (MIC) badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych względem *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.faecalis*.

Do oznaczenia wartości minimalnego stężenia hamującego - MIC badanych antyseptyków zastosowano metodę mikrorozcieńczeń na polistyrenowych płytkach 96-dołkowych (Sarstedt) według wytycznych opracowanych przez EUCAST dla antybiotyków. Z 24-godzinnej hodowli płynnej badanego szczepu sporządzano zawiesinę o gęstości 1×10^8 komórek/ml (0.5MF). Zawiesinę rozcieńczono 100-krotnie za pomocą TSB w celu otrzymania zawiesiny bakteryjnej o gęstości 1×10^6 komórek/ml. Następnie przygotowano płytkę titracyjną, do której wprowadzono do studzienek 1-12 w rzędzie, 100 μ L płynnego podłoża TSB. Kolejno, do dołka nr10 wprowadzono 100 μ L badanej substancji przeciwdrobnoustrojowej i wykonano szereg geometrycznych rozcieńczeń – zatrzymując się na dołku nr 1. Po wykonaniu rozcieńczenia, 100 μ l zawiesiny bakteryjnej o gęstości 1×10^6 komórek/ml przeniesiono do odpowiednich dołków (1-10 oraz 12) płytki titracyjnej. Dołek 11 służył do kontroli jałowości doświadczenia (napełniano go jałową pożywką płynną); dołek 12 – do kontroli potwierdzającej zdolność szczepu do tworzenia biofilmu na powierzchni polistyrenowej. Tak przygotowaną płytkę titracyjną poddano ocenie spektrofotometrycznej przy długości fali wynoszącej 590nm (spektrometr Multiscan Go, Thermo Scientific). Po zakończeniu pomiaru, płytki inkubowano 24h/37°C. Po upływie czasu inkubacji ponowiono pomiar spektrometryczny. Kontrolę wzrostu stanowiła studzienka zawierająca drobnoustroje, do której nie wprowadzono antyseptyku lub antybiotyku. Przyrost absorbancji w tej studzience traktowano jako 100% i względem niej liczono poziom zahamowania wzrostu drobnoustroju stosując wzór: poziom zahamowania wzrostu drobnoustroju = **100% - [wartość absorbancji w studzience z zawiesiną mikroorganizmów i substancją przeciwdrobnoustrojową/wartość absorbancji w studzience zawierającej kontrolę wzrostu*100%]**. Jałowe medium w dołku 11 stanowiło pomiar typu „blank”. Dodatkowo, w celu określenia MIC antyseptyków użyto metody Richardsa opierającej się na ocenie redukcji 1% bezbarwnego chlorku 2,3,5-

trójfenylotetrazoliowego (TTC, Fluka) do czerwonego formazanu. Do barwnej redukcji związku dochodzi jedynie w obecności drobnoustrojów charakteryzujących się aktywnością metaboliczną. Za minimalne stężenie hamujące (MIC) przyjmowano stężenie antyseptyku w pierwszym dołku, w którym po 24 godzinach od inkubacji z TTC, nie doszło do zmiany zabarwienia. Każdy pomiar przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

4.6. Wyznaczenie Minimalnego Stężenia Eradykującego Biofilm (MBEC) badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych względem *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.faecalis*

Z 24 godzinnej hodowli płynnej badanego szczepu sporządzano zawiesinę o gęstości 1×10^8 komórek/ml (0.5MF). Zawiesinę rozcieńczono 100-krotnie za pomocą TSB w celu otrzymania zawiesiny bakteryjnej o gęstości 1×10^6 komórek/ml. 100 μ l zawiesiny bakteryjnej o gęstości 1×10^6 komórek/ml przeniesiono do odpowiednich dołków (1-10 oraz 12) płytki titracyjnych. Dołek 11 służył do kontroli jałowości doświadczenia (napełniano go jałową pożywką płynną), dołek 12 – do kontroli potwierdzającej zdolność szczepu do tworzenia biofilmu na powierzchni polistyrenowej. Tak przygotowaną płytkę titracyjną inkubowano 24h/37°C. Po zakończeniu inkubacji, zawiesinę usunięto, a dołki przepłukano 3x 0.9% NaCl w celu usunięcia nieprzylegających komórek bakteryjnych w formie planktonicznej. Do studzienek wprowadzono następnie 100 μ L podłoża TSB, a następnie do studzienki nr 10 - 100 μ L substancji przeciwdrobnoustrojowej, którą rozcieńczono w postępie geometrycznym w kolejnych studzienkach płytki. Płytki titracyjne inkubowano 24h/37°C. W celu określenia minimalnego stężenia hamującego MBEC badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych użyto metody Richardsa opierającej się na ocenie redukcji 1% bezbarwnego chlorku 2,3,5-trójfenylotetrazoliowego (TTC, Fluka) do czerwonego formazanu. Do barwnej redukcji związku dochodzi jedynie w obecności drobnoustrojów charakteryzujących się aktywnością metaboliczną. Za minimalne stężenie eradykujące biofilm MBEC przyjmowano stężenie substancji przeciwdrobnoustrojowej w pierwszym dołku, w którym po 24 godzinach od

inkubacji z TTC, nie doszło do zmiany zabarwienia. Dodatkowo wykorzystano fakt, że przy zastosowaniu stężenia związków przeciwdrobnoustrojowych poniżej wartości bójczej dochodzi w czasie 24 godzin od ich aplikacji do rozwoju form planktonicznych wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 580nm. Każdy pomiar przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

4.7. Ocena aktywności impregnowanego substancjami przeciwdrobnoustrojowymi dysku celulozowego za pomocą zmodyfikowanej metody dyfuzyjno-krażkowej

BC zaimpregnowane związkami przeciwdrobnoustrojowymi tak jak to opisano w części 4.4.4. manuskryptu położono na podłoża agarowe Mueller-Hinton (M-H) (BioMaxima, Polska), na które posiano uprzednio zawiesinę o gęstości 0,5 McFarlanda badanych drobnoustrojów patogennych metodą na murawę. Hodowlę prowadzono przez 24 godziny w 37°C. Po upływie czasu inkubacji obliczono średnie strefy zahamowania wzrostu (w mm). Badanie wykonano w trzech powtórzeniach.

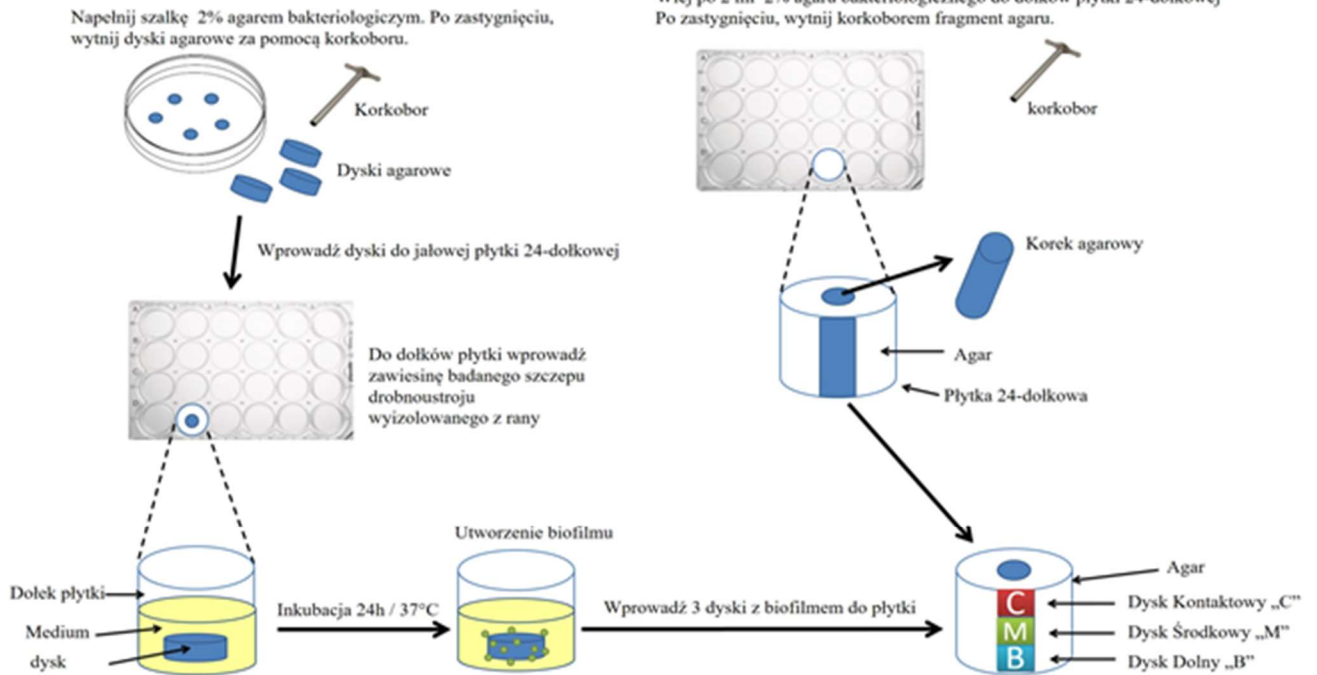
4.8. Określenie aktywności przeciwbiofilmowej badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych za pomocą metody Antimicrobial Dressing Activity Measurement [A.D.A.M.]

Szczepy poddane badaniu przesiano z odpowiednich podłoży stałych do bulionu TSB (VWR, Polska) i inkubowano przez 24h/37°C. Po upływie czasu inkubacji, zawiesiny rozcieńczono do 0,5McFarlanda, a następnie do 10⁵ cfu/mL za pomocą seryjnych rozcieńczeń w 0,9% roztworze NaCl

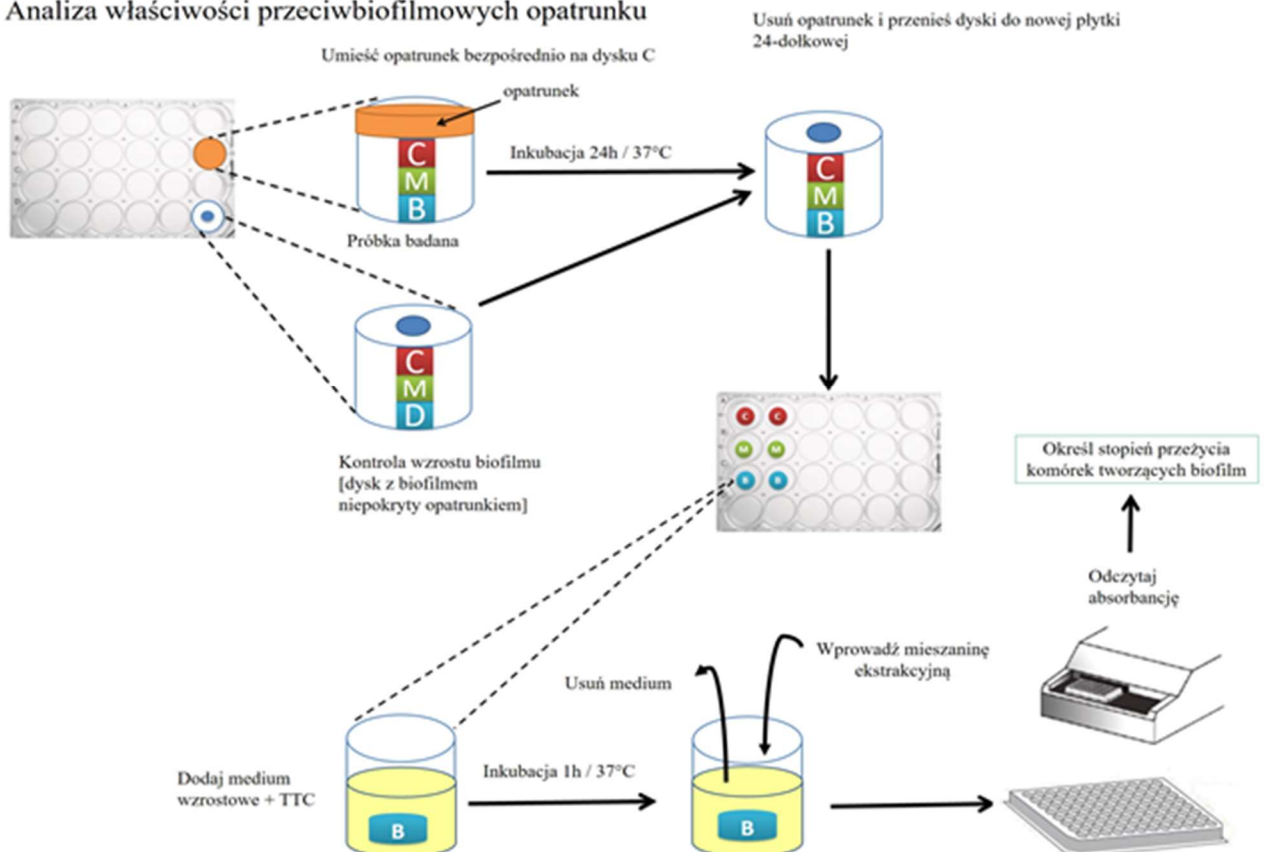
Używając korkoboru o średnicy 8mm z agaru BHI wylanego do dołków płytki 24-dołkowej wycięto korek agarowy, który pocięto na 3, równej grubości, agarowe dyski, które przełożono do nowej płytki 24-dołkowej. Do studzienek płytki wprowadzono 1mL zawiesiny drobnoustrojów o gęstości 10⁵ cfu/mL i inkubowano przez 24h/37°C do czasu pokrycia dysków przez biofilm badanych patogenów. Obecność biofilmu na dyskach agarowych potwierdzano osobno za pomocą mikroskopii elektronowej oraz za pomocą techniki TTC.

Trzy dyski z biofilmem ułożono w dołkach płytki 24-dołowej (otoczonej agarem BHI) jeden na drugim. Dyskowi położonemu na dnie płytki przypisano symbol „B” (ang. bottom – dolny), kolejny dysk określono mianem „M” (ang. middle – środkowy), dysk górny – literą „C” (ang. contact – kontaktowy). Na dyski C nałożono celulozowe opatrunki zawierające substancje przeciwdrobnoustrojowe (grupa badana) oraz celulozowe opatrunki niewysyczone antyseptykiem/antybiotykiem (kontrola doświadczenia). Układ doświadczalny inkubowano 24h/37°C. Następnie, opatrunki ściągano, a dyski poddawano 4h inkubacji z medium TSB zawierającym 1% chlorek 2,3,5-trifenylo-2H-tetrazoliowy TTC (Sigma-Aldrich, Niemcy), który w obecności żywych, metabolicznie aktywnych drobnoustrojów ulega przekształceniu w czerwony formazan. Po zakończeniu inkubacji, dyski z wybarwionym biofilmem przenoszono do 1mL etanolu 99% (POCH Polska) i wytrząsano mechanicznie (wytrząsarka płytek Schuttiken, Niemcy) przez pół godziny. Po zakończeniu wytrząsania, supernatant zawierający czerwony formazan poddano ocenie spektrometrycznej przy długości fali 490nm. Układ doświadczalny zawierający 3 dyski agarowe pokryte biofilmem, na który nie nałożono opatrunku, służyły jako kontrola dodatnia wzrostu drobnoustrojów. Uzyskane wartości absorbancji przy długości fali 490nm dla biofilmu rosnącego w tym układzie doświadczalnym przyjmowano jako 100% i względem nich liczono redukcję biofilmu na skutek obecności opatrunków. Wszystkie pomiary przeprowadzono 3-krotnie, w sześciu powtórzeniach technicznych. Metodę wykonania testu A.D.A.M. Czytelnik znaleźć może zobrazowaną na **Rycinie 7.**

I. Utworzenie biofilmu na dysku agarowym



II. Analiza właściwości przeciwbiofilmowych opatrunku



Ryc.7. Schemat wykonania metody A.D.A.M.

4.9. Określenie aktywności przeciwbiofilmowej badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych za pomocą zmodyfikowanej metody Antimicrobial Dressing Activity Measurement

Szczepy poddane badaniu przesiano z odpowiednich podłoży stałych do bulionu TSB (VWR, Polska) i inkubowano przez 24h/37°C. Po upływie czasu inkubacji, zawiesiny rozcieńczono do 0,5McFarlanda, a następnie do 10⁵ cfu/mL za pomocą seryjnych rozcieńczeń w 0,9% roztworze NaCl.

Używając korkoboru o średnicy 8mm z agaru BHI wylanego do dołków płytki 24-dołkowej wycięto korek agarowy, który pocięto na 3, równej grubości, agarowe dyski, które przełożono do nowej płytki 24-dołkowej. Do studzienek płytki wprowadzono 1mL zawiesiny drobnoustrojów o gęstości 10⁵ cfu/mL i inkubowano przez 24h/37°C do czasu pokrycia dysków przez biofilm badanych patogenów. Obecność biofilmu na dyskach agarowych potwierdzano osobno za pomocą mikroskopii elektronowej oraz za pomocą techniki TTC. W odróżnieniu od metody A.D.A.M. gdzie używa się 3 dysków agarowych, w zmodyfikowanej metodzie A.D.A.M. użyto jednego dysku agarowego porośłego biofilmem, który wprowadzono do studzienki agarowej w dołku płytki 24-dołkowej. Pozostałą przestrzeń wypełniono płynnym podłożem imitującym sztuczny wysięk, którego bazę stanowił bulion tryptozowo-sojowy oraz 4,5% surowicza albumina wołowa (ang. BSA, bovine serum albumin). Dodatkowo, przeprowadzono badanie, w którym do wyżej opisanego medium wprowadzono glukozę w stężeniu 32mg/dL. Na górę studzienki agarowej nałożono celulozowe opatrunki zawierające substancje przeciwdrobnoustrojowe (grupa badana) oraz celulozowe opatrunki niewysyczone antyseptykiem/antybiotykiem (kontrola doświadczenia). Układ doświadczalny inkubowano 24h/37°C. Następnie, opatrunki ściągano, a dyski poddawano 4h inkubacji z medium TSB zawierającym 1% chlorek 2,3,5-trifenylo-2H-tetrazoliowy TTC (Sigma-Aldrich, Niemcy), który w obecności żywych, metabolicznie aktywnych drobnoustrojów ulega przekształceniu w czerwony formazan. Po zakończeniu inkubacji, dyski z wybarwionym biofilmem przenoszono

do 1mL etanolu 99% (POCH Polska) i wytrząsano mechanicznie (wytrząsarka płytek Schuttiken, Niemcy) przez pół godziny. Po zakończeniu wytrząsania, supernatant zawierający czerwony formazan poddano ocenie spektrometrycznej przy długości fali 490nm. Układ doświadczalny zawierający 3 dyski agarowe pokryte biofilmem, na który nie nałożono opatrunku, służyły jako kontrola dodatnia wzrostu drobnoustrojów. Uzyskane wartości absorbancji przy długości fali 490nm dla biofilmu rosnącego w tym układzie doświadczalnym przyjmowano jako 100% i względem nich liczone redukcję biofilmu na skutek obecności opatrunków. Wszystkie pomiary przeprowadzono 3-krotnie, w sześciu powtórzeniach technicznych.

4.10. Wizualizacja biofilmu tworzonego przez badane drobnoustroje za pomocą Skaningowej Mikroskopii Elektronowej

Dyski celulozowe wytworzone tak jak to opisano w sekcji 3.3. umieszczono w 2% aldehydzie glutarowym i inkubowano przez 4h w temp. 4°C. Po inkubacji przepłukano preparaty wodą (3 razy po 2 min) i przeprowadzono przez szereg rosnących stężeń etanolu (2 razy po 10 min w 10%, 1 raz po 10 min w: 25%, 50%, 70%, 80%, 90% oraz 2 razy po 15 min w 100%). Następnie preparaty suszono w temperaturze 37°C.

W przypadku badanych szczepów patogennych, jako powierzchnię wzrostową dla biofilmu zastosowano koliste inserty polistyrenowe o grubości 2mm i średnicy 14,9mm wytworzone za pomocą korkoboru o średnicy 15mm z wieczek płytek polistyrenowych. Inserty poddano dezynfekcji w środku powierzchniowo czynnym, następnie pod komorą laminarną poddano płukaniu w jałowej wodzie i pozostawiono do wyschnięcia w komorze laminarnej. Następnie, inserty poddano sterylizacji za pomocą lampy UV (2x15 min.) W przypadku każdej serii, 10% insertów wprowadzano do podłoża płynnego do hodowli drobnoustrojów beztlenowych (podłoże tioglikolanowe) oraz do bogatego odżywczo podłoża BHI (bulion mózgowo-sercowy, brain-heart infusion medium). Inserty inkubowano przez 7 dni w 37°C. Brak zmętnienia w próbkach po tym okresie świadczył o jałowości insertów.

Tak przygotowane inserty wprowadzano na dno studzienki płytki 24-dołkowej, którą uzupełniano następnie 2mL zawiesiny zawierającej 10^5 cfu/mL. Płytkę wraz z insertami inkubowano w $37^\circ\text{C}/24\text{h}$, następnie insert wyciągano aseptycznie, delikatnie przepłukiwano 0.9% roztworem chlorku sodu w celu usunięcia niezadherowanych komórek i poddawano dehydratacji tak jak to opisano względem dysków celulozowych.

Próbki (dyski celulozowe, inserty zawierające biofilm patogenów, dyski agarowe zawierające biofilm) poddawano napyleniu z użyciem napyłarki Quorum mieszaniną Au/Pd. Biofilm wizualizowano za pomocą mikroskopu elektronowego Zeiss Evo MA 25.

4.11. Ocena cytotoksyczności substancji przeciwdrobnoustrojowych uwolnionych z nośnika względem linii fibroblastów L929

100 μl komórek fibroblastów L929 pochodzących z hodowli referencyjnej ATCC o gęstości 1×10^6 komórek/1 ml wysiano na płytkę 96 dołkową. Komórki inkubowano w $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2/24\text{h}$ (do osiągnięcia kofluencji). Po upływie czasu inkubacji, z dołków usunięto medium (MEM) i wprowadzono 100 μl ekstraktów pochodzących z opatrunków BC wysyconych substancjami przeciwdrobnoustrojowymi, a uzyskanymi według normy ISO 10993: Biological evaluation of medical devices; Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity; Part 12: Biological evaluation of medical devices, sample preparation and reference materials (ISO 10993-5:2009 and ISO/IEC 17025:2005). Po 24 godzinach inkubacji, płynne medium zawierające ekstrakty usunięto, a do studzienek dołków wprowadzono świeże medium. Następnie, przeprowadzono test żywotności komórek za pomocą 0,2 ml MTT o stężeniu 0,5 mg/ml. Płytkę inkubowano przez 3h. Po upływie tego czasu z dołków usunięto MTT i dodano 0,1ml dimetylosulfotlenku (DMSO) w celu rozpuszczenia kryształków formazanu powstałych na skutek włączenia MTT do systemu dehydrogenazy bursztynianowej. System ten, należący do mitochondrialnego łańcucha oddechowego, aktywny jest tylko w żywych komórkach. Mitochondrialna dehydrogenaza redukuje żółtą sól tetrazolową do rozpuszczalnego, fioletowego formazanu. Po rozpuszczeniu

kryształków w dimetylosulfotlenku (DMSO Sigma-Aldrich),, dokonano pomiaru absorbancji w czytniku płytek, przy długości fali 540nm i użyciu filtra referencyjnego. 690nm (Infinite, Tecan). Kontrolę wzrostu stanowiły komórki ATCC L929, które zamiast antyseptykiem, traktowano w czasie kontaktowym, jałowym, fizjologicznym stężeniem roztworu fosforanowego (PBS, Sigma-Aldrich). Dodatkową kontrolę stanowiły badane substancje antyseptyczne w stężeniach wynoszących 50% roztworu roboczego. Pomiary wykonano w 6 powtórzeniach.

