



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Wydział Lekarski

ROZPRAWA DOKTORSKA

Wytworzenie i ocena aktywności
przeciwbiofilmowej prototypowego opatrunku
celulozowego o kontrolowanej szybkości
uwalniania substancji
przeciwdrobnoustrojowej

Konrad Pańczak

Pracę wykonano w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii
Farmaceutycznej i Parazytologii

Promotor

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

Wrocław 2019

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. Dynamika ran przewlekłych i ich znaczenie medyczno-ekonomiczne.....	5
2.2. Leczenie zainfekowanych ran przewlekłych w świetle aktualnych wytycznych ogólnopolskich.....	9
2.2.1. Charakterystyka poliheksanidyny, oktenidyny, powidonu jodu chlorheksydyny i gentamycyny.....	12
2.2.2. Opatrunki stosowane w leczeniu ran przewlekłych	15
2.2.2.1. Opatrunki z biocelulozy bakteryjnej.....	19
2.3. Biofilm jako adaptacja drobnoustrojów umożliwiającą im przeżycie w środowisku rany	21
2.4. Charakterystyka drobnoustrojów poddanych badaniu.....	22
3. Cel pracy.....	25
4. Materiały i Metody.....	26
4.1. Użyte szczepy bakteryjne oraz linia eukariotyczna komórek fibroblastów L929.....	26
4.2. Zastosowane substancje przeciwdrobnoustrojowe.....	26
4.3. Wytworzenie nośników celulozowych BC.....	27
4.4. Cechy fizyczne nośników celulozowych	29
4.4.1. Szybkość pochłaniania wody przez nośniki celulozowe niemodyfikowane i modyfikowane.....	29
4.4.2. Zdolność do utrzymania wody przez modyfikowane i niemodyfikowane nośniki BC.....	30
4.4.3. Wysycenie nośników modyfikowanych i niemodyfikowanych antyseptykami i antybiotykiem.....	30

4.4.4 Uwalnianie antyseptyków i antybiotyku z niemodyfikowanych i modyfikowanych nośników BC.....	31
4.5. Określenie Minimalnego Stężenia Hamującego (MIC) antyseptyków i antybiotyków względem analizowanych szczepów bakteryjnych.....	31
4.6. Wyznaczenie Minimalnego Stężenia Eradykującego Biofilm (MBEC) antyseptyków i antybiotyku względem analizowanych szczepów bakteryjnych	32
4.7. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej substancji uwalniających się nośników celulozowych celulozowego z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody dyfuzyjno-krażkowejdyfuzijnokrażkowej.....	33
4.8. Określenie aktywności przeciwbiofilmowej badanych nośników celulozowych zawierających środki przeciwdrobnoustrojowe z użyciem metody Antimicrobial Dressing Activity Measurement	34
4.9. Określenie aktywności przeciwbiofilmowej badanych nośników celulozowych zawierających środki przeciwdrobnoustrojowe z użyciem zmodyfikowanej metody Antimicrobial Dressing Activity Measurement	37
4.10. Obrazowanie nośników celulozowych za pomocą Skaningowej Mikroskopii Elektronowej	39
4.11. Ocena cytotoksyczności nośników BC i użytych substancji przeciwdrobnoustrojowych względem linii fibroblastów L929.....	40
4.12. Analiza statystyczna.....	41
5. Wyniki.....	42
6. Dyskusja.....	91
7. Wnioski.....	103
8. Streszczenie.....	104
9. Abstract.....	105
120. Literatura.....	106

1. SPIS RYCIN, ZDJĘĆ, WYKRESÓW I TABELI

Rycina 1. Wzory strukturalne poliheksanidyny, oktenidyny, powidonu jodu, chlorheksydydny i gentamycyny	[Str. 12]
Rycina 2. Schemat wykonania metody A.D.A.M.	[Str. 36]
Rycina 3. Zasada działania zmodyfikowanego testu A.D.A.M.	[Str.39]
Zdjęcie 1. Wygląd i cechy makroskopowe wytworzonych nośników celulozowych	[Str. 60]
Zdjęcie 2. Mikrostruktura wytworzonych nośników celulozowych	[Str. 61]
Zdjęcie 3. Strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów dookoła poszczególnych typów nośników BC	[Str. 75]
Wykres 1. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu eradykujące biofilm <i>S.aureus</i> ATTC 6538.	[Str. 43]
Wykres 2. Minimalne Stężenie chlorheksydydny i gentamycyny Eradykujące Biofilm <i>S.aureus</i> ATCC 6538	[Str. 44]
Wykres 3. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu hamujące wzrost <i>S.aureus</i> ATTC 6538	[Str. 45]
Wykres 4. Minimalne stężenia chlorheksydydny i gentamycyny hamujące wzrost <i>S.aureus</i> ATTC 6538	[Str. 46]
Wykres 5. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu eradykujące biofilm <i>S.aureus</i> ATTC 33591	[Str. 47]
Wykres 6. Minimalne Stężenie chlorheksydydny i gentamycyny Eradykujące Biofilm <i>S.aureus</i> ATCC 33591	[Str. 48]
Wykres 7. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu hamujące wzrost <i>S.aureus</i> ATTC 3351	[Str. 49]
Wykres 8. Minimalne stężenia chlorheksydydny i gentamycyny hamujące wzrost <i>S.aureus</i> ATTC 3351	[Str. 50]

Wykres 9. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu eradykujące biofilm <i>P.aeruginosa</i> ATTC 15442	[Str. 51]
Wykres 10. Minimalne Stężenie chlorheksydydny i gentamycyny Eradykujące Biofilm <i>P.aeruginosa</i> ATTC 15442	[Str. 52]
Wykres 11. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu hamujące wzrost <i>P.aeruginosa</i> ATTC 15442	[Str. 53]
Wykres 12. Minimalne stężenia chlorheksydydny i gentamycyny hamujące wzrost <i>E. faecalis</i> ATTC 29212	[Str. 54]
Wykres 13. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu eradykujące biofilm <i>E. faecalis</i> ATTC 29212	[Str. 55]
Wykres 14. Minimalne Stężenie chlorheksydydny i gentamycyny Eradykujące Biofilm <i>E. faecalis</i> ATTC 29212	[Str. 56]
Wykres 15. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu hamujące wzrost <i>E. faecalis</i> ATTC 29212	[Str. 57]
Wykres 16. Minimalne stężenia chlorheksydydny i gentamycyny hamujące wzrost <i>E. faecalis</i> ATTC 29212	[Str. 58]
Wykres 17 . Porównanie różnic w mokrej masie wytworzonych nośników celulozowych	[Str. 62]
Wykres 18. Porównanie różnic w suchej masie wytworzonych nośników celulozowych	[Str. 63]
Wykres 19. Porównanie szybkości pochłaniania wody i badanych środków przeciwdrobnoustrojowych przez wytworzone nośniki	[Str. 66]
Wykres 20. Różnice w wartości parametru zdolności do utrzymania wody przez uzyskane typy nośników	[Str. 67]

Wykres 21. Uwalnianie badanych związków przeciwdrobnoustrojowych w czasie z nośników celulozowych [Str. 70]

Wykres 22. Uwalnianie specyficznego związku przeciwdrobnoustrojowego z nośników celulozowych [Str. 72]

Wykres 23. [%] redukcja biofilmu badanych szczepów na skutek aktywności przeciwdrobnoustrojowej poliheksanidyny wydzielającej się z poszczególnych typów nośników [Str. 86]

Wykres 24. [%] redukcja biofilmu badanych szczepów na skutek aktywności przeciwdrobnoustrojowej powidonu jodu wydzielającego się z poszczególnych typów nośników [Str. 87]

Wykres 25. [%] redukcja biofilmu badanych szczepów na skutek aktywności przeciwdrobnoustrojowej gentamycyny wydzielającej się z poszczególnych typów nośników [Str. 88]

Wykres 26. [%] przeżywalność linii komórkowej fibroblastów poddanych hodowli w obecności medium inkubowanego uprzednio w obecności nośników celulozowych [Str. 89]

Wykres 27. [%] przeżywalność linii komórkowej fibroblastów poddanych działaniu analizowanych substancji przeciwdrobnoustrojowych [Str. 90]

Tabela 1. Wartości MIC i MBEC zastosowanych środków przeciwdrobnoustrojowych względem badanych szczepów drobnoustrojów w formie planktonicznej oraz biofilmowej [Str. 42]

Tabela 2. Porównanie wielkości stref zahamowania dookoła niemodyfikowanych, nasyconych związkami przeciwdrobnoustrojowymi, nośników BC [Str. 76]

Tabela 3. . Porównanie wielkości stref zahamowania dookoła modyfikowanych, nasyconych związkami przeciwdrobnoustrojowymi, nośników BC [Str. 77]

Tabela 4. Redukcja biofilmu *E.faecalis* 2912 oceniana za pomocą testu A.D.A.M. [Str. 79]

Tabela 5. Redukcja biofilmu *S.aureus* 6538 oceniana za pomocą testu A.D.A.M. [Str. 81]

Tabela 6. Redukcja biofilmu *S.aureus* 33591 oceniana za pomocą testu A.D.A.M. [Str. 83]

Tabela 7. Redukcja biofilmu *P.aeruginosa* 15442 oceniana za pomocą testu A.D.A.M.

[Str. 85]

2. WSTĘP

2.1. Dynamika ran przewlekłych i ich znaczenie medyczno-ekonomiczne

Mianem **rany** określamy przerwanie ciągłości skóry i błon śluzowych z obecnością uszkodzonych komórek oraz zniszczonych bądź zmienionych chorobowo tkanek. Przerwanie ciągłości obejmować może jednak nie tylko skórę, ale także tkanki położone głębiej: tkanki podskórne, powięź czy mięśnie. W przypadku ran penetrujących, głębokość uszkodzenia sięgać może do jam ciała i obejmować także narządy wewnętrzne i kości. Ze względu na przyczynę i czas trwania uszkodzenia rozróżnić można **rany ostre i przewlekłe** [1].

Rana ostra to uraz będący wynikiem zdarzenia traumatycznego (np. rany mechaniczne, postrzałowe, termiczne, powstałe na skutek ekspozycji na promieniowanie, wysoką/niską temperaturę, działanie żrących substancji chemicznych) lub działania chirurgicznego. Rany ostre goją się zazwyczaj w czasie do 8 tygodni (oczywiście czynnikiem wpływającym bezpośrednio na czas gojenia jest wielkość rany oraz ryzyko powikłań infekcyjnych), a sam proces gojenia przebiega według prawidłowej trajektorii obejmującej kolejno nachodzące na siebie procesy regeneracyjne prowadzące finalnie do zasklepienia się nieciągłości i powstania zbliznowacenia [2].

Natomiast rany przewlekłe są wynikiem choroby lub chorób współtowarzyszących, szczególnie tych, które upośledzają pracę układu immunologicznego i wydolność układu krążenia oraz jego sprawność angiogenetyczną. Gojenie tego typu ran nie przebiega według prawidłowej trajektorii, a przy braku wdrożenia odpowiedniego typu leczenia, zazwyczaj nie dochodzi do samoistnego (przeprowadzonego siłami organizmu) zasklepienia się rany [3].

Prawidłowe gojenie się ran jest dynamicznym i złożonym procesem regeneracji tkanek przechodzącym przez cztery kolejne etapy [4]:

(1) fazę wykrzepiania i hemostazy, do której dochodzi bezpośrednio po urazie.

(2) fazę zapalną rozpoczynającą się w ciągu pierwszych godzin od uszkodzenia tkanki.

Podczas fazy zapalnej dochodzi do powstania obrzęku, zaczerwienienia, a na poziomie biochemicznym, w łożysku rany wykrywane jest zazwyczaj wysokie stężenie mediatorów stanu zapalnego.

(3) fazę proliferacji, podczas której powstają nowe tkanki (ziarnina) i naczynia krwionośne.

(4) fazę epitelializacji, podczas której zachodzi przebudowa tkanek powstałych w fazie proliferacji.

Fazy te, w ranie ostrej, zachodzą w sposób uporządkowany i kaskadowy, natomiast w ranie przewlekłej, zazwyczaj na etapie fazy zapalnej dochodzi do zaburzenia fizjologicznego procesu gojenia i zatrzymania go na skutek wysokiego stężenia metaloproteinaz, cytokin i interleukin prozapalnych, upośledzenia tworzenia nowych naczyń krwionośnych oraz obecności drobnoustrojów, które dodatkowo indukują uwalnianie przez komórki efektorowe układu immunologicznego czynników prozapalnych [4]. W efekcie dochodzi do zatrzymania się procesu gojenia i przejście rany w stan niegojący się (chroniczny, przewlekły). Długotrwałe pozostawianie rany w stanie przewlekłym sprzyja jej kolonizacji przez drobnoustroje, dlatego też wszystkie rany przewlekłe można określić mianem ran zagrożonych ryzykiem infekcji [5]. Biorąc pod uwagę cechy wirulencji drobnoustrojów (opisane w sposób szczegółowy w dalszej części niniejszej pracy) szczególnie często zasiedlających łożysko rany, oczywistym staje się fakt, że stan ran przewlekłych, które uległy infekcji, nie tylko nie poprawia się, ale wręcz dochodzi do jego pogorszenia przejawiającego się między innymi

powiększeniem obszaru i głębokości rany. W skrajnych przypadkach, gdy rana ulegnie zakażeniu przez drobnoustroje charakteryzujące się wysoką zdolnością rozkładu tkanek (do czego mikroorganizmy wykorzystują między innymi enzymy: elastazy, proteiny, kolagenazy, lipazy), dochodzi do zajęcia infekcyjnego głębiej położonych tkanek. Jednakże należy zauważyć, że już sama obecność drobnoustrojów w ranie jest czynnikiem podnoszącym ryzyko zajęcia infekcyjnego jałowych z definicji obszarów organizmu pacjenta, do czego dochodzi z wykorzystaniem drogi krwi [5].

Rany przewlekłe można podzielić na następujące typy [6]:

1. owrzodzenia żyłne goleni,
2. owrzodzenia tętnicze goleni,
3. owrzodzenia goleni żylna-tętnicze (etiologia mieszana),
4. odleżyny,
5. rozległe rany oparzeniowe,
6. zespół stopy cukrzycowej

Obecnie zaczynamy dopiero poznawać złożone interakcje między organizmem pacjenta a drobnoustrojami, zachodzące na poziomie komórkowym i biochemicznym, które przekładają się na zagojenie rany lub jej przejście w stan przewlekły.

Należy mieć świadomość, że już sama analiza zależności między określonymi stężeniami specyficznych cytokin i metaloproteinaz produkowanych przez chorego, a procesem stymulacji sekrecji składników błony podstawnej, nasilenia stanu zapalnego lub tworzenia tkanki ziarninowej jest zadaniem wymagającym nie tylko zebrania olbrzymiej liczby danych, ale i ich analizy za pomocą najsilniejszych technik statystycznych i chemometrycznych; wprowadzenie do tych równań efektów wywoływanych przez drobnoustroje - mając na uwadze olbrzymią liczbę gatunków

mogących infekować rany czy zróżnicowanie ich czynników wirulencji – jest, zgodnie z przewidywaniami, zadaniem wymagającym zastosowania superkomputerów klastrowych następnej generacji, które obecnie znajdują się dopiero w fazie prototypowej.

Należy zdać sobie sprawę z wagi problemu, jaką stanowią rany przewlekłe, szczególnie te, w których dochodzi do powikłania procesem infekcyjnym. Szacuje się, że 5% budżetów zdrowotnych wysoko rozwiniętych krajów Unii Europejskiej pochłaniana jest przez walkę z ranami przewlekłymi (w tym ranami przewlekłymi zakażonymi) [7]. Obciążenia będące efektem ran przewlekłych dla budżetów państwowych, innych niż zdrowotne, są ciężkie do oceny, jednakże z pewnością istotne.

Pacjenci z ranami przewlekłymi doświadczają często wykluczenia ekonomicznego, które związane jest z ich ograniczoną mobilnością (a co za tym idzie ograniczoną zdolnością do świadczenia pracy) oraz wykluczenia socjalnego (na przykład na skutek brzydkiego zapachu wydobywającego się z rany). Osoba z raną przewlekłą wymaga często (a biorąc pod uwagę moje doświadczenie praktyczne należałoby napisać - zazwyczaj) w procesie leczenia zaangażowania innych członków rodziny lub zespołu pielęgniarskiego do przemywania rany czy zmian opatrunków. Przede wszystkim jednak pacjenci z ranami przewlekłymi borykać muszą się z bólem i ciągłą, często wieloletnią, świadomością zagrożenia ich zdrowia, a nawet życia, co przekłada się na częste wśród tej grupy pacjentów długotrwałe obniżenie samopoczucia, przeradzające się nierzadko w stany depresyjne wymagające leczenia psychiatrycznego oraz farmakologicznego [8].

Dlatego opracowanie skutecznych metod leczenia ran przewlekłych, szczególnie tych objętych procesem infekcyjnym, jest działaniem wymaganym i koniecznym nie tylko

dla odciążenia budżetów zdrowotnych, ale przede wszystkim dla zapewnienia pacjentom możliwości bezpiecznego i godnego życia.

2.2. Leczenie zainfekowanych ran przewlekłych w świetle aktualnych wytycznych ogólnopolskich

Aktualne ogólnopolskie wytyczne, opublikowane przez wielośrodkową grupę ekspertów skupionych wokół Towarzystwa Leczenia Ran oraz Towarzystwa Mikrobiologii Klinicznej, wyróżniają cztery filary prawidłowego leczenia ran [9]. Są nimi:

- 1) antybiotykoterapia ogólnoustrojowa
- 2) debridement (oczyszczenie rany)
- 2) lawaseptyka i antyseptyka
- 3) zastosowanie opatrunków aktywnych przeciwdrobnoustrojowo

W świetle wytycznych, warunkiem koniecznym do uznania rany za zakażoną i poprzedzającym wykonanie wyżej wymienionych środków terapeutycznych powinno być wyizolowanie za pomocą metod mikrobiologicznych czynnika etiologicznego infekcji i określenie jego lekowrażliwości. W przypadku braku możliwości wykonania szybkiej diagnostyki mikrobiologicznej i konieczności podjęcia natychmiastowego działania, wytyczne zalecają zastosowanie oceny stanu zagrożenia rany infekcją za pomocą algorytmu W.A.R. [ang. wounds at risk] [5] bądź innego, ekwiwalentnego systemu klinicznej oceny stanu mikrobiologicznego rany.

Jeśli, na podstawie wyników badań mikrobiologicznych bądź parametrów klinicznych, rana uznana zostanie za zakażoną, zaleca się podjęcie antybiotykoterapii celowanej (w

pierwszym z powyższych przypadków) bądź empirycznej (w drugim z powyższych przypadków), do czasu uzyskania wyników oceny lekowrażliwości drobnoustroju oraz rozpoczęcie procedury debridementu.

Debridement lub oczyszczenie rany jest techniką mającą na celu uzyskania czystego i podatnego na leczenie łożyska rany dzięki usunięciu z niego zaburzających proces gojenia czynników endogennych - wysięku, złogów tkanki nekrotycznej i fibryny oraz biofilmu tworzonego przez drobnoustroje a także, jeśli występują, takich czynników egzogennych jak pozostałości opatrunków (włókna, fragmenty poliadsorbentu), czy fragmentów włóknistych pochodzących np. z prześcieradła czy ubioru pacjenta, a także gleby i wszystkich innych elementów (ciał) obcych [10].

Obecnie najczęściej stosowaną techniką debridementu jest oczyszczenie chirurgiczne polegające na usunięciu tkanek nekrotycznych, fibryny, tkanek zmienionych na skutek aktywności drobnoustrojów za pomocą narzędzi chirurgicznych. Coraz częściej stosowane są jednak, jako techniki mniej inwazyjne, metody oczyszczania enzymatycznego wykorzystujące enzymy proteoliczne powodujące upłynnienie martwych tkanek bądź wysoko skuteczna larwoterapia, która z wykorzystaniem larw muchy *Lucilia sericata* prowadzi nie tylko do usunięcia zmienionych chorobowo tkanek, ale także jest skuteczna w procesie eradykacji biofilmu tworzonych przez drobnoustroje [11].

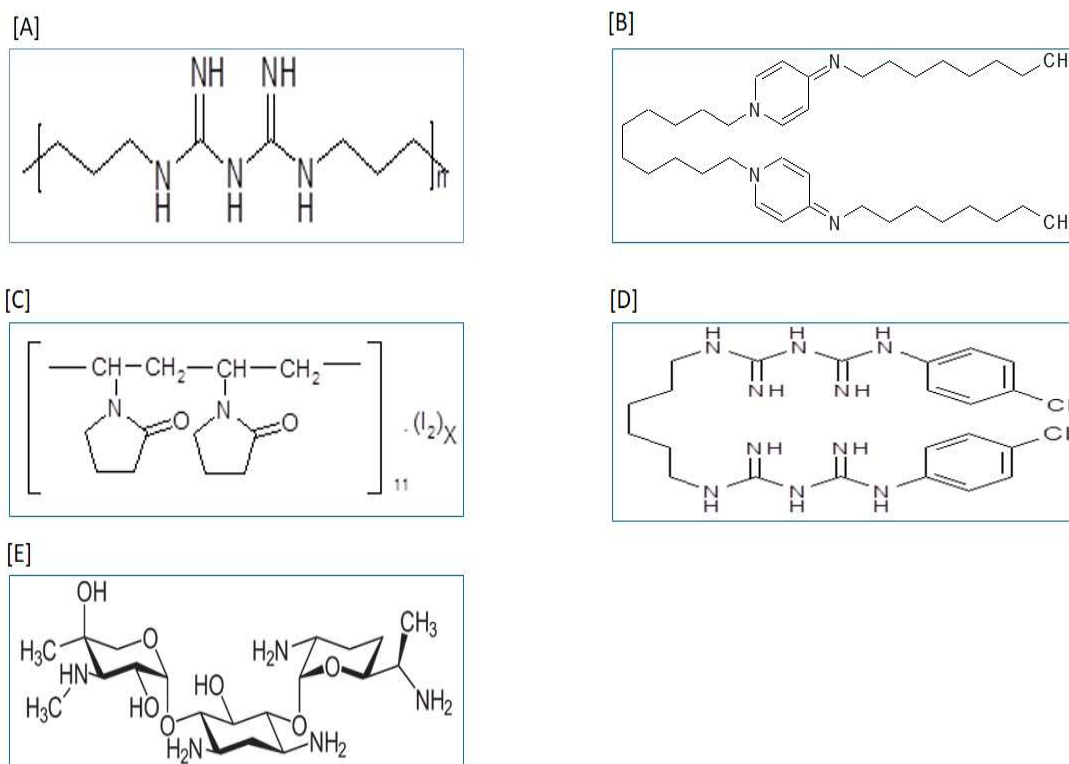
Osobną, nową i intensywnie rozwijaną techniką debridementu jest zastosowanie opatrunków oczyszczających charakteryzujących się zdolnością do pochłaniania wysięków, sekwestracji drobnoustrojów oraz do pobudzania ran do ziarninowania [12].

Drugim z filarów leczenia/opieki nad raną wyróżnionym w aktualnych ogólnopolskich wytycznych jest stosowanie preparatów płynnych zdolnych do mechanicznego wypłukania z rany pozostałości po wykonaniu debridementu lub/oraz do eradykacji drobnoustrojów w formie biofilmowej infekujących ranę. W teorii, preparaty zawierające środki powierzchniowo czynne a nie zawierające środków przeciwdrobnoustrojowych nazywane są **lawaseptykami**, a preparaty zawierające miejscowe środki przeciwdrobnoustrojowe nazywane są **antyseptykami** [6].

Jednak w praktyce znacząca część lawaseptyków zawiera w swym składzie miejscowo działające środki przeciwdrobnoustrojowe, których obecność warunkuje utrzymanie jałowości (konserwację) lawaseptyku, a znaczna część antyseptyków zawiera w swym składzie środki powierzchniowo czynne, ponieważ umożliwiają one substancjom przeciwdrobnoustrojowym penetrację w głąb złogów martwicy i włókniaka oraz skuteczną eradykację znajdującego się pod nimi biofilmu. Rozróżnienie tych dwóch rodzajów preparatów płynnych do stosowania na ranę utrudnione jest dodatkowo na skutek obwarowań prawnych dzielących poszczególne grupy produktów na wyroby medyczne lub leki [13, 14, 15]. Do pożądaných cech wyrobów tego typu należy brak cytotoksyczności (w przypadku lawaseptyków) bądź bardzo niska cytotoksyczność (w przypadku antyseptyków), bardzo niskie napięcie powierzchniowe, zgodność farmaceutyczna z opatrunkami oraz, w przypadku antyseptyków, wysoka siła bójcza i zdolność do penetracji w głąb warstw biofilmu [16]. Substancjami przeciwdrobnoustrojowymi stosowanymi powszechnie w obu typach preparatów (jakkolwiek w różnych stężeniach) są dwuchlorek oktenidyny (OCT), poliheksanidyna (PHMB), powidon jodu (PVP-I) oraz chlorheksydyna (CHX). Wyżej wymienione substancje wykorzystałem w niniejszej pracy do impregnacji wytworzonych przeze mnie prototypowych opatrunków celulozowych, dlatego w poniższej części manuskryptu, przybliżę charakterystykę każdej z nich. Dodatkowo, z powodów przedstawionych w sposób bardziej szczegółowy w kolejnym podrozdziale,

dokonałem zwięzłej charakterystyki jedyne go antybiotyku mogącego być stosowanym w miejscowym leczeniu ran, mianowicie gentamycyny, którą także zastosowałem w badaniach nad stworzeniem prototypowego opatrunku celulozowego służącego do zwalczania zakażeń wywołanych przez biofilmy tworzone przez drobnoustroje izolowane z ran przewlekłych.

2.2.1. Charakterystyka poliheksanidyny, oktenidyny, powidonu jodu chlorheksydyny i gentamycyny



Rycina 1. Wzory strukturalne poliheksanidyny, oktenidyny, powidonu jodu, chlorheksydyny, gentamycyny. A – poliheksanidyna, B – oktenidyna, C – powidon jodu, D – chlorheksydyna, E – gentamycyna

Poliheksanidyna [PHMB] [17] to mieszanina polimerów syntetycznych, których budowa chemiczna i strukturalna zbliżona jest do małych peptydów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych wytwarzanych przez komórki przyranne oraz neutrofile. PHMB oddziałuje selektywnie, uszkodzając komponenty cytoplazmy, ściany drobnoustrojów oraz prowadząc do degradacji ich DNA.

Spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej poliheksanidyny obejmuje bakterie Gram (-) i Gram (+) (ich formy planktoniczne oraz biofilmowe); a także bakterie, które rozwinęły zdolność wnikania i namnażania się wewnątrz komórek eukariotycznych; PHMB oddziałuje także bójczo na grzyby drożdżopodobne oraz strzępkowe, a także na wybrane gatunki wirusów ssaczycy, w tym na ludzki wirus niedoboru odporności (ang. HIV, Human Immunodeficiency Virus).

Oktenidyna, dwuchlorek oktenidyny [OCT] [18], której pełna nazwa chemiczna to (N,N'-(1,10 dekanediyl-di-1[4H]-pyridinyl-4-lideno) bis-(1-oktanamino) dwuchlorowodorek), jest bispirymidyną posiadającą dwa kationowe centra aktywne umiejscowione na równoległe zorientowanych końcach łańcucha sacharydowego o charakterze hydrofobowym. Mechanizm działania OCT, podobnie jak w przypadku PHMB, opiera się na wiązaniu z ujemnie naładowaną ścianą komórkową bakterii i zakłóceniu jej integralności a następnie funkcjonalności. Prowadzi to do śmiertelnego dla bakterii wycieku komponentów cytoplazmy z komórki do środowiska. Spektrum aktywności dwuchlorowodoru oktenidyny jest bardzo szerokie i obejmuje bakterie Gram(-) oraz Gram(+) (jakkolwiek nie obejmuje przetrwalników bakteryjnych), a także grzyby i wirusy bezotoczkowe.

Powidon jodu (PVP-I) [19] to złożona strukturalnie cząsteczka chemiczna składająca się z nośnika, poliwinylpirolidonu (powidonu), stabilizującego cząsteczkę aktywną przeciwdrobnoustrojową, jaką jest jod. Mechanizm działania powidonu jodu opiera się na uwalnianiu tego pierwiastka z nośnika w roztworach wodnych i utlenianiu aminokwasów

bakteryjnych, tworzeniu destabilizujących aktywność ściany komórkowych mostków dwusiarczkowych oraz zaburzaniu struktury trzecio- i czwartorzędową białek drobnoustrojów, co przekłada się na ich denaturację i śmierć mikroorganizmu. Jod wykazuje także zdolność do wiązania się z nukleotydami tworzącymi DNA i RNA bakterii, co zaburza proces replikacji i translacji wewnątrzkomórkowych. Jod posiada również zdolność do wiązania się resztami lipidowymi ścian komórkowych drobnoustrojów i, podobnie jak ma to miejsce w przypadku PHMB oraz OCT, do zwiększenia ich przepuszczalności, a w efekcie do wycieku komponentów komórkowych do środowiska zewnętrznego. Spektrum aktywności PVP-I jest bardzo szerokie i obejmuje zarówno bakterie Gram (-), Gram (+), przetrwalniki bakteryjne, mykobakterie, grzyby i ich zarodniki, a także wirusy, pasożyty i pierwotniaki. Niedogodnością w stosowaniu jodu w leczeniu ran jest jego skłonność do wiązania się z białkami wysięku i elementami morfotycznymi krwi, co prowadzi do obniżenia aktywnego przeciwdrobnoustrojowo stężenia tego antyseptyku w ranie, oraz możliwość przenikania jodu pierwiastkowego do organizmu pacjenta i odkładania się np. w tarczycy.