4.12. Analiza statystyczna

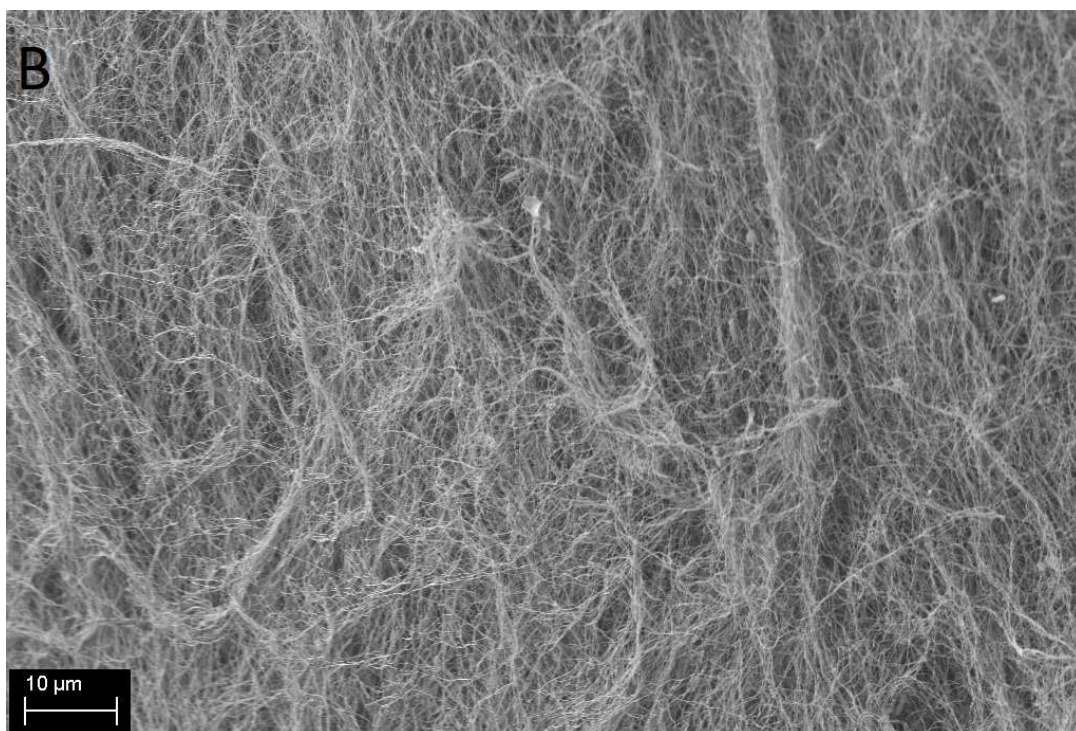
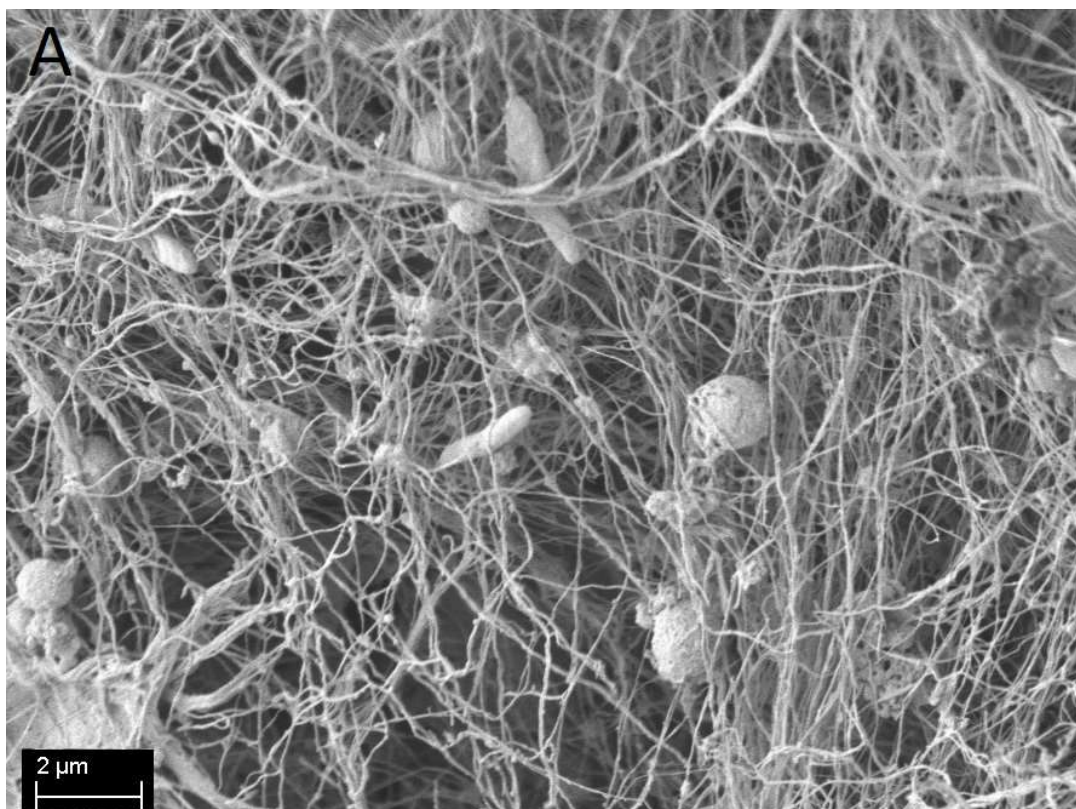
Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą oprogramowania GraphPad Prism, wersja 7. Normalność rozkładu obliczono za pomocą testu D'Agostino-Pearson. Ponieważ uzyskane wartości nie rozkładały się normalnie, zastosowano test Kruskala-Walisa z analizą post-hoc Dunneta. Wyniki uznawano za istotne przy wartości $p < 0,5$.

5. Wyniki

Do celów eksperymentalnych wytworzono dyski celulozowe o średnicy wynoszącej 18mm, poddano oczyszczeniu [Zdj.2] i wykorzystano w badaniach opisanych w dalszej części manuskryptu. Następnie wykonano obrazowanie za pomocą mikroskopii elektronowej w celu wykazania skuteczności oczyszczenia nośnika z komórek *K.xylinus* i zwizualizowania przestrzennej, siateczkowej budowy prototypowego opatrunku celulozowego [Zdj.3.]

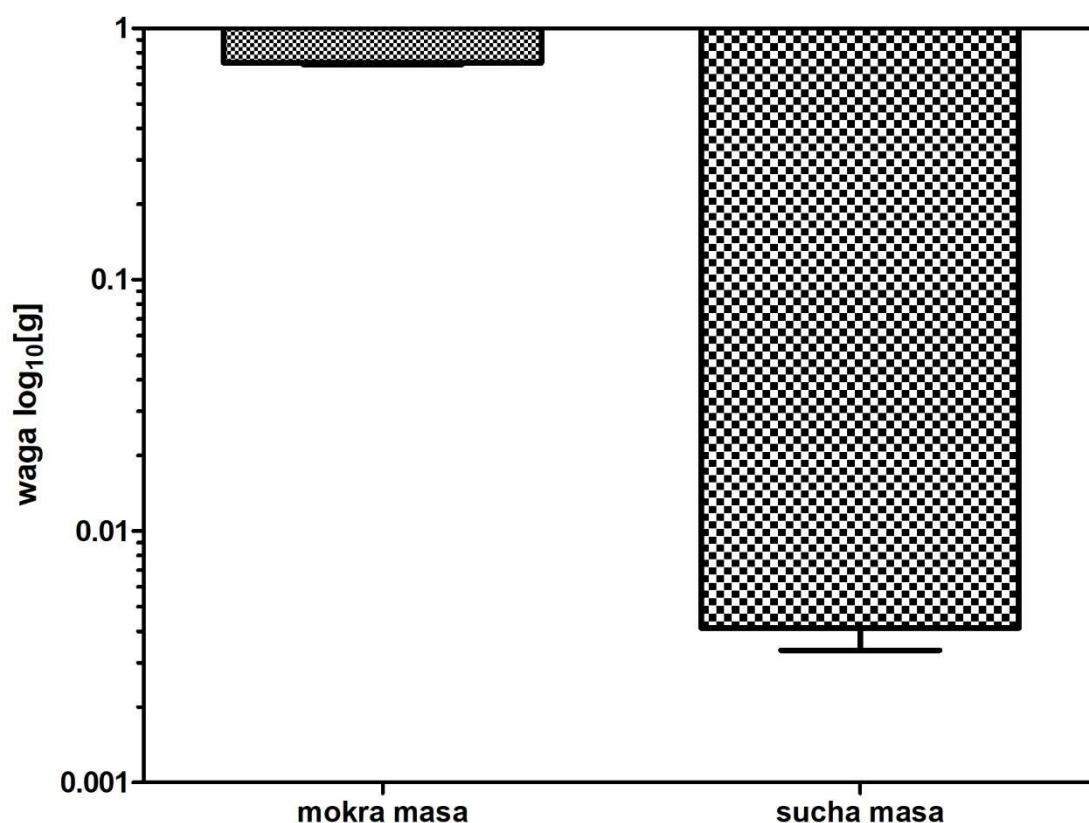


Zdj.2. Dyski celulozowe, oczyszczone z medium HS i komórek *K.xylinus* wykorzystywane w dalszych badaniach. Lewa część zdjęcia przedstawia dyski BC o średnicy 18mm, prawa część zdjęcia to dysk BC o średnicy 24mm przedstawiony dla lepszej wizualizacji takich cech bakteryjnej celulozy jak przejrzystość, wilgotność i elastyczność.



Zdj.3. Mikrostruktura bakteryjnej celulozy; **A** – natywna bioceluloza zawierająca w swoim składzie nieczystości pochodzące oraz komórki *K.xylinus*; **B** – nośnik celulozowy po oczyszczeniu i przepłukaniu, wolny od zanieczyszczeń i komórek bakteryjnych. Magn.1000x i 1500; A,B, odpowiednio. Mikroskop Elektronowy Zeiss EVO MA25.

Po wytworzeniu nośnika BC dokonano jego charakterystyki, której pierwszy etap polegał na określeniu suchej i mokrej masy (wagi) oczyszczonej, 7-dniowej bakteryjnej celulozy. Wyniki wykazujące wysokie uwodnienie celulozy natywnej, a co za tym idzie niemal 1000x wyższą jej wagę w porównaniu do celulozy suchej, przedstawiono na **Wykresie 1**.

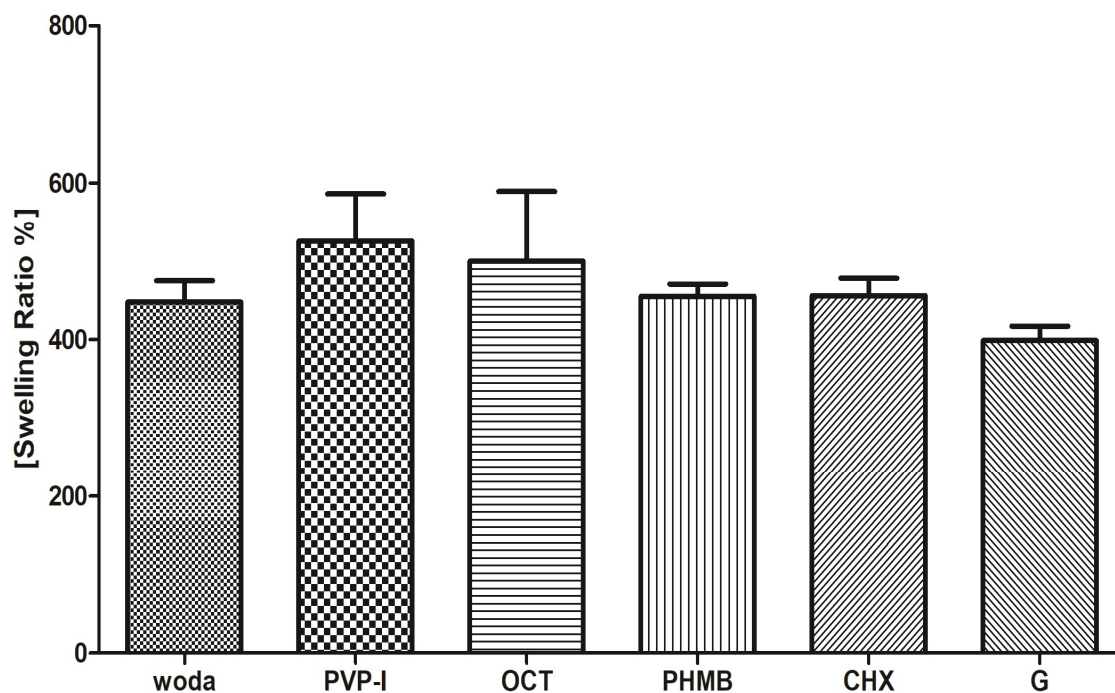


Wyk.1. Porównanie masy mokrej i suchej celulozy bakteryjnej stosowanej w badaniach. Dla przejrzystości wykresu, do zobrazowania różnic w masie wykorzystano skalę logarymiczną (logarytm dziesiętny).

Następnie, przeprowadzono ocenę szybkości pochłaniania wody oraz badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych przez stworzony nośnik BC [**Wyk.2.**]. Uzyskane wyniki wskazują na wyższą szybkość pochłaniania wszystkich badanych roztworów zawierających substancje o aktywności przeciwdrobnoustrojowych z wyjątkiem roztworu gentamycyny. Wzmiankowany

trend, jakkolwiek wyraźny i powtarzalny, nie cechował się istotnością statystyczną (K-W test, post-hoc Dunnet's analysis, $p > 0.5$).

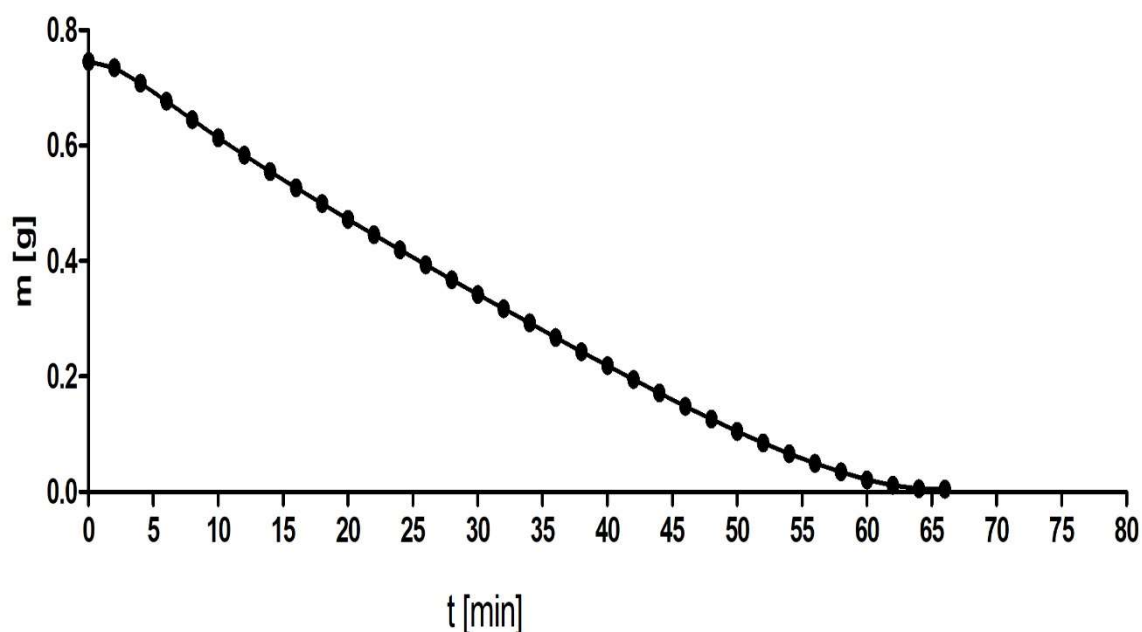
Kolejnym etapem charakterystyki nośnika z bakteryjnej celulozy było określenie jego zdolności do utrzymania wody. Wyniki określające wartości parametru WHC (ang. water-holding capacity) przedstawiono na **Wyk.3**.



Wyk.2. Porównanie szybkości absorpcji płynów przez nośnik celulozowy. PVP-I: roztwór powidonu jodu, OCT – roztwór zawierający dichlorowodorek oktenidyny, PHMB – roztwór zawierający poliheksanidynę, CHX – roztwór octanu chlorheksydy; G – roztwór siarczanu gentamycyny.

Wykazano, że nośnik celulozowy, wykorzystywany w kolejnych etapach badań eksperymentalnych wykazuje się wysoką zdolnością do utrzymania wody. Do całkowitego oddania wody przez prototypowy opatrunek BC dochodziło po 65min suszenia opisanego w części 4.4.2. manuskryptu, połowa objętości wody została oddana przez nośnik z celulozy po około 35 minut od rozpoczęcia inkubacji. Co więcej, proces oddawania wody przebiegał

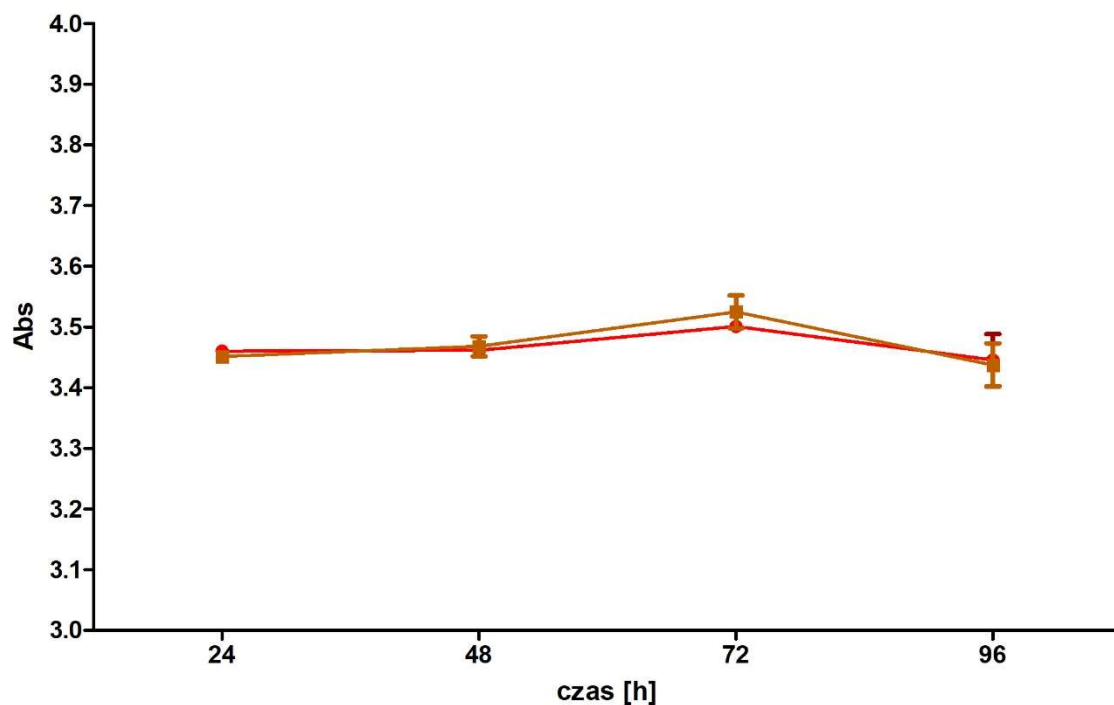
stopniowo, a nie skokowo, co znaczy że zbliżone objętości wody oddawane były przez nośnik w tych samych interwałach czasowych – od momentu rozpoczęcia procedury inkubacji do jej zakończenia.



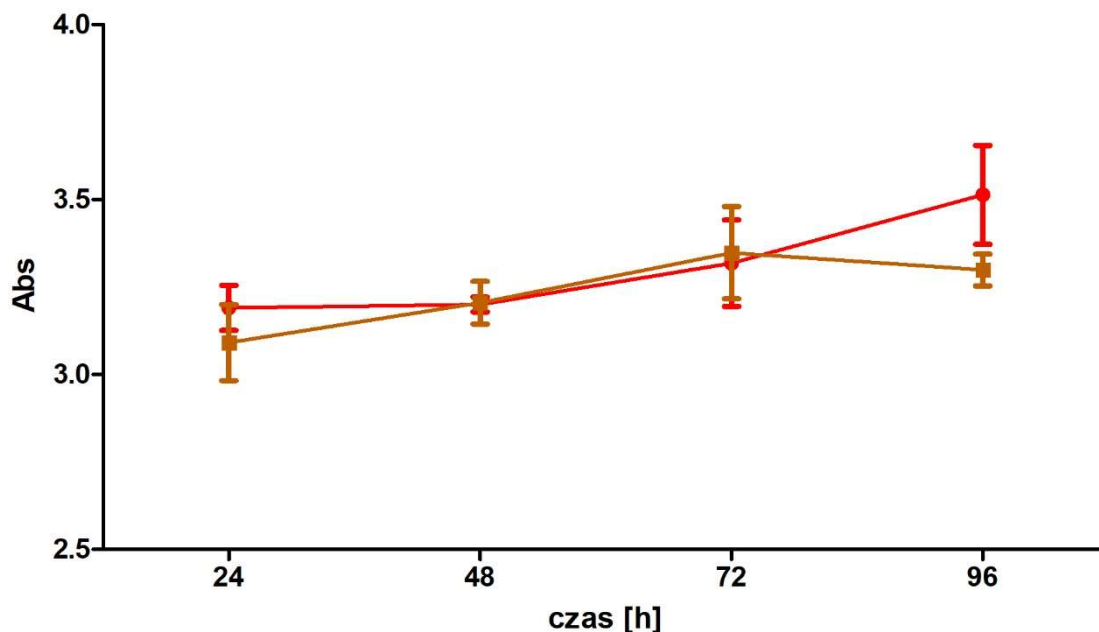
Wyk.3. Określenie wartości parametru zdolności do utrzymania wody przez nośnik celulozowy.

Po określeniu wartości parametrów nośnika celulozowego związanych z jego zdolnością absorpcji i uwalniania wody, określono stopień impregnacji badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych w BC. Badanie opisane w części 4.4.3. manuskryptu wykonywano w 24-godzinnych interwałach czasowych przez okres 96 godzin, przy czym określano za pomocą czytnika absorbancji w sposób półilościowy stężenie związków przeciwdrobnoustrojowych, które zostały zaimpregnowane w nośniku celulozowym w określonym punkcie czasowym oraz stężenie związków przeciwdrobnoustrojowych pozostałych w roztworze impregnacyjnym.

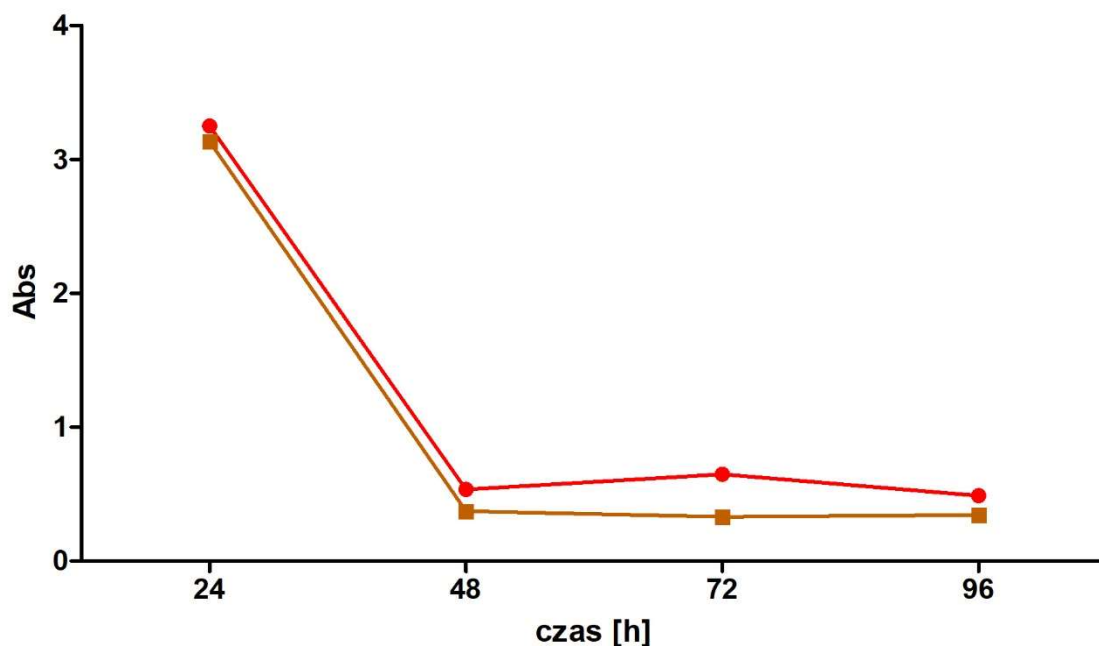
Wykresy przedstawiające obie te wartości w poszczególnych dobach procesu impregnacji przedstawiono na **Wykresach 4-8**.



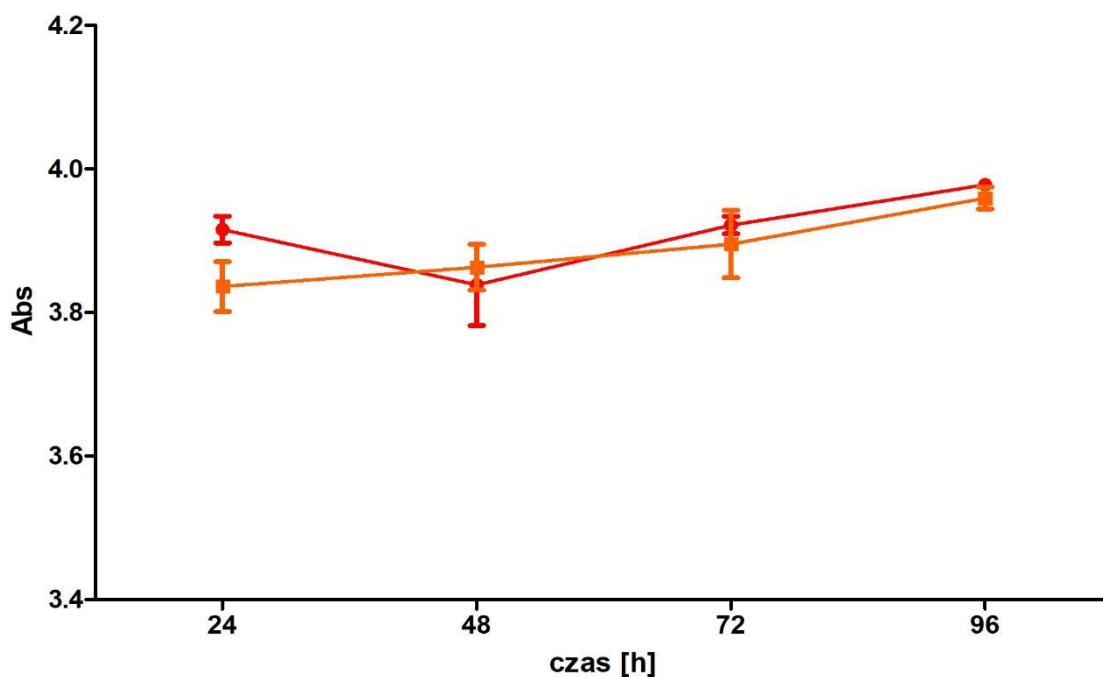
Wyk.4. Zawartość związku przeciwdrobnoustrojowego zawierającego dichlorowodorek oktenidyny w nośniku celulozowym oraz w roztworze impregnacyjnym. Pomiar przeprowadzono w kolejnych dobach impregnacji [24-96h]. **Kolor brązowy** – zawartość OCT w nośniku; **kolor czerwony** – zawartość OCT w roztworze impregnacyjnym. **Abs=270nm**.