Chlorheksydyna [20], której pełna nazwa chemiczna to 1,1'-heksametylen-bid (5-[p-chlorfenyl] biguanid, [CHX] jest zmodyfikowaną biguanidyną sprzężoną zazwyczaj z glukonianem bądź octanem. Podobnie jak w przypadku oktenidyny i poliheksanidyny, mechanizm aktywności przeciwdrobnoustrojowej polega na zdolności tej molekuły do łączenia się i uszkodzaniu ścian komórkowych. Prowadzi to do wycieku komponentów cytoplazmy do środowiska zewnętrznego i śmierci drobnoustrojów. Chlorheksydyna jest w stanie łączyć się z DNA drobnoustrojów i zaburzać jego funkcjonalność. Spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej chlorheksydyny jest względnie szerokie i obejmuje bakterie Gram (+), bakterie Gram (-), grzyby, wirusy otoczkowe i pierwotniaki. Chlorheksydyna nie jest aktywna względem przetrwalników bakteryjnych. Niedogodnością płynącą ze stosowania CHX jest możliwość jej rozkładu do rakotwórczej chloroaniliny a także indukcja oporności

drobnoustrojów na antybiotyki na skutek aktywacji tak zwanych niespecyficznych pomp effluksowych wyrzucających chlorheksydynę z cytoplazmy bakterii (raz aktywowane pompy effluksowe, wyrzucają z wnętrza komórki nie tylko CHX, ale także szerokie spektrum antybiotyków).

Gentamycyna [21] to antybiotyk aminoglikozydowy stosowany powszechnie w leczeniu ciężkich zakażeń, w tym ran oraz kości. W świetle aktualnych wytycznych, gentamycyna jest jedynym antybiotykiem, który może być stosowany miejscowo w leczeniu ran, jeśli znajduje się w kolagenowym nośniku (tak zwana gąbka garamycynowa). Przyczyną tego stanu rzeczy są liczne doniesienia płynące zarówno z zakresu nauk podstawowych, jak i klinicznych wykazujących, że lokalna aplikacja gentamycyny w postaci gąbki nie prowadzi do uwalniania antybiotyku w zbyt niskich stężeniach oraz nie wywołuje efektów cytotoksycznych a jej stosowanie przekłada się na satysfakcjonujące efekty w walce z biofilmami (szczególnie gronkowca złocistego oraz pałeczki ropy błękitnej) infekującymi rany przewlekłe.

2.2.2. Opatrunki stosowane w leczeniu ran przewlekłych

Opatrunki stosowane są do leczenia ran od zarania cywilizacji. Jakkolwiek starożytni Grecy uważali (nie bez pewnych racji), że rana sucha i odkryta goi się szybciej niż rana wilgotna i zakryta opatrunkiem, to Egipcjanie już blisko 3 tysiące lat temu zalecali stosowanie i przykrywanie rany liśćmi z roślin o zaobserwowanych empirycznie właściwościach gojących lub sztabkami zawierającymi miedź [22]. W późniejszych czasach także Grecy zrewidowali swoje podejście przykrywając rany o dużej powierzchni opatrunkiem z wygotowanej w wodzie lub winie wełny. Od czasów Starożytności podejście do stosowania opatrunków, szczególnie opatrunków aktywnych przeciwdrobnoustrojowych, ewoluowało wraz z pogłębianiem się naszej wiedzy o procesach zachodzących w ranach a także w raz z naszym pogłębiającym się zrozumieniem roli, jaką w procesie gojenia się rany odgrywa biofilm bakteryjny. Obecnie

istniejące zasady doboru opatrunku opierają się (na naszym kontynencie) na opracowanym przez Europejskie Towarzystwo Leczenia RAN (ang. European Wound Management Association) algorytmie o akronimie T.I.M.E [23], którego rozwinięcie to:

- T (ang. tissue debridement) – opracowanie tkanek;
- I (ang. infection and inflammation control) – kontrola infekcji i cech stanu zapalnego;
- M (ang. moisture balance) – utrzymywanie odpowiedniego poziomu wilgoci w ranie;
- E (ang. edges, epithelialization stimulation) – opracowanie brzegów rany i stymulacja naskórkowania.

W aspekcie stosowania opatrunków aktywnych, kluczowe są elementy „I” oraz „M” algorytmu. Zrozumienie, że zachowanie odpowiedniego poziomu wilgoci w ranie (a nie jej przesuszanie) jest warunkiem koniecznym do szybkiego wygojenia było jednym z najistotniejszych przełomów w leczeniu ran w czasie ostatnich kilkunastu lat, natomiast rozwój technologii umożliwiający wytwarzanie opatrunków cechujących się ukierunkowanym, kontrolowanym uwalnianiem silnie działających związków przeciwdrobnoustrojowych, pozwolił na szybsze i skuteczniejsze zwalczanie toczącej się w ranie infekcji. Zadaniem opatrunków aplikowanych na rany zagrożone infekcją jest hamowanie rozwoju drobnoustrojów i ich negatywnego wpływu na proces gojenia ran, sekwestracja nadmiernej objętości wysięku oraz niwelowanie brzydkiego zapachu wydobywającego się z rany. Obecnie lekarz praktyk zajmujący się leczeniem ran przewlekłych ma do dyspozycji dziesiątki opatrunków przeznaczonych do różnego rodzaju ran przewlekłych. W poniższej części pracy podjąłem się zwięzłej próby ich klasyfikacji, która – poza oczywistym elementem poznawczym – służyć ma umiejscowieniu i oznaczeniu funkcjonalności prototypowych opatrunków z biocelulozy, które po wytworzeniu poddałem ocenie przedstawionej w części „Wyniki” niniejszego manuskryptu.

W naszym kraju, prawdopodobnie z przyczyn ekonomicznych, w dalszym ciągu do okładzin ran przewlekłych (mimo licznych przeciwwskazań) stosowane są tak zwane **opatrunki tradycyjne**, występujące w postaci kompresów z gazy bądź bawełny. Ich właściwości pochłaniania wysięku oraz zdolność do utrzymania płynu są wysoce ograniczone. Co więcej, zmiana opatrunku tego typu prowadzić może do uszkodzeń ziarniny i spowolnienia procesu gojenia [24].

Z kolei do nowoczesnych **opatrunków aktywnych** zaliczane są między innymi wytworzone z karboksymetylocelulozy opatrunki **hydrowłókniste**, zdolne do szybkiego pochłaniania i utrzymania wysięku we wnętrzu swojej struktury. W kontakcie z wysiękiem, opatrunki tego typu przechodzą w formę żelową, zapewniającą odpowiedni poziom wilgoci oraz relatywnie wysoki stopień wymiany gazowej. Niedogodnością wynikającą ze stosowania opatrunków hydrowłóknistych jest konieczność zabezpieczenia ich opatrunkiem wtórnym [25].

Opatrunki hydrożelowe to okładziny na ranę zbudowane z polimerów żelatyny i polisacharydów przeplatanych polimerami poliakrylamidowymi. W kontakcie z płynem z rany, opatrunki tego typu pęcznieją. Korzyścią płynącą z ich stosowania jest przyspieszenie procesu oczyszczenia samoistnego (autolizy) rany. Także opatrunki hydrożelowe wymagają zabezpieczenia w postaci opatrunku wtórnego, stosowane są przede wszystkim do opieki nad ranami suchymi i wytwarzającymi małe objętości wysięku [26].

Opatrunki hydrokoloidowe to okłady zawierające część aktywną koloidalną, przylegającą bezpośrednio do rany oraz zewnętrznej warstwy polietylenowej pełniącej rolę opatrunku wtórnego. Podobnie jak opatrunki hydrożelowe, także hydrokoloid przyspiesza proces autolizy, dodatkowo stymuluje on tworzenie nowych naczyń krwionośnych w ranie i proliferację komórek ziarninujących i epitelializujących. Opatrunki hydrokoloidowe stosowane są do ran charakteryzujących się umiarkowanym i obfitym wysiękiem. Badania kliniczne nie

potwierdzają przydatności tego typu opatrunków do stosowania na rany suche i objęte procesem infekcji [27].

Opatrunki alginianowe są wytwarzane z polisacharydów produkowanych przez brunatnice. Okłady te charakteryzują się wysoką zdolnością do absorpcji wysięku (co wywołuje ich żelowanie) oraz do sekwestracji tego płynu z rany. Dodatkową korzyścią płynącą z ich stosowania jest zdolność do hamowania krwawienia i przyspieszenia procesu krzepnięcia krwi. Opatrunki alginianowe stosowane są do ran o umiarkowanym oraz obfitym wysięku. Wymagają założenia opatrunku wtórnego [28].

Opatrunki piankowe tworzone są z poliuretanu, materiału charakteryzującego się bardzo wysoką chłonnością. Z racji swych właściwości materiałowych, opatrunki piankowe nadają się do stosowania jedynie na rany wysiękujące (ich stosowanie na rany suche może prowadzić do wystąpienia efektów niepożądanych) [29].

Opatrunki lipidokoloidowe TLC (ang. *technology lipido-colloid*) są zbudowane z warstwy poliakrylanu oraz warstwy lipidokoloidowej (karboksymetylocelulozy rozproszonej w lipofilnej warstwie petrolatum). Podobnie jak opatrunki hydrowłókniste i hydrokoloidalne, opatrunek typu TLC wytwarza przy kontakcie z płynami z rany żel charakteryzujący się niezwykle wysoką zdolnością chłonną oraz zdolnością do stymulacji procesu autolizy. Opatrunki typu TLC mogą być stosowane na rany o obfitym, jak i skąłym wysięku [30].

Opatrunki dekstranomerowe składają się z usieciowanego kopolimeru dekstranu, który posiada zdolność do przechodzenia w formę żelu przy kontakcie z wysiękiem. Opatrunki dekstranomerowe wyróżniają się niezwykle wysokimi właściwościami chłonnymi, stosować je można na rany o obfitym wysięku i na rany objęte procesem infekcyjnym [31].

Jednocześnie, w przypadku większości z przedstawionych powyżej typów opatrunków możliwa jest ich modyfikacja polegająca na impregnacji związkami o charakterze

przeciwdrobnoustrojowym, takimi jak srebro oraz opisane już antyseptyki: poliheksanidyna, oktenidyna, powidon jodu, chlorheksydyna oraz antybiotyk – gentamycyna.

W kolejnym podrozdziale przedstawiona jest charakterystyka bakteryjnej celulozy, określanej mianem „najbardziej obiecującego biopolimeru ostatnich dziesięcioleci” ze szczególnym naciskiem położonym na aplikacje medyczne tego bioamteriału.

2.2.2.1. Opatrunki z biocelulozy bakteryjnej

Bioceluloza [BC] wytwarzana jest przez Gram-ujemną, ściśle tlenową bakterię z gatunku *Komagataeibacter xylinus*. Drobnoustrój ten należy do szeroko rozpowszechnionej w środowisku naturalnym grupy funkcjonalnej bakterii określanej mianem bakterii kwasu octowego [32]. Drobnoustroje te występują w klimacie umiarkowanym, śródziemnomorskim i tropikalnym zasiedlając powierzchnie roślin, a szczególnie owoców. Od lat 70-tych ubiegłego wieku, bakteria z gatunku *K. xylinus* stała się istotnym biotechnologicznie mikroorganizmem modelowym służącym do wytwarzania biomateriału określanego mianem bionano- lub biocelulozy [33]. Ten nierozgałęziony biopolimer składa się z cząsteczek β -D-glukopiranozy, połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Wytworzona przez *K.xylinus* celuloza bakteryjna cechuje się wysokim stopniem polimeryzacji oraz krystaliczności. W odróżnieniu od celulozy roślinnej, celuloza pochodzenia bakteryjnego nie zawiera takich zanieczyszczeń jak hemiceluloza, pektyny, воск oraz lignina, które wymagają usunięcia. *K.xylinus* hodowany w płynnym medium odżywczym tworzy na styku faz woda-ciecz stosunkowo grubą i niezwykle elastyczną błonę. Co więcej, celuloza bakteryjna charakteryzuje się całkowitą biokompatybilnością i biodegradowalnością oraz brakiem oddziaływań cytotoksycznych względem komórek eukariotycznych [34]. Niezwykle istotną cechą BC są jej fenomenalne wręcz parametry związane ze zdolnością do pochłaniania cieczy (sięgające 1000x masy suchej celulozy) oraz zdolnością do utrzymania jej w swojej strukturze. Wymienione w powyższej

części manuskryptu cechy BC predysponują ten biomateriał do zastosowania do celów medycznych, szczególnie w charakterze opatrunku. Elastyczność, przezroczystość, wysoki stopień wymiany gazowej, wysoka zdolność absorpcji cieczy i jej sekwestracji, wytrzymałość mechaniczna, możliwość wysycenia polimeru substancjami wspomagającymi gojenie oraz związkami przeciwdrobnoustrojowymi sprawiają, że coraz częściej wykonywane są badania mające na celu opracowanie technik wykorzystania BC jako okładziny z przeznaczeniem do leczenia i pielęgnacji ran przewlekłych, w tym tych powikłanych procesem infekcyjnym [35]. W chwili obecnej, dostępne komercyjnie opatrunki z BC nie są opatrunkami aktywnymi przeciwdrobnoustrojowo, jakkolwiek w literaturze przedmiotu odnaleźć można doniesienia o zastosowaniu opatrunków z BC impregnowanych srebrem lub poliheksanidyną.

Należy mieć jednak świadomość, że podobnie jak ma to miejsce w przypadku każdego biomateriału pochodzenia zwierzęcego, roślinnego czy bakteryjnego, czynnikami limitującymi jego użyteczność może być zróżnicowanie parametrów biomateriału, które jest wynikiem jego wytwarzania poprzez żywe organizmy (a nie na drodze ściśle zdefiniowanych warunków syntezy chemicznej) [36].

W ostatnich latach prowadzone są badania nad takimi modyfikacjami nośników celulozowych, które prowadziłyby do kontrolowanej zmiany chłonności BC, a co za tym idzie do kontrolowanej szybkości uwalniania z nośnika substancji przeciwdrobnoustrojowej [37, 38].

Biorąc pod uwagę wysoką chłonność biocelulozy można założyć, że uwalniające się z niej wysokie stężenia substancji przeciwdrobnoustrojowej mogłyby służyć do eradykacji z łożyska rany przewlekłej biofilmu tworzonego przez drobnoustroje.

2.3. Biofilm jako adaptacja drobnoustrojów umożliwiającą im przeżycie w środowisku rany

Biofilm to społeczność drobnoustrojów cechująca się wysoką tolerancją względem układu odpornościowego oraz środków przeciwdrobnoustrojowych – antybiotyków i antyseptyków [39]. W przypadku biofilmów tworzących się w ranach przewlekłych stosowanie terminu „społeczność osiadła” jest uprawnione, natomiast wiadomo obecnie, że biofilmy tworzące się w innych niszach ciała mogą przybierać formy unoszących się na styku fazy powietrze/ciecz błon (analogicznie jak ma to miejsce w przypadku opisanego uprzednio biofilmu niepatogennej bakterii *K.xylinus*) bądź toczących się pod powierzchnią cieczy, luźno przylegających agregatów otoczonych skąpą macierzą zewnątrzkomórkową [40]. Macierz ta (ang. matrix) stanowi rusztowanie, spichlerz oraz sieć komunikacyjną biofilmu.

Obecnie uważa się, że biofilmy odpowiedzialne są za 80% wszystkich zakażeń szpitalnych, i że ta forma bytowania drobnoustrojów wywołuje blisko 70% zakażeń ran przewlekłych [41, 42]. Biofilm tworzony jest zazwyczaj przez ściśle przylegające do siebie warstwy komórek, które cechują się zróżnicowaniem poziomu aktywności metabolicznej. Mikroorganizmy z wyższych warstw biofilmu (tzw. warstwy środkowe i szczytowe) cechują się wysokim poziomem aktywności metabolicznej, podczas gdy komórki warstwy podstawnej cechują się niskim poziomem bądź całkowicie zatrzymanym metabolizmem [43]. Zjawisko to w znaczący sposób obniża aktywność bakteriobójczą antybiotyków działających na zasadzie hamowania procesu transkrypcji czy translacji komórkowej. Zdolność biofilmu do przetrwania i proliferacji w ranie przewlekłej wiąże się także z cechami gatunkowymi drobnoustroju tworzącymi biofilm, na przykład z mechanizmami oporności na środki przeciwdrobnoustrojowymi, zdolnością do mimikry molekularnej czy zdolnością do zwalczania komórek efektorowych układu immunologicznego.

Z mojego punktu widzenia, jako lekarza klinicysty, najistotniejszym jest fakt, że drobnoustroje w formie biofilmu cechują się znacznie wyższą (sięgającą 1000x) tolerancją na środki przeciwdrobnoustrojowe niż drobnoustroje w formie niezadherowanej (tak zwane komórki planktoniczne) [44].

Biorąc pod uwagę częstość oraz zagrożenie dla zdrowia i życia pacjenta będące rezultatem toczącej się infekcji, moim celem było opracowanie nowych, prototypowych opatrunków z bakteryjnej celulozy mogących służyć eradykacji patogenów będących czynnikami etiologicznymi zakażeń ran przewlekłych, z którymi najczęściej spotykam się w swojej praktyce lekarskiej. Dlatego w kolejnym podrozdziale przedstawiona została krótka charakterystyka 3 istotnych drobnoustrojów tworzących biofilm w ranach przewlekłych, mianowicie gronkowca złocistego, pałeczki ropy błękitnej oraz paciorkowca kałowego.

2.4. Charakterystyka drobnoustrojów poddanych badaniu

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) to Gram-dodatni ziarniak wywołujący szerokie spektrum infekcji. Drobnoustrój ten, w warunkach zdrowia, kolonizuje skórę oraz przedsionek nosa. Szacuje się, że do 50% populacji jest nosicielami gronkowca złocistego bez wystąpienia objawów chorobowych; jednakże uważa się, że nosicielstwo *Staphylococcus aureus* jest punktem wyjścia do zakażenia w przypadku osłabienia układu immunologicznego bądź naruszenia bariery ochronnej, jaką stanowi skóra. Struktura i cechy biofilmu gronkowca złocistego charakteryzuje się wysoką zmiennością i adaptacyjnością i uwarunkowane są przede wszystkim niszą ciała kolonizowaną/infekowaną przez drobnoustrój. Gronkowiec złocisty zdolny jest do produkcji szerokiego wachlarza enzymów litycznych oraz toksyn. Wywoływać może infekcje skóry, tkanek miękkich, ran, krwi, wsierdza, narządów wewnętrznych, dróg moczowych, oddechowych oraz kości. W ostatnich latach odnotowywany jest istotny wzrost

oporności tych ziarniaków na antybiotyki, co związane jest prawdopodobnie z nadużywaniem tych środków przeciwdrobnoustrojowych w środowisku szpitalnym i pozaszpitalnym [45, 46].

Pałeczka ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*) to najważniejszy z klinicznego punktu widzenia przedstawiciel swojego rodzaju. Jest to Gram-ujemna pałeczka, patogen oportunistyczny, zdolny do wywołania ciężkich zakażeń, szczególnie u pacjentów z upośledzonym układem odpornościowym. Podobnie jak w przypadku gronkowca złocistego, także pałeczka ropy błękitnej izolowana może być z szerokiego spektrum infekcji obejmującego zakażenia skóry, tkanek miękkich, ran (szczególnie oparzeń), układu moczowego i oddechowego, rogówki oraz błony śluzowej ucha zewnętrznego, krwi, wsierdza oraz kości. *Pseudomonas aeruginosa* charakteryzuje się także wysoką opornością (naturalną jak i nabytą) na antybiotyki oraz niektóre antyseptyki (szczególnie chlorheksydynę). Pałeczka ropy błękitnej zaliczana jest do najgroźniejszych patogenów wywołujących infekcje szpitalne także ze względu na wysoką zdolność do tworzenia biofilmu, szczególnie w środowiskach o podwyższonej wilgotności [45, 47].

Paciorkowiec kałowy (*Enterococcus faecalis*) jest Gram-dodatnim, względnie beztlenowym ziarniakiem przystosowanym do życia w układzie pokarmowym, dlatego też stosunkowo często (na skutek występujących problemów z utrzymaniem higieny wśród pacjentów z ranami przewlekłymi) izolowany jest ze specyficznego typu ran przewlekłych, jakim są owrzodzenia goleni. Czynnikiem utrudniającym eradykację *Enterococcus* jest ich wysoka oporność naturalna i nabyta na antybiotyki. Do pierwszego ze wzmiankowanych typów należy oporność na antybiotyki β -laktamowe, klindamycynę, aminoglikozydy oraz trimetoprim w połączeniu z sulfametoksazolem. *Enterococcus* izolowane są nie tylko z zakażeń goleni, ale także (z tych samych powodów, co uprzednio wspomniane) z infekcji odleżyn oraz stopy cukrzycowej [45, 48].

Narastająca częstość występowania ran przewlekłych oraz trudności z usuwaniem z nich biofilmu tworzonego przez drobnoustroje była przyczyną, dla której podjąłem się wykonania badań przedstawionych w doświadczalnej części niniejszej pracy. Biorąc pod uwagę kondycję finansową sektora opieki zdrowotnej w naszym kraju, podjąłem się wytworzenia i oceny właściwości fizycznych oraz biologicznych różnych typów opatrunków celulozowych wysyconych środkami przeciwdrobnoustrojowymi. Biorąc pod uwagę niski koszt wytworzenia opatrunków tego typu, mam nadzieję, że wyniki moich badań staną się impulsem wiodącym do rozwoju nowych sposobów leczenia ran przewlekłych powikłanych procesem infekcyjnym.

3. Cel pracy

Celem pracy było **wytworzenie i analiza** właściwości fizycznych i biologicznych **nośników biocelulozowych wysyconych antyseptykami:**

- dwuchlorowodorkiem oktenidyny,
- poliheksanidyną
- powidonem jodu
- chlorheksydyną

lub antybiotykiem:

- gentamycyną

charakteryzujących się zróżnicowaną (kontrolowaną) szybkością uwalniania substancji aktywnej

pod kątem ich zastosowania do eradykacji biofilmu tworzonego przez *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* oraz *Pseudomonas aeruginosa* - drobnoustrojów wywołujących infekcje ran przewlekłych.

4. Materiały i Metody

4.1. Użyte szczepy bakteryjne oraz linia eukariotyczna komórek fibroblastów L929

Do celów eksperymentalnych zastosowano szczep gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* z Amerykańskiej Kolekcji Szczepów Wzorcowych American Tissue and Cell Culture, o numerze 33591 [szczep metycylinooporny] oraz szczep *Staphylococcus aureus* ATCC6538 charakteryzujący się metycylino-wrażliwością. W badaniu wykorzystano także bakterię Gram-ujemną *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442 oraz Gram-dodatniego ziarniaka *Enterococcus faecalis* ATCC29212. Nośniki celulozowe natywne (3,7,12-dniowe) zostały wytworzone z użyciem szczepu *Komagataibacter xylinus* ATCC53524. Szczepy bakteryjne wykorzystane w tej pracy stanowią część Kolekcji Szczepów Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

W badaniach nad przeżywalnością i cytotoksycznością na skutek aktywności antyseptyku i antybiotyku uwalnianych z nośników celulozowych zastosowano linię komórkową fibroblastów ATCC L929.

4.2. Zastosowane substancje przeciwdrobnoustrojowe

W badaniu wykorzystano:

- a) antyseptyk o składzie: 0,1% undecylenamidopropylobetainę, 0,1% biguanid poliaminopropylowy i wodę oczyszczoną – w pracy określany jako „PHMB”.
- b) antyseptyk o składzie: 0,1% dwuchlorowodorek oktenidyny 2% fenoksyetanol, kokamidopropylbetainę - roztwór 30 %, sodu D-glukonian, glicerol 85 %, sodu wodorotlenek, sodu chlorek, wodę oczyszczoną – w pracy określany jako „OCT”.
- c) antyseptyk o składzie: 0,05% octan chlorheksydy - w pracy określany jako „CHX”.

d) antyseptyk o 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 pracy określany jako „PVP-I”.

e) wodny roztwór siarczanu gentamycyny przygotowany z antybiotyku w postaci stałej (sypkiej) – w pracy określany jako „G”.

4.3. Wytworzenie nośników celulozowych BC

Szczep *Komagataibacter xylinus* ATCC53524 hodowano w medium Hestrin-Shramm [H-S], zawierającym:

- 2 % glukozę
- 0,5% baktopeptonu
- 0,5% ekstraktu drożdżowego
- 0,27% wodorofosforanu sodu
- 0,115% kwasu cytrynowego
- 0,05% heptahydratu siarczanu magnezu
- 1% etanolu

Szczep znajdujący się w stanie zamrożenia (-80°C) wprowadzano do płynnego podłoża Herstina-Shramma i poddawano inkubacji w temperaturze 28°C do czasu wytworzenia dysku celulozowego. Następnie, w celu rozpuszczenia dysku i uzyskania wysokiej liczby żywych komórek bakterii, celulozę poddawano rozpuszczeniu za pomocą celulazy w buforze cytrynowym w temperaturze 37°C w łaźni wodnej. Po zakończeniu inkubacji, uzyskaną zawiesinę poddawano wirowaniu (15min/5000 rpm; wirówka Schüttigen 96). Po zakończonym

wirowaniu supernatant zlewano, a osad dwukrotnie przepłukiwano płynem fizjologicznym, za każdym razem powtarzając proces wirowania. Oczyszczony osad bakteryjny zawieszono ponownie w medium H-S i w objętości 2mL wprowadzano do dołków mikrotitracyjnych płytek 24-dołkowych (średnica studzienek wynosi 15mm). Bakterie *K.xylinus* w płynnym medium HS hodowano w temperaturze 28°C przez 3 lub 7, lub 12 dni do czasu wytworzenia nośników celulozowych o różnej grubości. Następnie nośniki BC inkubowano w 0.1M roztworze wodorotlenku sodu w temperaturze 80°C w łaźni wodnej w celu lizy komórek bakteryjnych. Po zakończeniu lizy nośniki celulozowe przemywano jałową wodą do czasu ustabilizowania się wartości pH (mierzonej za pomocą indykatora paskowego). Tak uzyskane nośniki, w zależności od czasu hodowli (3,7,12 dni) określane są w dalszej części pracy mianem BC-3, BC-7, BC-12, odpowiednio.

Dodatkowo, w pracy wykorzystano nośniki celulozowe, modyfikowane olejem bądź kwasem cytrynowym.

W przypadku nośnika celulozowego modyfikowanego olejem, w dalszej części pracy określanego mianem BC-7O, proces jego wytworzenia był analogiczny do procesu wytworzenia nośnika BC-7, z tą różnicą, że medium hodowlane stanowiło płynne podłoże H-S suplementowane 1% olejem rzepakowym. Po zakończonym procesie hodowli olej usuwano za pomocą standardowej techniki Soxhleta.

Do wytworzenia nośnika BC modyfikowanego kwasem cytrynowym posłużono się nośnikiem typu BC-7, który po oczyszczeniu za pomocą NaOH inkubowano przez 24h w 20% (w/v) kwasie cytrynowym, a następnie poddawano zapiekaniu w temperaturze 160°C przez 5 minut. Po zakończeniu procesu zapiekania, nośniki typu BC-7CA poddawane były płukaniu w wodzie destylowanej do czasu osiągnięcia pH=6.

4.4. Cechy fizyczne nośników celulozowych

Waga mokrych i suchych nośników celulozowych BC-3,7,12 oraz BC-7O, BC-7A została określona za pomocą wagi analitycznej PA Pioneer OHAUS PA114C/1. Suszenie nośników opierało się na ich 6-godzinnej inkubacji w suszarce typu Binder AP, w temperaturze 60°C. Pomiary przeprowadzone zostały w 6 powtórzeniach technicznych oraz w 3 pomiarach niezależnych.

4.4.1. Szybkość pochłaniania wody przez nośniki celulozowe niemodyfikowane i modyfikowane

Nośniki celulozowe poszczególnych typów pocięto na fragmenty o wymiarach 1x1cm i poddano suszeniu w suszarce Binder AP w temperaturze 60 °C przez okres 6 godzin, a następnie zważono z wykorzystaniem wagi analitycznej PA Pioneer OHAUS PA114C/1. Następnie, analizowany fragment nośnika wprowadzono na czas 1 minutę do naczynia zawierającego wodę destylowaną (temperatura pokojowa). Następnie nośnik wyciągano, ocierano delikatnie bibułą filtracyjną i poddawano procesowi ważenia. Proces powtarzano do momentu braku przyrostu wagi nośnika. Zarówno proces nasączania nośników oraz ich ważenie wykonano w sześciu powtórzeniach. Uzyskane wyniki zobrazowano wykorzystując wartość procentowego poziomu szybkości pochłaniania wody przez nośnik BC [%SR, ang. Swelling Rate]. Wartość %SR obliczono w następujący sposób: **% SR = [(mokra masa nośnika BC - sucha masa nośnika BC) / sucha masa nośnika BC] × 100%.**

Analogiczne pomiary wykonywano także dla nośników celulozowych wysyconych badanymi antyseptykami oraz antybiotykiem.

4.4.2. Zdolność do utrzymania cieczy przez niemodyfikowane i modyfikowane nośniki BC

Niemodyfikowane i modyfikowane nośniki BC wprowadzono do wody destylowanej na okres 24h zapewniając tym samym najwyższą możliwą absorpcję cieczy przez nośnik. Następnie nośniki wyjmowano, przecierano delikatnie bibułą filtracyjną i ważono na wadze analitycznej PA Pioneer OHAUS PA114C/1. Po zakończeniu procesu ważenia, nośniki BC poddawano inkubacji w czasie do 400 min. i w temperaturze wynoszącej 60°C, a następnie ponownie poddawano ważeniu. Obliczenia zdolności utrzymania cieczy przez niemodyfikowane i modyfikowane nośniki BC wykonywano z użyciem następującego wzoru:

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

Gdzie:

W_m - waga mokrego nośnika BC;

W_p – waga nośnika BC suszonego do 400minut/60°C;

W_s – waga całkowicie wysuszonego nośnika BC.

Analogiczne pomiary wykonywano także dla nośników BC wysyconych antyseptykami i antybiotykiem.

4.4.3. Wysycenie nośników modyfikowanych i niemodyfikowanych antyseptykami i antybiotykiem

W celu wprowadzenia związków przeciwdrobnoustrojowych do nośników, poszczególne typy nośników BC wprowadzano do objętości 5ml badanych antyseptyków bądź antybiotyku na okres 96h w temperaturze pokojowej. Układ zabezpieczono przed parowaniem oraz wysychaniem. Co 24h, z układu badawczego pobierano pipetą automatyczną 200μL roztworu i przeprowadzano pomiar absorbancji przy długości fali odpowiedniej dla danego antyseptyku

bądź antybiotyku. Analizę wykonano w 3 powtórzeniach technicznych, w 3 niezależnych, oddzielonych czasowo pomiarach.

4.4.4. Uwalnianie antyseptyków i antybiotyku z niemodyfikowanych i modyfikowanych nośników BC

Do oceny poziomu uwalniania badanych antyseptyków i antybiotyku z nośników BC, wykorzystano metodę spektrometryczną (spektrometr MultiScan Go). Nośniki BC poddano inkubacji 300 minut/ 37 °C w zamkniętych naczyniach, do których uprzednio wprowadzono 5mL destylowanej wody. W interwałach czasowych wynoszących: 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 oraz 300 min roztwór w objętości wynoszącej 200 µL nakrapiano do studzienek mikropłytki typu UV i dokonywano pomiaru spektrometrycznego absorbancji przy odpowiednich dla każdego z badanych antyseptyków i antybiotyku długościach fali. Do pomiaru zastosowano tzw. „working solutions” antyseptyków, z wyjątkiem PVP-I, którego brązowy kolor wymusił 10xkrotne rozcieńczenie w celu przeprowadzenia analizy. Po wykonaniu badania spektrometrycznego, 200 µL badanych roztworów wprowadzano ponownie do naczyń zawierających antyseptyki lub antybiotyki.

4.5. Określenie Minimalnego Stężenia Hamującego (MIC) antyseptyków i antybiotyków względem analizowanych szczepów bakteryjnych.

W celu wyznaczenia minimalnego stężenia hamującego (MIC) badanych antyseptyków i antybiotyku zastosowano metodę mikrorozcieńczeń w 96-dołkowych płytkach polistyrenowych, opierając się na zasadach opracowanych przez EUCAST. Szczepy wysiewano z odpowiednich podłoży stałych na podłoża płynne i poddawano 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C. Następnie, stosując densytometr ustalano gęstość hodowli płynnej na 1×10^8 komórek/mL (tzn. 0.5 w skali McFarlanda). Uzyskaną zawiesinę doprowadzano do gęstości 1×10^6 komórek/mL rozcieńczając 0.5MF 100-krotnie z użyciem TSB. Do uprzednio przygotowanej płytki titracyjnej, wprowadzono do studzienek o numerach

1-12, 100µL płynnego podłoża TSB. Następnie, do dołka o numerze 10 wprowadzono 100µL antyseptyku bądź antybiotyku i wykonano szereg geometrycznych rozcieńczeń – w kierunku dołka nr 1. Uzyskawszy szereg rozcieńczeń substancji czynnej, do studzienek 1-10 oraz 12 wprowadzano 100µl zawiesiny bakteryjnej o gęstości 1×10^6 komórek/ml. Dołek 11 wypełniony sterylną pożywką płynną stanowił kontrolę jałowości doświadczenia; dołek 12 stanowił zaś kontrolę żyzności podłoża (do pożywki wprowadzano jedynie badany szczep bakteryjny). Przygotowaną w wyżej opisany sposób płytkę titracyjną poddano ocenie absorbancji stosując spektrometr Multiscan Go przy długości fali wynoszącej 590nm. Następnie, płytkę inkubowano 24h w temperaturze 37°C i ponownie wykonano pomiar spektrometryczny. Wartość absorbancji w studzience zawierającej kontrolę żyzności traktowano jako 100% i względem niej oszacowano poziom zahamowania wzrostu drobnoustroju na skutek aktywności antyseptyku bądź antybiotyku stosując wzór:

poziom zahamowania wzrostu drobnoustroju = 100% - [wartość absorbancji w studzience z zawiesiną drobnoustrojów i antybiotykiem bądź antyseptykiem/wartość absorbancji w studzience zawierającej kontrolę żyzności*100%]. Każdy pomiar przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

4.6. Wyznaczenie Minimalnego Stężenia Eradykującego Biofilm (MBEC) antyseptyków i antybiotyku względem analizowanych szczepów bakteryjnych

Z 24-godzinnej hodowli płynnej badanego patogenu sporządzano zawiesinę o gęstości 1×10^8 komórek/mL (0.5McFarlanda). Zawiesinę tę rozcieńczano następnie 100-krotnie w bulionie TSB. 100µL tak otrzymanej zawiesiny bakterii o gęstości wynoszącej 1×10^6 komórek/mL nakropiono do dołków 1-10 oraz 12 płytki titracyjnej. Dołek 11 służył jako próba jałowości wykonania doświadczenia (napełniano go sterylną pożywką TSB), a dołek 12 jako kontrola zdolności badanego drobnoustroju do tworzenia biofilmu na powierzchni polistyrenowej. Tak przygotowaną płytkę poddawano inkubacji przez okres 24h/37°C. Po zakończeniu inkubacji

zawiesinę usunięto, a dołki przepłukano trzykrotnie solą fizjologiczną w celu usunięcia luźno zadherowanych komórek bakteryjnych. Do studzienek wprowadzono 100µL bulionu TSB, a następnie do studzienki nr 10 - 100µL antyseptyku bądź antybiotyku i wykonano rozcieńczenie w postępie geometrycznym do kolejnych studzienek płytki. Po wykonaniu tej części przygotowawczej, płytki inkubowano 24h/37°C. W celu określenia minimalnego stężenia antyseptyków/antybiotyku eradykującego biofilm badanych szczepów patogennych wykorzystano metodę 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 żywych mikroorganizmów wykazujących aktywność 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. W celu dodatkowej weryfikacji poprawności określenia wartości MBEC, wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 580nm w czytniku płytek. Uzyskane wartości absorbancji porównano z wartościami absorbancji dla obu zastosowanych prób kontrolnych, to znaczy dla kontroli jałowości doświadczenia oraz dla kontroli zdolności badanych szczepów do tworzenia biofilmu. Każdy pomiar przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

4.7. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej substancji uwalniających się nośników celulozowych celulozowego z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody dyfuzyjno-krażkowej

Nośniki BC wysycone antyseptykami bądź antybiotykiem nałożono na płytki zawierające podłoże Muellera-Hintona, na które posiano uprzednio zawiesinę badanego drobnoustroju o gęstości wynoszącej 0,5 McFarlanda metodą „na murawę”. Płytkę wraz z drobnoustrojami i nośnikami BC inkubowano przez 18 godzin w temperaturze 37°C. Następnie dokonano

pomiarów średnich stref zahamowania wzrostu (w mm) murawy bakteryjnej dookoła nośników BC. Badanie wykonano w trzech powtórzeniach.

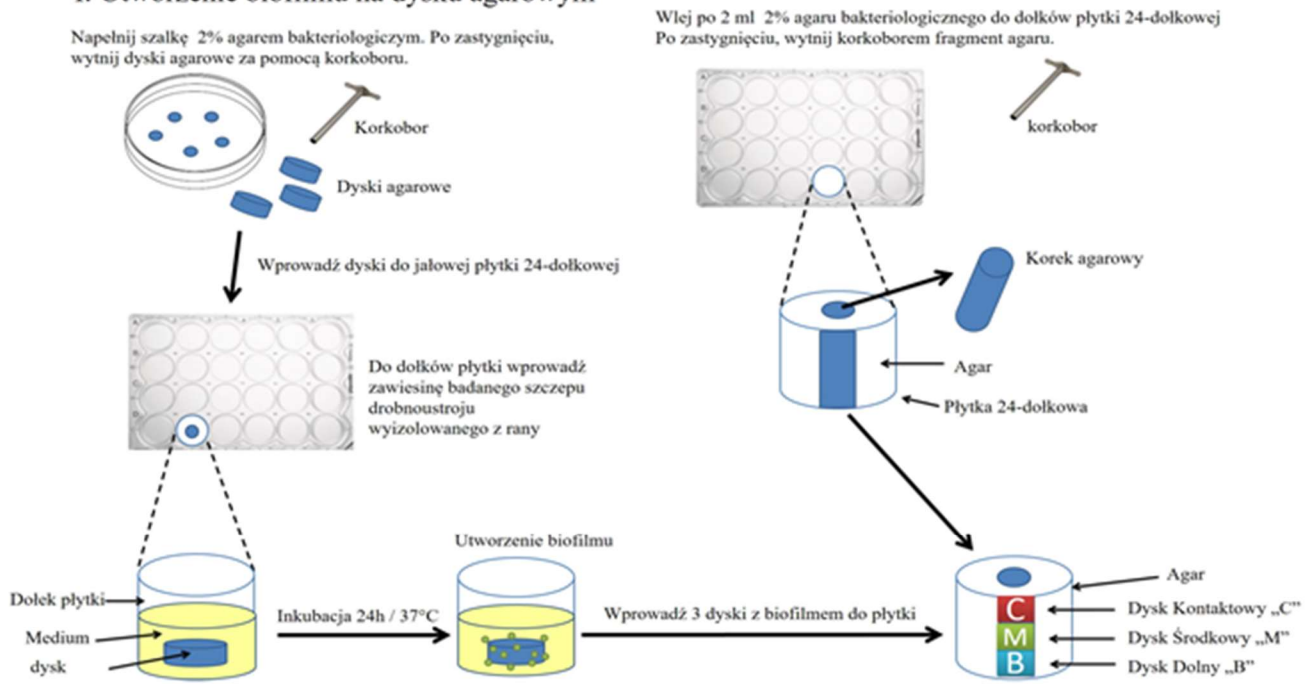
4.8. Określenie aktywności przeciwbiofilmowej badanych nośników celulozowych zawierających środki przeciwdrobnoustrojowe z użyciem metody Antimicrobial Dressing Activity Measurement [49]

Analizowane szczepy przesiano z podłoża agarowych stałych do bulionu tryptozowo-sojowego i poddano inkubacji przez 24h w temperaturze wynoszącej 37°C. Otrzymane zawiesiny bakteryjne rozcieńczono do gęstości wynoszącej 0,5McFarlanda, a następnie z wykorzystaniem korkoboru o średnicy wynoszącej 8mm, z agaru BHI wylanego do studzienki płytki 24-dołkowej wycięto korek (ang. stack) agarowy. Korek pocięto na 3 agarowe dyski o równej grubości, które przełożono do kolejnej płytki 24-dołkowej. Do studzienek zawierającej dyski wprowadzono po 1mL zawiesiny analizowanych mikroorganizmów o gęstości 10^5 cfu/mL i poddano inkubacji przez 24h/37°C. W tym czasie dochodziło do wytworzenia na powierzchni dysków biofilmu. Obecność biofilmu na dyskach agarowych potwierdzano za pomocą techniki Richardsa wykorzystującej przekształcanie się chlorku tetrazoliowego do czerwonego formazanu w obecności żywych komórek. Następnie trzy dyski z biofilmem ułożono w dołkach płytki 24-dołkowej (otoczonej stałą pożywką Brain-Heart Infusion Agar) jeden na drugim. Dysk położony na dnie płytki określany jest literą „B” (ang. bottom – dolny), kolejny dysk to dysk „M” (ang. middle – środkowy), natomiast dysk górny oznaczano literą „C” (ang. contact – kontaktowy). Na dysk C nałożono nośnik BC wysycony antyseptykiem bądź antybiotykiem (grupa badana) albo dysk celulozowy niewysycony antyseptykiem/antybiotykiem (kontrola doświadczenia). Po upływie 24h nośniki BC usuwano, a dyski agarowe poddawano 4h inkubacji z medium TSB zawierającym 1% chlorek 2,3,5-trifenylo-2H-tetrazoliowy TTC. Po upływie 4h, dyski z biofilmem przenoszono do 1mL etanolu 99% i poddawano mechanicznemu wytrząsaniu na wytrząsarce płytek (Schuttiken, Niemcy) przez okres pół godziny. W kolejnym etapie, supernatant zawierający czerwony barwnik (formazan) poddano analizie

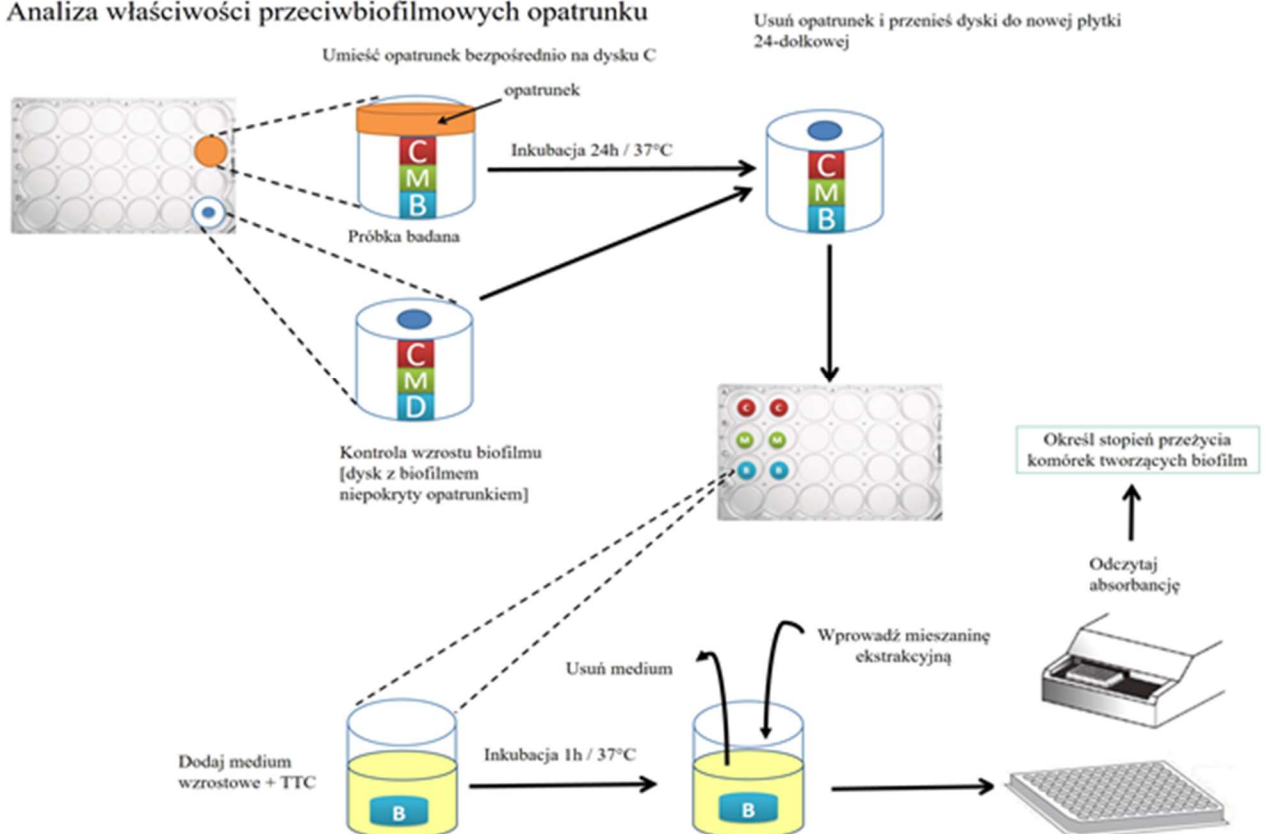
spektrometrycznej przy długości fali 490nm. Uzyskane wartości absorbancji przy długości fali 490nm dla biofilmu rosnącego w układzie doświadczalnym, w którym wykorzystano nośnik BC nienasycony środkiem przeciwdrobnoustrojowym, przyjmowano jako 100% i względem tych wartości absorbancji liczono redukcję biofilmu, do której doszło na skutek aktywności związków przeciwdrobnoustrojowych wydostających się z opatrunków. Pomiarów wykorzystujących metodę A.D.A.M. przeprowadzono 3-krotnie, a każdy pomiar w sześciu powtórzeniach technicznych.

Schemat wykonania metody A.D.A.M. zobrazowano na **Rycinie 2**.

I. Utworzenie biofilmu na dysku agarowym



II. Analiza właściwości przeciwbiofilmowych opatrunku

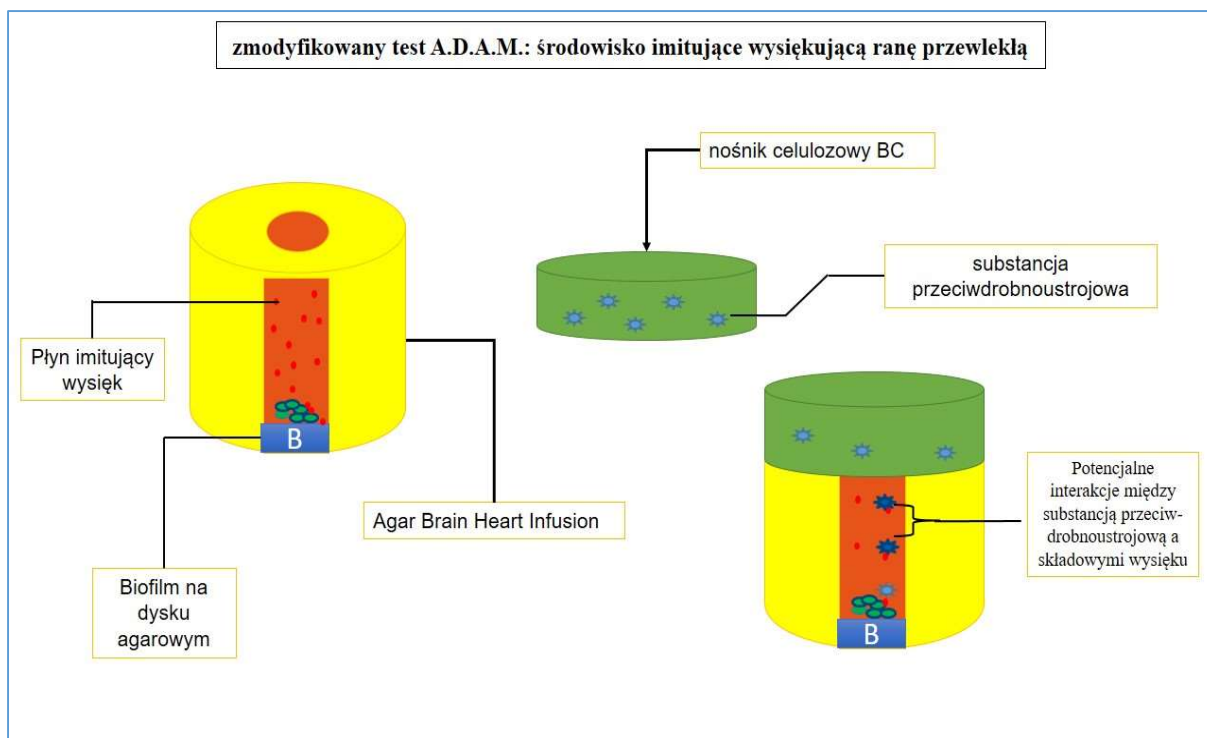


Ryc.2. Schemat wykonania metody A.D.A.M. Rycinę wykorzystano dzięki uprzejmości dr Adama Junki z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii

4.9. Określenie aktywności przeciwbiofilmowej badanych nośników celulozowych zawierających środki przeciwdrobnoustrojowe z użyciem zmodyfikowanej metody Antimicrobial Dressing Activity Measurement

Analizowane szczepy przesiano z podłoża agarowych stałych do bulionu tryptozowo-sojowego i poddano inkubacji przez 24h w temperaturze wynoszącej 37°C. Następnie, zawiesiny bakteryjne rozcieńczono do gęstości wynoszącej 0,5McFarlanda. Za pomocą korkoboru o średnicy wynoszącej 8mm, z agaru BHI wylanego do studzienki płytki 24-dołkowej wycięto korek (ang. stack) agarowy. Korek pocięto następnie na 3 agarowe dyski o równej grubości, które przełożono do kolejnej płytki 24-dołkowej. Do studzienek zawierających dyski wprowadzono po 1mL zawiesiny analizowanych mikroorganizmów o gęstości 10^5 cfu/mL i poddano inkubacji przez 24h/37°C. W tym czasie dochodziło do wytworzenia na powierzchni dysków biofilmu. Obecność biofilmu na dyskach agarowych potwierdzano za pomocą techniki Richardsa wykorzystującej przekształcanie się chlorku tetrazoliowego do czerwonego formazanu w obecności żywych komórek. Dysk pokryty biofilmem wprowadzono do studzienki agarowej w dołku płytki 24-dołkowej. Pozostałą przestrzeń wypełniono płynnym medium imitującym sztuczny wysięk, który składał się z bulionu tryptozowo-sojowego, do którego wprowadzono surowiczą albuminę wołową (ang. BSA, bovine serum albumin) uzyskując jej stężenie wynoszące 4,5% oraz glukozę, której stężenie końcowe wynosiło 32mg/dL. Na górę studzienki agarowej nakładano nośniki BC wysycone antyseptykami lub antybiotykiem oraz, w charakterze próby kontrolnej, nośniki BC niewysycone antyseptykiem/antybiotykiem. Płytkę zawierającą biofilm, sztuczny wysięk oraz nośniki BC inkubowano 24h/37°C. Następnie, nośniki BC usuwano, a dyski agarowe poddawano 4h inkubacji z medium TSB zawierającym 1% chlorek 2,3,5-trifenylo-2H-tetrazoliowy TTC. Po upływie 4h, dyski z biofilmem przenoszono do 1mL etanolu 99% i poddawano mechanicznemu wytrząsaniu na wytrząsarce płytek (Schuttiken, Niemcy) przez okres pół godziny. W kolejnym

etapie, supernatant zawierający czerwony barwnik (formazan) poddano analizie spektrometrycznej przy długości fali 490nm. Uzyskane wartości absorbancji przy długości fali 490nm dla biofilmu rosnącego w układzie doświadczalnym, w którym wykorzystano nośnik BC nienasycony środkiem przeciwdrobnoustrojowym, przyjmowano jako 100% i względem tych wartości absorbancji liczono redukcję biofilmu, do której doszło na skutek aktywności związków przeciwdrobnoustrojowych wydostających się z opatrunków. Pomiary wykorzystujące zmodyfikowaną metodę A.D.A.M. przeprowadzono 3-krotnie, a każdy pomiar w sześciu powtórzeniach technicznych. Różnicę polegającą na zastosowaniu w zmodyfikowanej metodzie A.D.A.M. jednego, zamiast trzech dysków agarowych i uzupełnienie powstałej w studziencie przestrzeni płynem imitującym wysięk przedstawiono na **Ryc.3.**



Ryc.3. Zasada działania zmodyfikowanego testu A.D.A.M. Rycinę wykorzystano dzięki uprzejmości dr Adama Junki z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii.

4.10. Obrazowanie nośników celulozowych za pomocą Skaningowej Mikroskopii Elektronowej

Nośniki celulozowe niemodyfikowane i modyfikowane wprowadzono do 2mL 2% aldehydu glutarowego i poddano inkubacji przez 4h w temp. 4°C. Następnie, tak utrwalone nośniki przepłukano wodą -3x po 2 min i odwodniono w szeregu rosnących stężeń etanolu (2 x 10 min w 10%, 1 x 10 min w 25%, 50%, 70%, 80%, 90% i finalnie 2 x 15 min w 100%). Odwodnione nośniki celulozowe suszono następnie w temperaturze 37°C.

W kolejnym etapie preparatyki nośniki BC poddawano napyleniu z wykorzystaniem napyłarki Quorum mieszaniną Au/Pd. Obrazowania mikrostruktury nośników dokonano z użyciem mikroskopu elektronowego Zeiss Evo MA 25.

4.11. Ocena cytotoksyczności nośników BC i użytych substancji przeciwdrobnoustrojowych względem linii fibroblastów L929

100µl komórek eukariotycznych fibroblastów L929 wzorcowych z kolekcji ATCC o gęstości 1×10^6 komórek/1 ml wprowadzono do studzienek płytki 96-dołkowej. Komórki inkubowano do osiągnięcia konfluencji w 37°C/5% CO₂/ 24h. Następnie, ze studzienek usunięto płynną pożywkę MEM i wprowadzono 100µl ekstraktów pochodzących z poszczególnych nośników otrzymanych według metodyki przedstawionej w normie 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 płynną pożywkę usunięto, a do studzienek wprowadzono świeże medium. W kolejnym etapie, przeprowadzono test żywotności komórek wykorzystując do tego celu 0,2 ml MTT o stężeniu 0,5 mg/mL. Płytkę zawierającą komórki eukariotyczne i zawieszę MTT inkubowano przez okres 3 godzin. Po upływie 3 godzin ze studzienek usunięto MTT a wprowadzono 0,1mL dimetylosulfotlenku (DMSO) w celu rozpuszczenia kryształków formazanu powstałych na skutek włączenia MTT do systemu dehydrogenazy bursztynianowej. Następnie, wykonano pomiar absorbancji z użyciem czytnika płytek Infinite Tecan, przy długości fali 540nm i użyciu filtra referencyjnego = 690nm. Kontrolę wzrostu stanowiły komórki ATCC L929, do których zamiast ekstraktu poinkubacyjnego, wprowadzono świeże medium MEM. Pomiary wykonano w 6 powtórzeniach. Analizę cytotoksyczności badanych antyseptyków/antybiotyku przeprowadzono analogicznie, z tą różnicą, że zamiast ekstraktu poinkubacyjnego zastosowano 50% stężenia robocze (ang. working solutions) badanych związków przeciwdrobnoustrojowych.