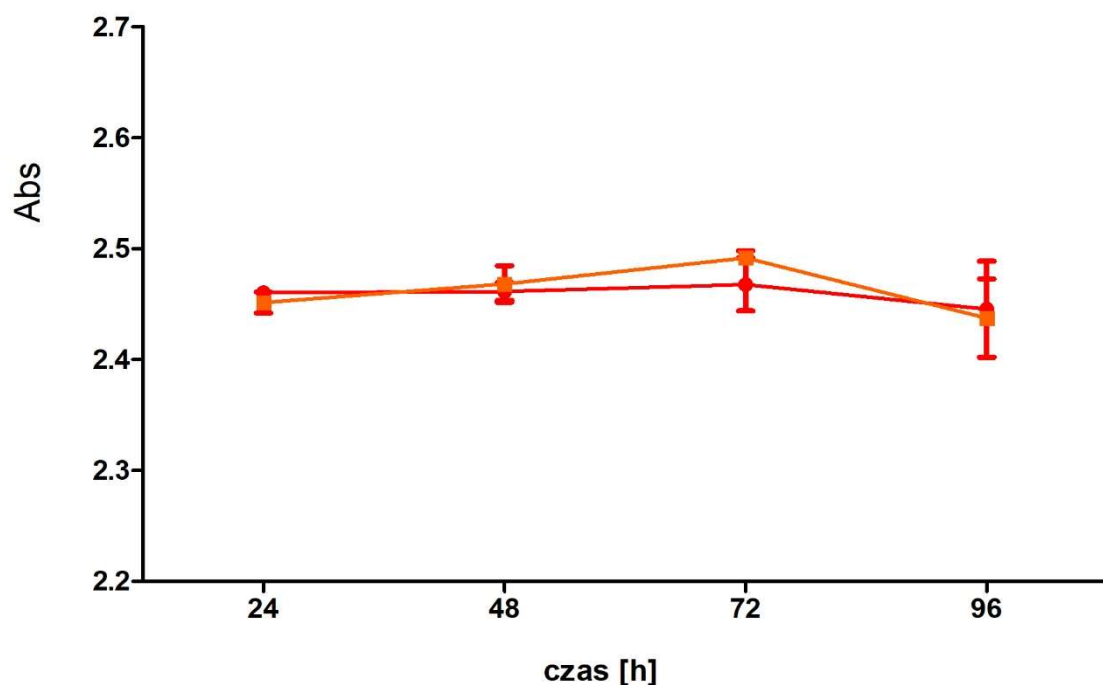
Wyk.5. Zawartość związku przeciwdrobnoustrojowego zawierającego powidon jodu w nośniku celulozowym oraz w roztworze impregnacyjnym. Pomiar przeprowadzono w kolejnych dobach impregnacji [24-96h]. Kolor brązowy – zawartość PVP-I w nośniku BC; kolor czerwony – zawartość PVP-I w roztworze impregnacyjnym. Abs=230nm



Wyk.6. Zawartość związku przeciwdrobnoustrojowego zawierającego chlorheksydynę w nośniku celulozowym oraz w roztworze impregnacyjnym. Pomiar przeprowadzono w kolejnych dobach impregnacji [24-96h]. Kolor brązowy – zawartość CHX w nośniku BC; kolor czerwony – zawartość CHX w roztworze impregnacyjnym. Abs=230nm.



Wyk.7. Zawartość związku przeciwdrobnoustrojowego zawierającego poliheksanidynę w nośniku celulozowym oraz w roztworze impregnacyjnym. Pomiar przeprowadzono w kolejnych dobach impregnacji [24-96h]. Kolor brązowy – zawartość PHMB w nośniku BC; kolor czerwony – zawartość PHMB w roztworze impregnacyjnym. Abs=230nm.



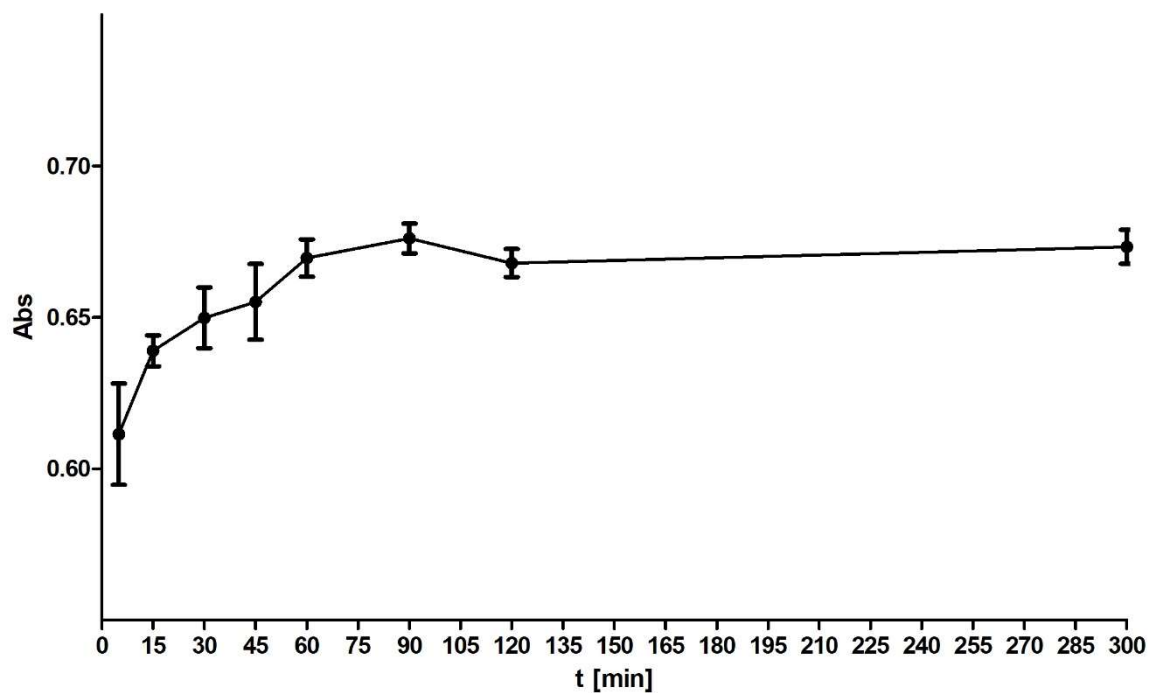
Wyk.8. Zawartość związku przeciwdrobnoustrojowego zawierającego siarczan gentamycyny w nośniku celulozowym oraz w roztworze impregnacyjnym. Pomiar przeprowadzono w kolejnych dobach impregnacji [24-96h]. Kolor brązowy – zawartość G w nośniku BC; kolor czerwony – zawartość G w roztworze impregnacyjnym. Abs – absorbanca przy długości fali=230nm.

Wykazano, że OCT, PHMB oraz G wchłaniają się do bakteryjnej celulozy przede wszystkim w czasie pierwszych 24 godzin od rozpoczęcia procesu impregnacji.

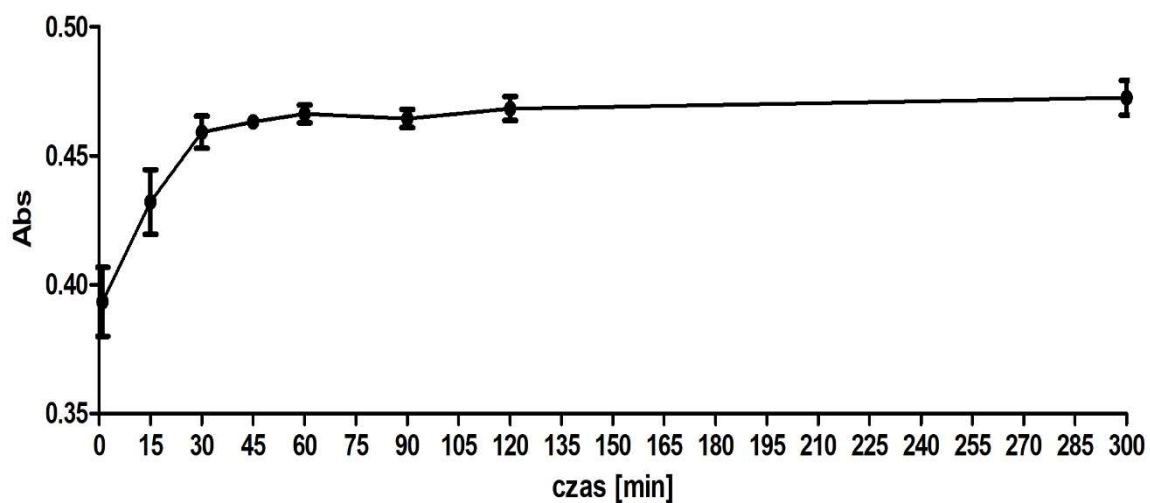
Z kolei PVP-I wchłaniał się do celulozowego nośnika w sposób przyrostowy w czasie pierwszych 72 godzin, plateau wysycenia nośnik impregnowany tą substancją przeciwdrobnoustrojową osiągał w 96 dobie od rozpoczęcia procesu.

Z kolei w przypadku CHX, w godzinie 48 procesu impregnacji, zaobserwowano znaczący i powtarzalny spadek stężenia tego antyseptyku – zarówno w nośniku celulozowym jak i w roztworze impregnacyjnym. W kolejnych godzinach impregnacji (72-96h) nie obserwowano już istotnej zmiany w stężeniu (w znaczeniu jego spadku lub wzrostu) CHX.

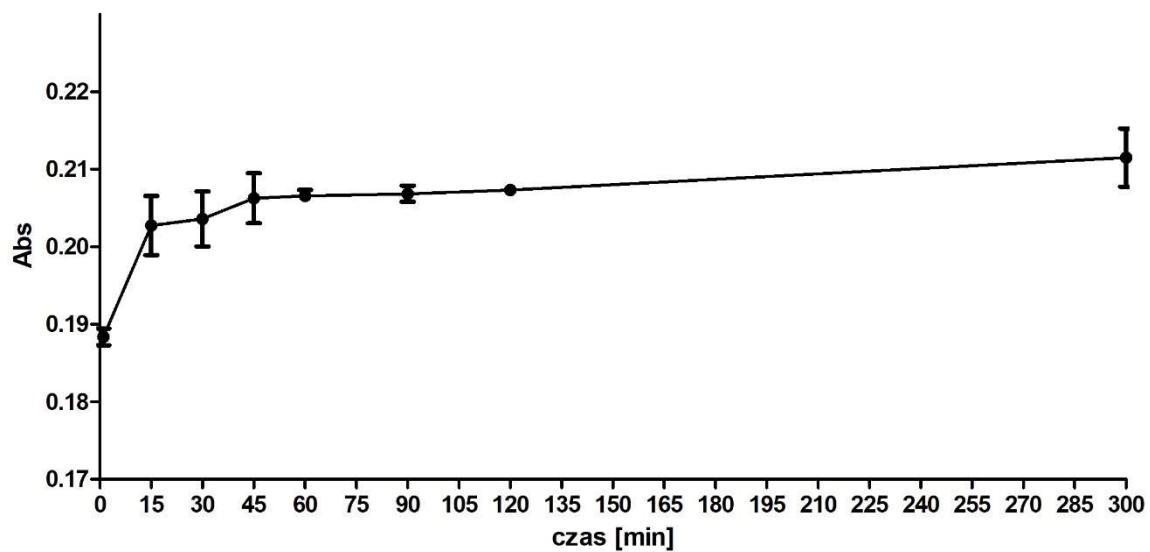
Oszacowawszy stężenie substancji przeciwdrobnoustrojowych w nośniku celulozowym przystąpiono do oceny uwalniania się związków przeciwdrobnoustrojowych z BC. Wyniki analiz przedstawione zostały na **Wykresach 9-13**.



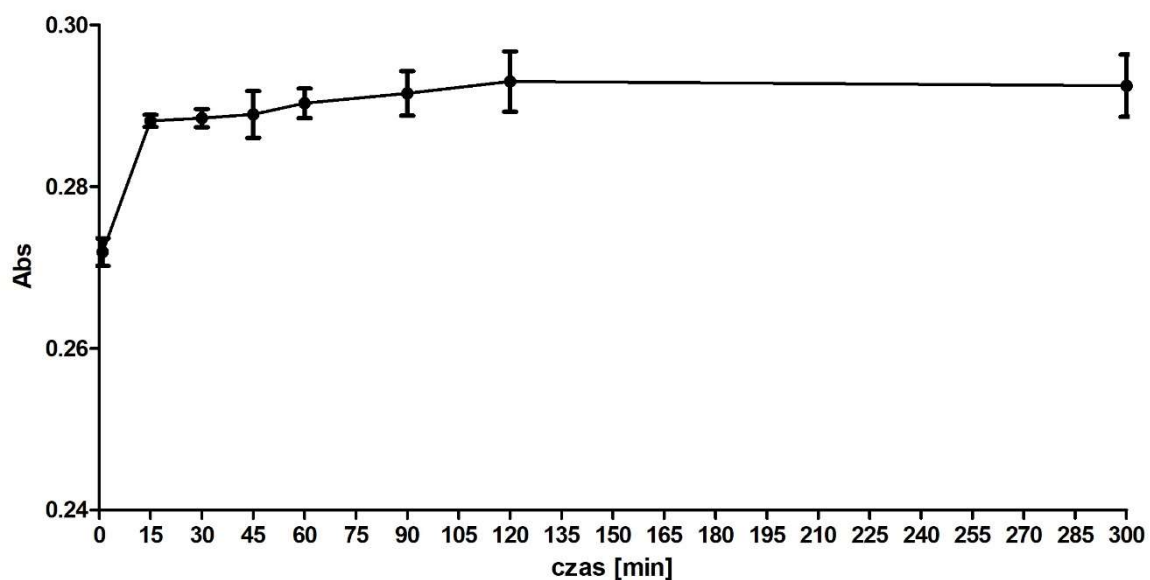
Wyk.9. Uwalnianie OCT z nośnika biocelulozowego w czasie. Abs=długość fali wynosząca 270nm.



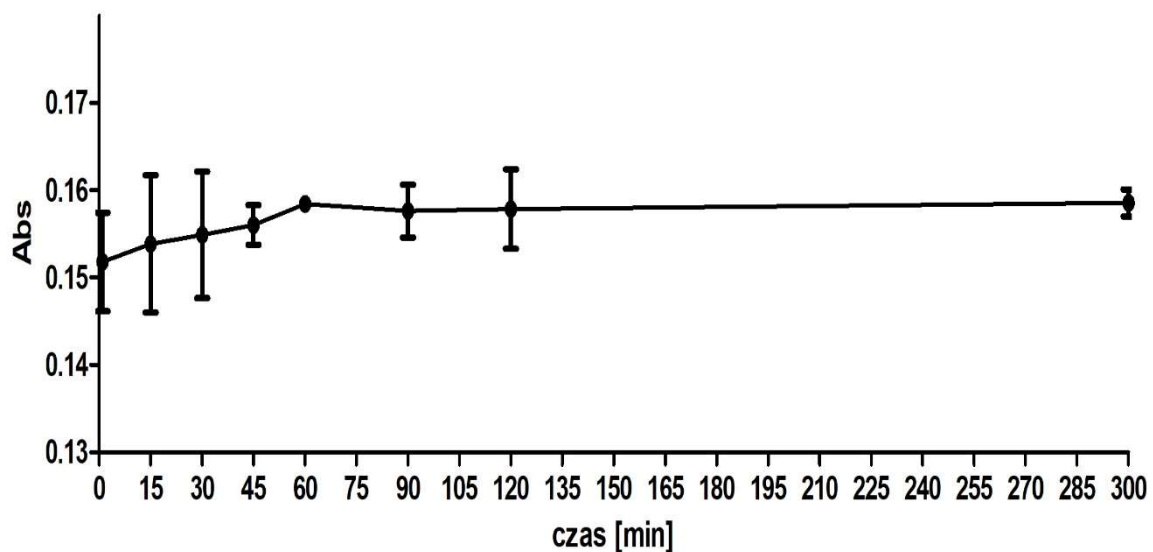
Wyk.10. Uwalnianie PVP-I z nośnika biocelulozowego w czasie. Abs=długość fali wynosząca 230nm.



Wyk.11. Uwalnianie CHX z nośnika biocelulozowego w czasie. Abs= długość fali wynosząca 230nm.



Wyk.12. Uwalnianie PHMB z nośnika biocelulozowego w czasie. Abs= długość fali wynosząca 230nm.

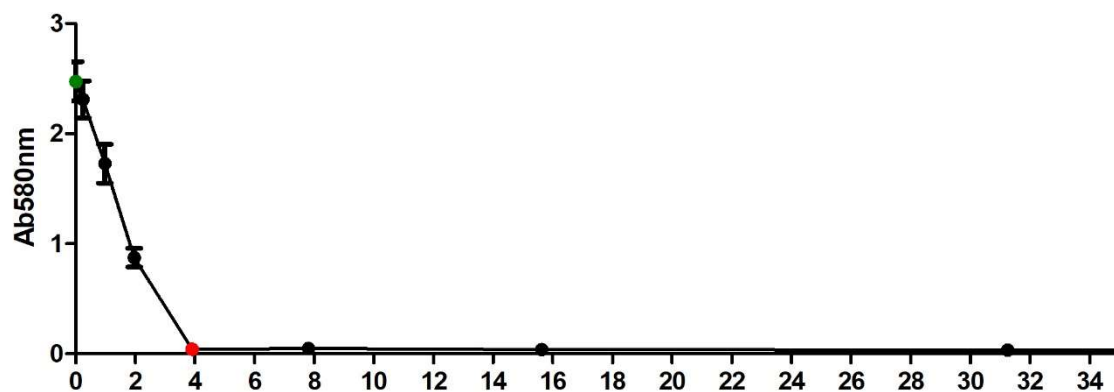


Wyk.13. Uwalnianie gentamycyny z nośnika biocelulozowego w czasie. Abs=długość fali wynosząca 230nm.

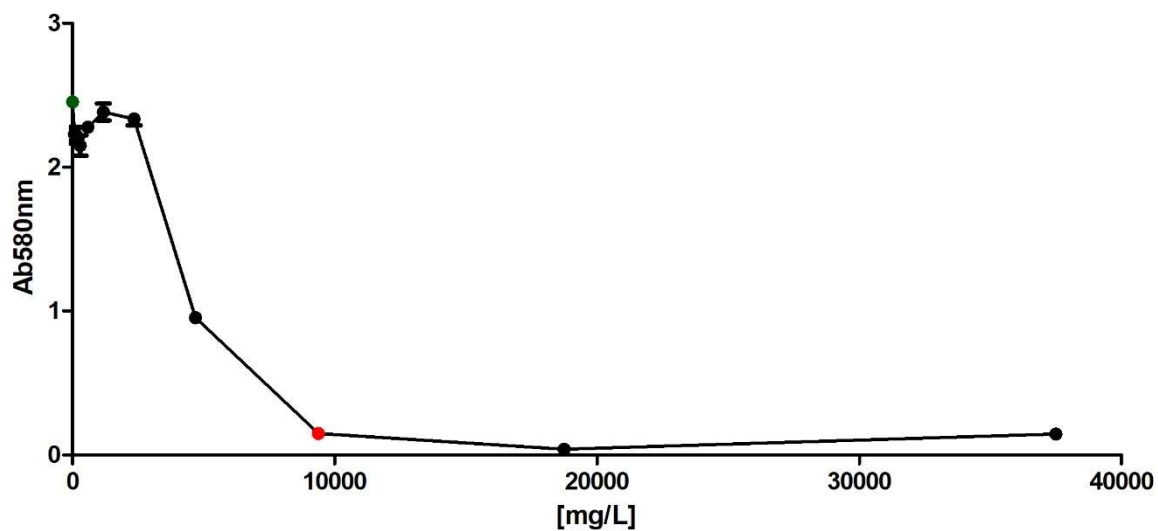
Wyniki przedstawione na **Wykresach 9 - 13** wykazują, że poszczególne substancje przeciwdrobnoustrojowe cechują się zróżnicowaną szybkością uwalniania się z nośnika celulozowego. Do najszybszej wymiany związków przeciwdrobnoustrojowych z nośnika a wodą dochodziło między czasem 0 a 90 min., przy czym prototypowy opatrunek celulozowy najgwałtowniej opuszczała PHMB (około 15min), CHX i PVP-I (około 45min.), G (około 60min.), a następnie OCT (około 90min.)

Określiwszy właściwości fizyczne nośnika celulozowego oraz jego zdolność do absorpcji i uwalniania poszczególnych substancji przeciwdrobnoustrojowych, przystąpiono do kolejnego etapu badania czyli oceny skuteczności wytworzonych prototypowych, aktywnych przeciwdrobnoustrojowo opatrunków celulozowych względem biofilmu tworzonego przez drobnoustroje z gatunku *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterococcus faecalis*. Wyniki przedstawiono na Wykresach **14-17**.

A

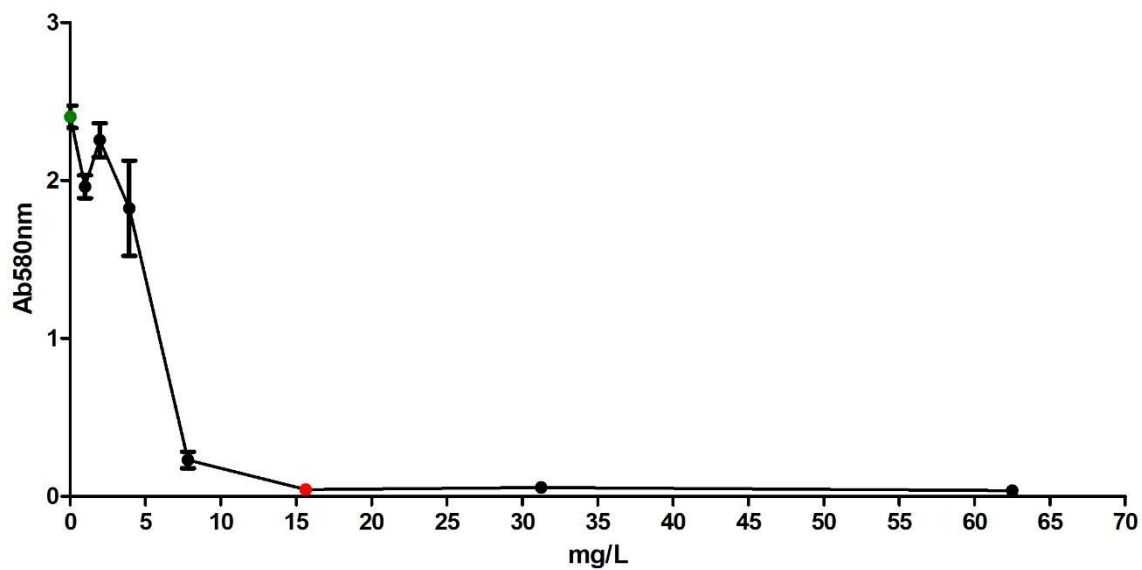


B.

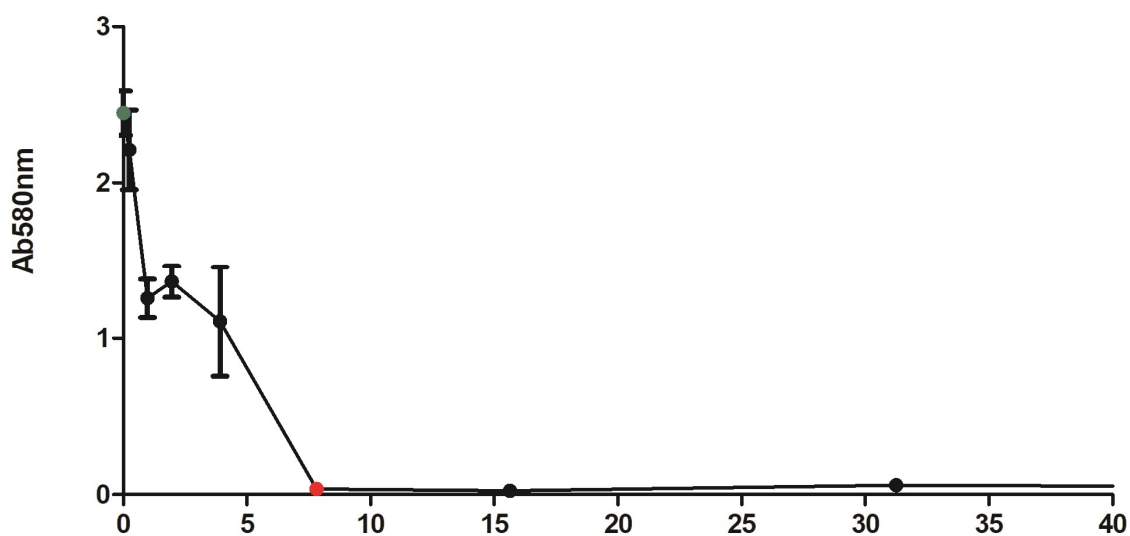


Wyk.14A-B Minimalne Stężenie Hamujące [A] OCT i [B] PVP-I względem komórek planktonicznych *S.aureus* 6538. **Kolor zielony** – wartość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina niektraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia hamującego.