4.12. Analiza statystyczna

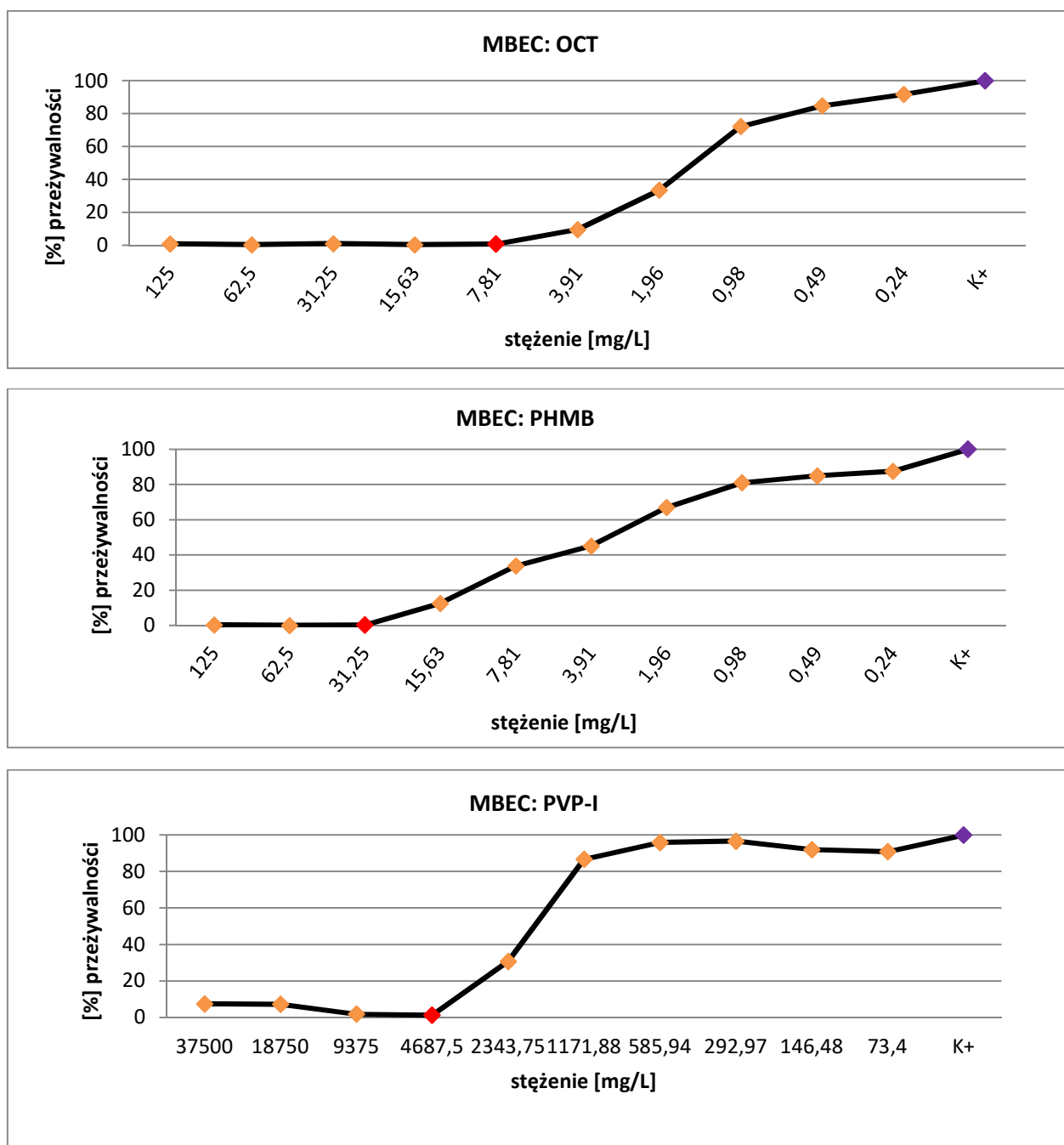
Analizy statystyczne przeprowadzono zostały z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism, wersja 7. Normalność rozkładu obliczono używając testu D'Agostino-Pearson. Jeśli uzyskane wartości nie charakteryzowały się rozkładem normalnym, używano testu Kruskala-Walisam a następnie analizy post-hoc Dunneta. Wyniki cechowały się istotnością, jeśli wartość p była mniejsza niż 0,5.

5. Wyniki

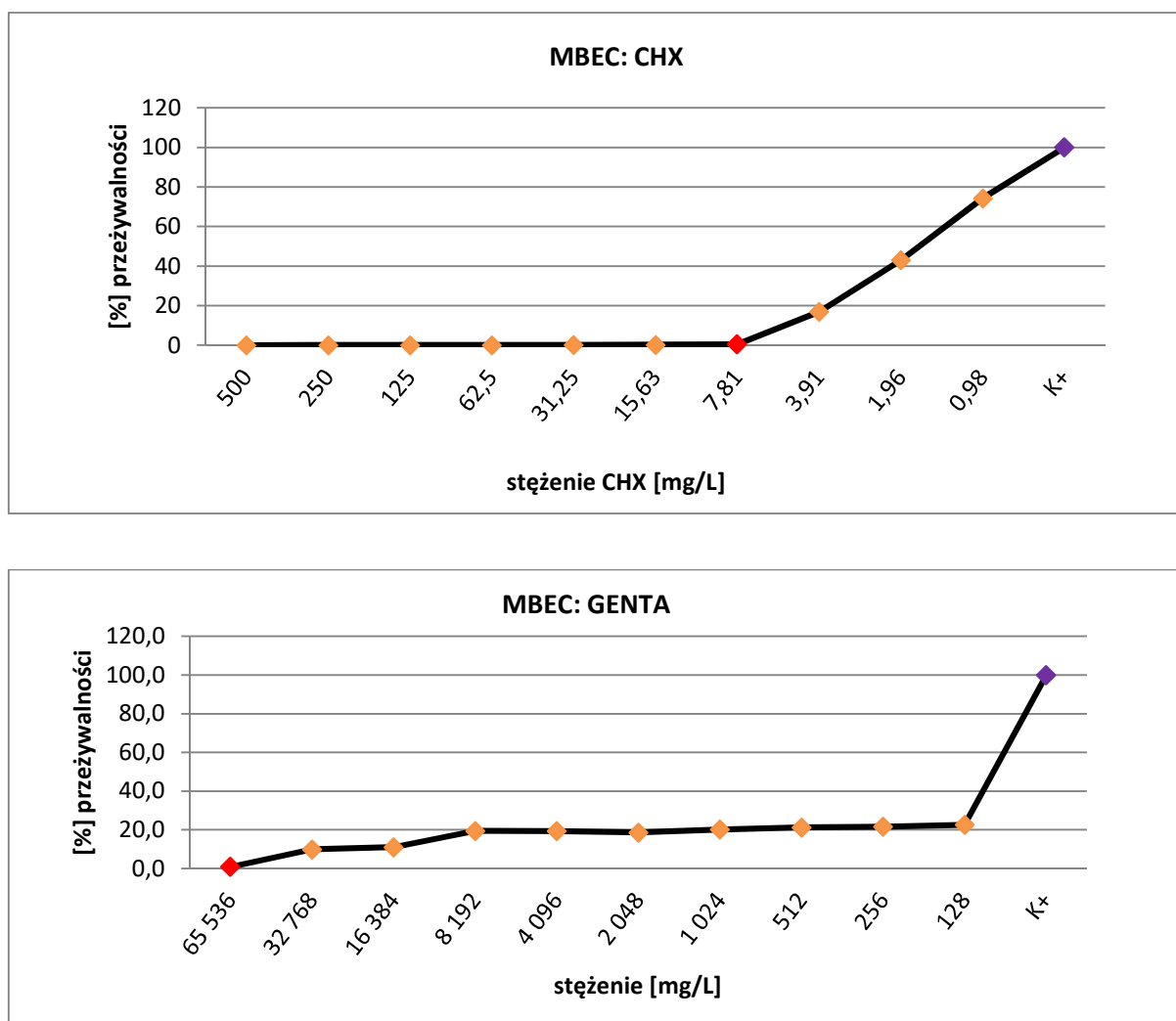
Pierwszą, i konieczną dla wykonania pozostałych badań zaplanowanych w niniejszej pracy, była analiza wrażliwości badanych drobnoustrojów na antyseptyki (oktenidynę, poliheksanidynę, powidon jodu, chlorheksydynę) oraz antybiotyk – gentamycynę. Badanie przeprowadzono względem form planktonicznych oraz biofilmu referencyjnych szczepów gronkowca złocistego, pałeczki ropy błękitnej oraz paciorkowca kałowego. Uzyskane wyniki przedstawione są zbiorczo w **Tabeli 1** oraz na **Wykresach 1-16**, pozwalających na analizę zależności między zastosowanym stężeniem środka przeciwdrobnoustrojowego, a siłą jego oddziaływania bójczego.

	<i>S.aureus</i> 6538		<i>S.aureus</i> 33591		<i>Paeruginosa</i> 15442		<i>E.faecalis</i> 29212	
	MIC	MBEC	MIC	MBEC	MIC	MBEC	MIC	MBEC
OCT	3,91	7,81	3, 91	7,81	15,63	31,25	7,81	7,81
PHMB	7,81	31,25	7, 81	31, 25	62,5	125	31,25	62,5
PVP-I	4 687	9 375	4 687	9 375	9375	9375	4687	9375
CHX	7,81	15,63	7,81	15,63	62,5	62,5	15,63	31,25
GENTA	2	65 536	2	16 384	2	4	8 192	65 536
stężenie	[mg/L]							

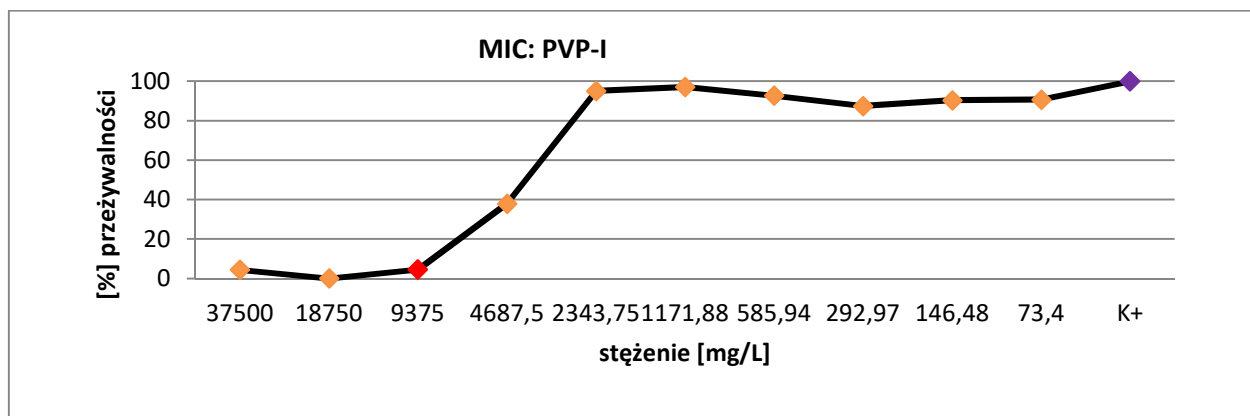
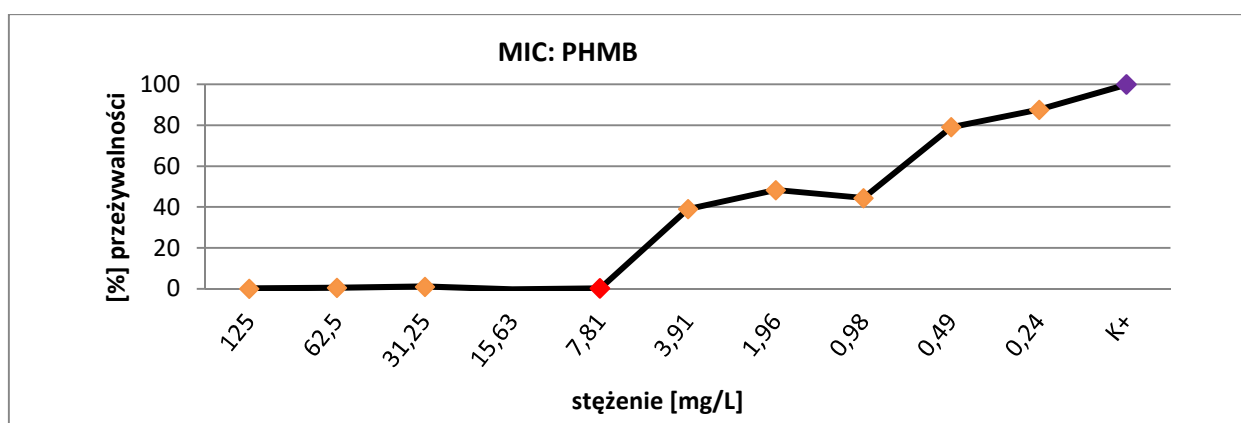
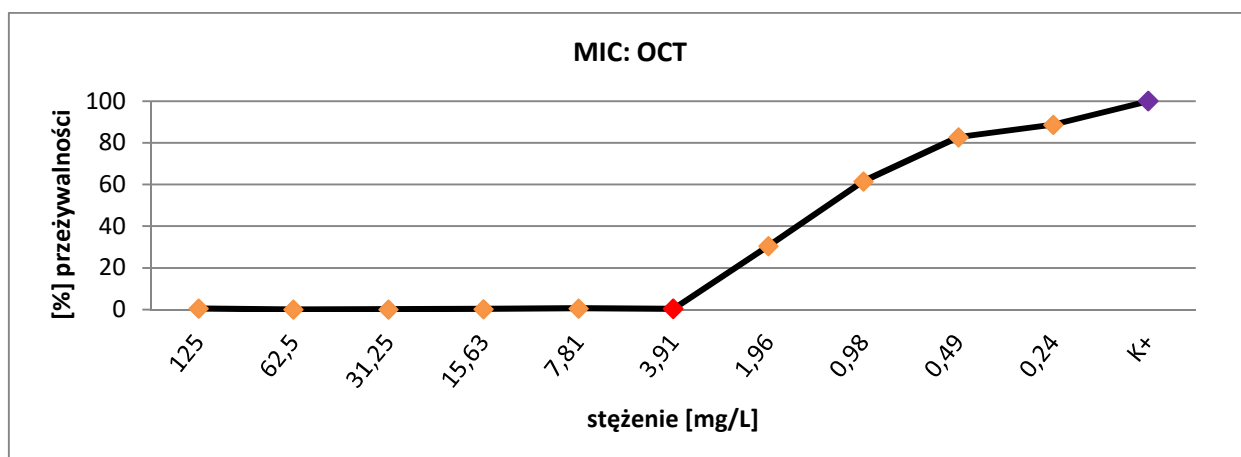
Tabela 1. Wartości MIC i MBEC zastosowanych środków przeciwdrobnoustrojowych względem badanych szczepów drobnoustrojów w formie planktonicznej oraz biofilmowej. OCT – oktenidyna, PHMB – poliheksanidyna, PVP-I – powidon jodu, CHX – chlorheksydyna, GENTA – gentamycyna.



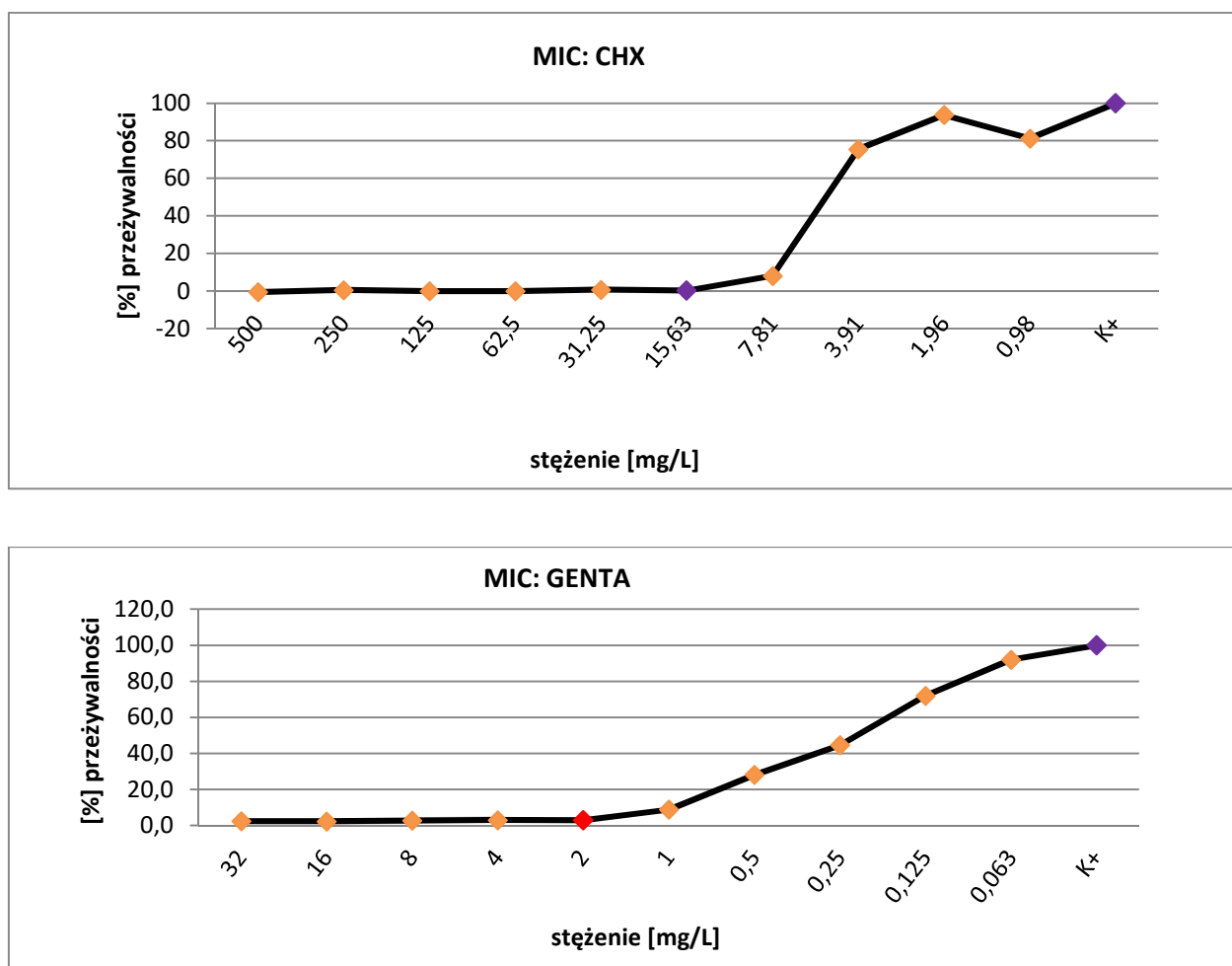
Wykres 1. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu eradykujące biofilm *S.aureus* ATTC 6538. MBEC – minimalne stężenie eradykujące biofilm; OCT – dwuchlorowodorek oktenidyny; PHMB – poliheksanidyna; PVP-I – powidon jodu. **Kolor fioletowy** – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej [K+], niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; **kolor czerwony** – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitej eradykacji biofilmu danego drobnoustroju.



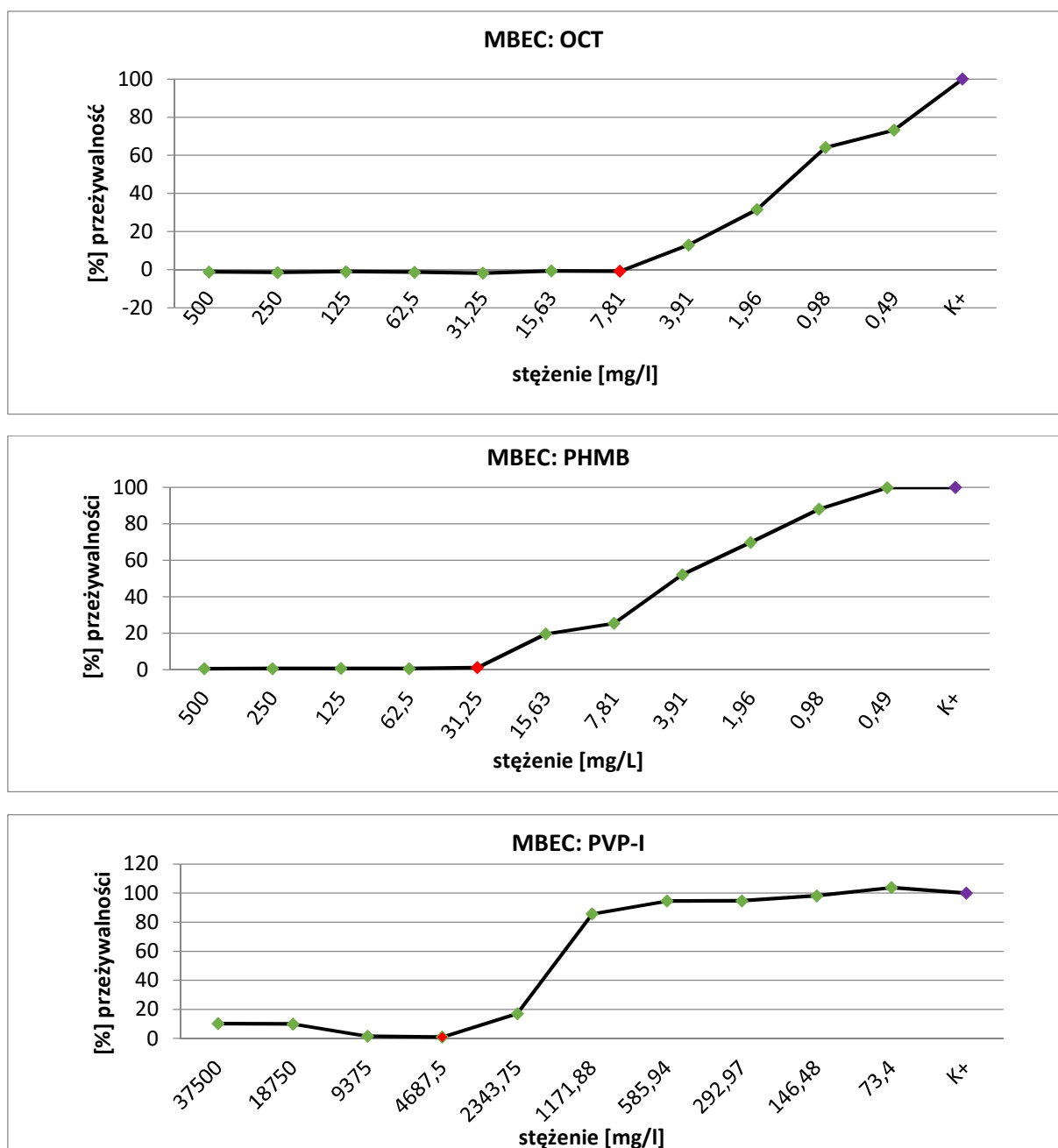
Wykres 2. Minimalne Stężenie chlorheksydy i gentamycyny Eradykujące Biofilm *S.aureus* ATCC 6538. MBEC – minimalne stężenie eradykujące biofilm. CHX – chlorheksydyna; GENTA – gentamycyna. Kolor fioletowy – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej [K+], niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; kolor czerwony – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitej eradykacji biofilmu danego drobnoustroju.



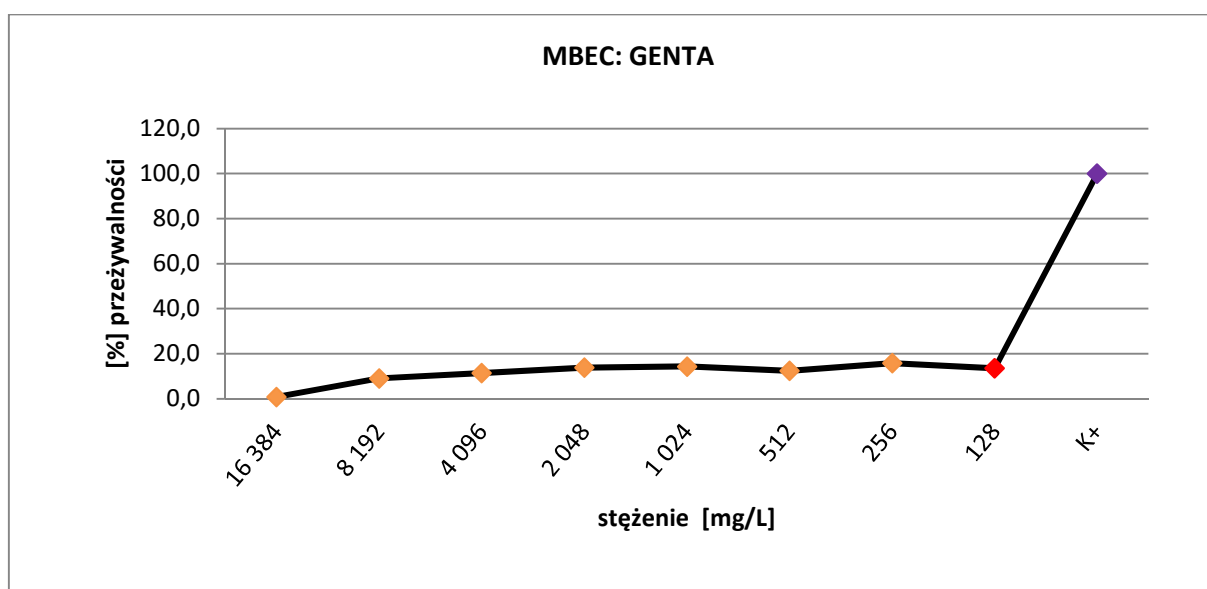
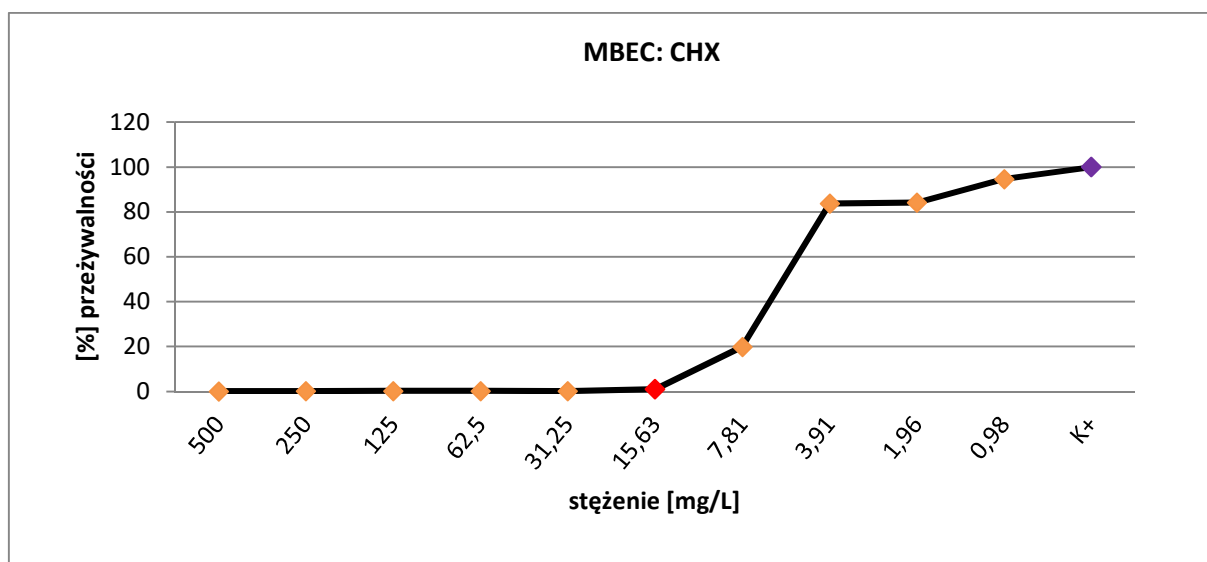
Wykres 3. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu hamujące wzrost *S.aureus* ATTC 6538. MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost; OCT – dwuchlorowodorek oktenidyny; PHMB – poliheksanidyna; PVP-I – powidon jodu. Kolor fioletowy – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej, niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; kolor czerwony – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitego zahamowania wzrostu komórek danego drobnoustroju.



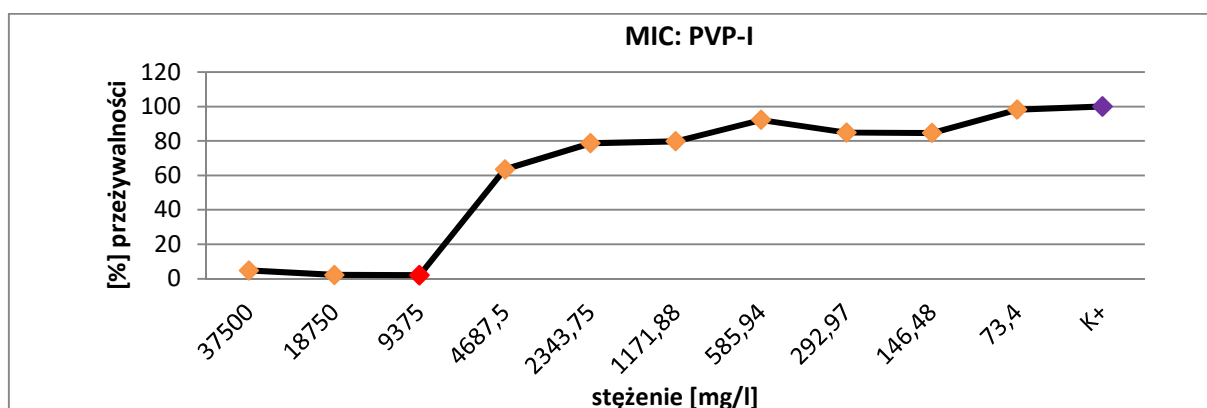
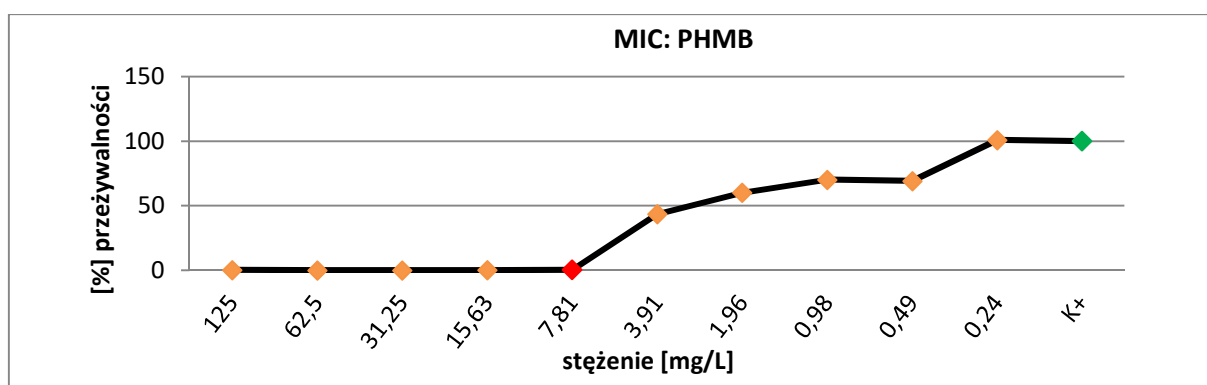
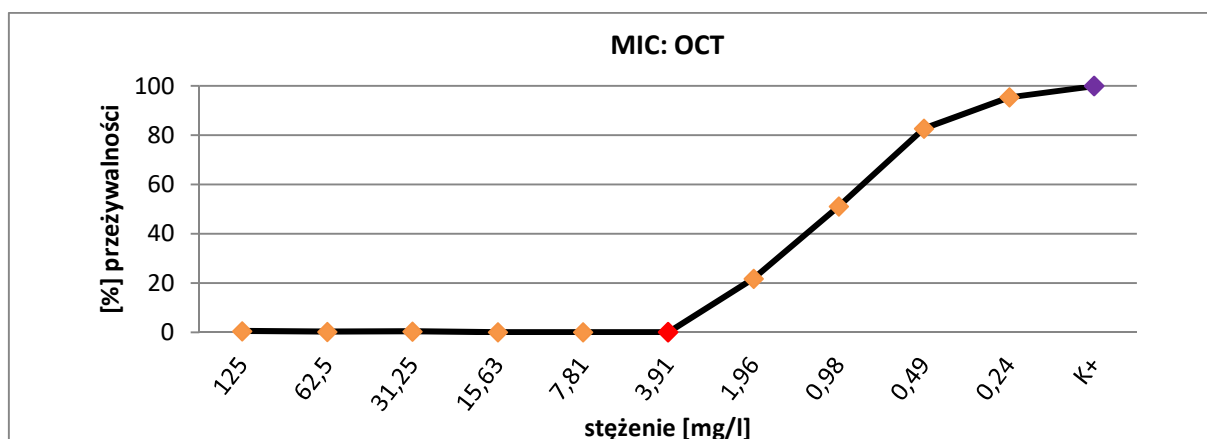
Wykres 4. Minimalne stężenia chlorheksydyny oraz gentamycyny hamujące wzrost *S.aureus* ATTC 6538. MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost; CHX – chlorheksydyna; GENTA - gentamycyna. Kolor fioletowy – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej, niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; kolor czerwony – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitego zahamowania wzrostu komórek danego drobnoustroju.