C.

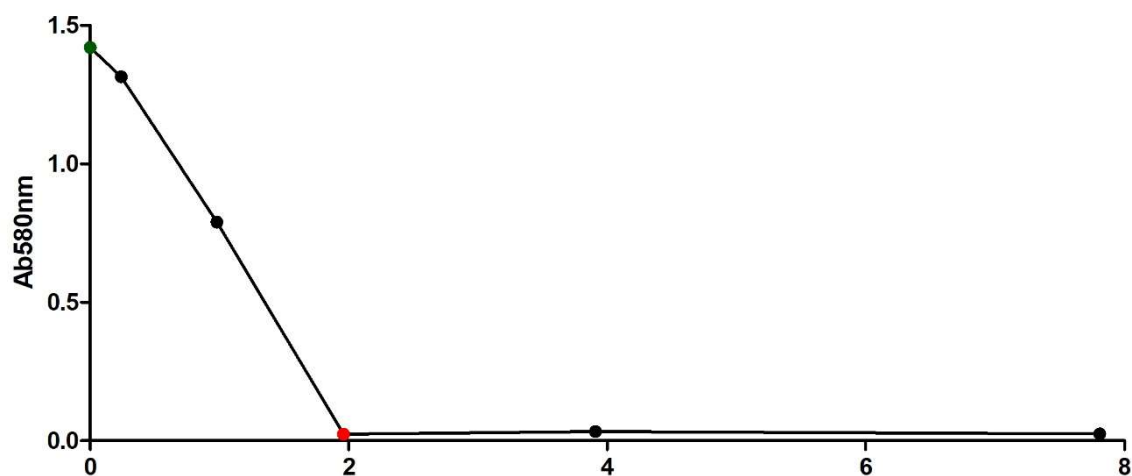


D.



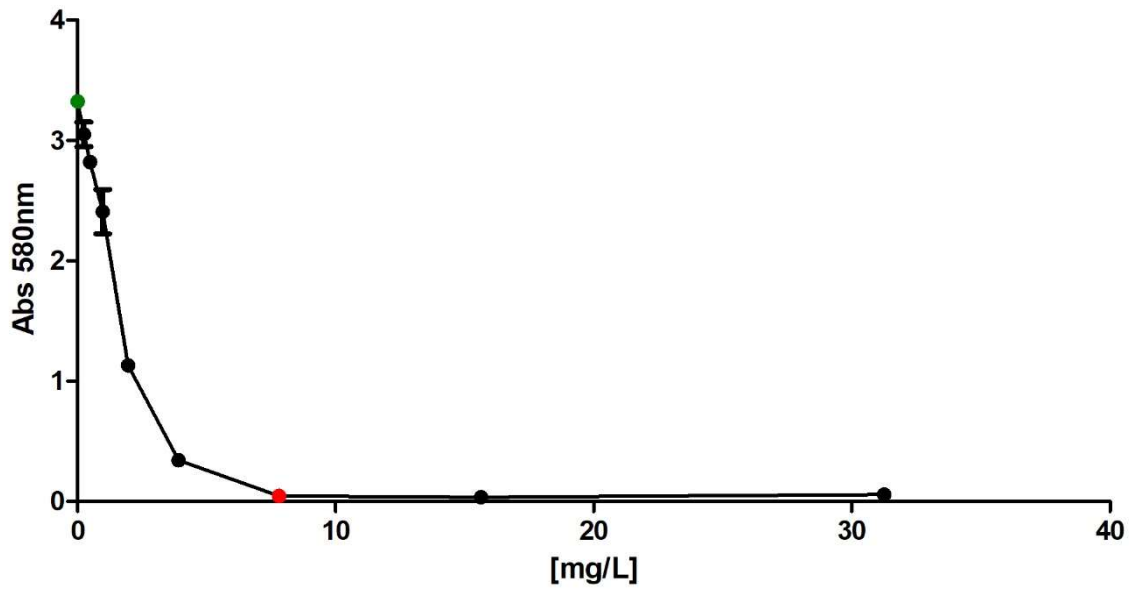
Wyk.14C-D Minimalne Stężenie Hamujące [C] CHX i [D] PHMB względem komórek planktonicznych *S.aureus* 6538. **Kolor zielony** – wartość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia hamującego.

E.

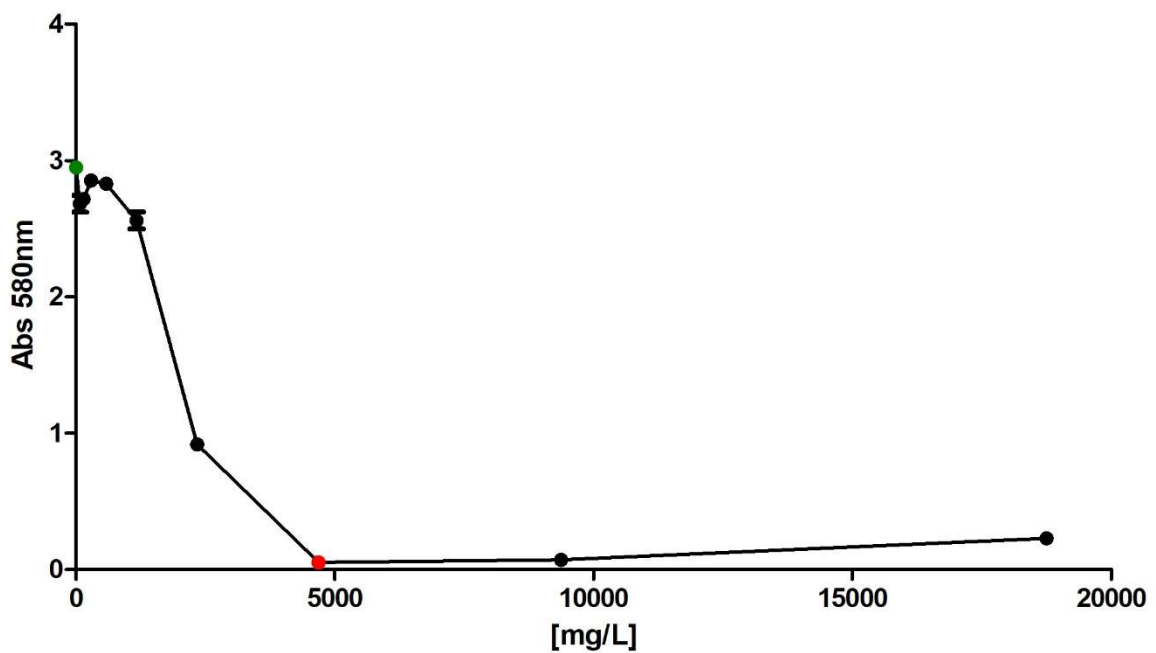


Wyk.14E Minimalne Stężenie Hamujące Gentamycyny względem komórek planktonicznych *S.aureus* 6538. **Kolor zielony** – wartość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia hamującego.

F

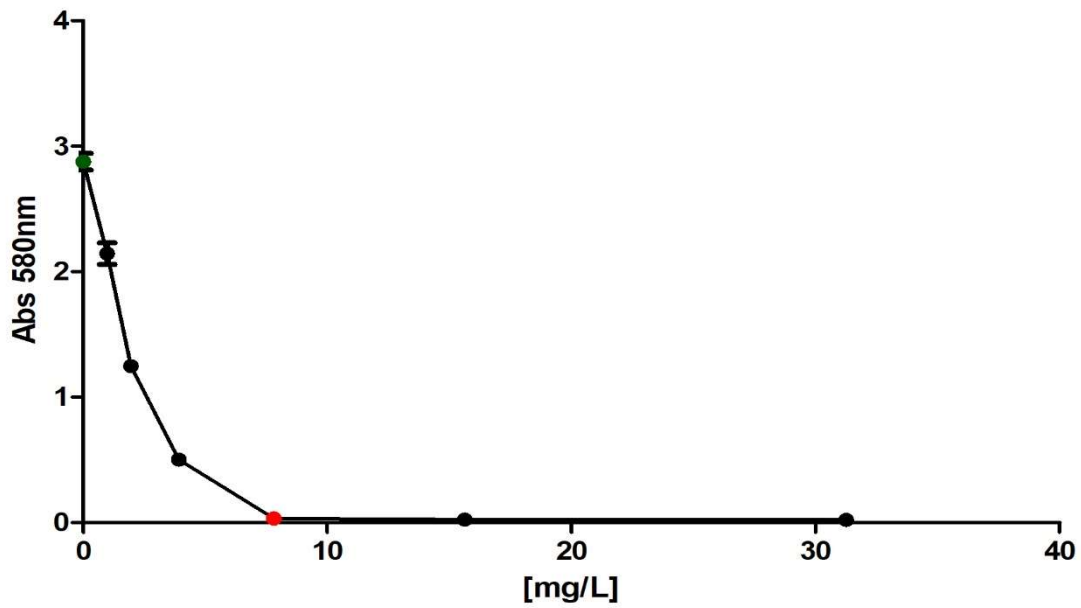


G

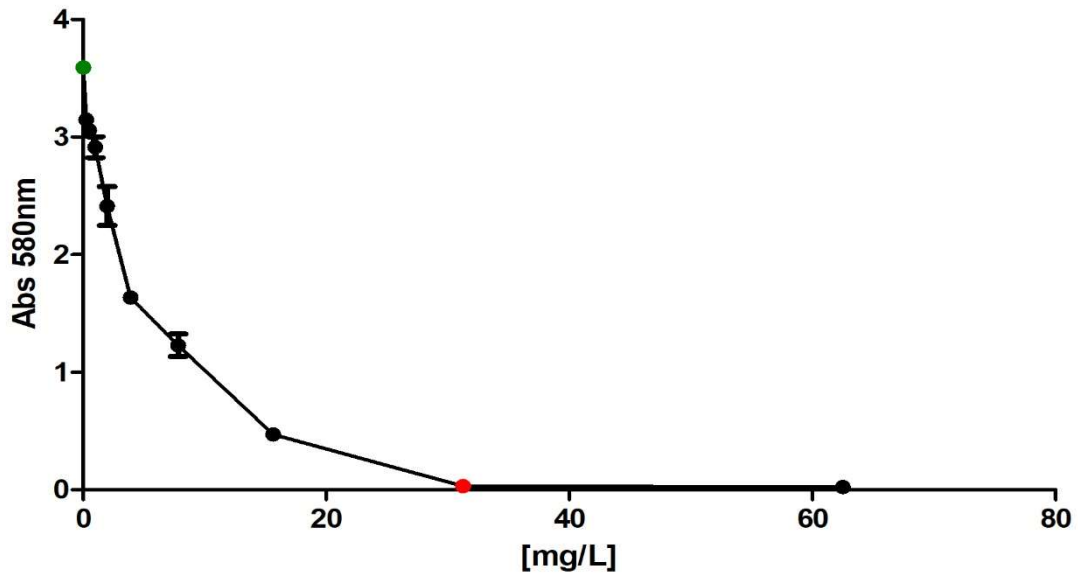


Wyk.14F-G. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm [F] OCT i [G] PVP-I względem biofilmu *S.aureus* 6538. **Kolor zielony** – wartość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia eradykującego biofilm.

H

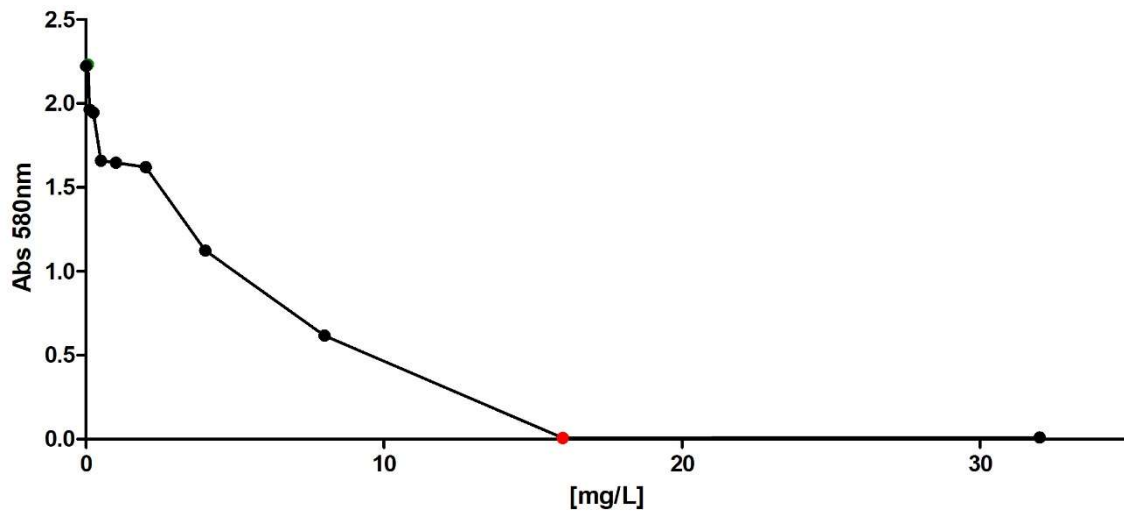


I



Wyk.14H-I. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm [H] CHX i [I] PHMB względem biofilmu *S.aureus* 6538. **Kolor zielony** – wartość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia eradykującego biofilm.

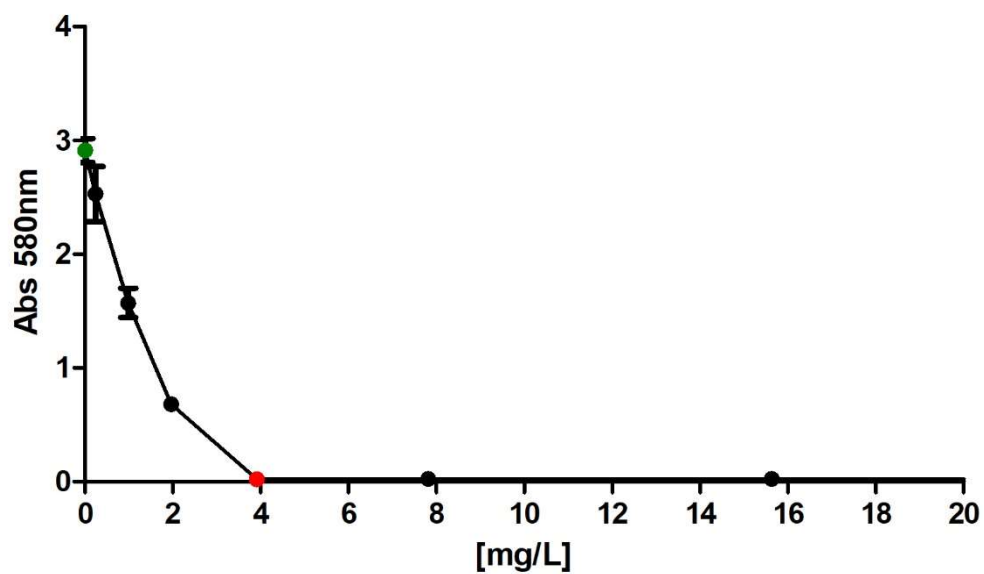
J



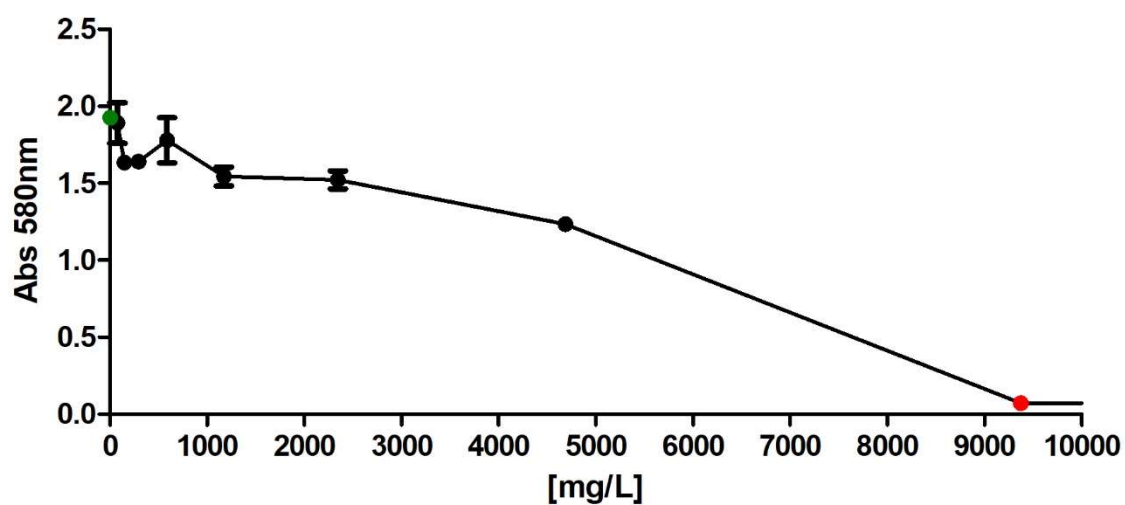
Wyk.14J. Minimalne Stężenie Eradykujące gentamycyny względem biofilmu *S.aureus* 6538.

Kolor zielony – **wartość absorbancji** dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia eradykującego biofilm.

A

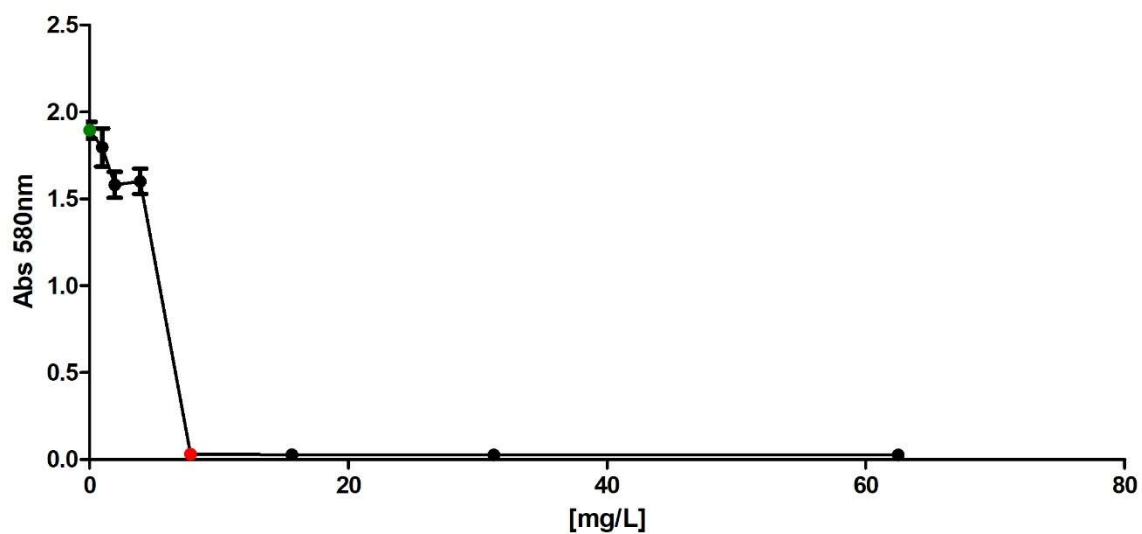


B

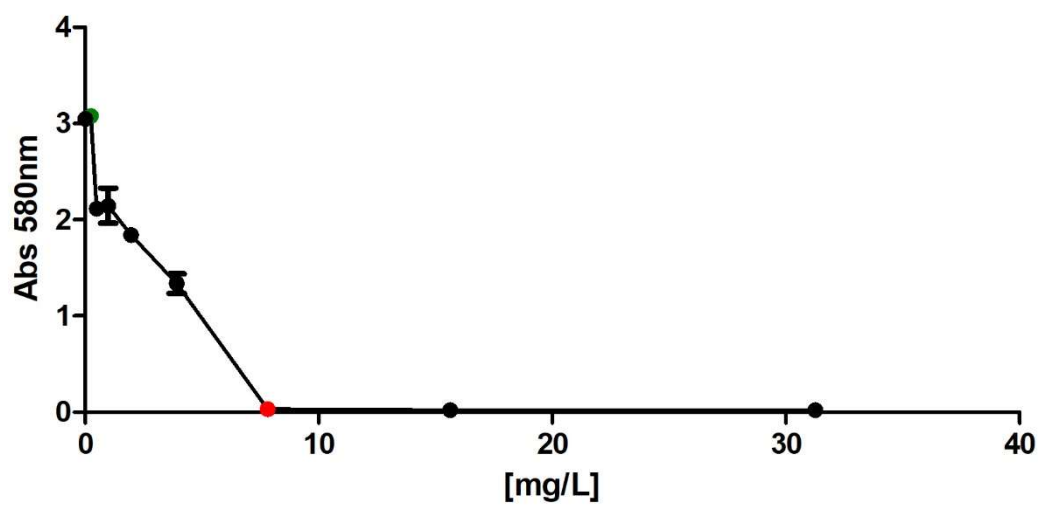


Wyk.15A-B Minimalne Stężenie Hamujące [A] OCT i [B] PVP-I względem komórek planktonicznych *S.aureus* 33591. **Kolor zielony** – wielkość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia hamującego.

C

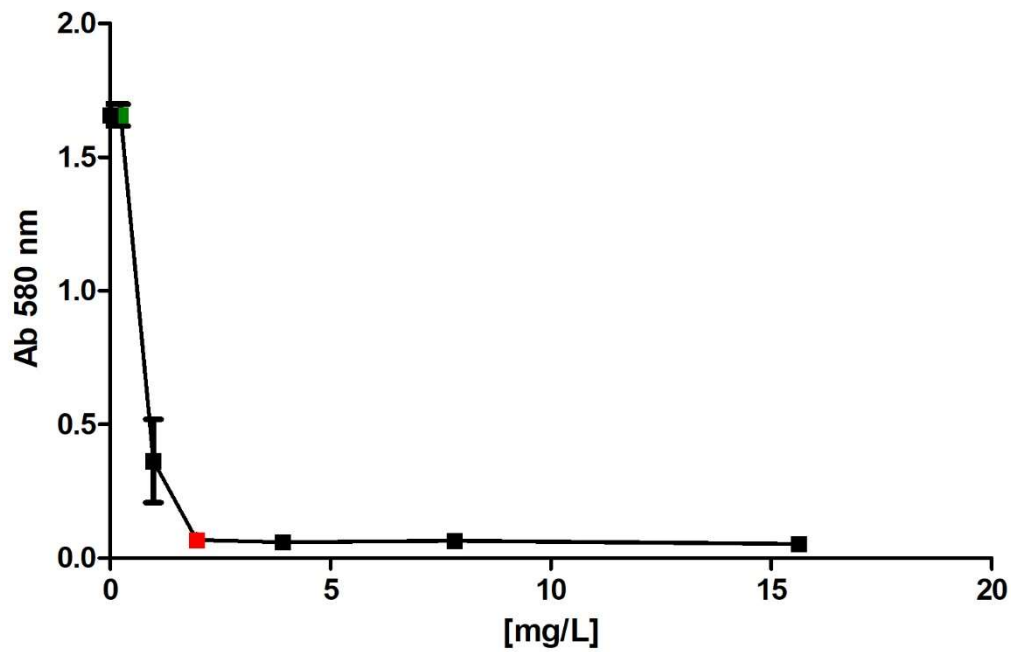


D



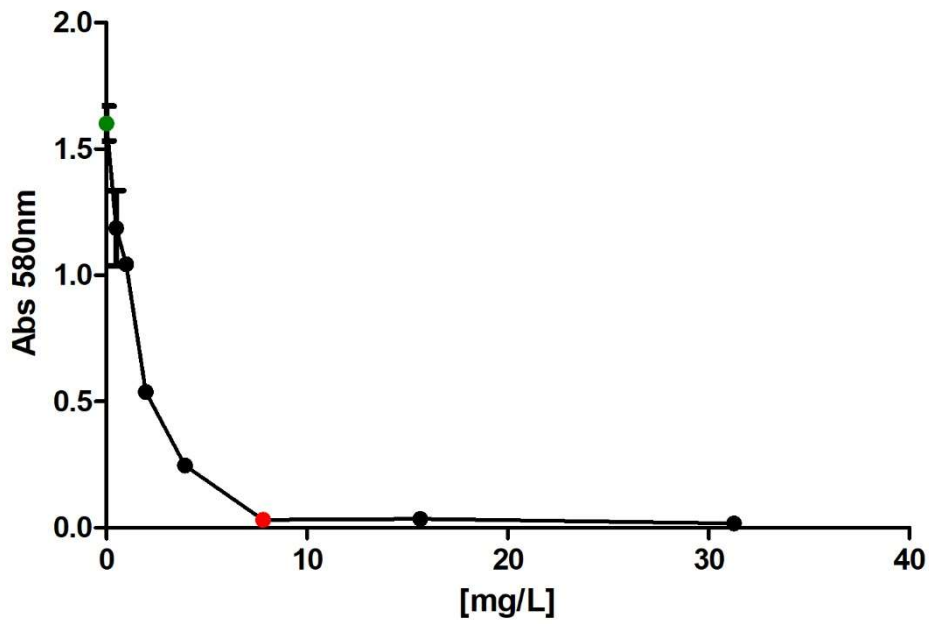
Wyk.15C-D Minimalne Stężenie Hamujące [C] CHX i [D] PHMB względem komórek planktonicznych *S.aureus* 33591. **Kolor zielony** – wartość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia hamującego.

E

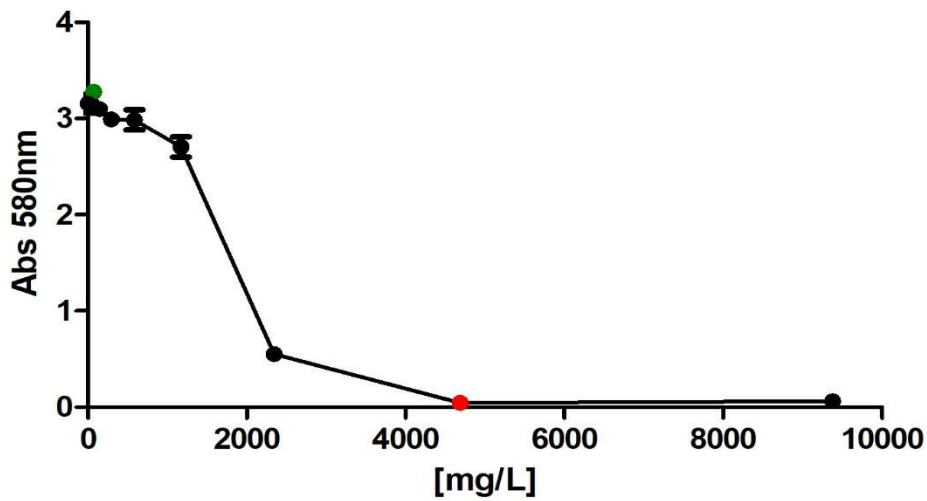


Wyk.15E Minimalne Stężenie Hamujące Gentamycyny względem komórek planktonicznych *S.aureus* 33591. **Kolor zielony** – wartość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia hamującego.

F

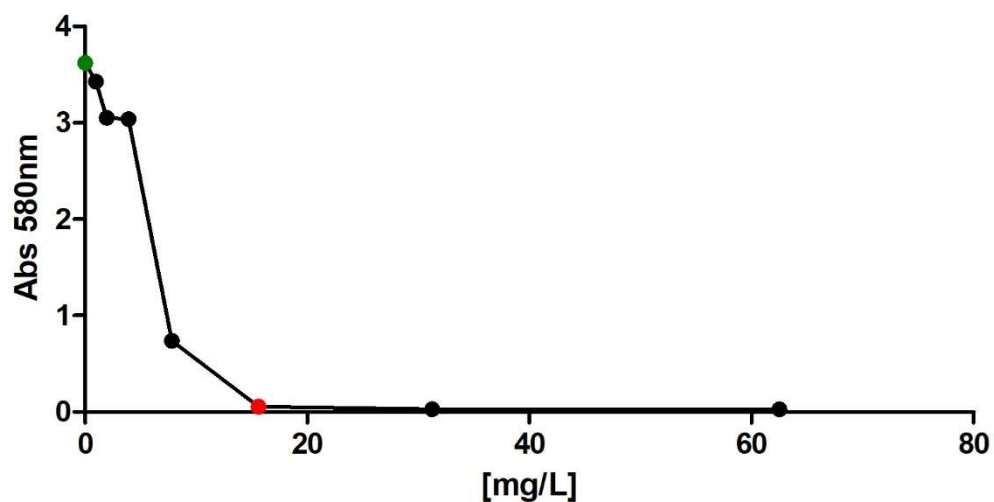


G

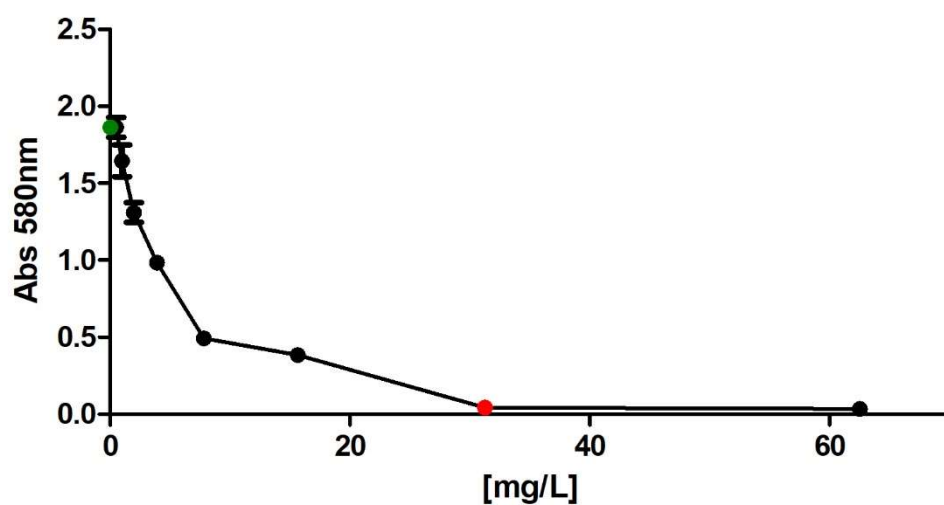


Wyk.15F-G. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm [F] OCT i [G] PVP-I względem biofilmu *S.aureus* 33591. **Kolor zielony** – wartość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia eradykującego biofilm.

H

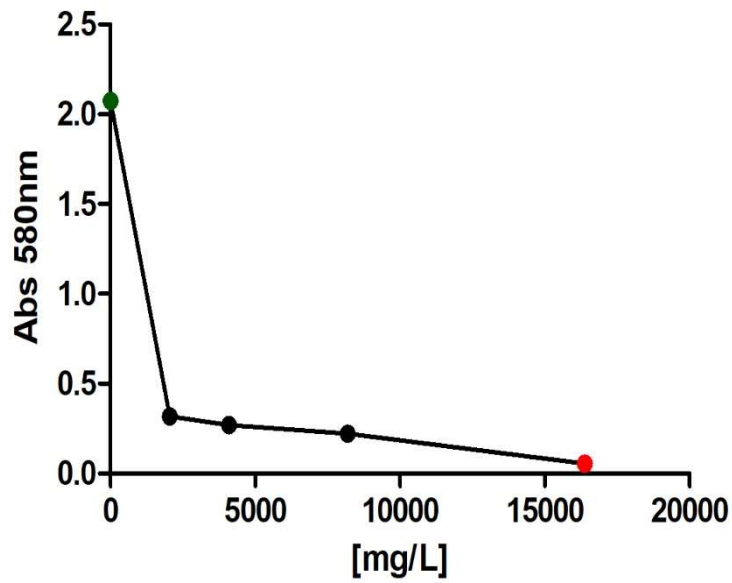


I



Wyk.15H-I. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm [H] CHX i [I] PHMB względem biofilmu *S.aureus* 33591. **Kolor zielony** – wartość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; kolor czerwony – wartość minimalnego stężenia eradykującego biofilm.

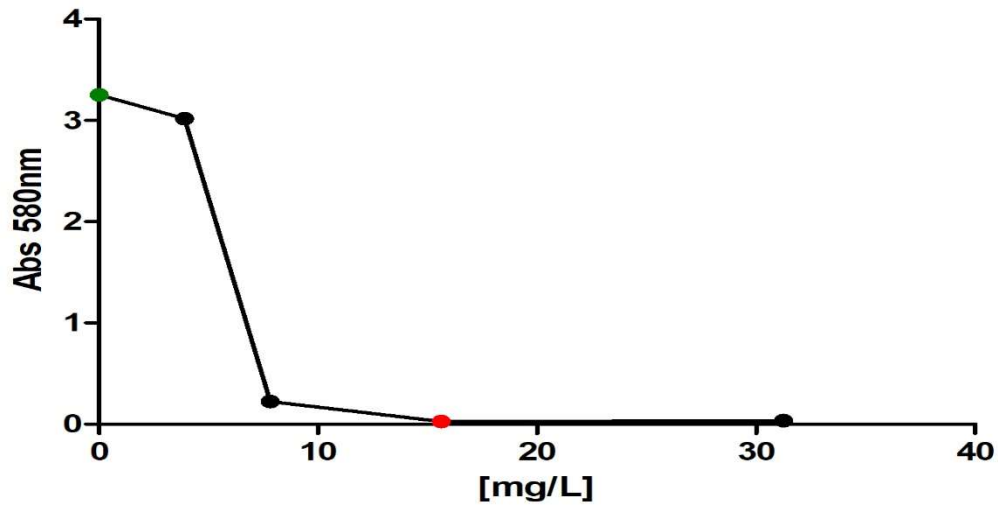
J



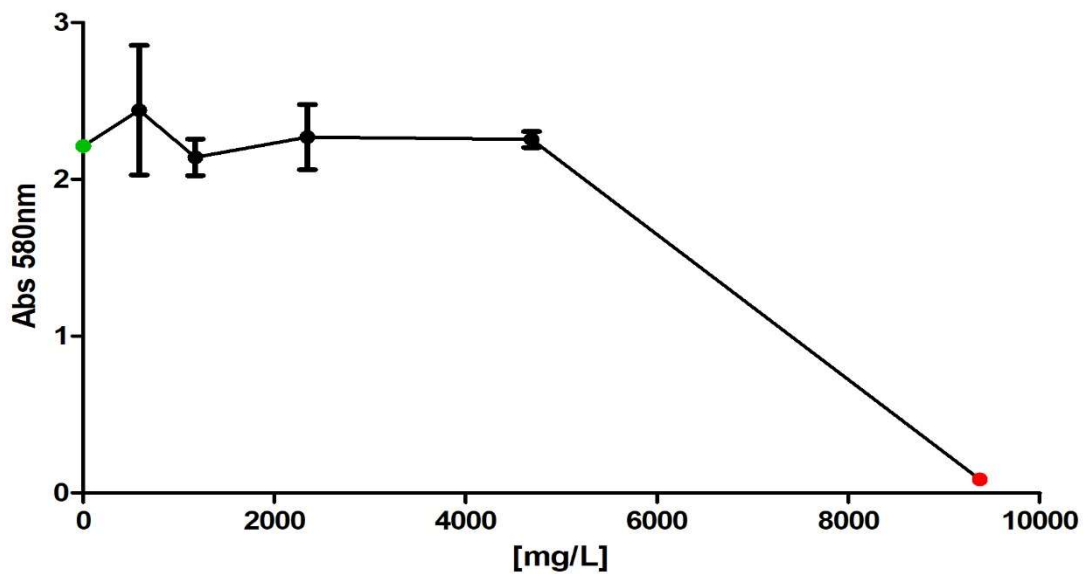
Wyk.15J. Minimalne Stężenie Eradykujące gentamycyny względem biofilmu *S.aureus* 33591.

Kolor zielony – wartość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia eradykującego biofilm.

A

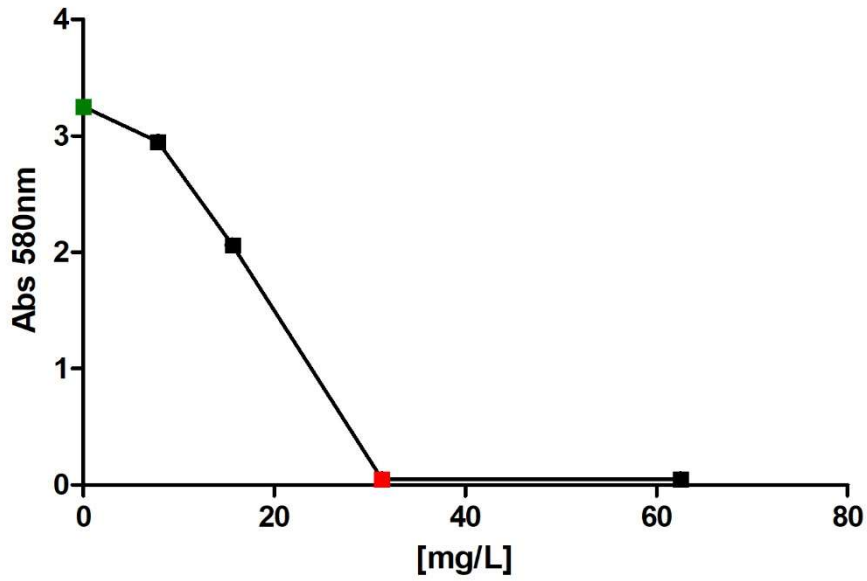


B

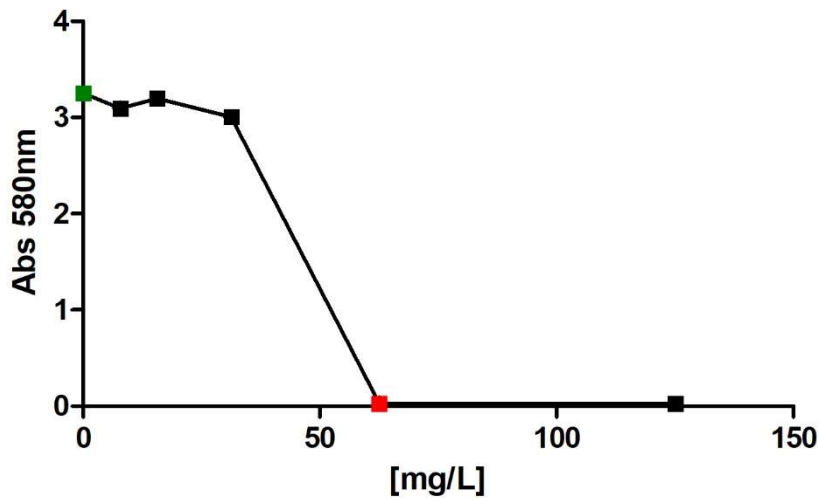


Wyk.16A-B Minimalne Stężenie Hamujące [A] OCT i [B] PVP-I względem komórek planktonicznych *P.aeruginosa* 15442. **Kolor zielony** – wartość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia hamującego.

C

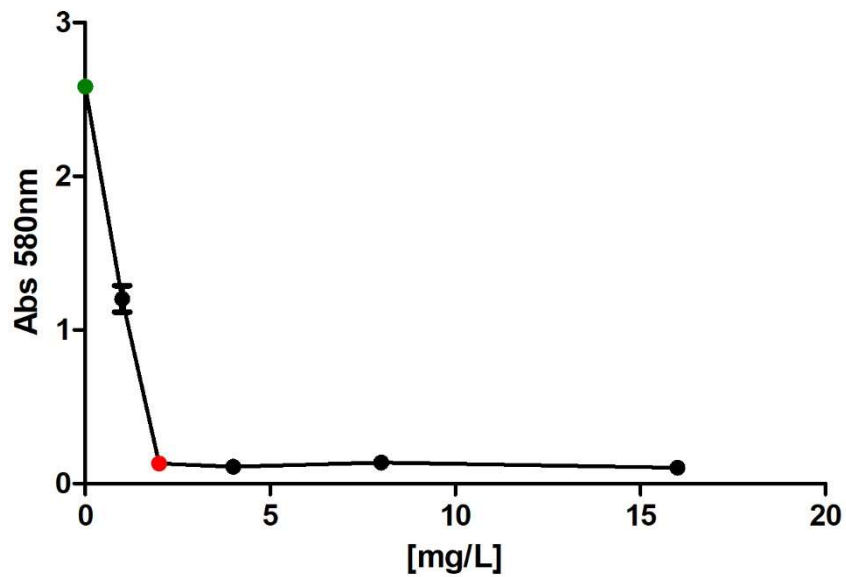


D



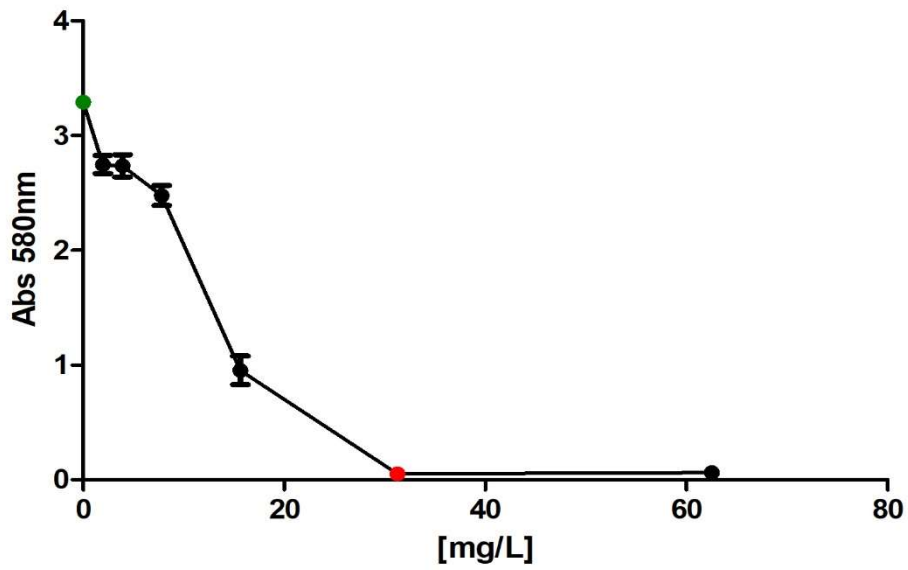
Wyk.16C-D Minimalne Stężenie Hamujące [C] CHX i [D] PHMB względem komórek planktonicznych *P.aeruginosa* 15442. **Kolor zielony** – wielkość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia hamującego.

E

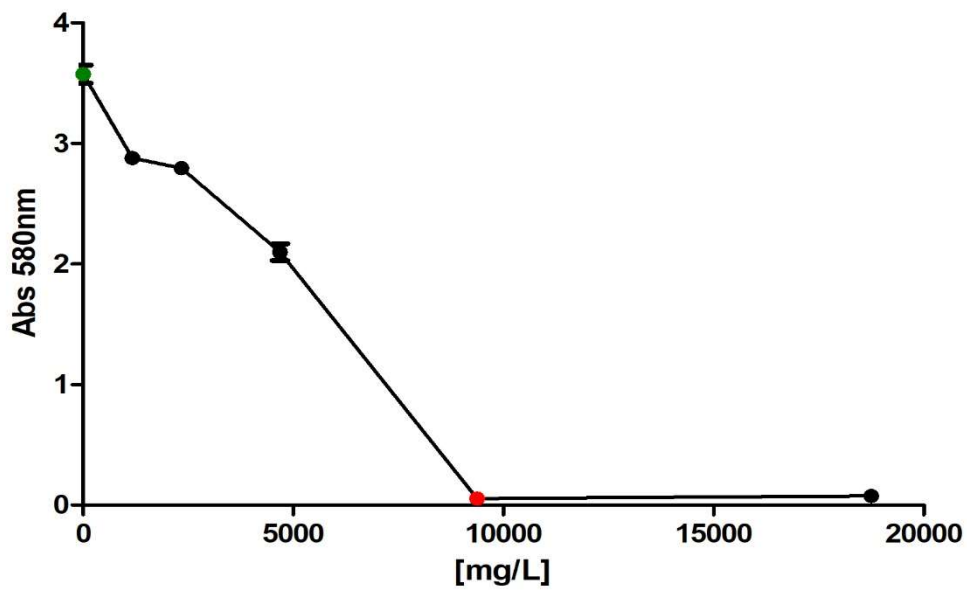


Wyk.16E Minimalne Stężenie Hamujące Gentamycyny względem komórek planktonicznych *P.aeruginosa* 15442. **Kolor zielony** – wielkość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia hamującego.

F

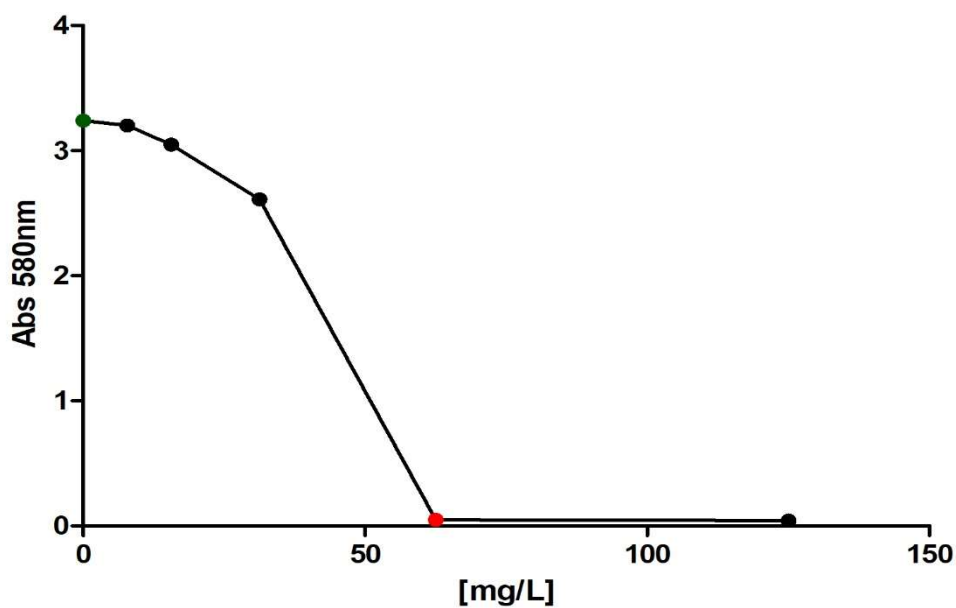


G

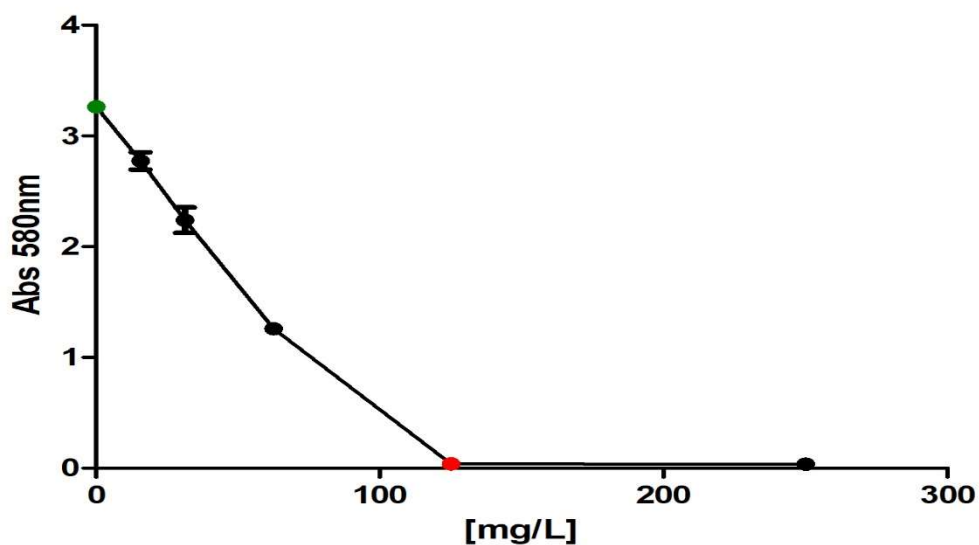


Wyk.16F-G. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm [F] OCT i [G] PVP-I względem biofilmu *P.aeruginosa* 15442. **Kolor zielony** – wielkość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia eradykującego biofilm.

H

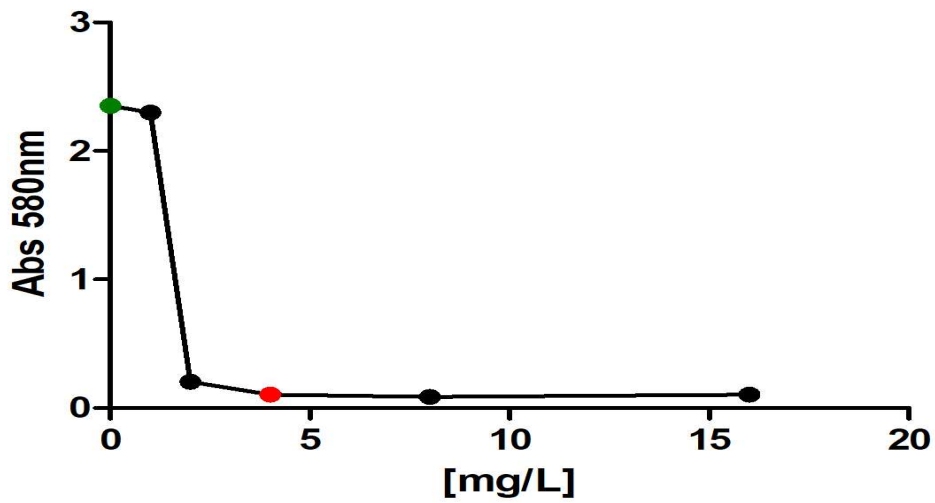


I



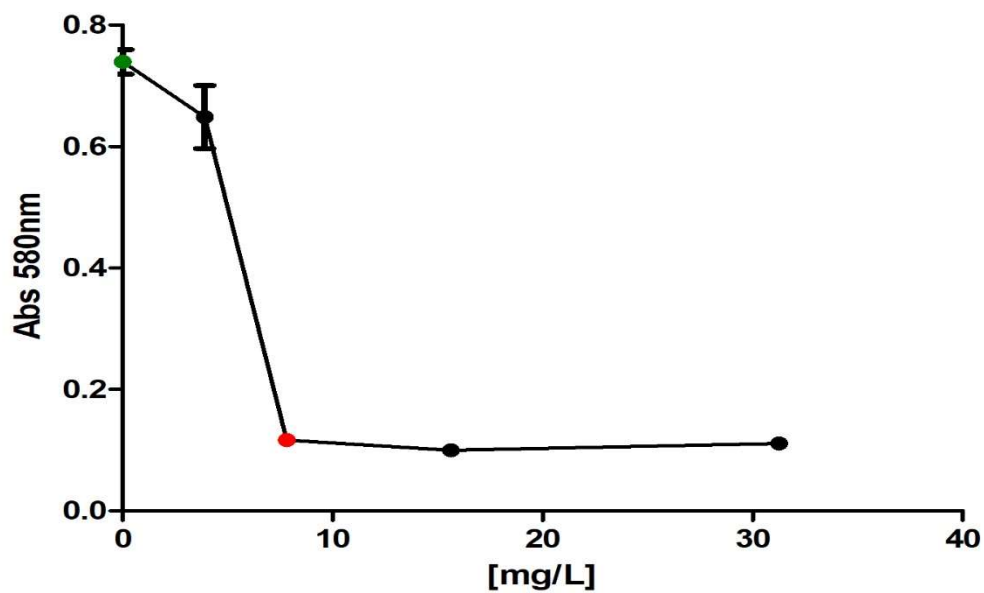
Wyk.16H-I. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm [H] CHX i [I] PHMB względem biofilmu *P.aeruginosa* 15442. **Kolor zielony** – wielkość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia eradykującego biofilm.