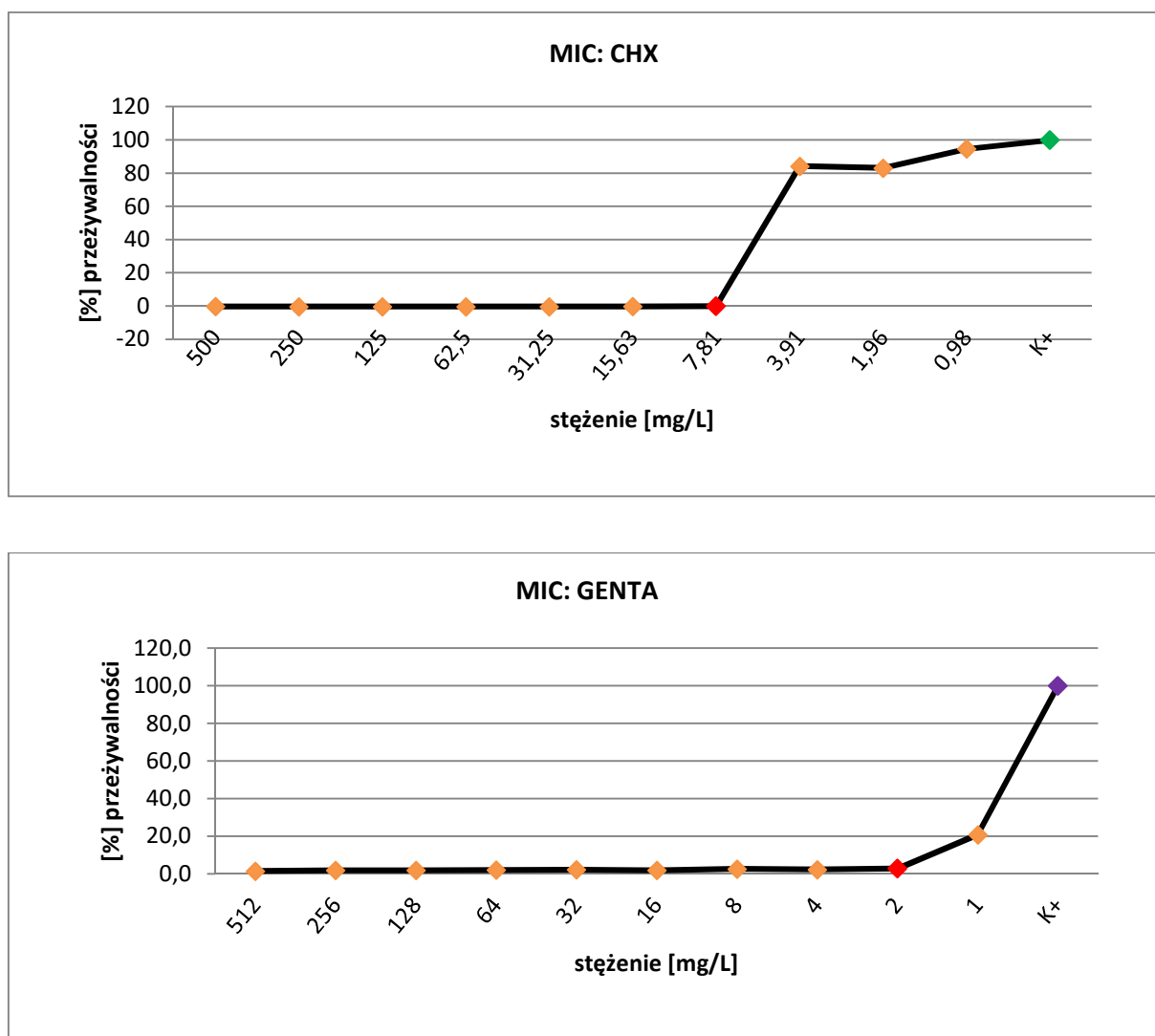
Wykres 5. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu eradykujące biofilm *S.aureus* ATTC 33591. MBEC – minimalne stężenie eradykujące biofilm; OCT – dwuchlorowodorek oktenidyny; PHMB – poliheksanidyna; PVP-I – powidon jodu. Kolor fioletowy – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej [K⁺], niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; kolor czerwony – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitej eradykacji biofilmu danego drobnoustroju.



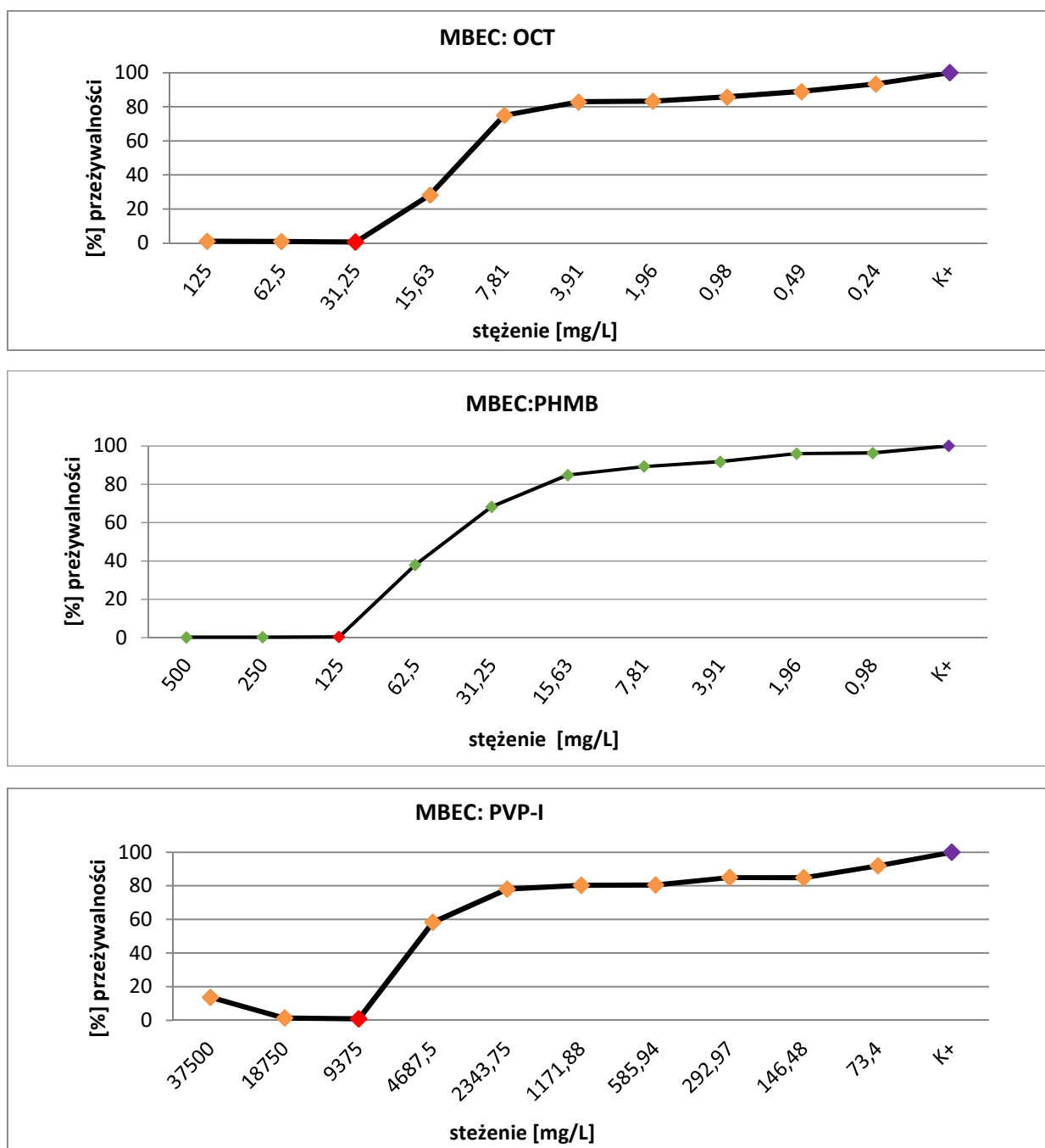
Wykres 6. Minimalne Stężenie chlorheksydyny i gentamycyny Eradykujące Biofilm *S.aureus* ATTC 33591. MBEC – minimalne stężenie eradykujące biofilm. CHX – chlorheksydyna; GENTA – gentamycyna. Kolor fioletowy – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej [K+], niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; kolor czerwony – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitej eradykacji biofilmu danego drobnoustroju.



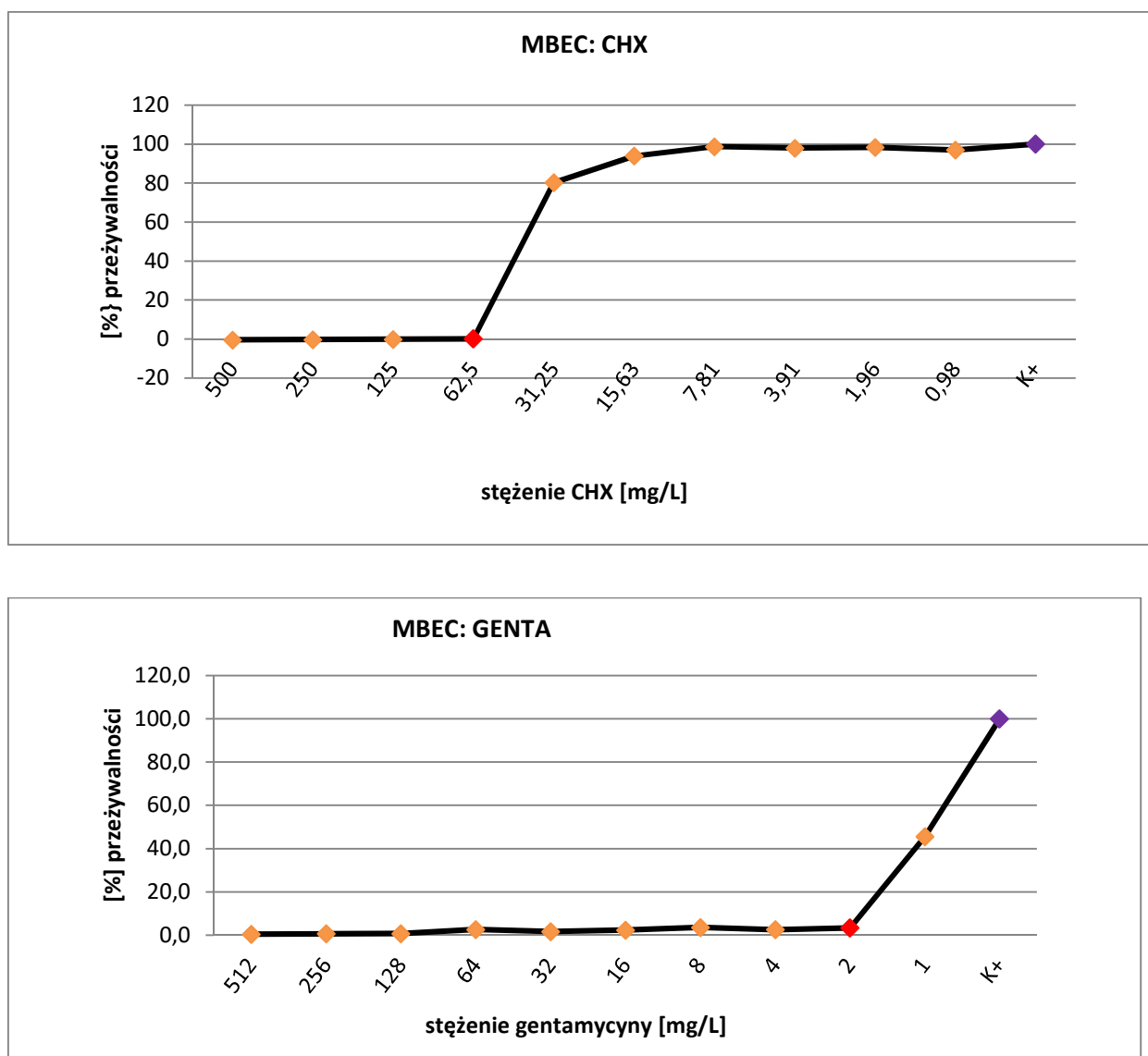
Wykres 7. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu hamujące wzrost *S.aureus* ATTC 33591. MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost; **OCT** – dwuchlorowodorek oktenidyny; **PHMB** – poliheksanidyna; **PVP-I** – powidon jodu. **Kolor fioletowy** – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej, niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; **kolor czerwony** – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitego zahamowania wzrostu komórek danego drobnoustroju.



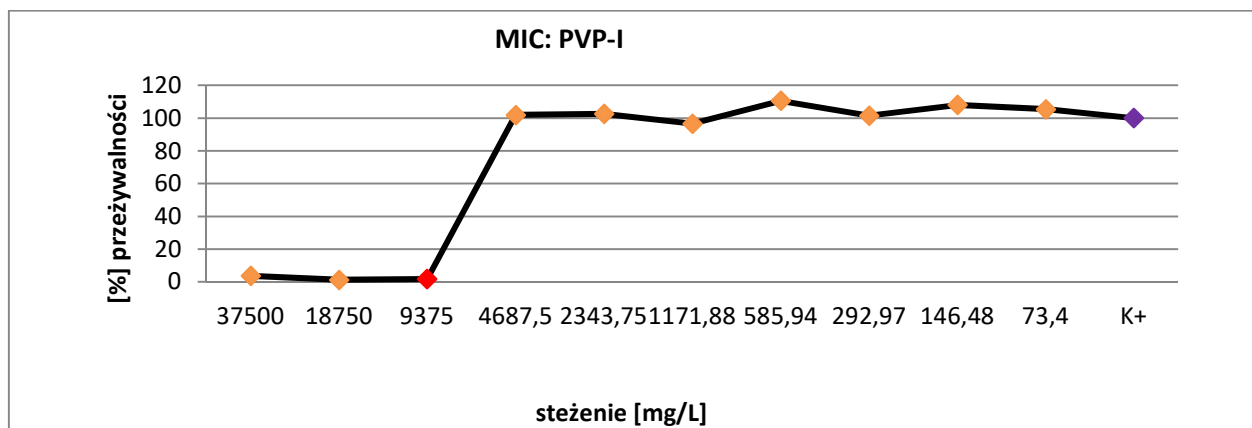
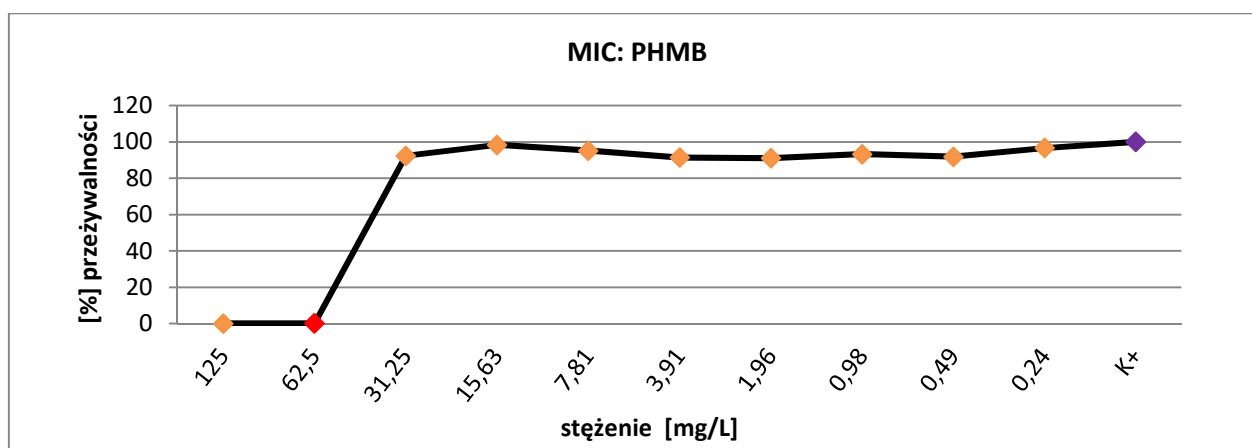
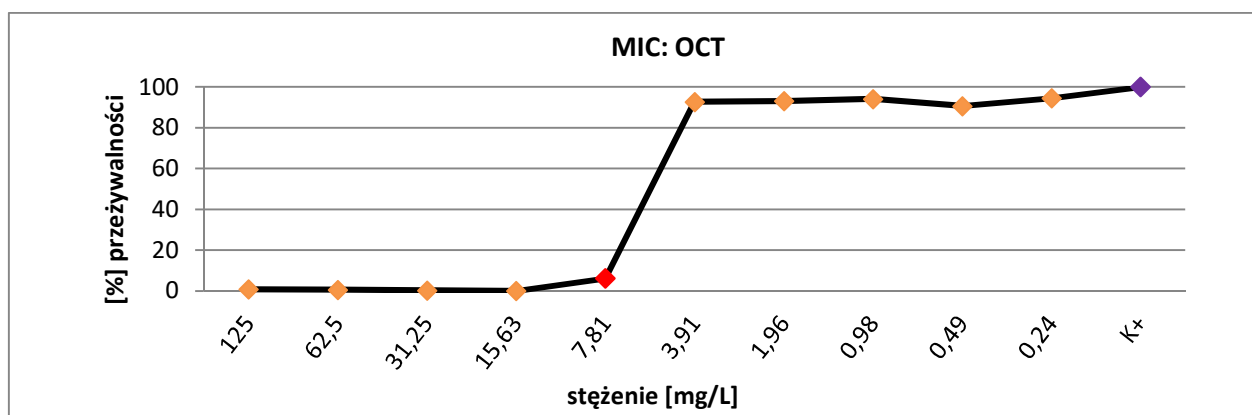
Wykres 8. Minimalne stężenia chlorheksydydy oraz gentamycyny hamujące wzrost *S.aureus* ATTC 33591. MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost; **CHX** – chlorheksydydy; **GENTA** - gentamycyna. **Kolor fioletowy** – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej, niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; **kolor czerwony** – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitego zahamowania wzrostu komórek danego drobnoustroju.



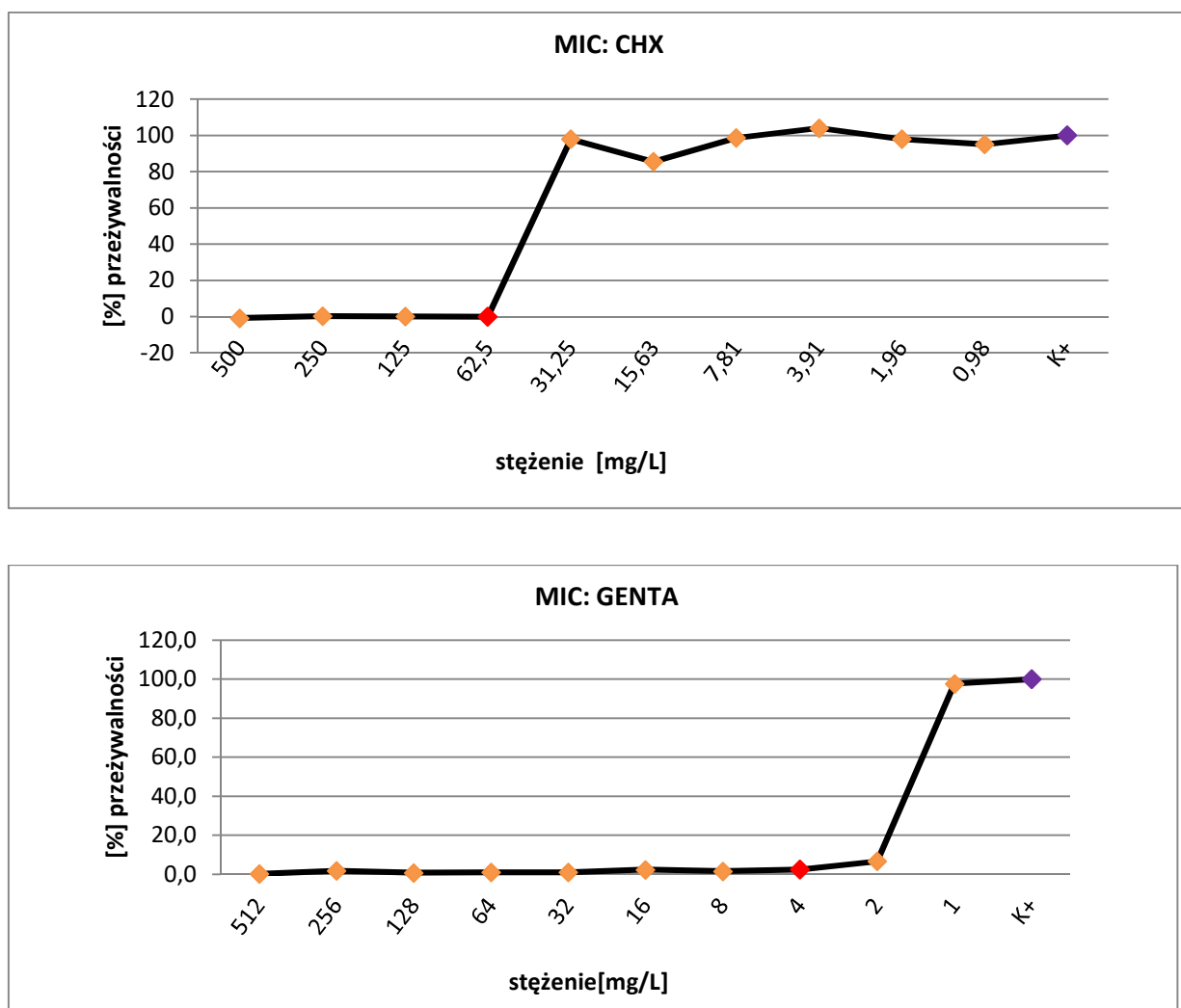
Wykres 9. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu eradykujące biofilm *P.aeruginosa* ATTC 15442. MBEC – minimalne stężenie eradykujące biofilm; OCT – dwuchlorowodorek oktenidyny; PHMB – poliheksanidyna; PVP-I – powidon jodu. Kolor fioletowy – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej [K+], niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; kolor czerwony – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitej eradykacji biofilmu danego drobnoustroju.



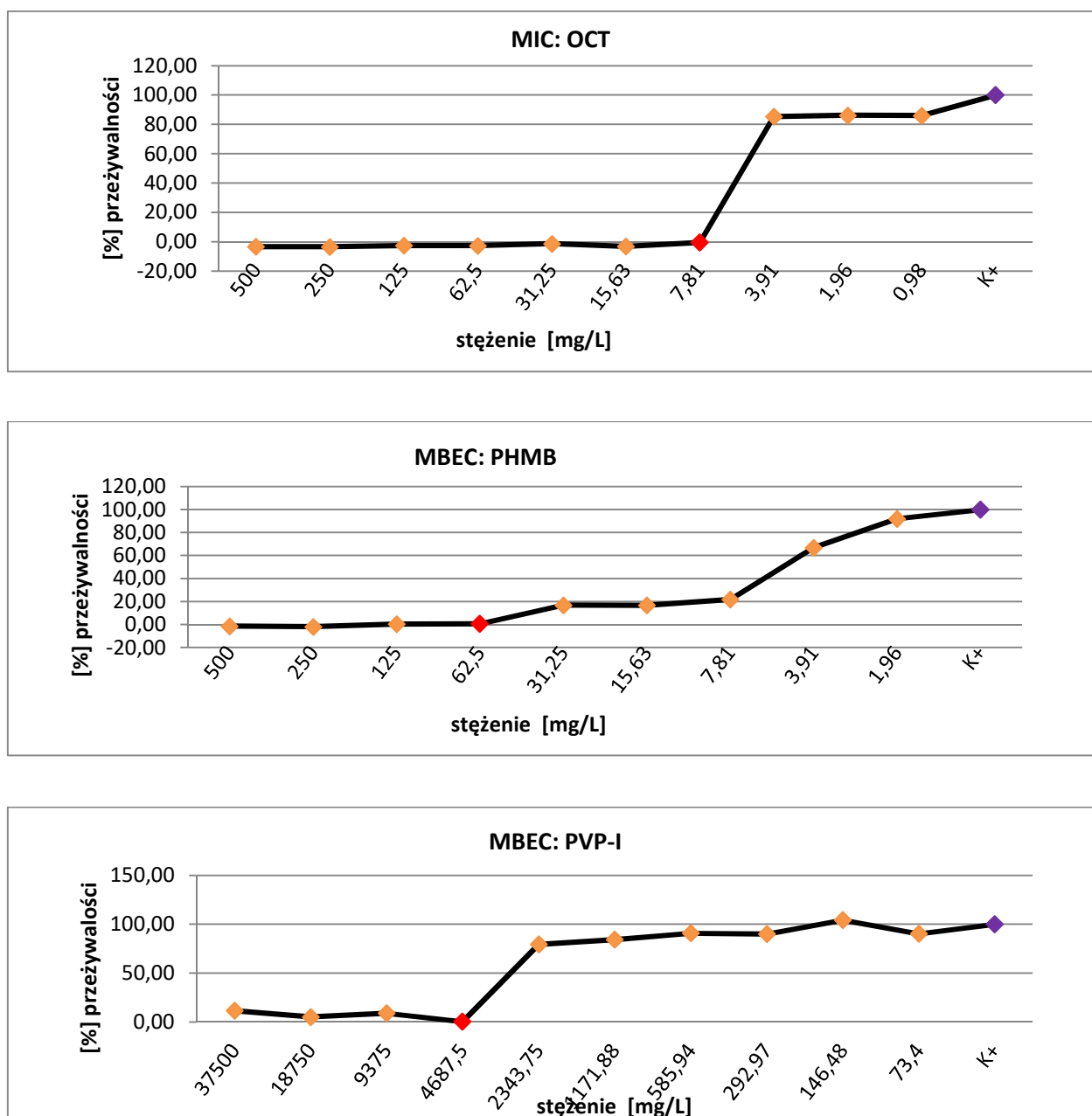
Wykres 10. Minimalne Stężenie chlorheksydy i gentamycyny Eradykujące Biofilm *P.aeruginosa* ATCC 15442. MBEC – minimalne stężenie eradykujące biofilm. CHX – chlorheksydyna; GENTA – gentamycyna. Kolor fioletowy – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej [K⁺], niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; kolor czerwony – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitej eradykacji biofilmu danego drobnoustroju.