J

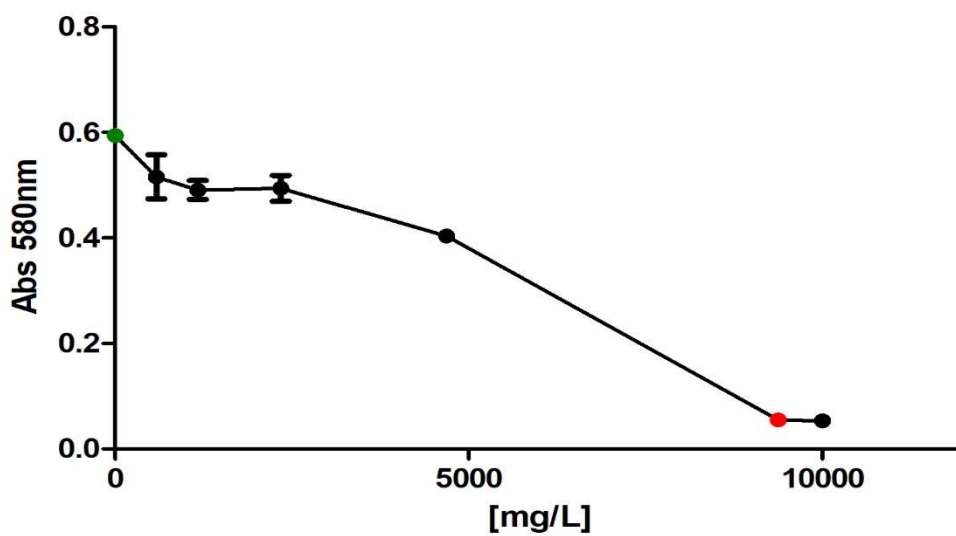


Wyk.16J. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm gentamycyny względem biofilmu *P.aeruginosa* 14452. **Kolor zielony** – wielkość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia eradykującego biofilm.

A

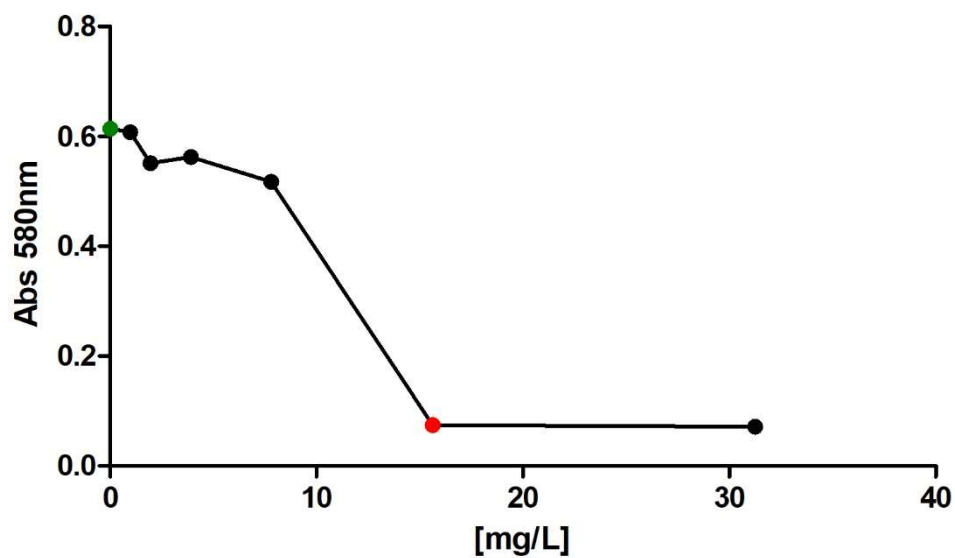


B

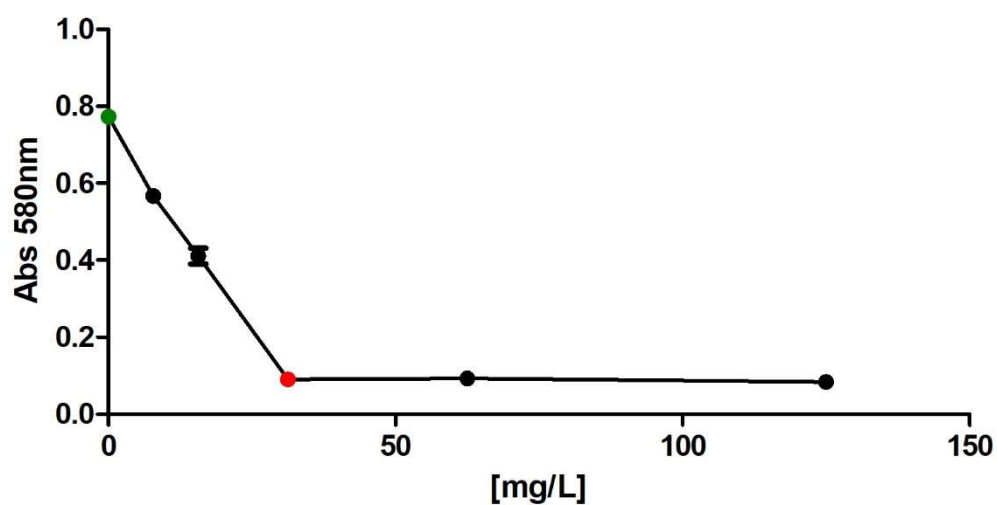


Wyk.17A-B Minimalne Stężenie Hamujące [A] OCT i [B] PVP-I względem komórek planktonicznych *E.faecalis* 29212. **Kolor zielony** – wielkość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia hamującego.

C

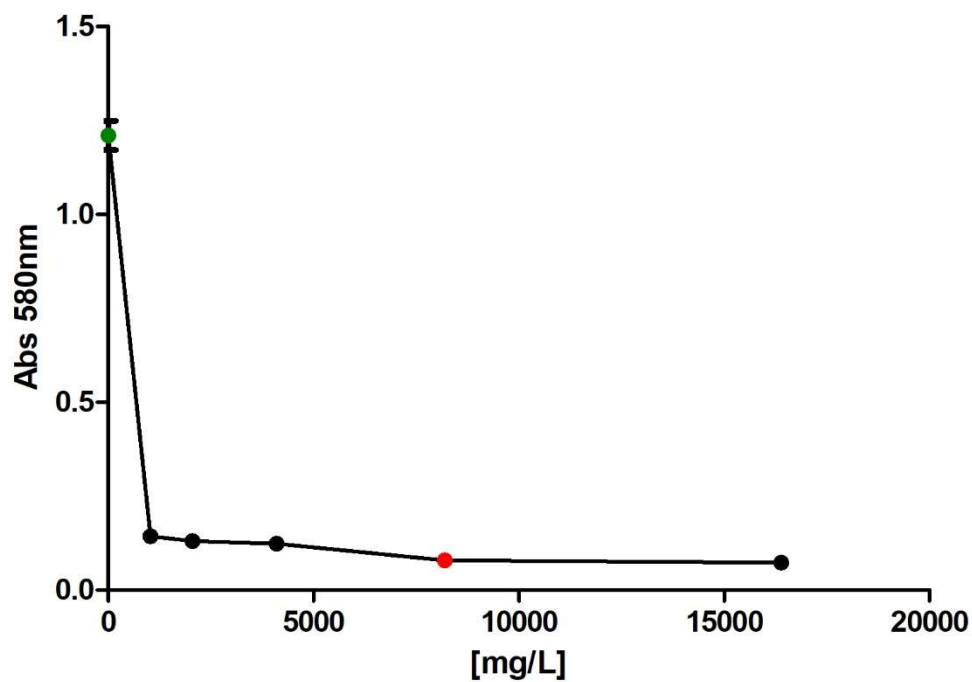


D



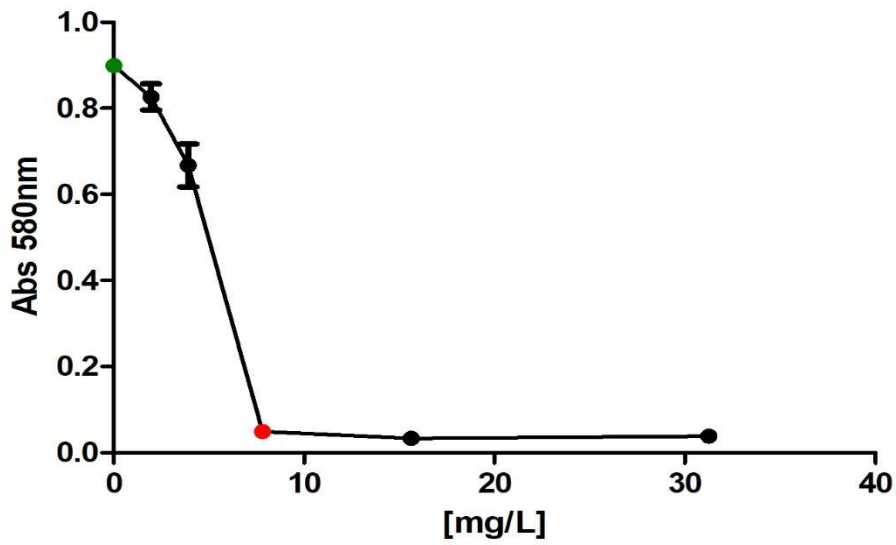
Wyk.17C-D Minimalne Stężenie Hamujące [C] CHX i [D] PHMB względem komórek planktonicznych *E.faecalis* 29212. **Kolor zielony** – wielkość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia hamującego.

E

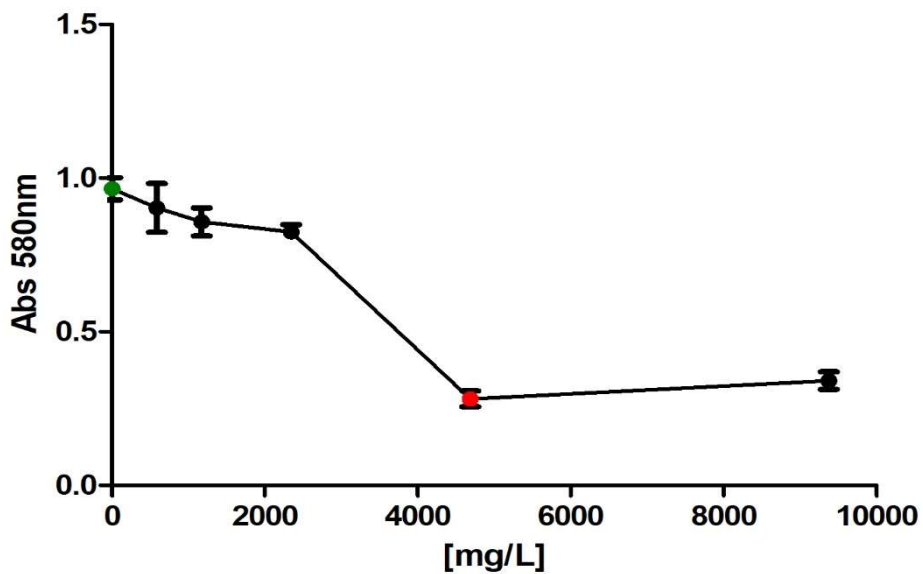


Wyk.17E Minimalne Stężenie Hamujące Gentamycyny względem komórek planktonicznych *E.faecalis* 29212. **Kolor zielony** – wielkość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia hamującego.

F

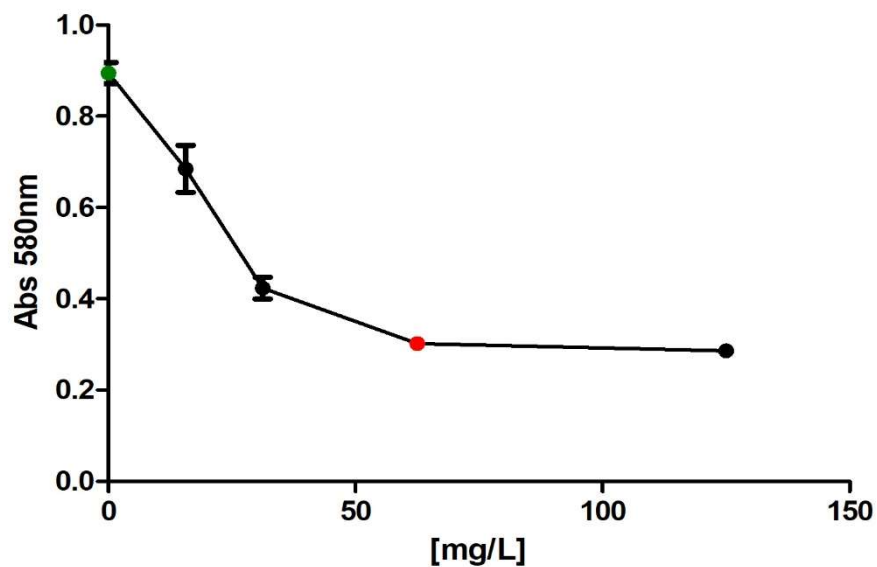


G

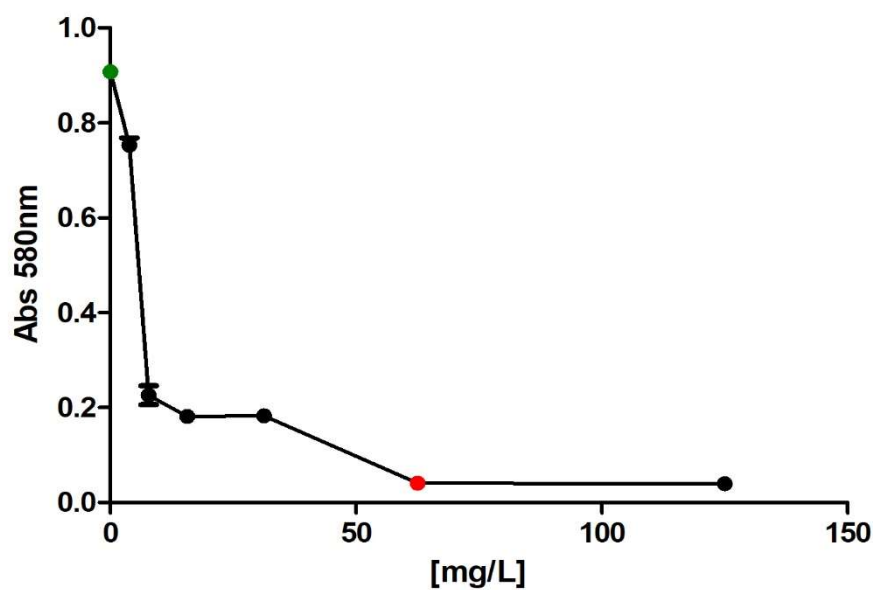


Wyk.17F-G. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm [F] OCT i [G] PVP-I względem biofilmu *E.faecalis* 29212. **Kolor zielony** – wielkość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia eradykującego biofilm.

H

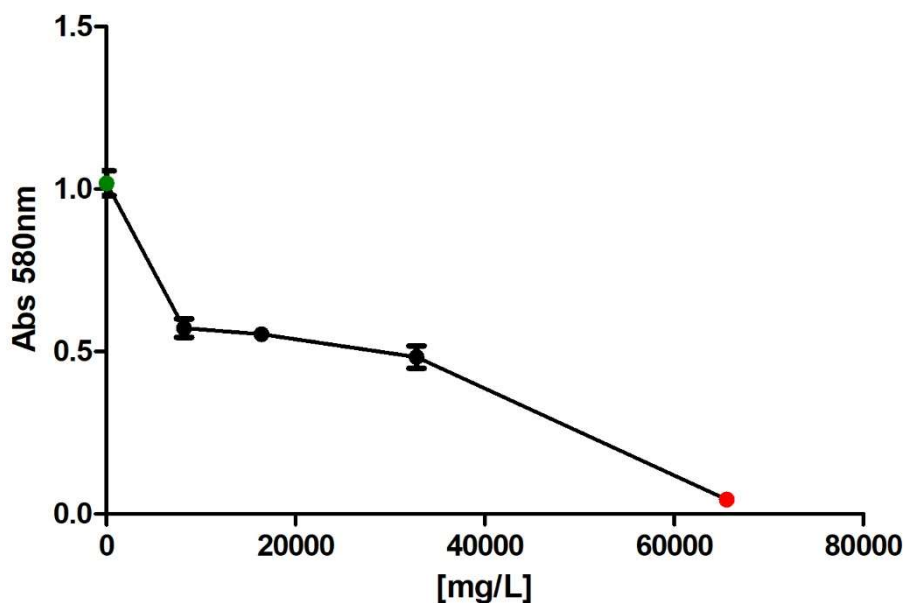


I



Wyk.17H-I. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm [H] CHX i [I] PHMB względem biofilmu *E.faecalis* 29212. **Kolor zielony** – wielkość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia eradykującego biofilm.

J

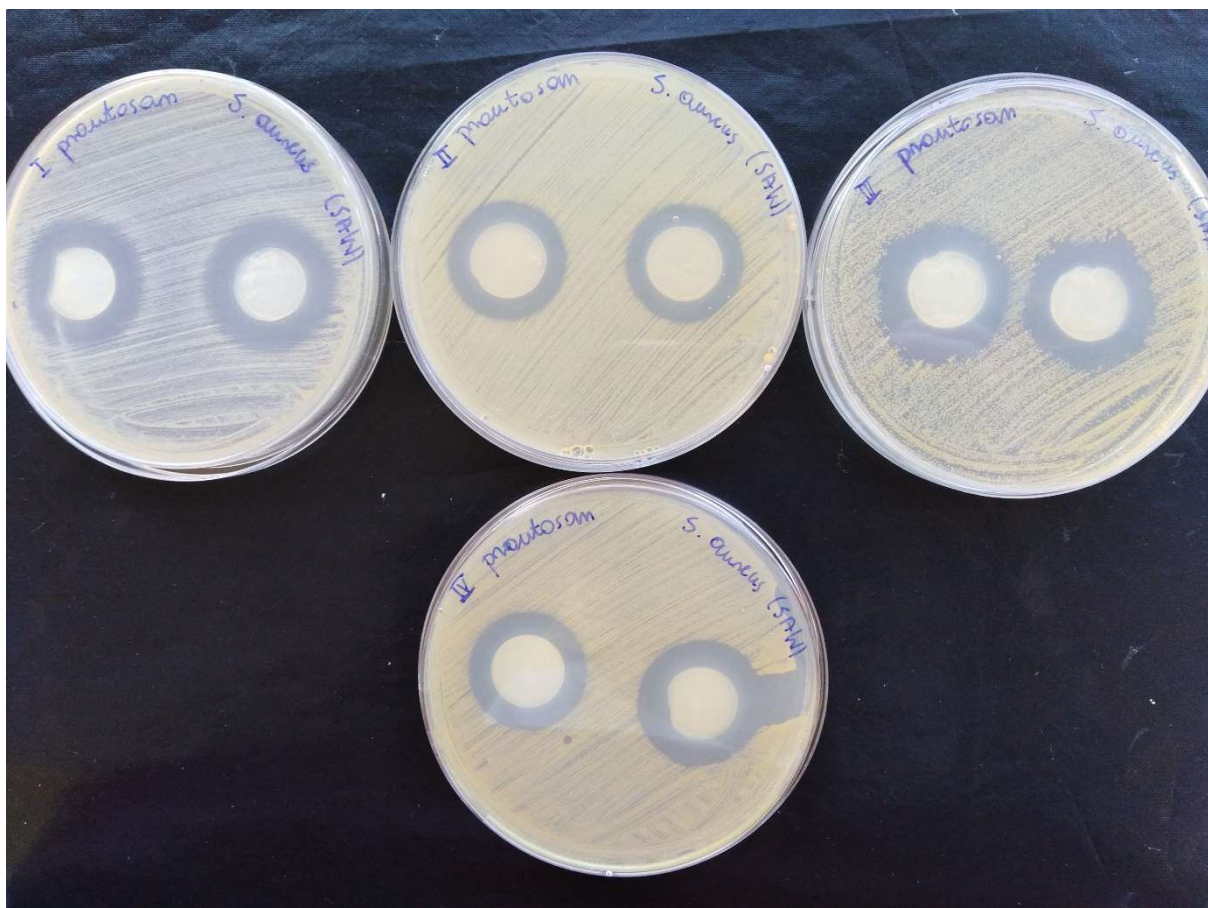


Wyk.17J. Minimalne Stężenie Eradykujące Biofilm wykazywane przez gentamycynę względem biofilmu *E.faecalis* 29212. **Kolor zielony** – wielkość absorbancji dla próby kontrolnej [zawiesina nietraktowana substancją przeciwdrobnoustrojową]; **kolor czerwony** – wartość minimalnego stężenia eradykującego biofilm.

Zgodnie z wynikami przedstawionymi na Wykresach 14-17, aktywność hamująca wzrost drobnoustrojów w formie planktonicznej lub prowadząca do eradykacji biofilmu różniła się zarówno w zależności od gatunku mikroorganizmu poddanego badaniu jak i w zależności od formy (planktonicznej lub biofilmowej), w której występował. W przypadku zawiesiny planktonicznej badanych szczepów *S.aureus* oraz *P.aeruginosa* najwyższą siłą bójczą cechowała się gentamycyna a najniższą PVP-I. W przypadku formy planktonicznej *E.faecalis* gentamycyna nie wykazywała istotnej aktywności, najsilniej działającą substancją przeciwdrobnoustrojową był OCT. Względem biofilmów, gentamycyna wykazywała się najniższą, spośród badanych związków, aktywnością przeciwko *S.aureus* oraz *E.faecalis* i

najwyższą względem *P.aeruginosa*. Dichlorowodorek charakteryzował się najwyższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową względem *S.aureus* oraz *E.faecalis*.

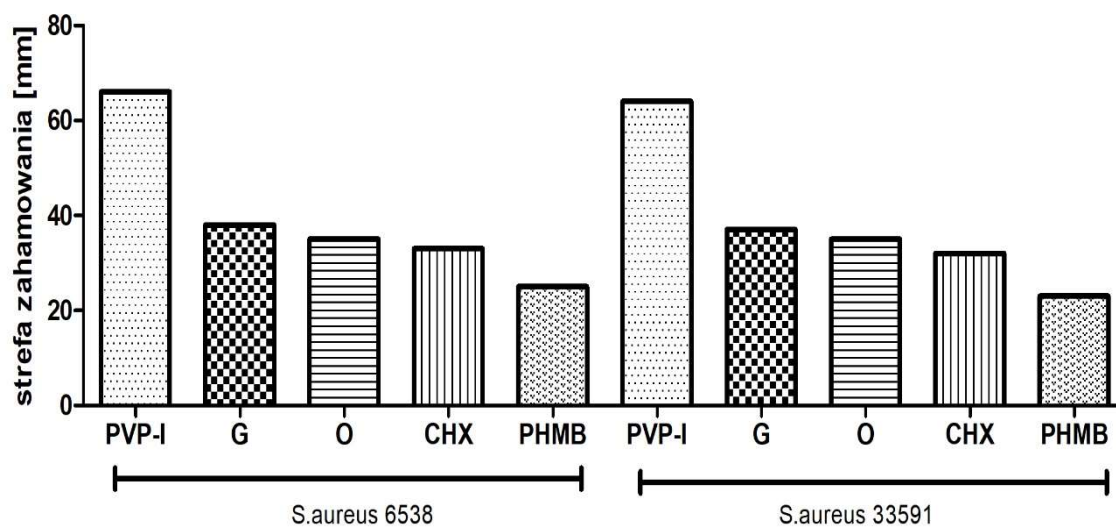
W kolejnym etapie doświadczenia, dyski celulozowe impregnowane badanymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi tak jak to opisano w sekcji 4.4.3 niniejszego manuskryptu, nakładano na płytki agarowe, na których posiano, sposobem analogicznym do tego używanego do oceny antybiotykowrażliwości (tzw. „posiew na murawę”), mikroorganizmy badane, *S.aureus* lub *P.aeruginosa* lub *E.faecalis*. Płytki z dyskami BC inkubowano następnie 24h/37°C, a następnie oceniano wielkość strefy zahamowania wzrostu dookoła dysków BC [Zdjęcie 4, Wykres 18].



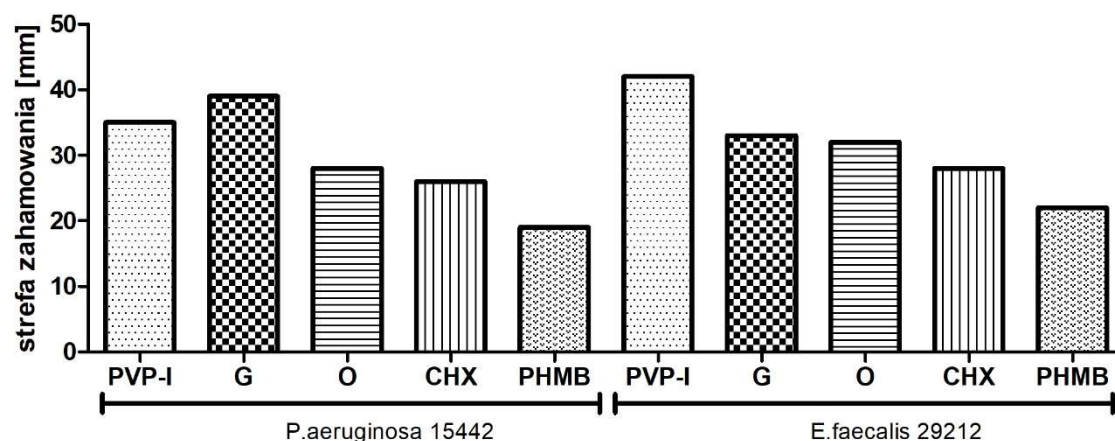
Zdj.4. Strefy zahamowania wzrostu wzorcowego szczepu *S.aureus* 6538 dookoła dysku BC nasączonego PHMB

Impregnacja opatrunków celulozowych powidonem jodu przekładała się na najwyższą eradykację badanych drobnoustrojów rosnących w postaci murawy na płytkach agarowych; najniższą skutecznością cechowała się zaś poliheksanidyna. Wyjątkiem od zaobserwowanego trendu był *P.aeruginosa*, względem którego najwyższą strefę zahamowania wzrostu zaobserwowano dla gentamycyny, a dopiero następnie dla powidonu jodu. W przypadku pałeczki ropy błękitnej, substancją, której uwalnianie się z nośnika BC przekładało się na najniższą skuteczność także była PHMB. [Wyk.18].

A



B



Wyk.18 Strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów dookoła krążków celulozowych impregnowanych substancjami przeciwdrobnoustrojowymi. A – wartości stref zahamowania wzrostu *S.aureus* 6538 i 33591; B – wartości stref zahamowania wzrostu *P.aeruginosa* 15442 oraz *E.faecalis* 29212. PVP-I, G, O, CHX, PHMB – powidon jodu, gentamycyna, dichlorowodorek oktenidyny, chlorheksydyna, poliheksanidyna, odpowiednio.

Po uzyskaniu wyników z podstawowego modelu badawczego, jakim jest zmodyfikowana metoda dyfuzyjno-krażkowa, wykorzystano technikę badawczą A.D.A.M. (ang. Antibiofilm Dressing Measurement Activity) w celu oceny nie tylko aktywności przeciwdrobnoustrojowej substancji uwalnianej z nośnika, ale i ich siły penetracyjnej poprzez kolejne warstwy agarowe i biofilmu. Rezultaty testu A.D.A.M. przedstawiono zbiorczo w **Tabelach 1-4**.

Substancja przeciwdrobnoustrojowa	[% redukcji biofilmu na dyskach agarowych]		
	Podstawny [B]	Środkowy [M]	Kontaktowy [C]
OCT	57	77	89
PVP-I	93	94	93
CHX	24	49	84
PHMB	20	32	73
G	29	71	87

Tab.1. % redukcja biofilmu *S.aureus* 6538 na dyskach agarowych B, M, C w metodzie A.D.A.M.

Substancja przeciwdrobnoustrojowa	[% redukcji biofilmu na dyskach agarowych]		
	Podstawny [B]	Środkowy [M]	Kontaktowy [C]
OCT	55	49	93
PVP-I	92	95	95
CHX	38	61	83
PHMB	55	49	83
G	58	88	87

Tab.2. % redukcja biofilmu *S.aureus* 33591 na dyskach agarowych B, M, C w metodzie A.D.A.M.

Substancja przeciwdrobnoustrojowa	[% redukcji biofilmu na dyskach agarowych]		
	Podstawny [B]	Środkowy [M]	Kontaktowy [C]
OCT	68	74	88
PVP-I	95	98	98
CHX	13	14	28
PHMB	24	45	74
G	55	66	68

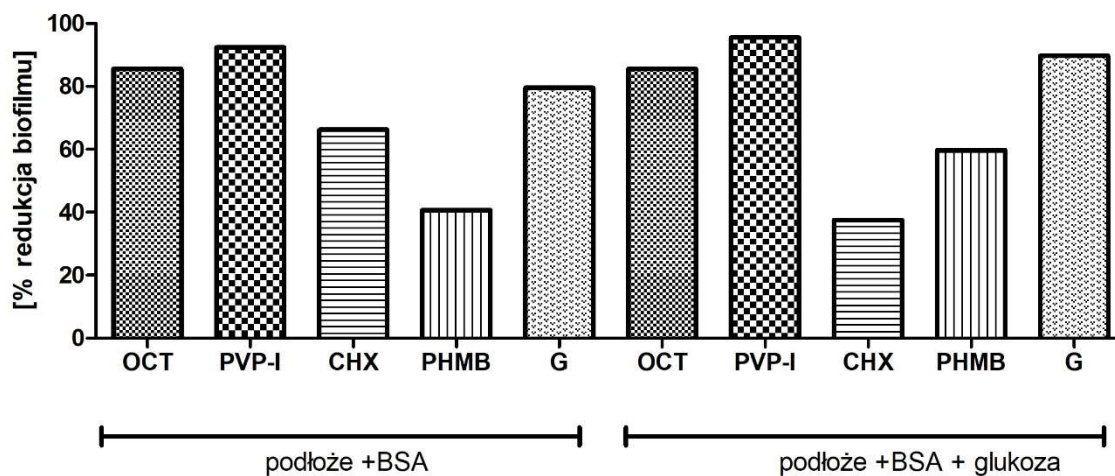
Tab.3. % redukcja biofilmu *P.aeruginosa* 15442 na dyskach agarowych B, M, C w metodzie A.D.A.M.

Substancja przeciwdrobnoustrojowa	[% redukcji biofilmu na dyskach agarowych]		
	Podstawny [B]	Środkowy [M]	Kontaktowy [C]
OCT	55	72	91
PVP-I	97	98	98
CHX	6	51	94
PHMB	42	51	86
G	57	68	72

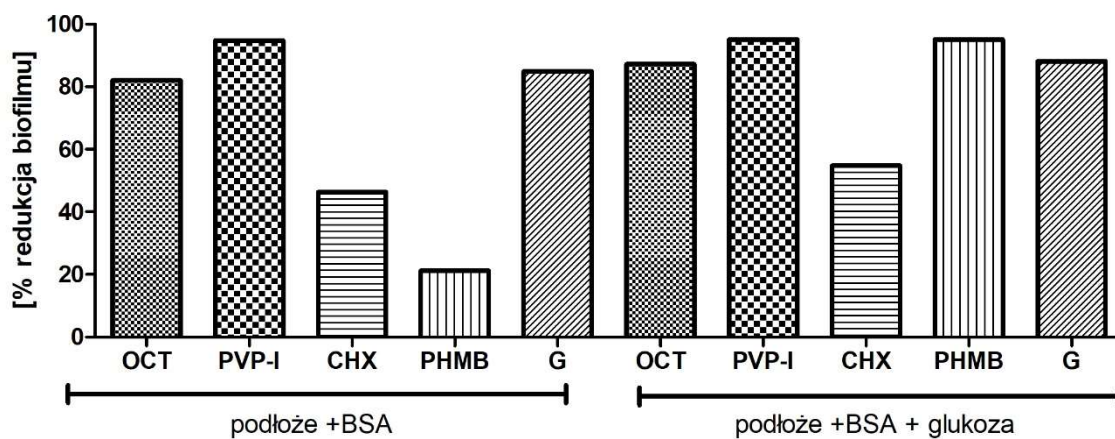
Tab.4. % redukcja biofilmu *E.faecalis* 29212 na dyskach agarowych B, M, C w metodzie A.D.A.M.

Uzyskane wyniki wykazują, że PVP-I cechował się najwyższą zdolnością do eradykacji biofilmu z każdej warstwy agarowej (kontaktowej, środkowej, podstawnej) zastosowanej zgodnie z metodyką testu A.D.A.M. Najniższą zdolnością penetracyjną do warstwy podstawnej wykazał się roztwór gentamycyny oraz octan chlorheksydyny. Wartości eradykacji uzyskiwane dla warstw kontaktowych pokrytych biofilmem badanych drobnoustrojów (w przypadku substancji przeciwdrobnoustrojowych innych niż wzmiankowany powyżej PVP-I) były stosunkowo wysokie, tzn. (z wyjątkiem gentamycyny vs. biofilm *P.aeruginosa*) wynosiły powyżej 70%.

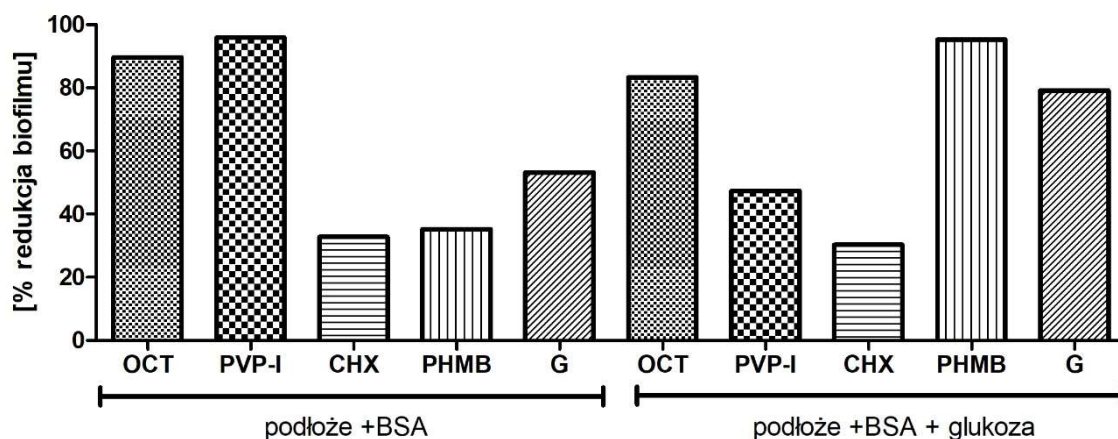
Ponieważ wysięk z rany zawiera liczne molekuly obniżające aktywność substancji przeciwdrobnoustrojowych, w kolejnym doświadczeniu wykorzystano układ, w którym antyseptyki i antybiotyki uwalniały się z prototypowego opatrunku BC do środowiska płynnego zawierającego obciążnik w postaci białka surowiczej albuminy wołowej oraz wysokiego stężenia glukozy (32mg/dL). Wyniki doświadczenia przedstawione są na **Wykresie 19-22**.



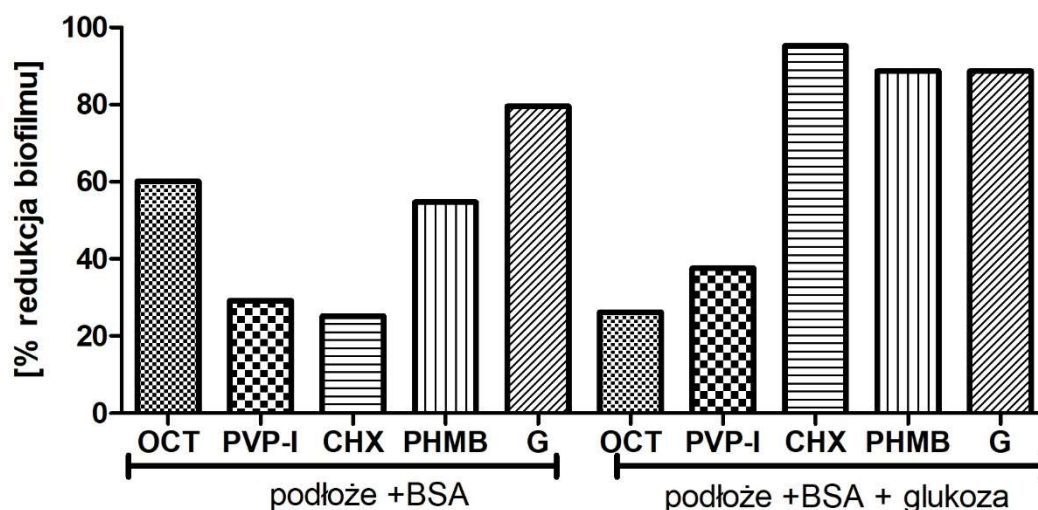
Wyk.19. [%] redukcja biofilmu *S.aureus* 6538 – zmodyfikowana metoda A.D.A.M. BSA – surowicza albumina wołowa



Wyk.20. [%] redukcja biofilmu *S.aureus* 33591 – zmodyfikowana metoda A.D.A.M. BSA – surowicza albumina wołowa



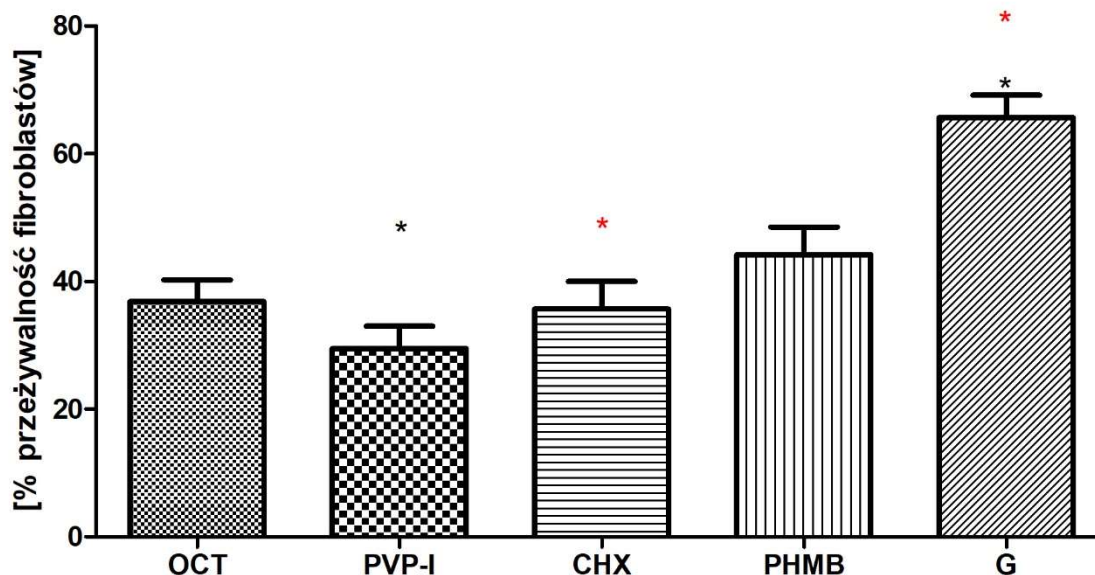
Wyk.21. [%] redukcja biofilmu *P.aeruginosa* 15442 – zmodyfikowana metoda A.D.A.M.
BSA – surowicza albumina wołowa



Wyk.22. [%] redukcja biofilmu *E.faecalis* 29212 – zmodyfikowana metoda A.D.A.M.
BSA – surowicza albumina wołowa

Podobnie jak w przypadku metody A.D.A.M, tak i w jej modyfikacji, najsilniej działającą substancją przeciwdrobnoustrojową, w układzie zawierającym medium oraz BSA, był PVP-I (względem biofilmu *S.aureus* i *P.aeruginosa*). CHX wywierała najsłabszy efekt bójczy względem biofilmu *S.aureus* oraz *P.aeruginosa*, natomiast najsilniejszy w przypadku biofilmu *E.faecalis* w medium zawierającym dodatek BSA oraz glukozy.

W ostatnim eksperymencie przedstawionym w niniejszej rozprawie doktorskiej oceniono cytotoksyczność badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych *in vitro* względem komórek odpowiedzialnych za gojenie się rany, czyli fibroblastów. Wyniki przedstawiono na **Wyk.22**.



Wyk.23. [%] przeżywalność fibroblastów poddanych działaniu badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych. Asterisk czerwony i czarny – różnice istotne statystycznie (K-W test, $p < 0,5$; analiza post hoc Dunneta)

Zgodnie z wynikami przedstawionymi na **Wykresie 22** badane antyseptyki cechowały się średnią bądź wysoką cytotoksycznością względem linii fibroblastów L929, a gentamycyna – cytotoksycznością umiarkowaną. Różnice w cytotoksyczności między gentamycyną a PVP-I oraz CHX były istotne statystycznie (K-W test, $p < 0,5$; analiza post hoc Dunneta).

6. Dyskusja

Mimo że w ostatnich latach zanotować można olbrzymi postęp w dziedzinie leczenia zainfekowanych ran przewlekłych, to w dalszym ciągu współczynnik sukcesu terapeutycznego nie jest zadawalający [1]. Skłania to do postawienia tezy, że konieczna jest implementacja skuteczniejszych strategii prowadzących do eradykacji zakażenia z ran przewlekłych oraz przyśpieszenia procesu gojenia prowadzącego do poprawy zdrowia i statusu socjo-ekonomicznego pacjenta.

Bakteryjna celuloza (BC) jest biopolimerem wytwarzanym przez bakterie kwasu octowego (AAB). Pod względem możliwości aplikacyjnych, BC cechuje się licznymi przewagami w porównaniu do celulozy roślinnej, między innymi wysoką czystością, porowatością, przepuszczalnością dla cieczy i gazów, korzystnymi właściwościami związanymi z absorpcją oraz uwalnianiem płynów oraz wyjątkowo wysoką odpornością na rozrywanie [63].

BC charakteryzuje się także wysoką biokompatybilnością i brakiem cytotoksyczności, co predysponuje ją do zastosowań biomedycznych. Co więcej, polimer ten może być w tani i prosty sposób modyfikowany – zarówno w aspekcie jego właściwości fizycznych i chemicznych (wymienionych w poprzednim akapicie), jak i w aspekcie jego impregnacji w związki o charakterze przeciwzapalnym czy przeciwdrobnoustrojowym.

W niniejszej pracy postanowiłam wykorzystać wszystkie wyżej wspomniane cechy biocelulozy w celu oceny jej biomedycznej przydatności, po nasączeniu miejscowo działającymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi, jako prototypowego opatrunku do stosowania na rany przewlekłe.

W swojej pracy zawodowej spotykam się na co dzień z problemem, jakim są niegojące się, zainfekowane rany o różnej etiologii. Obecnie w naszym kraju dostępnych jest wiele środków antyseptycznych/lawaseptycznych przeznaczonych, zgodnie z zapewnieniami producentów, do

leczenia i opieki nad raną przewlekłą. Postanowiłam zatem poddać ocenie te z antyseptyków/lawaseptyków, które używane są najczęściej i są najsilniej promowane na polskim rynku szpitalnym oraz pozaszpitalnym: dichlorowodorek oktenidyny, powidon jodu, chlorheksydynę oraz poliheksanidynę. Dodatkowo, postanowiłam także zbadać przydatność antybiotyku gentamycyny jako substancji aktywnej uwalniającej się z bakteryjnej celulozy, (gentamycyna w nośniku kolagenowym spełnia wymagania stawiane związkom przeciwdrobnoustrojowym przeznaczonym do miejscowego leczenia ran). Co więcej, obiecująca i przydatna z punktu klinicznego jest – wykazywana w piśmiennictwie – zdolność gentamycyny do przełamywania oporności szczepów tworzących biofilm. Efektywne niszczenie biofilmu oraz zdolność do penetracji do jego warstw podstawnych jest jedną z dwóch kluczowych cech przeciwdrobnoustrojowych związków przeznaczonych do stosowania miejscowego. Drugą – jest niska cytotoksyczność [64], dlatego też dokonałam także oceny cytotoksyczności *in vitro* wyżej wzmiankowanych substancji względem linii komórkowej fibroblastów, odpowiedzialnych *in vivo* są za proces gojenia się ran, w tym ran przewlekłych. Prototypowe opatrunki z BC otrzymałam stosując standardową metodę hodowli *K.xylinus* oraz oczyszczania bakteryjnej celulozy za pomocą wysokiej temperatury i wodorotlenku sodu. Uzyskane dyski celulozowe charakteryzowały się przejrzystością oraz elastycznością [**Zdj.2., część prawa**], co stanowi cenną zaletę w przypadku zastosowania na rany, ponieważ wzmiankowane cechy umożliwiają nie tylko sprawne nałożenie, ale też monitorowanie stanu rany bez konieczności – często bolesnego dla pacjenta – ściągania opatrunku. Zastosowana przeze mnie metoda oczyszczenia celulozy z pozostałości podłoża i komórek *K.xylinus* była efektywna – brak wspomnianych zanieczyszczeń wykazałam za pomocą mikroskopii elektronowej [**Zdj.3B.**]

Uzyskany i wyprodukowany nośnik poddałam szeregowi analiz rozpoczynając od pomiaru suchej i mokrej masy biopolimeru, pośrednio świadczącej o jego chłonności [**Wyk.1.**]

Wykazałam, że wyprodukowany przez bakterie *K.xylinus* nośnik jest w stanie zaabsorbować objętość wody stanowiącą około 1000x swojej suchej masy, co pozostaje w zgodności z danymi przytaczanymi przez inne zespoły badawcze [65] i świadczy o prawidłowości przeprowadzonego przeze mnie procesu hodowli i oczyszczania.

Następnie, podjęłam się ocenie porównania szybkości i poziomu absorpcji substancji przeciwdrobnoustrojowych, OCT, PVP-I, PHMB, CHX oraz G do nośnika celulozowego [Wyk.2].

Wyniki okazały się być powtarzalne i cechowały się niskim poziomem odchyień standardowych – roztwory badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych były absorbowane przez nośnik celulozowy w sposób efektywny i zbliżony (w znaczeniu objętościowym) do poziomu absorpcji wody. Uważam, że związane jest to z faktem, że wszystkie z zastosowanych antyseptyków i antybiotyków rozpuszczone były w roztworze wodnym. Ponieważ jedynymi silnie aktywnymi chemicznie grupami w celulozie są reszty hydroksylowe [65], zakładam, że do absorpcji w BC dochodziło w głównej mierze poprzez działanie sił kapilarnych warunkowanych przez wysoką porowatość nośnika.

Istotnym, w znaczeniu zastosowania BC jako opatrunku na rany przewlekłe, parametrem jest zdolność do utrzymania płynu przez nośnik celulozowy. Zgodnie z obowiązującym algorytmem leczenia i opieki nad raną T.I.M.E. (akronim pochodzący od słów „czas”, „infekcja”, „wilgotność”, „epitelializacja”) opatrunek powinien zapewnić wilgotne środowisko rany, które ułatwia fibroblastom migrację i rozrost będące warunkiem koniecznym w procesie gojenia [30]. Wykazałam, że opatrunek celulozowy w temperaturze 60°C oddaje wodę w czasie wynoszącym ponad godzinę w sposób stopniowy i równomierny [Wyk.3]; połowa zaabsorbowanego płynu oddawana jest po czasie około 30 minut. Ekstrapolując te uzyskane *in vitro* wyniki na warunki kliniczne, można założyć, że przy temperaturze ciała pacjenta (37°C lub nieco wyżej; podniesiona ciepłota jest jedną z cech charakterystycznych infekcji w ranie

przewlekłej) oraz przy nasączaniu celulozy wysiękiem z rany, poziom utrzymania cieczy przez opatrunek mógłby być wystarczający do pozostawienia go przez okres 24-48 godzin bez konieczności zmiany.

Jest to zagadnienie na tyle istotne, że w kolejnych swoich badaniach planuję wykonanie eksperymentu polegającego na zewnętrznym zwilżaniu opatrunku BC (na przykład za pomocą spray'u zawierającego jałowy, izotoniczny roztwór 0.9%NaCl) w celu określenia warunków pozwalających na utrzymanie poziomu wilgoci celulozy bakteryjnej na poziomie zapewniającym optymalne gojenie się rany.