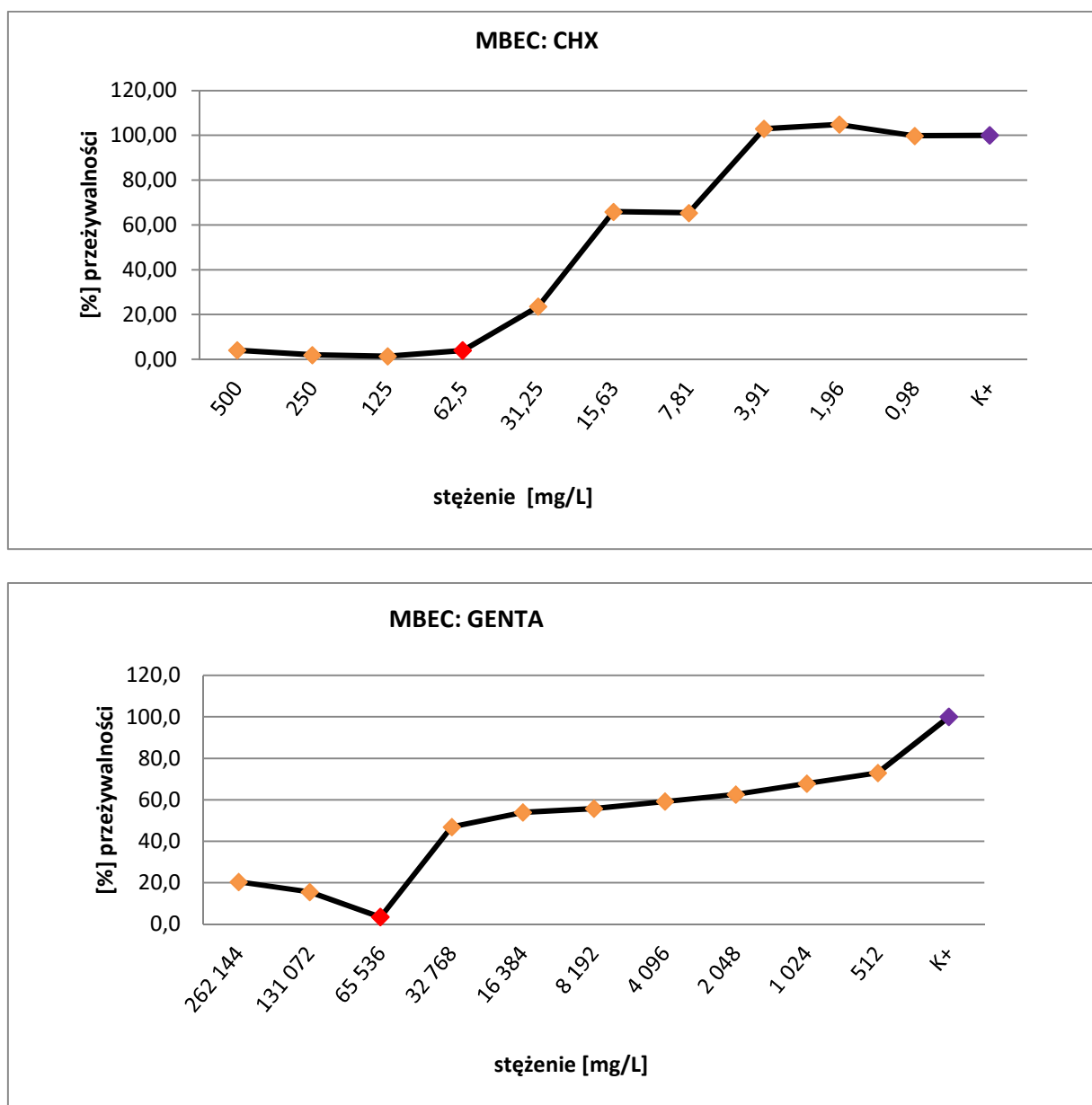
Wykres 11. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu hamujące wzrost *P.aeruginosa* ATTC 15442. MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost; **OCT** – dwuchlorowoderek oktenidyny; **PHMB** – poliheksanidyna; **PVP-I** – powidon jodu. **Kolor fioletowy** – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej, niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; **kolor czerwony** – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitego zahamowania wzrostu komórek danego drobnoustroju.



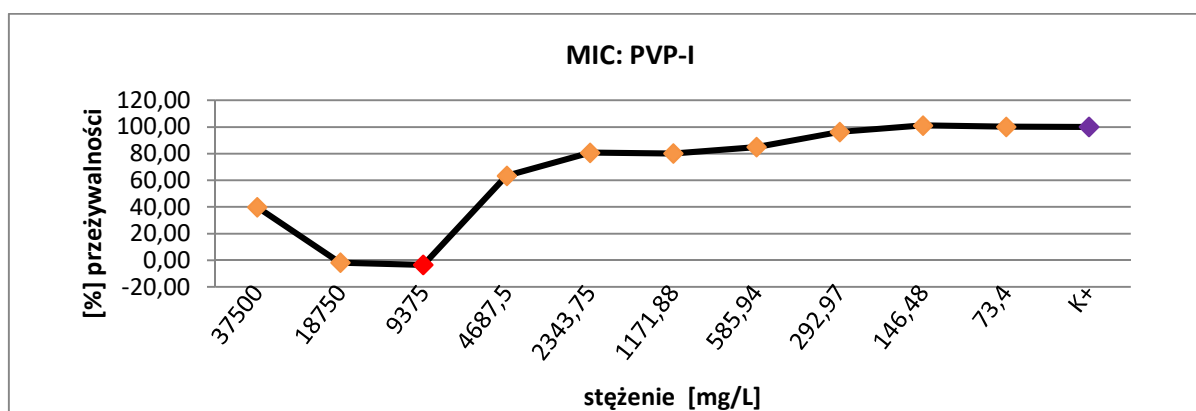
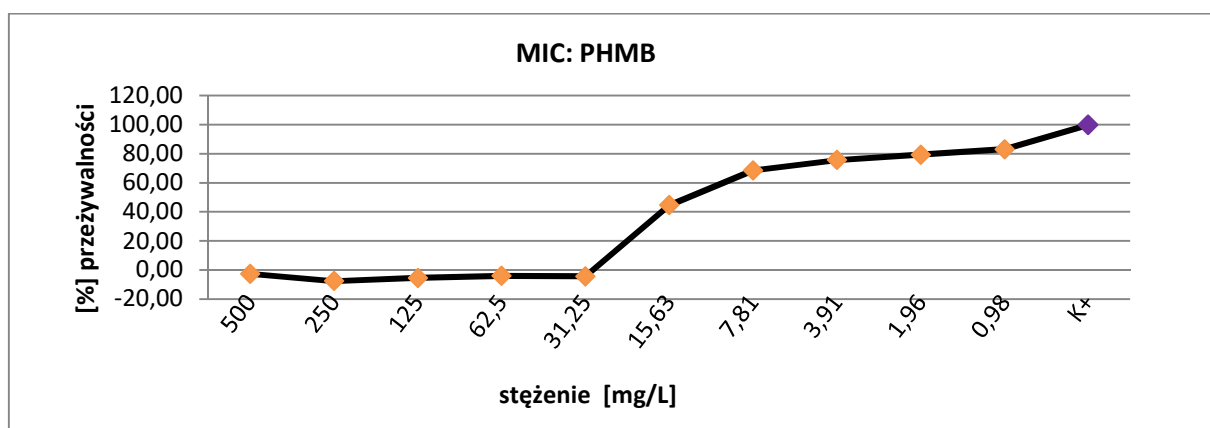
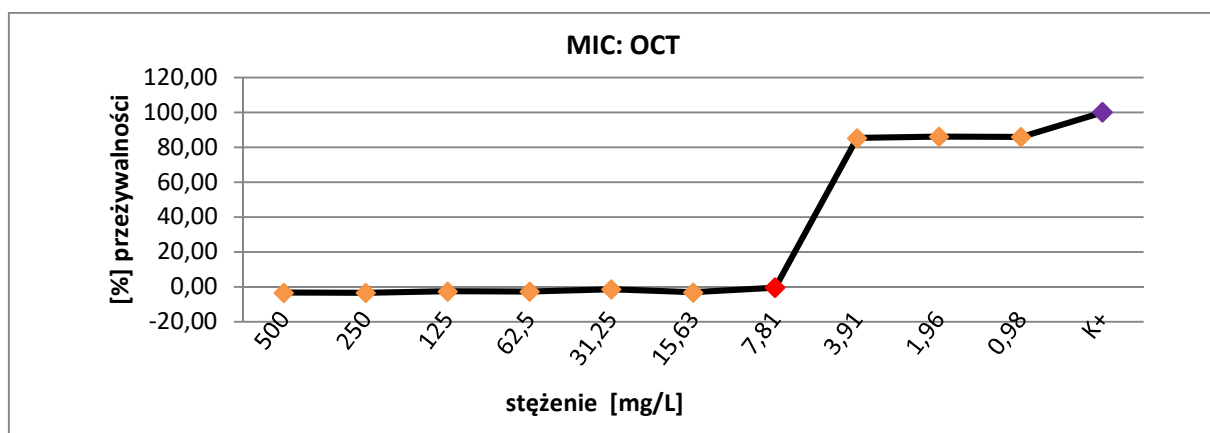
Wykres 12. Minimalne stężenia chlorheksydydy oraz gentamycyny hamujące wzrost *P.aeruginosa* ATTC 15442. MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost; **CHX** – chlorheksydydy; **GENTA** - gentamycyna. Kolor fioletowy – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej, niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; kolor czerwony – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitego zahamowania wzrostu komórek danego drobnoustroju.



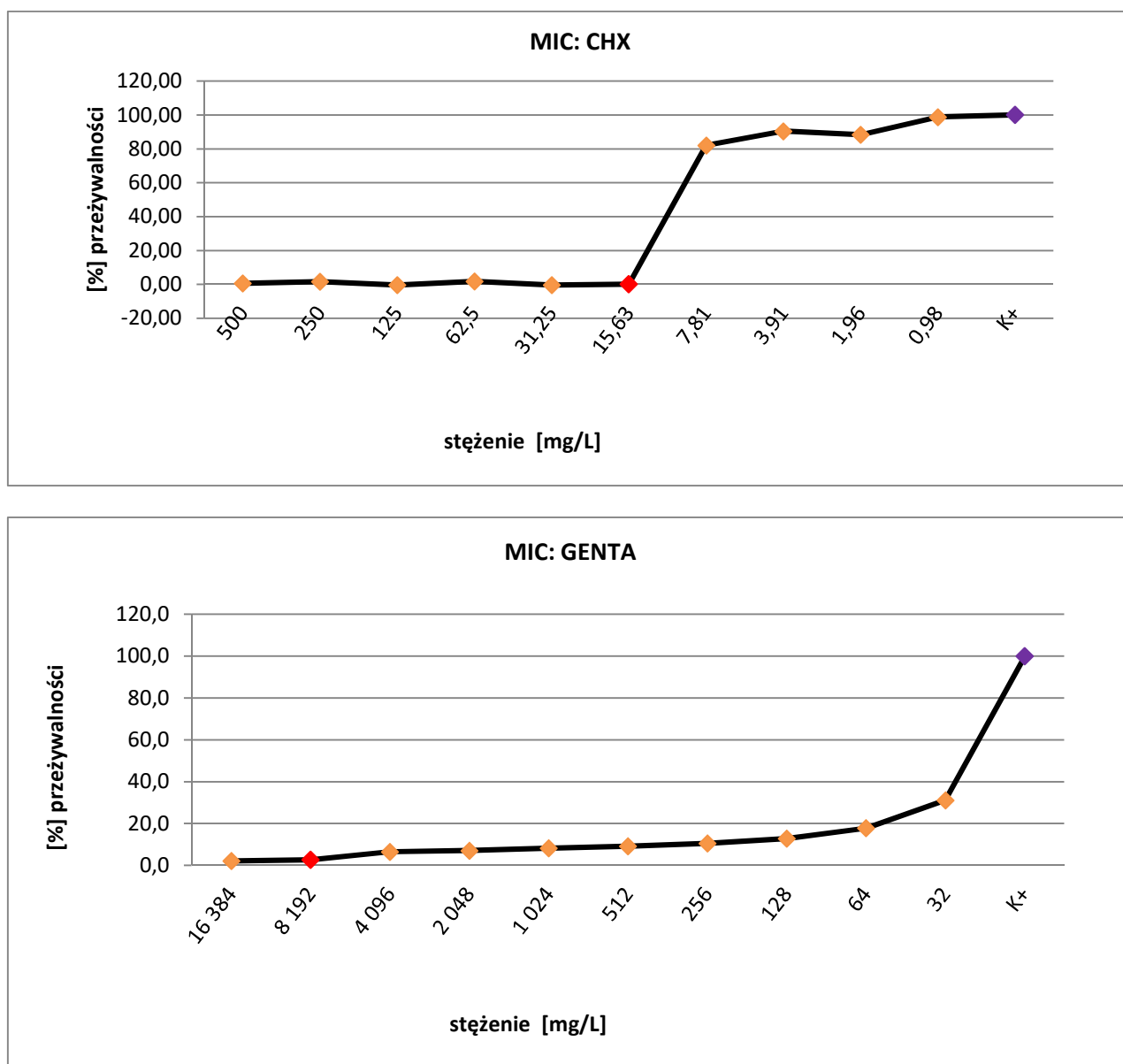
Wykres 13. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu eradykujące biofilm *E.faecalis* ATTC 29212. MBEC – minimalne stężenie eradykujące biofilm; **OCT** – dwuchlorowodorek oktenidyny; **PHMB** – poliheksanidyna; **PVP-I** – powidon jodu. **Kolor fioletowy** – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej [K+], niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; **kolor czerwony** – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitej eradykacji biofilmu danego drobnoustroju.



Wykres 14. Minimalne Stężenie chlorheksydyny i gentamycyny eradykujące Biofilm *E.faecalis* ATCC 29212. MBEC – minimalne stężenie eradykujące biofilm. **CHX** – chlorheksydyna; **GENTA** – gentamycyna. **Kolor fioletowy** – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej [K+], niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; **kolor czerwony** – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitej eradykacji biofilmu danego drobnoustroju.



Wykres 15. Minimalne stężenia oktenidyny, poliheksanidyny i powidonu jodu hamujące wzrost *E.faecalis* ATTC 29212. MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost; **OCT** – dwuchlorowodorek oktenidyny; **PHMB** – poliheksanidyna; **PVP-I** – powidon jodu. **Kolor fioletowy** – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej, niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; **kolor czerwony** – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitego zahamowania wzrostu komórek danego drobnoustroju.



Wykres 16. Minimalne stężenia chlorheksydyny oraz gentamycyny hamujące wzrost *E. faecalis* ATTC 29212. MIC – minimalne stężenie hamujące wzrost; CHX – chlorheksydyna; GENTA - gentamycyna. Kolor fioletowy – przeżywalność [%] w próbie kontrolnej, niepoddanej działaniu środka przeciwdrobnoustrojowego; kolor czerwony – najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, którego zastosowanie prowadziło do całkowitego zahamowania wzrostu komórek danego drobnoustroju

Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że formy planktoniczne *S.aureus*, *P.aeruginosa* cechują się wrażliwością na badane związki przeciwdrobnoustrojowe, wyjątkiem był *E. faecalis*, który cechował się opornością na aktywność gentamycyny. Wrażliwość biofilmów badanych drobnoustrojów na antyseptyki i antybiotyków była wyraźnie niższa w porównaniu do wrażliwości form planktonicznych.

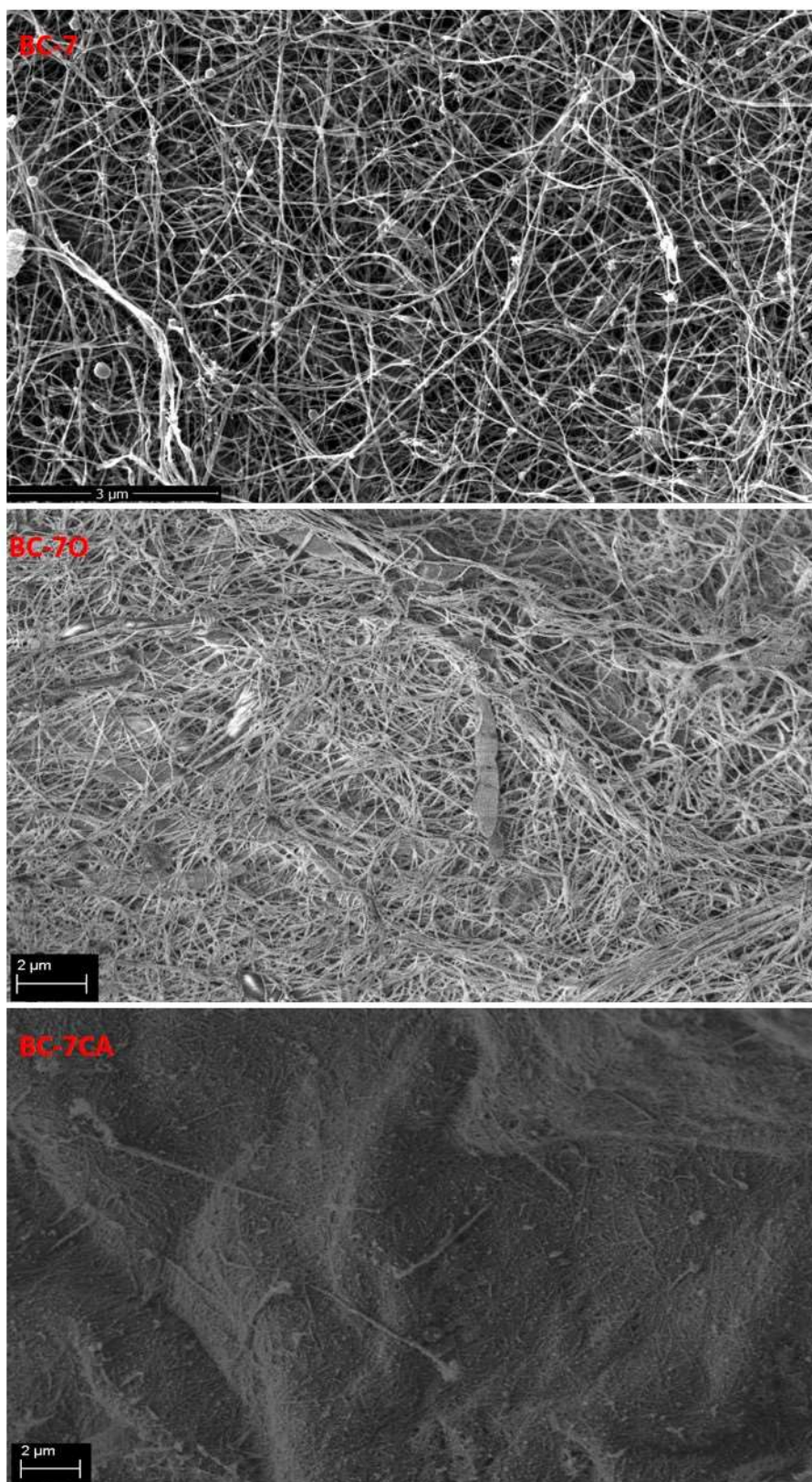
W kolejnym etapie badań podjęto się wytworzenia nośników biocelulozowych, zgodnie z procedurami opisanymi w dziale „Materiały i Metody”. Wytworzono 3 typy nośników niemodyfikowanych (celuloza wytwarzana przez *K.xylinus* w czasie 3, 7, 12 dni); w dalszej części manuskryptu określane mianem BC-3, BC-7, BC-12, odpowiednio) oraz dwóch typów nośników modyfikowanych (celuloza tworzona w obecności oleju oraz celuloza poddana modyfikacji za pomocą kwasu cytrynowego), w dalszej części określane mianem BC-7O, BC-7CA, odpowiednio.

Kształt oraz wygląd poszczególnych typów nośników przedstawiono na **Zdjęciu 1**, natomiast porównanie mikrostruktury celulozy niemodyfikowanej i celuloz modyfikowanych przedstawiono na **Zdjęciu 2**. Uzyskane nośniki różniły się między sobą wysokością (grubością); przy czym najwyższą grubością cechował się nośnik BC-7CA, a najniższą BC-3. Zróżnicowanie w grubości wszystkich nośników (począwszy od najgrubszego do najcieńszego) rozkładało się w następujący sposób: $BC-3 < BC-7 < BC-7O < BC-12 < BC-7CA$. W obrazach uzyskanych za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej, nośniki niemodyfikowane charakteryzowały się wyższą porowatością niż nośniki modyfikowane, natomiast modyfikowany nośnik BC-7O charakteryzował się wyższą porowatością niż nośnik BC-7CA.



Zdjęcie 1. Wygląd i cechy makroskopowe wytworzonych nośników celulozowych.

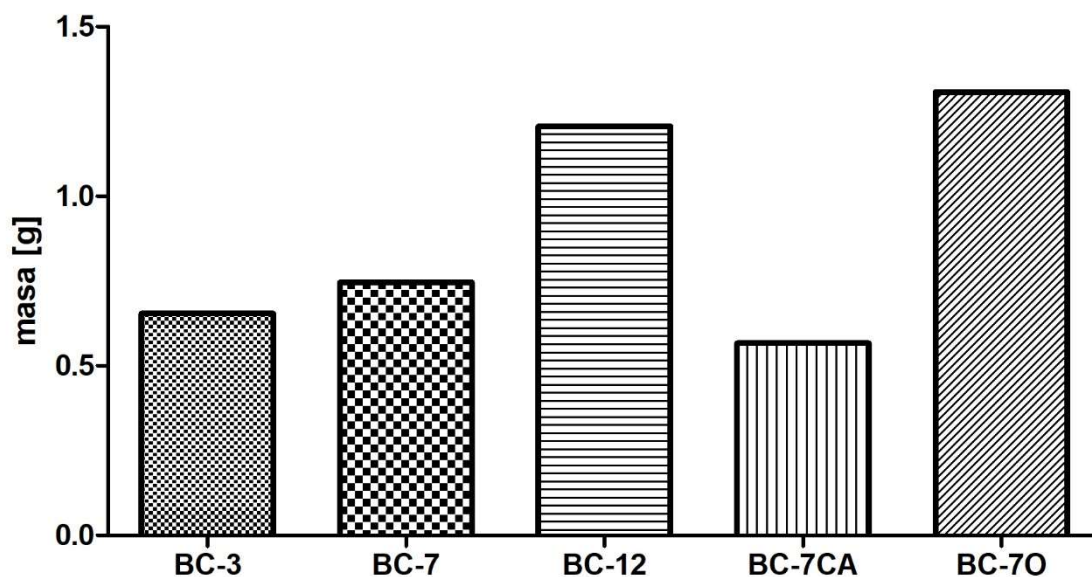
BC-3,7,12: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; **BC-7CA:** celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; **BC-7O:** celuloza modyfikowana olejem, hodowla 7-dniowa. **Zdjęcie górne:** różnice w grubości i kształcie wytworzonych nośników celulozowych; **Zdjęcie dolne, lewe:** uwidocznienie porów w celulozie będących efektem hodowli *K.xylinus* w medium modyfikowanym celulozą. **Zdjęcie dolne, prawe:** uwidocznienie makro-wgłębień oraz zwiększenia objętości celulozy będących efektem modyfikacji kwasem cytrynowym.



Zdjęcie 2. Mikrostruktura wytworzonych nośników celulozowych. BC-7: nośnik niemodyfikowany, 7 dni hodowli; **BC-7O:** nośnik modyfikowany olejem; **BC-7CA:** nośnik modyfikowany kwasem cytrynowym. ZEISS EVO MA 25. Magn. 6000x.

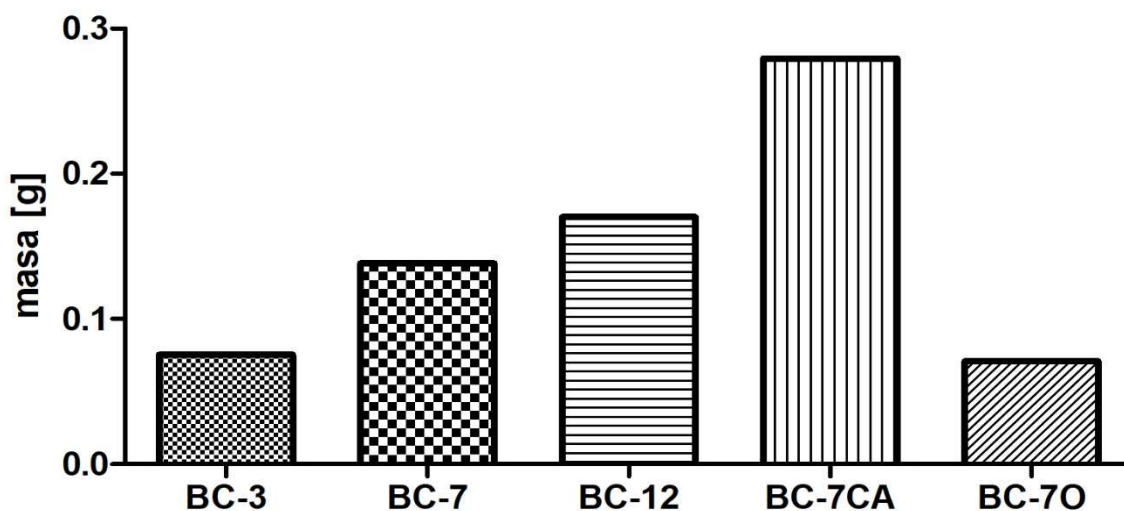
Następnie podjęto się analizy i charakterystyki cech fizycznych wytworzonych nośników celulozowych, w celu określenia ich właściwości, a tym samym potencjalnej przydatności jako opatrunków aktywnych względem drobnoustrojów infekujących rany przewlekłe.

Po wytworzeniu nośników celulozowych dokonano oceny ich masy mokrej [Wykres 17] oraz suchej [Wykres 18] w celu określenia stopnia ich uwodnienia.



Wykres 17. Porównanie różnic w mokrej masie wytworzonych nośników celulozowych.

BC-3,7,12: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; **BC-7CA:** celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; **BC-7O:** celuloza modyfikowana olejem, hodowla 7-dniowa.