Następnie, podjęłam się określenia szybkości pochłaniania badanych antyseptyków i antybiotyku przez nośnik celulozowy; podobne badania dla dichlorowodoru oktenidyny, wykonywane już były przez inne zespoły badawcze [66]; w piśmiennictwie naukowym brak jest jednak (według mojej najlepszej wiedzy) danych dotyczących poliheksanidyny, chlorheksydyny, gentamycyny oraz PVP-jodu. Wykazałam [Wyk.4,7,8], że do najsilniejszego pochłaniania oktenidyny, poliheksanidyny i gentamycyny dochodzi w ciągu pierwszych 24 godzin od rozpoczęcia procesu. Wiedza taka jest cenna w znaczeniu możliwości optymalizacji potencjalnych, przemysłowych procesów impregnacji BC antyseptykami i antybiotykami (skrócenie czasu impregnacji). W przypadku PVP-jodu, poziom impregnacji osiągnął constans w 96 godzinie od rozpoczęcia procesu [Wyk.5]. Natomiast w przypadku chlorheksydyny w 48 godzinie procesu impregnacji doszło do znacznego zmniejszenia stężenia tej substancji [Wyk.6]. W celu pełnego wyjaśnienia tego zjawiska konieczne jest wykonanie dalszych badań; dane z piśmiennictwa wskazują na możliwy rozkład CHX do chloraniliny [52], co tłumaczyłoby uzyskane wyniki, jakkolwiek potwierdzenie tego domysłu wymagałoby przeprowadzenia analiz wykorzystujących na przykład technikę Jądrowego Rezonansu Magnetycznego. Z racji na wysoki koszt tego badania na chwilę obecną pozostawiam pytanie o spadek stężenia CHX w procesie impregnacji BC bez odpowiedzi, jakkolwiek analizy

umożliwiający potwierdzenie mojego przypuszczenia o rozkładzie tego antyseptyku w trakcie procesu, mam zamiar wykonać w kolejnych planowanych przeze mnie eksperymentach. Wyniki przedstawione na Wykresach 9-13 wykazują tempo, w jakim badane substancje przeciwdrobnoustrojowe uwalniane są z nośnika biocelulozowego; *plateau* poziomu uwalniania osiągnięte było między 30 a 90 minutą od rozpoczęcia procesu. Nie jest to zatem parametr BC cechujący się wysoką przydatnością w leczeniu ran przewlekłych; znacznie korzystniejsze byłoby uwalnianie trwające kilka-kilkanaście godzin, co nie pozwoliłoby biofilmowi na pełne odtworzenie swojej struktury. W moich badaniach wykorzystałam celulozę natywną, czyli taką, której parametry związane z absorpcją i uwalnianiem płynów nie były w żaden sposób (hodowlany, fizyczny czy chemiczny) modyfikowane, jednak najnowsze badania nad sposobami modyfikacji wyżej wzmiankowanych parametrów [67] pozwalają żywić nadzieję na stworzenie opatrunków z BC cechujących się kontrolowanym, przedłużonym sposobem uwalniania się związków przeciwdrobnoustrojowych z ich wnętrza.

Dane przedstawione na Wykresach 14-17 obrazują przede wszystkim różnicę w zdolności badanych związków do eradykacji drobnoustrojów w formie planktonicznej i biofilmowej. Metoda hodowli biofilmu i oceny jego lekowrażliwości w studzienkach płytek 96-dołkowych jest historycznie pierwszą i wciąż najbardziej rozpowszechnioną techniką; jakkolwiek wraz z rozwojem wiedzy o tej formie bytowania drobnoustrojów, pojawia się coraz częściej pytanie o zasadność jej stosowania, a przede wszystkim o jej relewantność w znaczeniu wierności odwzorowania biofilmów tworzących się w warunkach *in vivo*. Niemniej jednak zastosowałam tę technikę jako punkt wyjścia do analiz, w których użyte metody badawcze mają na celu odtworzenie (przynajmniej częściowe) środowiska rany przewlekłej objętej procesem infekcji. Za pomocą metody hodowli w studzienkach 96-dołkowej wykazałam, że formy biofilmowe są kilkukrotnie bardziej odporne na aktywność badanych związków przeciwdrobnoustrojowych niż formy planktoniczne; dane te pozostają w zgodności z

wynikami przytaczanymi przez innych autorów [68], jakkolwiek należy wspomnieć, że istnieją też doniesienia wykazujące, że wzmiankowane różnice w oporności sięgać mogą 100-1000x [69].

W oparciu o dane płynące z Wykresów 14-17 zauważyć można fakt wysokiej skuteczności oktenidyny w eradykacji zarówno biofilmu jak i planktonu *E.faecalis* oraz brak różnic w stężeniu chlorheksydydy hamującym wzrost zarówno biofilmu jak i form planktonicznych *P.aeruginosa*. W aspekcie zastosowanego stężenia substancji przeciwdrobnoustrojowej, największą liczbą cząstek aktywnych konieczną do zahamowania wzrostu form planktonicznych i form biofilmowych badanych drobnoustrojów charakteryzował się preparat antyseptyczny zawierający PVP- jod. Dane te znajdują odzwierciedlenie w pracach innych autorów [68].

O istotności zastosowanego modelu badawczego przekonać się można analizując **Zdjęcie 4** oraz **Wykres 18**. Wzmiankowany uprzednio PVP-I, który w badaniach podstawowych cechował się najniższą zdolnością bójczą, uwalniając się z prototypowego opatrunku celulozowego, najskuteczniej hamował wzrost wszystkich badanych drobnoustrojów; z kolei poliheksanidyna cechowała się w tym układzie doświadczalnym najniższą skutecznością.

Podobnie w metodzie określanej akronimem A.D.A.M, stworzonej specjalnie z myślą o ocenie aktywności przeciwbiofilmowej opatrunków aktywnych, najwyższą skutecznością eradykacyjną oraz penetracją przez warstwy agarowe i biofilm cechował się PVP-I [Tab1-4]. Z kolei najniższą penetracją, niezależnie od drobnoustroju tworzącego biofilm, do dysku podstawnego i utworzonego tam biofilmu, cechowała się chlorheksydydy. Co istotne, biofilm z warstw kontaktowych eradykowany był skutecznie przez wszystkie zastosowane w badaniu związki przeciwdrobnoustrojowe. Uzyskane wyniki pozostają w zgodności (w przypadku PVP-I oraz OCT) z danymi prezentowanymi przez innych Autorów [70] (zgodnie z moją najlepszą wiedzą PHMB, CHX oraz G nie były do tej pory badane metodą A.D.A.M.).

Wyniki przedstawione na **Wykresach 19-22** powstały po przeprowadzeniu analiz wykorzystujących zmodyfikowaną metodę A.D.A.M., w której wykorzystano płynne podłoże zawierające obciążnik białkowy lub obciążnik białkowy i glukozę w stężeniu występującym w wysięku ran u pacjentów cierpiących na cukrzycę. Uzyskane wyniki potwierdziły wykazaną w poprzednich analizach wysoką skuteczność uwalnianego z opatrunku BC powidonu jodu (niezależnie od zastosowanego do żywności dodatku). Co więcej, zaobserwowano powtarzający się i istotny statystycznie (K-W test, analiza post hoc Dunneta, $p < 0.5$) trend przejawiający się wyższą skutecznością poliheksanidyny w środowisku zawierającym podwyższone stężenie glukozy. W chwili obecnej nie jestem w stanie wysnuć w oparciu o te dane wiążących wniosków, jednak badania przedstawione w roku 2017 wykazały, że takie podwyższone stężenie cukru w środowisku bytowania bakterii, a szczególnie biofilmu bakteryjnego, przekładać się może na obniżenie pH [71]. Wykazano także, że aktywność bójcza PHMB jest parametrem pH-zależnym [1]. Uzyskane przeze mnie wyniki zdają się potwierdzać te doniesienia.

W ostatnim doświadczeniu wchodzącym w skład moich badań, oceniłam cytotoksyczność substancji uwalniających się z prototypowego opatrunku BC. Wykazałam, że najwyższą cytotoksycznością (korelującą z najniższą przeżywalnością komórek odpowiedzialnych za gojenie się ran) cechuje się PVP-I oraz chlorheksydyna. Wyniki te zdają się potwierdzać tezę, że zdecydowana większość związków aktywnych przeciwdrobnoustrojowo cechuje się także właściwościami niepożądanymi względem komórek pacjenta [30].

7. Wnioski

- **Wytworzone i oczyszczone prototypowe opatrunki z bakteryjnej celulozy wykazują cechy predysponujące je do stosowania w leczeniu zainfekowanych ran przewlekłych**
- **Otrzymane wyniki poddają w wątpliwość zasadność stosowania chlorheksydyny jako substancji aktywnej prototypowego opatrunku z bakteryjnej celulozy**
- **Na podstawie uzyskanych doświadczalnie danych należy wskazać powidon jodu jako substancję z wyboru do impregnacji prototypowych celulozowych opatrunków przeciwdrobnoustrojowych**
- **W pracach doświadczalnych dotyczących eksperymentalnych opatrunków aktywnych o charakterze przeciwdrobnoustrojowym należy wykorzystywać zróżnicowane techniki i metody badawcze w celu uzyskania pełnego spektrum wyników odzwierciedlających złożone interakcje zachodzące między opatrunkiem, środowiskiem rany przewlekłej a biofilmem tworzącym się w jej łożysku**

8. Streszczenie

W swojej pracy podjęłam się oceny *in vitro* przydatności prototypowych opatrunków z bakteryjnej celulozy, wysyconych związkami przeciwdrobnoustrojowymi, do eradykacji biofilmów tworzonych przez mikroorganizmy wywołujące zakażenia ran przewlekłych. Do produkcji opatrunków wykorzystałam niepatogeny szczep *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53524. Uzyskane po 7 dniach hodowli maty celulozowe oczyściłam za pomocą lizy alkalicznej z komórek bakterii i poddałam płukaniu aż do ustabilizowania się pH. Nośnik celulozowy poddałam szeregowi analiz fizyko-chemicznych wykazując jego wysoką chłonność, zdolność do powolnego oddawania wody, strukturę porowatą, zdolność do absorpcji i uwalniania związków przeciwdrobnoustrojowych – oktenidyny, powidonu jodu, chlorheksydyny, poliheksanidyny oraz gentamycyny. Następnie wykazałam znacząco podniesioną tolerancję na wyżej wzmiankowane środki biofilmu tworzonych przez referencyjne szczepy *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterococcus faecalis* w porównaniu do form niezadherowanych (planktonicznych) tych drobnoustrojów. Za pomocą zróżnicowanych technik badawczych (zmodyfikowanej metody dyfuzyjno-krażkowej, metody Antibiofilm Dressing Activity Measurement, analizy aktywności bójczej w podłożu zawierającym obciążniki białkowe oraz podwyższone stężenie cukrów prostych) wykazałam wysoką przydatność PVP-jodu i niską przydatność chlorheksydyny jako substancji uwalnianej z bakteryjnej celulozy do eradykacji biofilmów tworzonych przez *S.aureus*, *P.aeruginosa* oraz *E.faecalis*. Wykazałam też niską cytotoksyczność gentamycyny i wysoką cytotoksyczność chlorheksydyny względem komórek fibroblastów odpowiedzialnych za gojenie się ran przewlekłych. Na podstawie wyników moich badań można stwierdzić, że stosowanie opatrunków z bakteryjnej celulozy wysyconej związkami przeciwdrobnoustrojowymi, szczególnie PVP-jodem, powinno znaleźć zastosowanie w leczeniu infekcji obejmujących rany przewlekłe o różnej etiologii.

Słowa kluczowe: opatrunki z bakteryjnej celulozy, antyseptyki, gentamycyna, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.faecalis*.

9. Abstract

In my work I performed the *in vitro* evaluation of the applicability of prototypical dressings made of bacterial cellulose (BC) saturated with antimicrobial compounds to eradicate biofilms formed by microorganisms causing infections of chronic wounds. For the production of dressings I used non-pathogenic strain referred to as the *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53524. Obtained after 7 days of culturing, mats made of bacterial cellulose were purified using alkaline lysis followed by rinsing in sterile water until pH value stabilization. I subjected BC carrier to a number of physic and chemical analyses demonstrating its high water absorption and release parameters, and porosity which allows to absorb and to release significant amount of antimicrobial compounds - octenidine, povidone iodine, chlorhexidine, poliheksanide and gentamicin. Subsequently I demonstrated a significant tolerance of biofilm formed by the reference strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* to the above-mentioned antimicrobial measures in the comparison to non-adhered planktonic forms of these microorganisms. Using wide spectrum of techniques (modified disc-diffusion method, Antibiofilm Dressing Activity Measurement, analysis including use of medium with high content of protein and sugar) I showed high usefulness of PVP-iodine and the low suitability of chlorhexidine as a substance released from the bacterial cellulose dressing in eradication of *S.aureus*, *P.aeruginosa* and *E.faecalis* biofilms. I have also demonstrated low cytotoxicity of gentamicin and high cytotoxicity of chlorhexidine towards fibroblast cells responsible for chronic wound healing. Based on my results it can be concluded that the use of microbial cellulose dressings saturated with antimicrobial compounds, especially PVP-iodine, may be of high use for treatment of chronic wound infections of various etiologies.

Key words: bacterial cellulose dressings, antiseptics, gentamicin, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E.faecalis*.

Literatura:

1. Kramer A, Dissemmond J, Kim S et al. *Consensus on Wound Antisepsis: Update 2018*. Skin Pharmacol Physiol 2018;31(1):28–58
2. Andersen CJ, Murphy KE, Fernandez ML. *Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity* Adv Nutr 2016; 7(1): 66–75
3. Schachter J., Martel J., et al. *Effects of obesity on depression: A role for inflammation and the gut microbiota*. Brain, Behavior, and Immunity 2018;69: 1-8
4. Bonaz B, Bazin T, Pellissier S. *The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis*. Front Neurosci. 2018; 12: 49
5. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, Gitto E, Arrigo T *Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases*. Int J Mol Sci. 2015; 16(1): 378–400.
6. Ubbink DT, Brölmann FE, Peter M, Vermeulen H: *Evidence-Based Care of Acute Wounds: A Perspective*. Adv Wound Care 2015; 4(5): 286–294
7. Krasowski G: Leczenie ran przewlekłych – cz. I: *Definicja, etiologia, epidemiologia, fizjologia i patofizjologia gojenia się ran*.
http://www.mp.pl/zakrzepica/wytyczneartykuly/artykuly_przegladowe/show.html?id=88117
8. Frykberg RG, Banks J: *Challenges in the Treatment of Chronic Wounds*. Adv Wound Care 2015; 4(9): 560–582
9. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. *Prokaryotes: the unseen majority*. PNAS 1998; 12: 6578–83
10. Łomnicki A: *Ekologia ewolucyjna*. PWN 2013, ISBN 978-83-01-17485-9
11. Bandi C, Sironi M, Damiani G, Magrassi L, Nalepa CA, Laudani U, Sacchi L: *The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites*. Proc Biol Sci. 1995; 22: 293-9
12. Shreiner AB, Kao JY, Young VB: *The gut microbiome in health and in disease*. Curr Opin Gastroenterol. 2015; 31(1): 69–75

13. Dean P, Quitard S, Bulmer DM, Roe AJ, Kenya B: *Cultured enterocytes internalise bacteria across their basolateral surface for, pathogen-inhibitable, trafficking to the apical compartment*. Sci Rep. 2015; 5: 17359
14. Kimberly AB, Maurelli AT: *Evolution of Bacterial Pathogens within the Human Host*. Microbiol Spectr. 2016; 4(1): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0017-2015
15. Fuente-Núñez C, Fernández FRL, Hancock REW: *Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies*. Curr Op Microb 2013; 16:580-589
16. Maric S, Vranes J.: *Characteristics and significance of microbial biofilm formation*. Per Bil 2007; 109:115–121
17. Yong-Gyun J, Jungil Cho, Soo-Kyoung K, Joon-Hee L, Sunghoon K: *Embedded Biofilm, a New Biofilm Model Based on the Embedded Growth of Bacteria*. Appl Environ Microbiol 2017; 81:211–219
18. Bryers JD: *Medical Biofilms*. Biotechnol Bioeng 2008; 100: 1–18
19. Donlan RM: *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*. Emerg Infect Dis. 2002; 8: 881–890
20. Lung Y., Matinlinna P.: *Aspects of silane coupling agents and surface conditioning in dentistry: an overview*. Dent. Mater. 2012, 28; 467 -477
21. Korber R, Lawrence R, Lappin-Scott M and Costerton W: *Growth of microorganisms on surfaces*. Microbial biofilms 1995 (Plant and Microbial Biotechnology research series). University Press, Cambridge UK
22. Poortinga T., Bos R., Busscher J.: *Reversibility of bacterial adhesion at an electrode surface*. Langmuir 2001; 17: 2581 – 2856.
23. Foster TJ, Geoghegan, JA, Ganesh VK, Höök M. *Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microb 2014, 4: 49–62
24. Flemming H Wingender J, Szewzyk U: *Biofilm Highlights; Springer Series on Biofilm* 2008, Vol.5, ISBN 978-3-642-19939-4
25. Lister JL, Horswill AR: *Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal*. Front Cell Infect Microbiol 2014. doi:10.3389/fcimb.2014.00178

26. Wu H, Moser C, Wang HZ, Hoiby N, Song ZJ: *Strategies for combating bacterial biofilm infections*. Int J Oral Sci 2014;7: 1-7
27. Li Y-H, Tian X: *Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms*. Sensors 2012;12:2519-2538
28. Omar A, Wright JB, Schultz G, Burrell R, Nadworny P. *Microbial Biofilms and Chronic Wounds*. Microorganisms 2017;5(1):9. doi:10.3390/microorganisms5010009
29. SZewczyk MT: *Wybrane aspekty leczenia ran przewlekłych*. Przew Lek, 2005;5: 54-60
30. Jawień A, Bartoszewicz M, Przondo-Mordarska A et al.: *Wytyczne postępowania miejscowego i ogólnego w ranach objętych procesem infekcji*. Leczenie Ran, 2012;9(3):59–75
31. Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME, Wolcott BM, Gogokhia L, Costerton JW, Dowd SE: *Chronic wounds and the medical biofilm paradigm*. J Wound Care 2010;19:45-53
32. 7. Jneid J, Cassir N, Schuldiner S et al. *Exploring the Microbiota of Diabetic Foot Infections With Culturomics*. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:282
33. Junka AF, Wojtowicz W, Ząbek A, Krasowski G, Smutnicka D, Bakalorz B, Boruta A, Dziadas M, Młynarz P, Sedghizadeh PP, Bartoszewicz M: *Metabolic profiles of exudates from chronic leg ulcerations*. J.Pharm.Biomed.Anal. 2017;137: 3-22
34. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MD. *Mikrobiologia medyczna*. wyd. 8; red. pol. Anna Przondo-Mordarska. Edra Urban & Partner, Wrocław 2018
35. Szewczyk E.M.: *Diagnostyka Mikrobiologiczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN SA. Warszawa, 2013, 20-30.
36. Begun J, Sifri CD, Goldman S, Calderwood SB, Ausbell FM: *Staphylococcus aureus Virulence Factors Identified by Using a High-Throughput Caenorhabditis elegans-Killing Model*. Infect Immun 2005; 73: 872–877
37. Międzobrodzki J, Małachowa N, Markiewski T, Białecka A, Kasprowicz A. *Różnicowanie izolatów Staphylococcus aureus w oparciu o cechy fenotypowe*. Post Hig Med Dosw 2008; 62: 322-327
38. Messad N, Landraud L, Canivet B, Lina G, Richard JL, Sotto A, Lavigne JP, Lemichez E, *Distribution of edin in Staphylococcus aureus isolated from diabetic foot ulcers*. Clin Microb Infect 2013; 19:243-249

39. O'Connell, DP: *The fibrinogen-binding MSCRAMM (clumping factor) of Staphylococcus aureus has a Ca²⁺-dependent inhibitory site.* J Biol Chem 1998;273: 6821–6829
40. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence.* Front Cell Infect Microbiol 2017;7 doi:10.3389/fcimb.2017.00039
41. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa: New insights into pathogenesis and host defenses.* Pathog Dis. 2013;67:159-173
42. Balasubramanian D, Schneper L, Kumari H, Mathee K: *A dynamic and intricate regulatory network determines Pseudomonas aeruginosa virulence.* Nucleic Acids Res 2013;41:1-20
43. Wei Q, Ma LZ: *Biofilm matrix and its regulation in Pseudomonas aeruginosa.* Int J Mol Sci. 2013;14:20983-21005
44. Irie Y, Borlee BR, O'Connor JR: *Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa.* Proc Natl Acad Sci. 2012;109:20632-20636
45. Hollenbeck BL, Rice LB. *Intrinsic and acquired resistance mechanisms in Enterococcus* Virulence 2012; 3: 421–569
46. Tendolkar PM, Baghadayan AS, Shankar N: *Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century.* Cell Mol Life Sci 2003; 60: 2622-2636
47. Nallapareddy SR, Murray BE: *Role of Serum, a Biological Cue, in Adherence of Enterococcus faecalis to Extracellular Matrix Proteins, Collagen, Fibrinogen, and Fibronectin.* J Infect Dis 2008; 197: 1728–1736
48. Malone M, Swanson T: *Biofilm-based wound care: the importance of debridement in biofilm treatment strategies.* Br J Community Nurs 2017; 22:20-25
49. Bazaliński D, Karnas M, Wołkowicz M i wsp: *Zastosowanie larw Lucilia sericata w oczyszczaniu ran przewlekłych – opis trzech przypadków.* Leczenie Ran 2018;15:153–159
50. Ovens L, Irving S: *Advances in wound cleansing: an integrated approach.* Wounds UK, 2018;14:58–63
51. Biegaj M: *Oktenidyna w leczeniu ran.* Farmacja Współczesna, 2017;10:107–110

52. Kramer A, Müller O, Reichwagen G, Widulle S, Heldt H, Nürnberg P: *Octenidine, Chlorhexidine, Iodine and Iodophores*: Stuttgart, New York: Georg Thieme, 2008
53. Sood A, Tomaselli NL: *Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data*. *Adv Wound Care*, 2014;3:511–529
54. Antolak H, Kręgiel D: *Bakterie kwasu octowego – taksonomia, ekologia oraz wykorzystanie przemysłowe*. *ŻNTJ*, 2015, 4(101), 21–35
55. Junka AF, Fijałkowski K, Ząbek A, Mikołajewicz K, Chodaczek G, Szymczyk P, Smutnicka D, Żywicka A, Sedghizadeh PP, Dziadas M, Młynarz P, Bartoszewicz M: *Correlation between type of alkali rinsing, cytotoxicity of bionanocellulose and presence of metabolites within cellulose membranes*. *Carbohydr Polym* 2017; 157: 371–379
56. Augimeri RV, Varleyand AJ, Strap JL: *Establishing a role for bacterial cellulose in environmental interactions: lessons learned from diverse biofilm – producing Proteobacteria*. *Front Microbiol* 2015; 6: 1–27
57. Lee KY, Buldum G, Mantalaris A, Bismarck A: *More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites*. *Macromol. Biosci* 2014; 14, 10–32
58. Kubiak K., Kalinowska H., Peplińska M., Bielecki S.: *Celuloza bakteryjna jako nanobiomaterial*. *Post Biol Kom* 2009; 36: 85–98
59. Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown RM.: *Microbial cellulose – the natural power to heal wounds*. *Biomaterials* 2006; 27, 145–151
60. Czaja W, Krystynowicz A, Pomorski L, Kołodziejczyk M: *The evaluation of usefulness of microbial cellulose as a wound dressing material*. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent*. 2000; 65, 213–220
61. Zhang L, Mah. TF: *Involvement of a Novel Efflux System in Biofilm-specific Resistance to Antibiotics*. *J Bacteriol*, 2008; 190, 13: 4447-4452
62. Lovering AM, Sunderland J. *Impact of soaking gentamicin-containing collagen implants on potential antimicrobial efficacy*. *Int J Surg*. 2012;10 Suppl 1, 2-4. doi: 10.1016/j.ijssu.2012.05.013.

63. Dydak K, Junka A, Bartoszewicz M. *Zastosowanie bionanocelulozy do celów medycznych. Leczenie Ran* 2017;14, 13-16
64. Kramer A. *Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity*; JAC 2008; 61, 1281-1287
65. Fijałkowski K, Żywicka A, Drozd R, Junka A, Peitler D, Kordas M, Konopacki M, Szymczyk P, Rakoczy R: *Increased water content in bacterial cellulose synthesized under rotating magnetic fields*. Electromagn.Biol.Med. 2017;36, 192-201
66. Morritz S et al. *Active wound dressings based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine*. Int J Pharm 2014; 25,45-55.
67. Żywicka A, Junka A, Szymczyk P, Chodaczek G, Grzesiak J, Sedghizadeh P, Fijałkowski K: *Bacterial cellulose yield increased over 500% by supplementation of medium with vegetable oil*. Carbohydr.Polym 2018; 199: 294-303
68. Junka A, Bartoszewicz M, Smutnicka D, Secewicz A, Szymczyk P: *Efficacy of antiseptics containing povidone-iodine, octenidine dihydrochloride and ethacridine lactate against biofilm formed by Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus measured with the novel biofilm-oriented antiseptics test*. Int Wound J 2014;6:730-734
69. Bartoszewicz M, Rygiel A, Krzemiński M, Przondo-Mordarska A: *Penetracja wybranego antybiotyku i antyseptyku w biofilmie tworzonym na stalowych wszczepach stosowanych w ortopedii = Penetration of a selected antibiotic and antiseptic into a biofilm formed on orthopedic steel implants*. Ortop Traumatol Rehabil 2007;9: 310-318
70. Junka A, Żywicka A, Szymczyk P, Dziadas M, Bartoszewicz M, Fijałkowski K.: *A.D.A.M. test (Antibiofilm Dressing's Activity Measurement) - simple method for evaluating anti-biofilm activity of drug-saturated dressings against wound pathogens*. J Microbiol Methods 2017; 143, 6-12
71. Junka A, Szymczyk P, Ziółkowski G, Karuga-Kuźniewska E, Smutnicka D, Bil-Lula I, Bartoszewicz M, Mahabady S, Sedghizadeh PP: *Bad to the bone: on in vitro and ex vivo microbial biofilm ability to directly destroy colonized bone surfaces without participation of host immunity or osteoclastogenesis*. PLoS One 2017; 12 art.e0169565