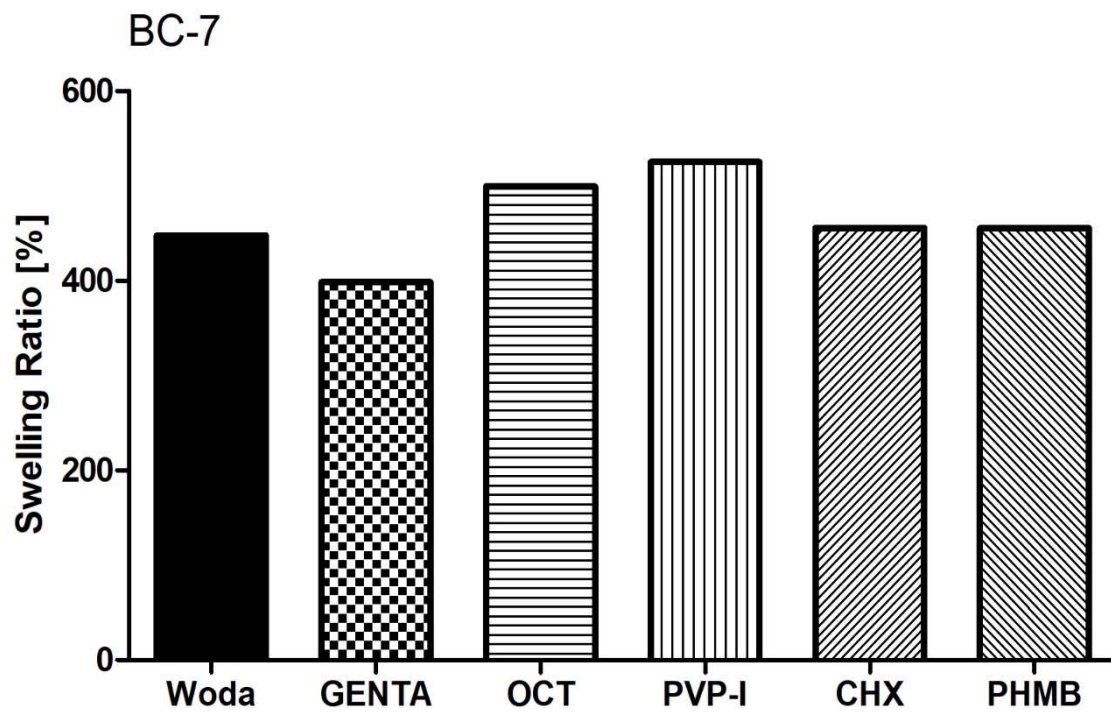
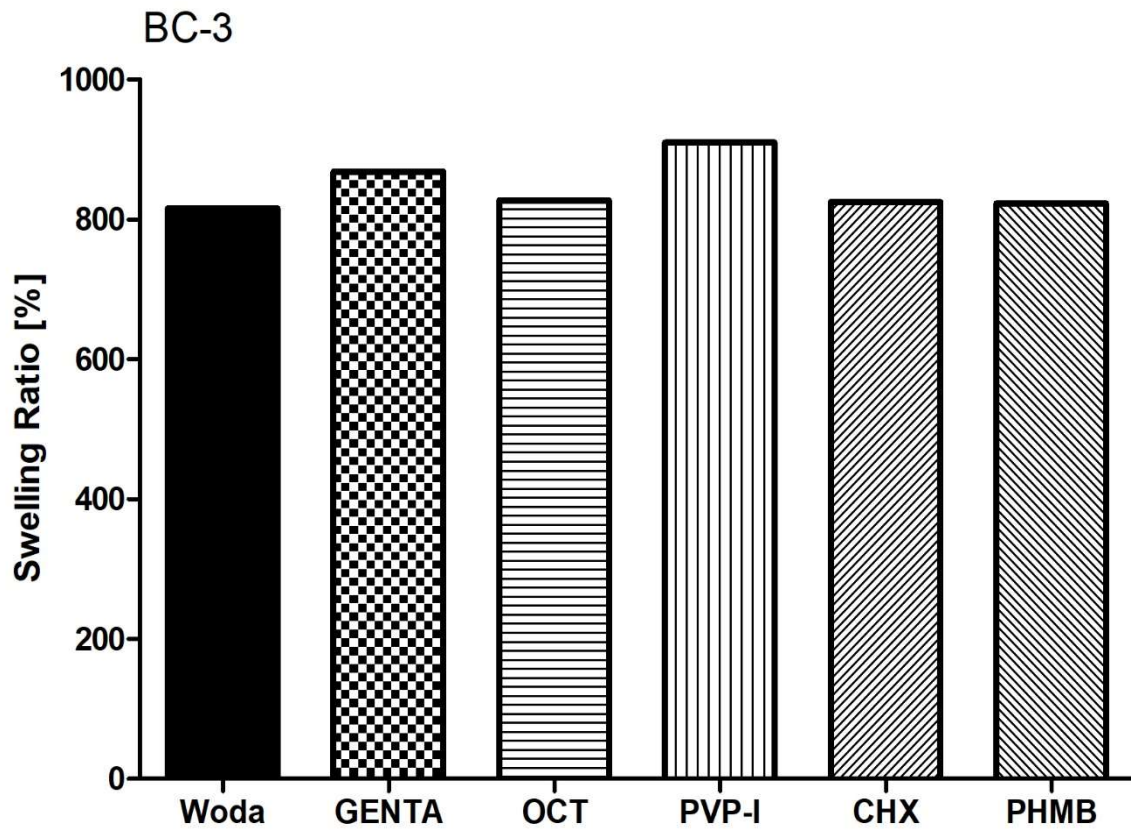


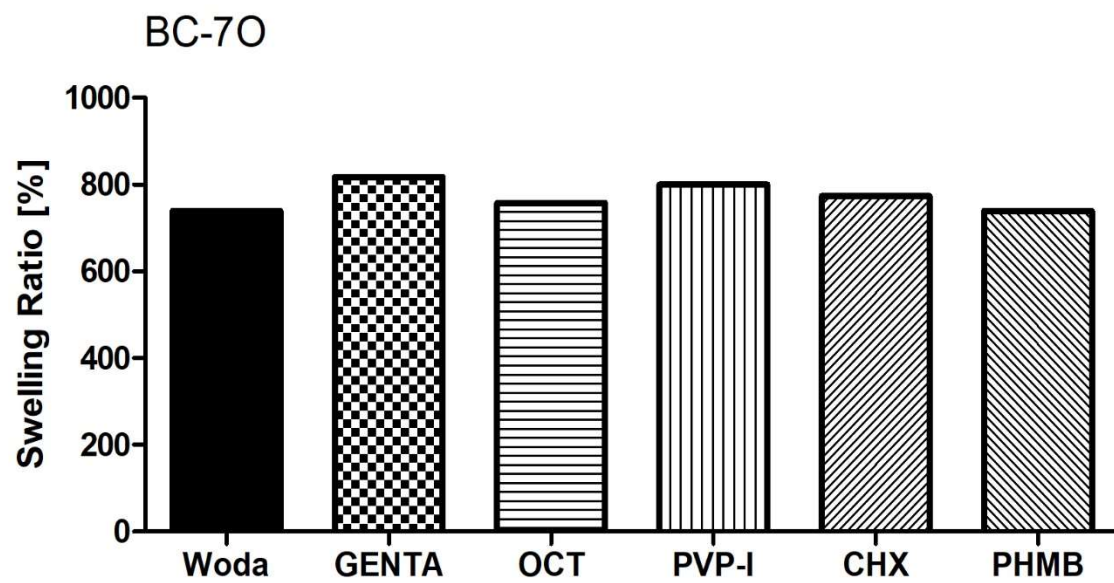
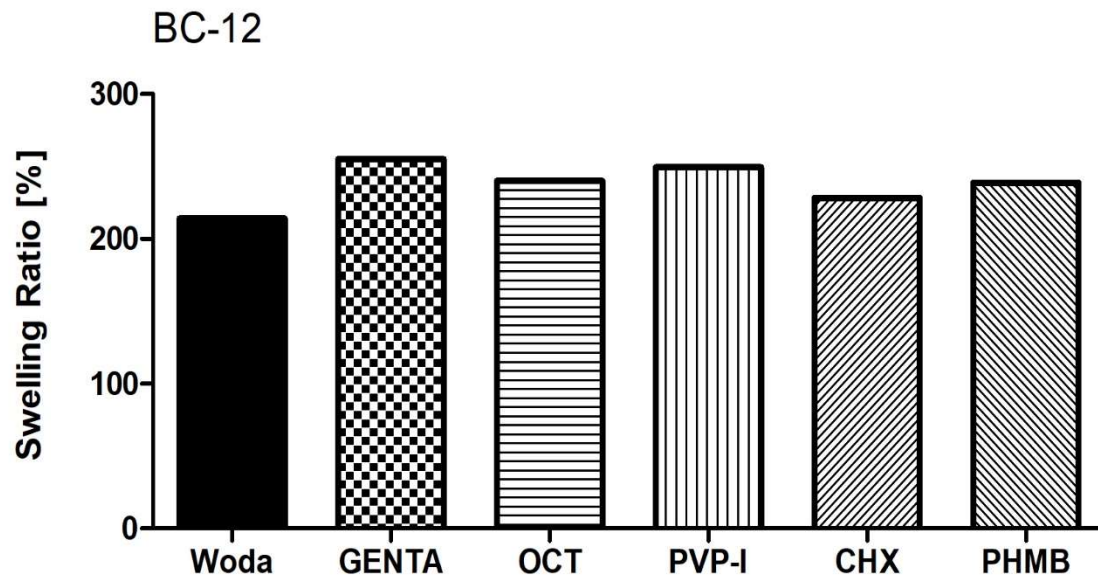
Wykres 18. Porównanie różnic w suchej masie wytworzonych nośników celulozowych.

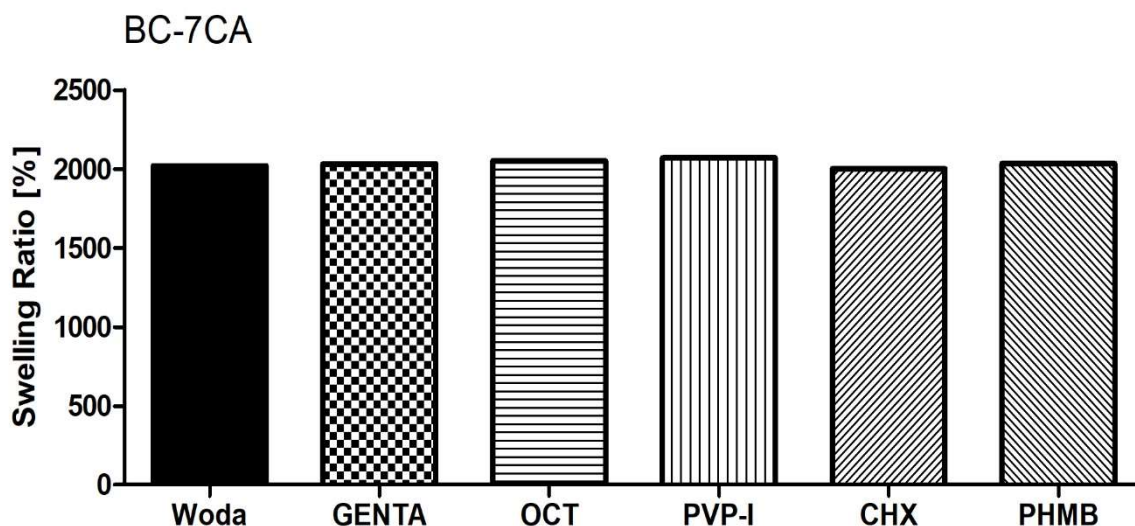
BC-3,7,12: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; **BC-7CA:** celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; **BC-7O,** celuloza 7-dniowa modyfikowana olejem.

Uzyskane wyniki wykazały wysokie uwodnienie celulozy natywnej 3-dniowej oraz celulozy modyfikowanej olejem w porównaniu do pozostałych wytworzonych nośników celulozowych.

Kolejną przeprowadzoną analizą było określenie szybkości pochłaniania [ang. Swelling Rate] wody oraz użytych w doświadczeniu związków przeciwdrobnoustrojowych przez modyfikowane oraz niemodyfikowane nośniki BC [**Wykres 19**].



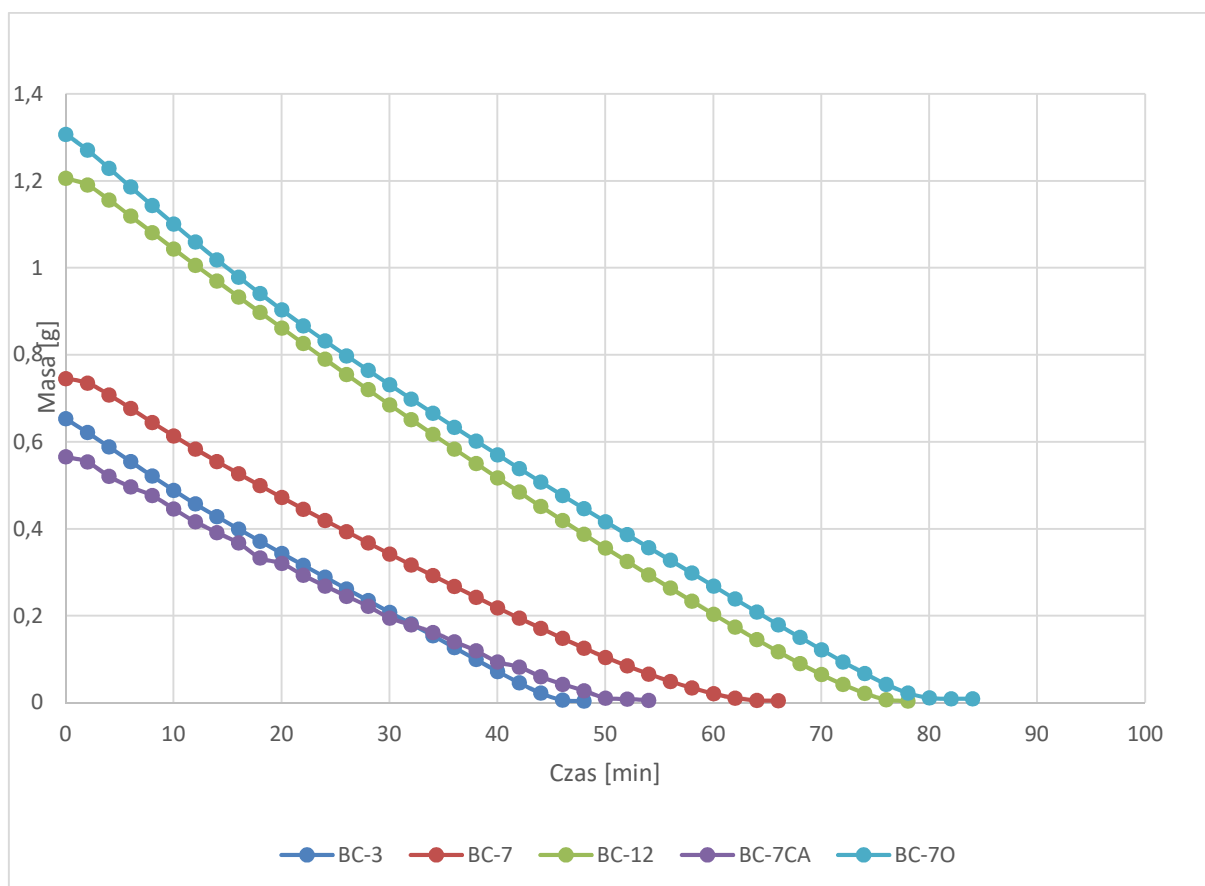




Wykres 19. Porównanie szybkości pochłaniania wody i badanych środków przeciwdrobnoustrojowych przez wytworzone nośniki. PVP-I: powidon jodu, OCT – dwuchlorowodorek oktenidyny, PHMB –poliheksanidyna, CHX –chlorheksydyna; G – gentamycyna. BC-3,7,12: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; BC-7CA: celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; BC-7O, celuloza 7-dniowa modyfikowana olejem.

Zgodnie z danymi przedstawionymi na **Wykresie 19**, poszczególne typy nośników absorbują wodę i zastosowane środki przeciwdrobnoustrojowe w podobnym zakresie; natomiast porównanie absorpcji płynów pomiędzy poszczególnymi typami nośników (BC-3 vs C-7 vs BC-12 vs BC-7O vs BC-7CA) wykazało, że najkorzystniejszą wartością parametru pochłaniania analizowanych roztworów charakteryzuje się nośnik typu BC-7CA, następnie BC-3, następnie BC-7O, następnie BC-7, a najniższą, spośród analizowanych, BC-12.

Następnie porównano zdolność do utrzymania wody przez otrzymane nośniki celulozowe. Jak przedstawiono to na **Wykresie 20**, wartości tego parametru dla poszczególnych typów nośników BC różniły się znacząco (nawet dwukrotnie).

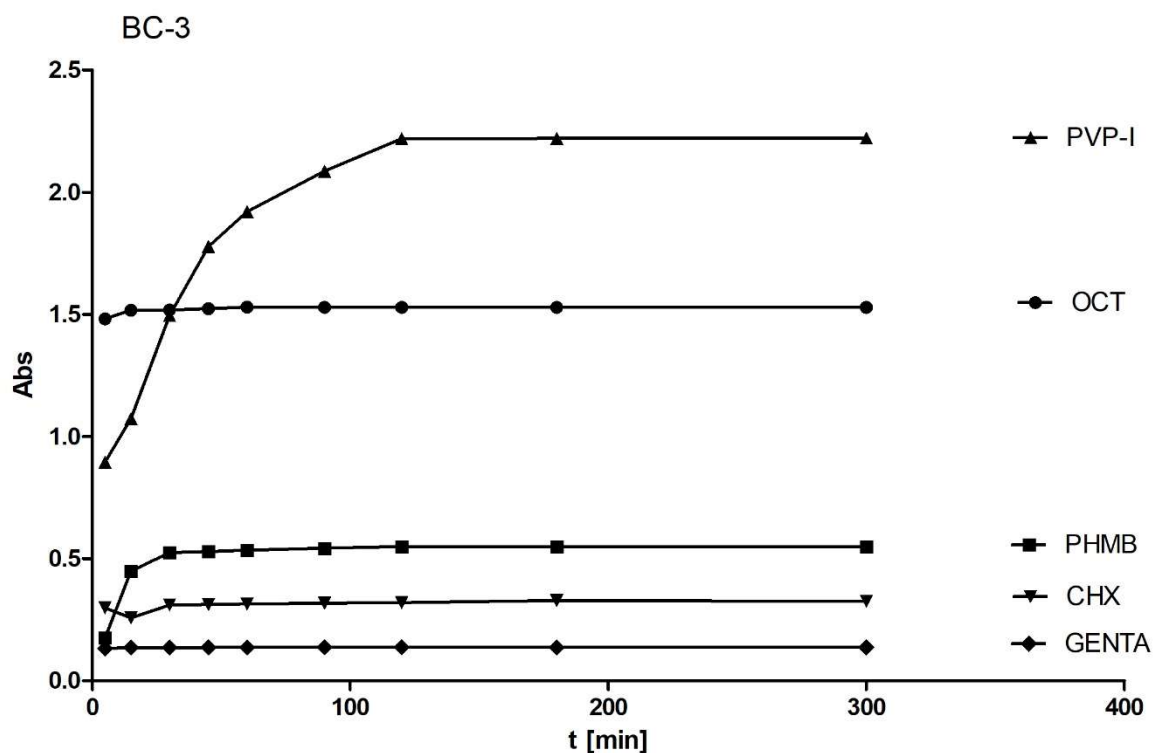


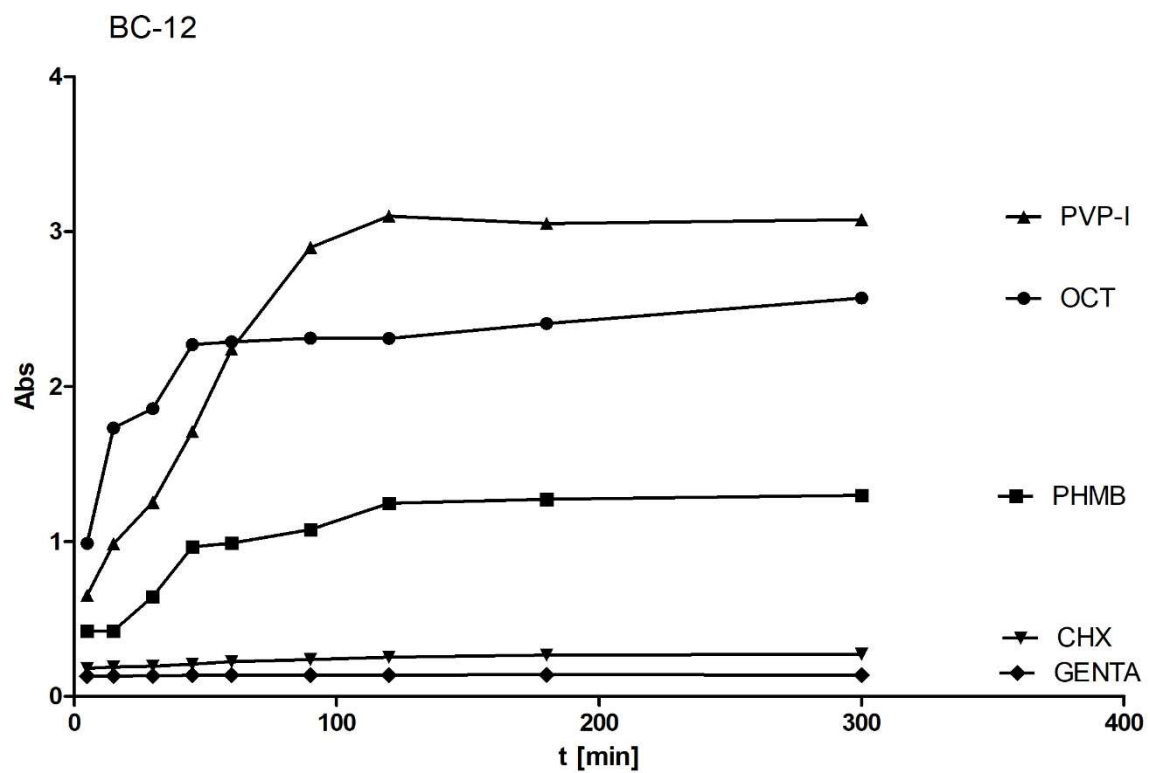
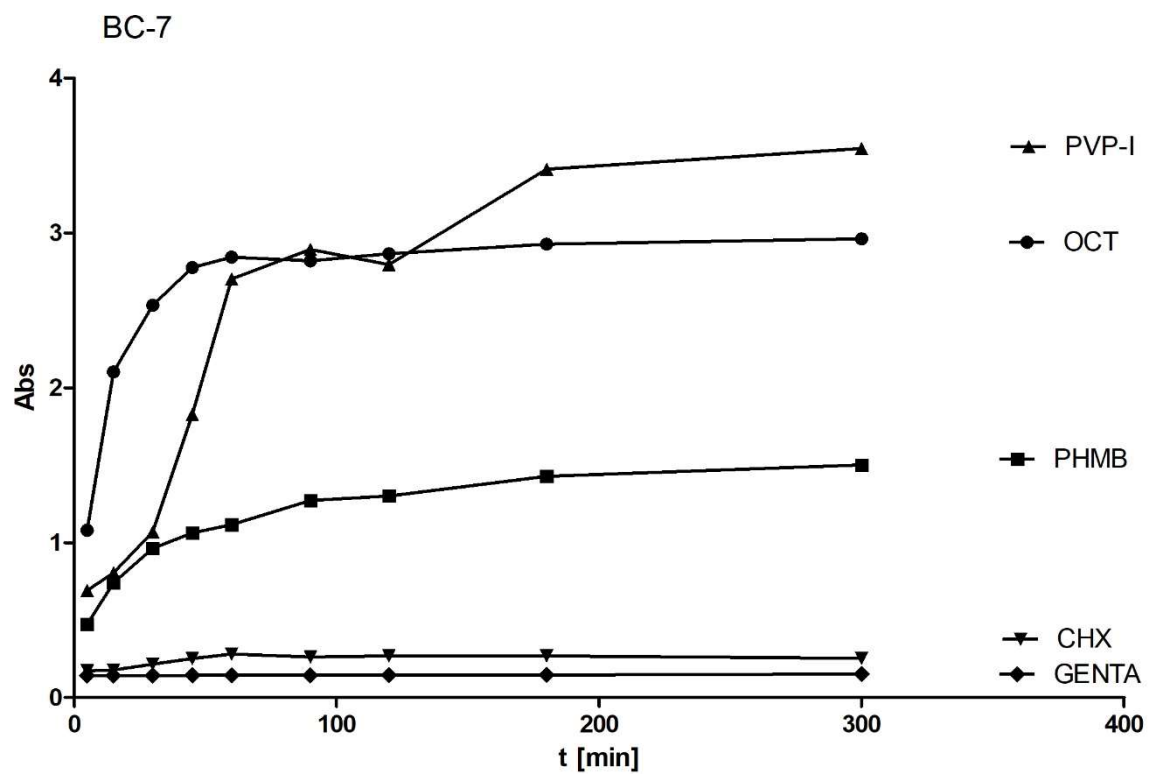
Wykres 20. Różnice w wartości parametru zdolności do utrzymania wody przez uzyskane typy nośników BC. BC-3,7,12: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; **BC-7CA:** celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; **BC-7O,** celuloza 7-dniowa modyfikowana olejem

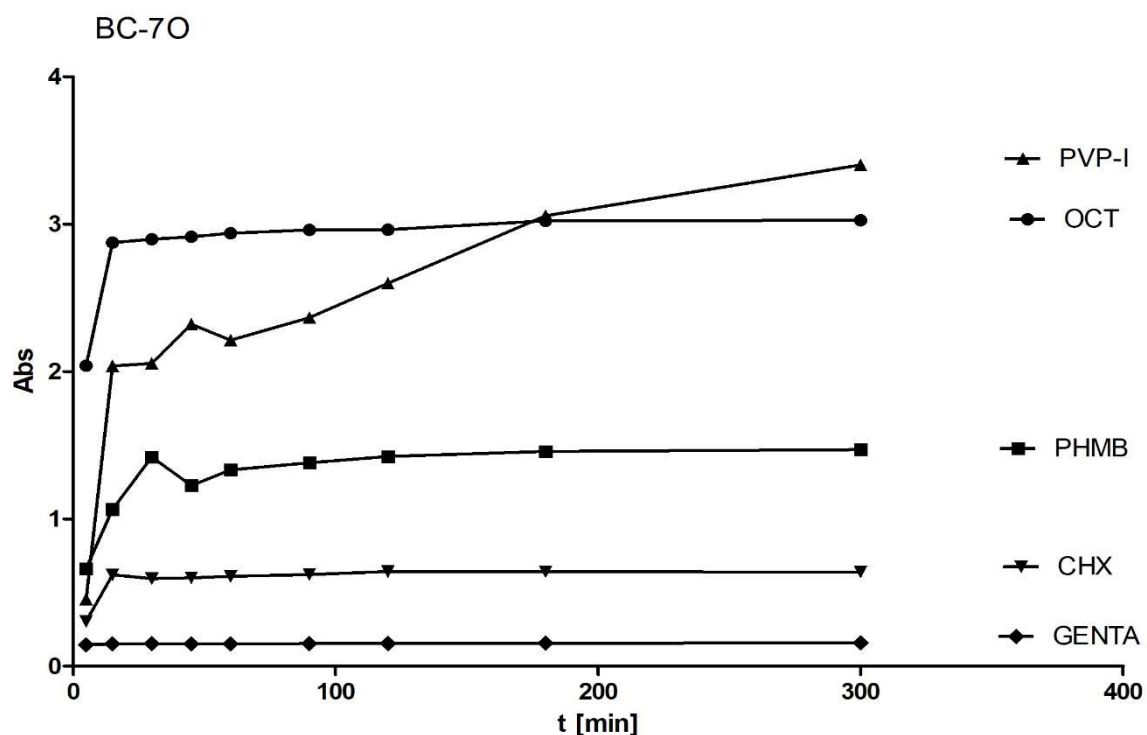
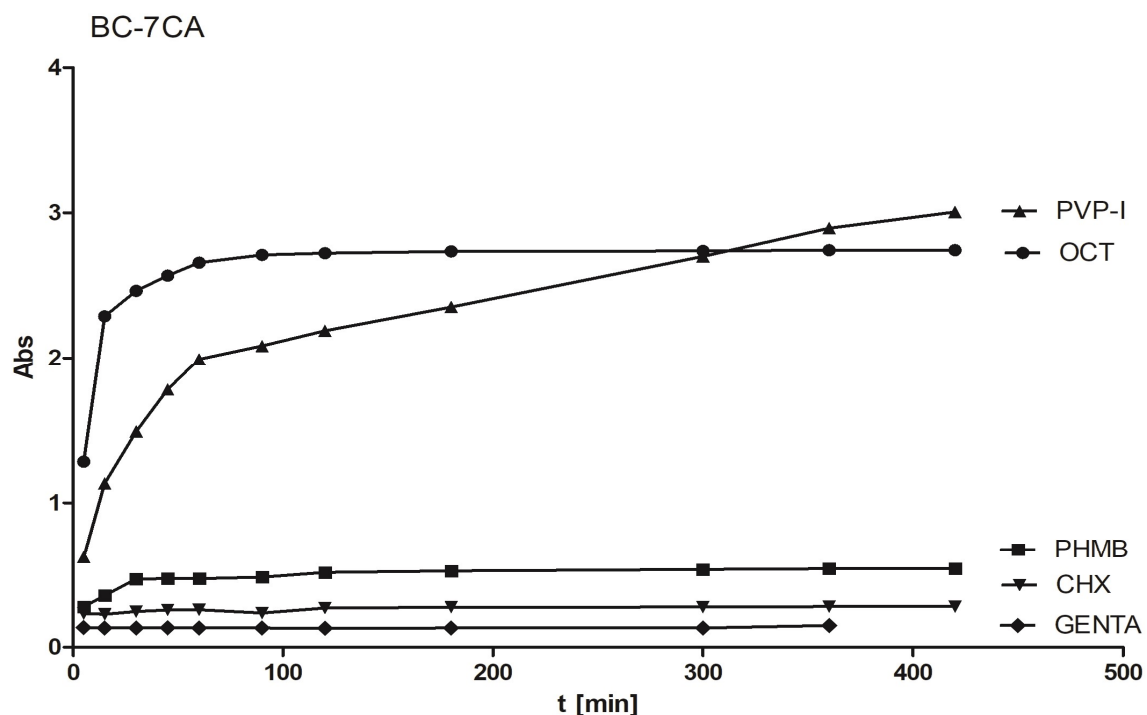
Najwyższą wartością wzmiankowanego parametru cechował się nośnik BC-7O, a najniższą nośnik BC-3. W obrębie nośników BC niemodyfikowanych, wartość parametru utrzymania wody (począwszy od najwyższej) rozkładał się następująco: BC-12 > BC-7 > BC-3, a wśród nośników modyfikowanych: BC-7O > BC-7CA. Należy zaznaczyć, że wszystkie analizowane nośniki oddawały wodę w sposób równomierny (objętościowo-wagowy ubytek płynu był równy lub zbliżony do siebie w analizowanych interwałach czasowych).

Określenie zdolności parametrów wytworzonych nośników BC do pochłaniania i oddawania wody ze swojej struktury było analizą konieczną dla przeprowadzenia badania dotyczącego uwalniania związków przeciwdrobnoustrojowych przez uprzednio zaimpregnowane

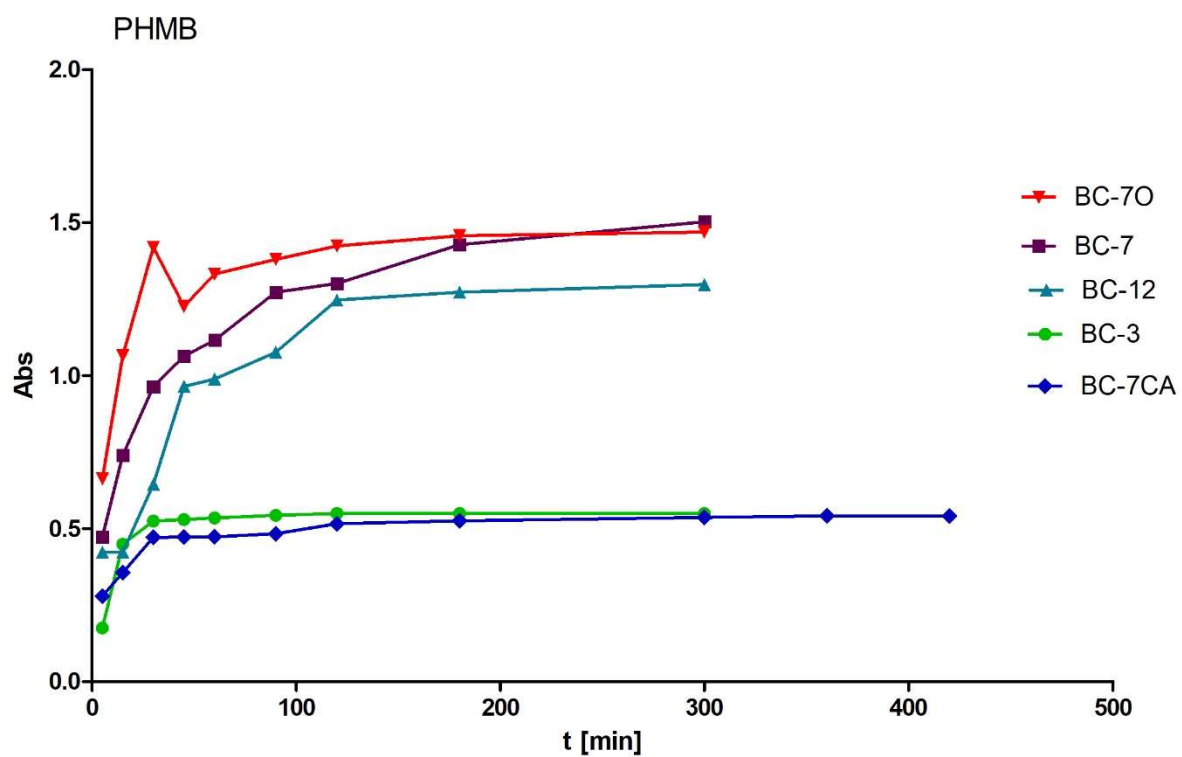
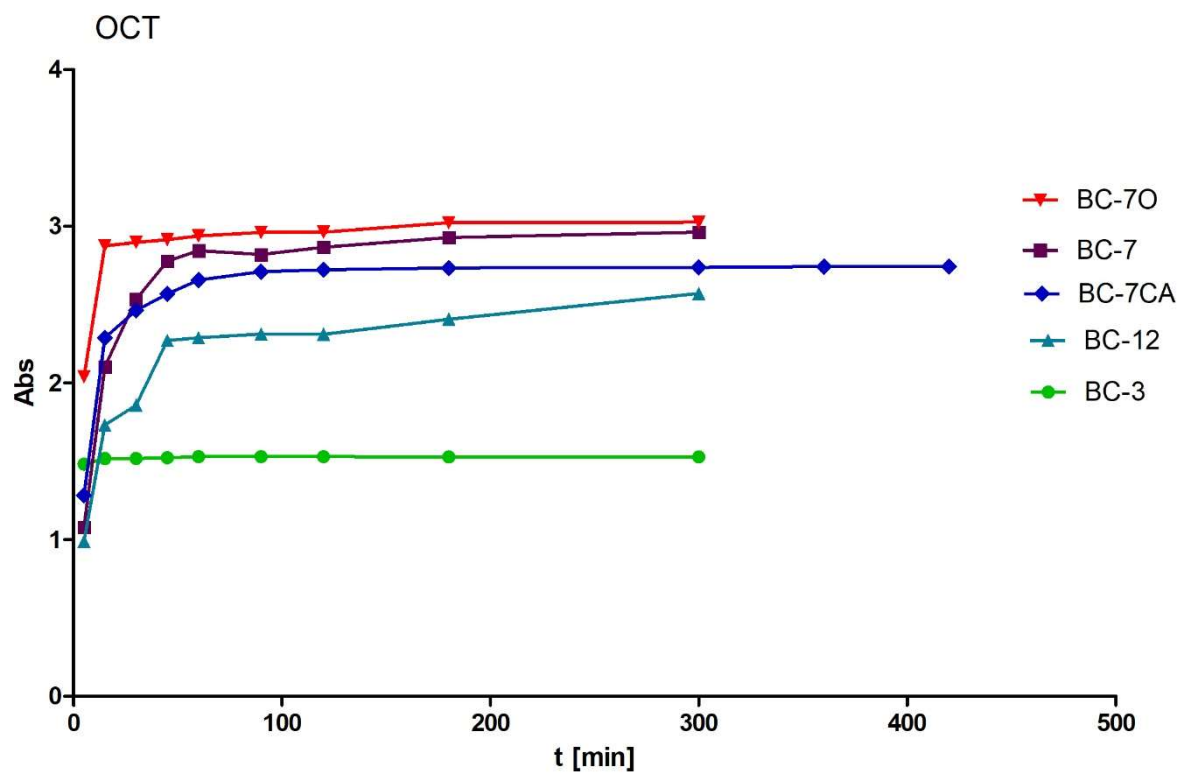
nośniki BC. Na **Wykresie 21** przedstawiono wyniki ukazujące proces uwalniania antyseptyków i antybiotyku z poszczególnych typów nośników BC w czasie 0-300 minut a na **Wykresie 22** uwalnianie poszczególnych związków przeciwdrobnoustrojowych z analizowanych typów nośników.

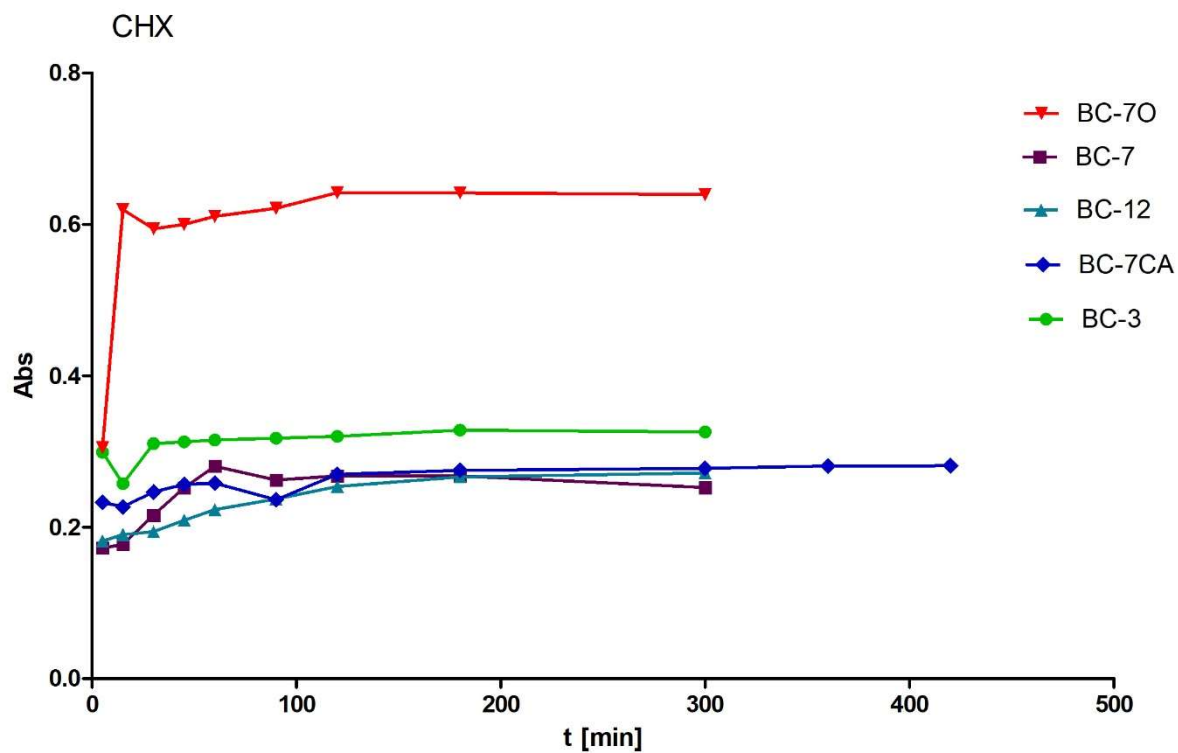
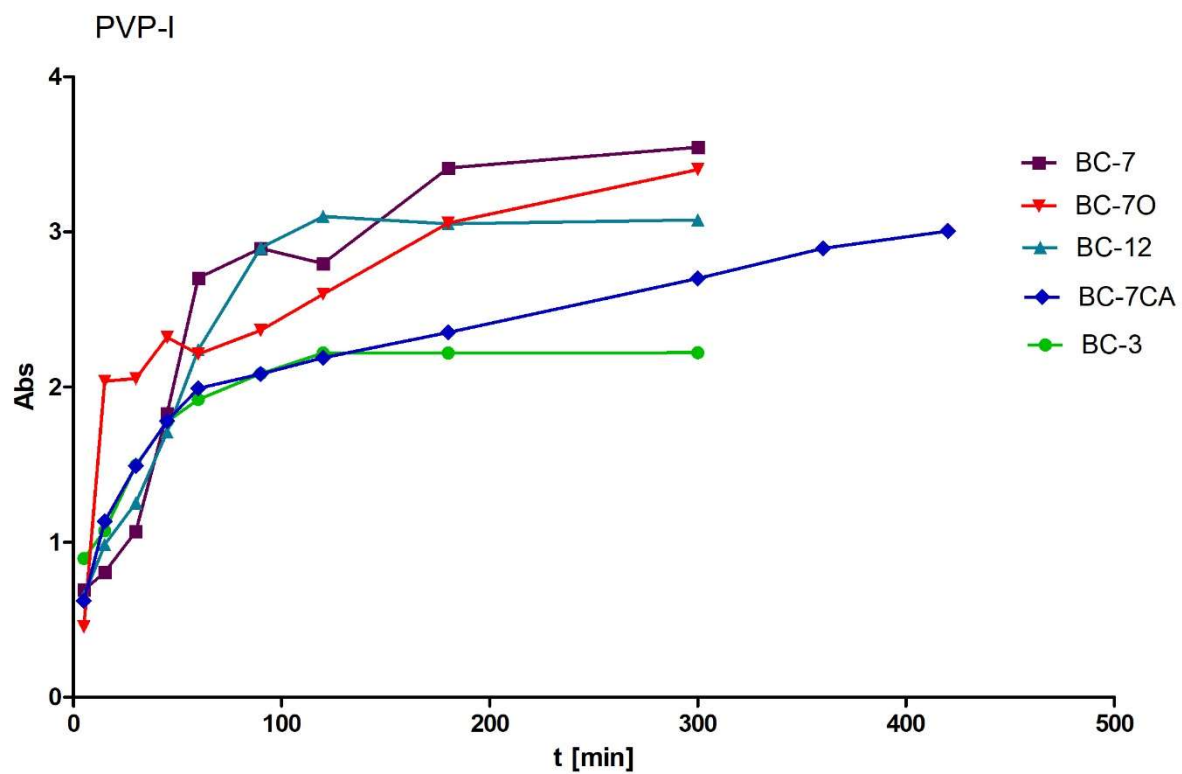


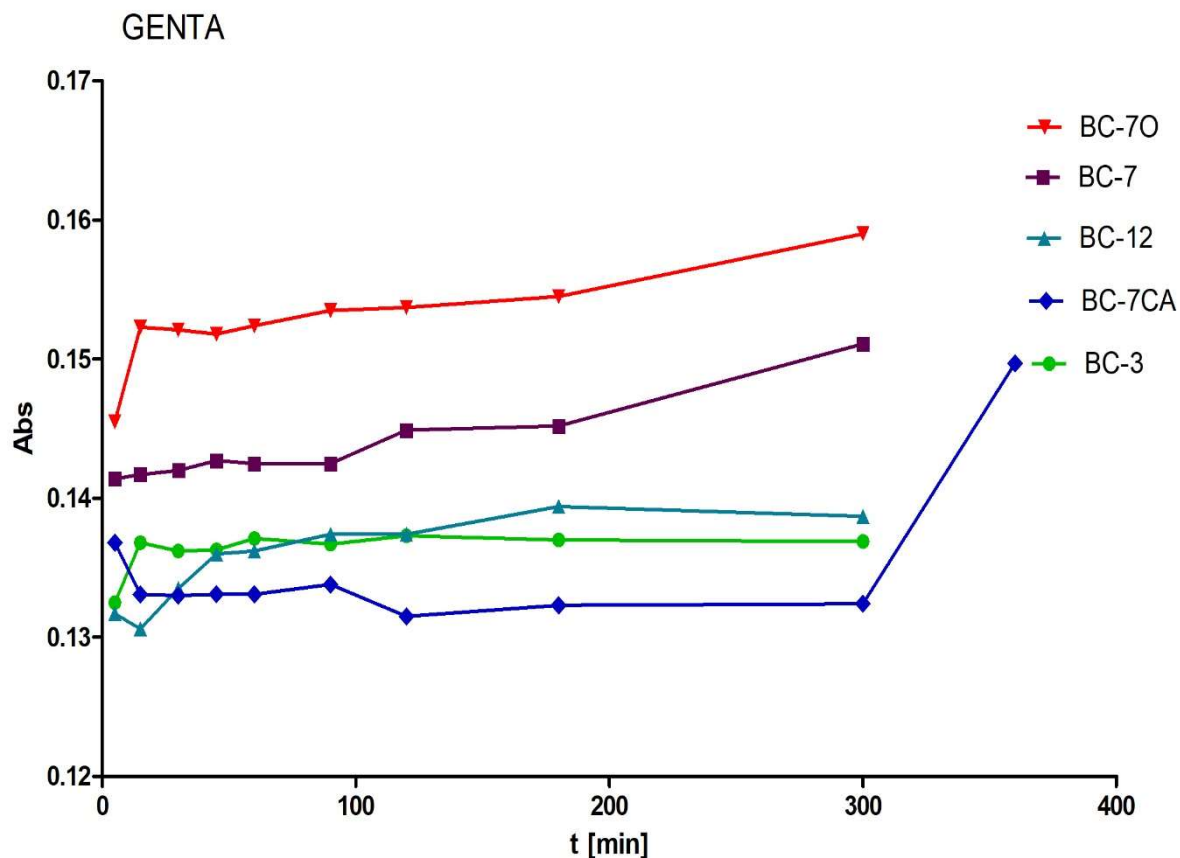




Wykres 21. Uwalnianie badanych związków przeciwdrobnoustrojowych w czasie z nośników celulozowych. BC-3,7,12: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; BC-7CA: celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; BC-7O, celuloza 7-dniowa modyfikowana olejem. PVP-I: povidon jodu, OCT –dwuchlorowodorek oktenidyny, PHMB –poliheksanidyna, CHX –chlorheksydyna; G –gentamycyna.





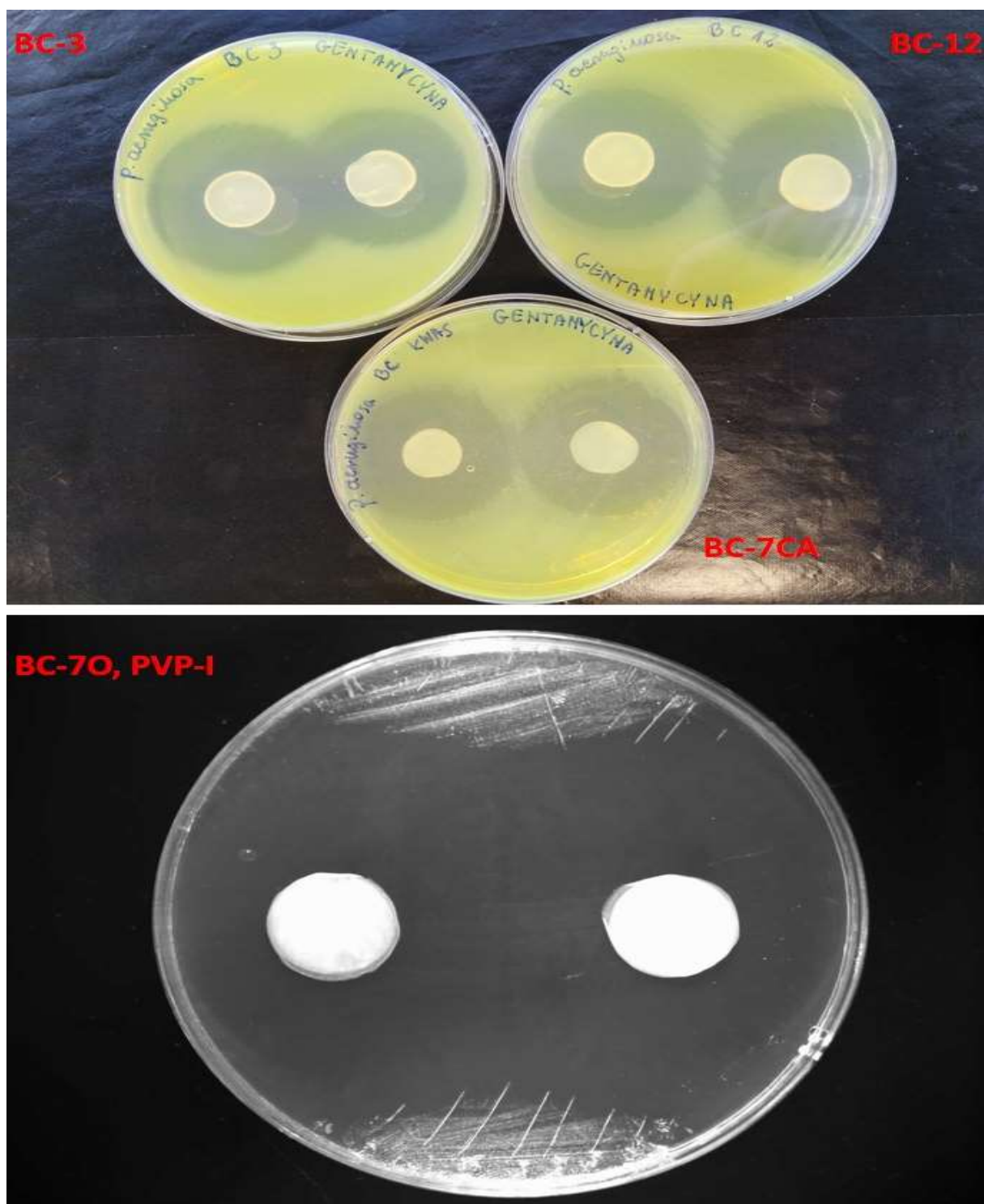


Wykres 22. Uwalnianie specyficznego związku przeciwdrobnoustrojowego z nośników celulozowych. BC-3,7,12: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; **BC-7CA:** celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; **BC-7O,** celuloza 7-dniowa modyfikowana olejem. **PVP-I:** powidon jodu, **OCT** –dwuchlorowodorek oktenidyny, **PHMB** –poliheksanidyna, **CHX** –chlorheksydyna; **G** –gentamycyna.

Wyniki przedstawione na **Wykresie 21** wskazują na fakt szybkiego uwalniania z nośnika BC3 wszystkich badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych. W przypadku nośników niemodyfikowanych, szybkość uwalniania kształtuje się w następujący sposób: BC3>BC7>BC12. Wykazano także, że z nośnika BC-7O oraz BC-7 uwalniane jest najwyższe (lecz jednocześnie porównywalne pomiędzy tymi dwoma nośnikami) stężenie każdej z analizowanych substancji w porównaniu do analogicznych parametrów zmierzonych dla BC-

3,12, BC-7CA. Z nośnika BC-7O uwalniane jest wyższe, w porównaniu do BC-7, stężenie chlorheksydydy oraz gentamycyny. Najszybciej uwalnianym związkiem z analizowanych nośników jest PVP-I, co przekłada się na jego wysokie (w porównaniu do innych analizowanych związków) stężenie w środowisku reakcyjnym. Godnym zanotowania jest powtarzalny trend polegający na nagłym wzroście stężenia gentamycyny uwalnianej z nośnika BC-7CA w 360 minucie pomiaru. Należy zauważyć także, że z nośnika BC-7CA badane związki przeciwdrobnoustrojowe uwalniały się dłużej (do 120 minut) w porównaniu do BC3, BC7, BC12, BC7O [Wykres 22].

Udowodniwszy zdolność modyfikowanych i niemodyfikowanych krążków celulozowych do pochłaniania i uwalniania ze swojej struktury środków antyseptycznych i antybiotyku, przeprowadzono badanie będące odwzorowaniem metody dyfuzyjno-krążkowej, standardowo stosowanej w analizie lekowrażliwości, z tą różnicą, że zamiast krążków bibułowych nasyconych antybiotykiem zastosowano nośniki celulozowe impregnowane analizowanymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi. Przykładowe strefy zahamowania wzrostu poszczególnych drobnoustrojów dookoła nasączonych środkami bójczymi nośników przedstawiono na **Zdj.3**, pełne dane liczbowe dotyczące analizowanego parametru przedstawiono w **Tabelach 2** oraz **3**.



Zdjęcie 3. Strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów dookoła poszczególnych typów nośników BC. Zdjęcie górne: Strefa zahamowania wzrostu *P.aeruginosa*, nośniki nasączone gentamycyną. Zdjęcie dolne: strefa zahamowania wzrostu *S.aureus*, nośniki nasączone **PVP-I**. **BC-3, BC-12:** nośnik z celulozy 3, 7 i 12- dniowej, odpowiednio; nośnik **BC-70, BC-7CA** – nośniki modyfikowane olejem lub kwasem cytrynowym, odpowiednio. **PVP-I:** powidon jodu.

strefy zahamowania [mm]	OCT	PHMB	PVP-I	CHX	GENTA
<i>S.aureus</i> 6538	22	23	55	22	9
<i>S.aureus</i> 33591	22	26	55	23	11
<i>P.aeruginosa</i> 15442	22	19	29	20	9
<i>E.faecalis</i> 29212	22	21	45	20	8
BC-3					

strefy zahamowania [mm]	OCT	PHMB	PVP-I	CHX	GENTA
<i>S.aureus</i> 6538	35	25	66	33	38
<i>S.aureus</i> 33591	35	23	64	32	37
<i>P.aeruginosa</i> 15442	35	19	28	26	39
<i>E.faecalis</i> 29212	32	22	42	28	33
BC-7					

strefy zahamowania [mm]	OCT	PHMB	PVP-I	CHX	GENTA
<i>S.aureus</i> 6538	32	29	60	27	43
<i>S.aureus</i> 33591	32	26	54	28	43
<i>P.aeruginosa</i> 15442	25	21	34	25	43
<i>E.faecalis</i> 29212	20	24	47	29	33
BC-12					

Tab.2. Porównanie wielkości stref zahamowania dookoła niemodyfikowanych, nasyconych związkami przeciwdrobnoustrojowymi, nośników BC. BC-3, BC-12: nośnik z celulozy 3, 7 i 12- dniowej, odpowiednio. PVP-I: powidon jodu, OCT –dwuchlorowodorek oktenidyny, PHMB –poliheksanidyna, CHX –chlorheksydyna; GENTA –gentamycyna

strefy zahamowania [mm]	OCT	PHMB	PVP-I	CHX	GENTA
<i>S.aureus</i> 6538	21	22	55	23	40
<i>S.aureus</i> 33591	21	26	54	23	43
<i>P.aeruginosa</i> 15442	20	18	30	15	38
<i>E.faecalis</i> 29212	22	21	41	20	30
BC-7CA					

strefy zahamowania [mm]	OCT	PHMB	PVP-I	CHX	GENTA
<i>S.aureus</i> 6538	26	25	46	25	15
<i>S.aureus</i> 33591	25	26	48	24	38
<i>P.aeruginosa</i> 15442	19	19	27	20	38
<i>E.faecalis</i> 29212	20	21	48	20	34
BC-7O					

Tab.3. Porównanie wielkości stref zahamowania dookoła modyfikowanych, nasyconych związkami przeciwdrobnoustrojowymi, nośników BC. BC-7CA, BC-7O: nośnik z celulozy modyfikowanej kwasem cytrynowym lub olejem, odpowiednio. PVP-I: powidon jodu, OCT – dwuchlorowodorek oktenidyny, PHMB –poliheksanidyna, CHX –chlorheksydyna; GENTA – gentamycyna.

Wyniki uzyskane za pomocą podstawowego modelu badawczego (zmodyfikowanej metody dyfuzyjno-krażkowej) oraz analiza profili uwalniania związków przeciwdrobnoustrojowych, pozwoliła na wybór układów cechujących się najwyższym potencjałem do zastosowania w leczeniu ran przewlekłych. W kolejnych, przedstawionych w dalszej części pracy, analizach opierających się na technice badawczej A.D.A.M. (ang. Antibiofilm Dressing Measurement Activity) oraz jej modyfikacji, wykorzystano wszystkie z wytworzonych typów nośników oraz

antyseptyki zawierające powidon jodu i poliheksanidynę i antybiotyk gentamycynę. Wyniki uzyskane za pomocą techniki A.D.A.M. przedstawiono zbiorczo w **Tabelach 4-7**.

Nośnik: BC-3	[% redukcji biofilmu <i>E.faecalis</i> na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyk	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	100	37	67
PVP-I	86	89	90
GENTA	27	57	80

Nośnik: BC-7	[% redukcji biofilmu <i>E.faecalis</i> na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyk	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	42	51	86
PVP-I	97	98	98
GENTA	57	68	72

Nośnik: BC-12	[% redukcji biofilmu <i>E.faecalis</i> na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyk	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	6	39	75
PVP-I	91	91	91
GENTA	73	59	73

Nośnik: BC-7CA	[% redukcji biofilmu <i>E.faecalis</i> na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyki	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	92	95	93
PVP-I	2	30	60
GENTA	11	73	83

Nośnik: BC-7O	[% redukcji biofilmu <i>E.faecalis</i> na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyki	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	17	28	72
PVP-I	89	89	89
GENTA	34	49	79

Tabela 4. Redukcja biofilmu *E.faecalis* 29212 oceniana za pomocą testu A.D.A.M. BC-3,7,12: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; **BC-7CA:** celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; **BC-7O,** celuloza 7-dniowa modyfikowana olejem. **PVP-I:** powidon jodu, **PHMB** –poliheksanidyna, **G** –gentamycyna.

Nośnik: BC-3	[% redukcji biofilmu <i>S.aureus</i> 6538 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyki	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	6	19	54
PVP-I	82	91	91
GENTA	65	64	86

Nośnik: BC-7	[% redukcji biofilmu <i>S.aureus</i> 6538 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyki	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	20	32	83
PVP-I	93	94	94
GENTA	29	81	87

Nośnik: BC-12	[% redukcji biofilmu <i>S.aureus</i> 6538 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyki	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	29	40	72
PVP-I	80	86	93
GENTA	38	43	87

Nośnik: BC-7CA	[% redukcji biofilmu <i>S.aureus</i> 6538 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyki	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	28	36	46
PVP-I	89	90	91
GENTA	51	59	71

Nośnik: BC-7O	[% redukcji biofilmu <i>S.aureus</i> 6538 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyki	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	28	49	72
PVP-I	94	95	96
GENTA	48	58	80

Tabela 5. Redukcja biofilmu *S.aureus* 6538 oceniana za pomocą testu A.D.A.M. BC-3,7,12: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; BC-7CA: celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; BC-7O, celuloza 7-dniowa modyfikowana olejem. PVP-I: powidon jodu, PHMB –polihexanidyna, G –gentamycyna.

Nośnik: BC-3	[% redukcji biofilmu <i>S.aureus</i> 33591 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyk	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	7	20	57
PVP-I	86	94	94
GENTA	64	64	82

Nośnik: BC-7	[% redukcji biofilmu <i>S.aureus</i> 33591 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyk	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	21	34	87
PVP-I	92	97	97
GENTA	26	83	89

Nośnik: BC-12	[% redukcji biofilmu <i>S.aureus</i> 33591 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyk	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	31	43	74
PVP-I	84	83	95
GENTA	39	44	85

Nośnik: BC-7CA	[% redukcji biofilmu <i>S.aureus</i> 33591 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyki	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	29	35	48
PVP-I	84	90	91
GENTA	50	57	70

Nośnik: BC-7O	[% redukcji biofilmu <i>S.aureus</i> 33591 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyki	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	29	48	73
PVP-I	95	96	97
GENTA	49	55	78

Tabela 6. Redukcja biofilmu *S.aureus* 33591 oceniana za pomocą testu A.D.A.M. BC-3,7,12: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; BC-7CA: celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; BC-7O, celuloza 7-dniowa modyfikowana olejem. PVP-I: powidon jodu, PHMB –polihexanidyna, G –gentamycyna.

Nośnik: BC-3	[% redukcji biofilmu <i>P.aeruginosa</i> 15442 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyki	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	0	15	56
PVP-I	63	69	90
GENTA	21	35	67

Nośnik: BC-7	[% redukcji biofilmu <i>P.aeruginosa</i> 15442 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyki	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	55	66	68
PVP-I	95	98	98
GENTA	24	45	73

Nośnik: BC-12	[% redukcji biofilmu <i>P.aeruginosa</i> 15442 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyki	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	29	40	72
PVP-I	80	86	93
GENTA	38	43	87

Nośnik: BC-7CA	[% redukcji biofilmu <i>P.aeruginosa</i> 15442 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyk	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	28	36	44
PVP-I	89	90	91
GENTA	28	36	44

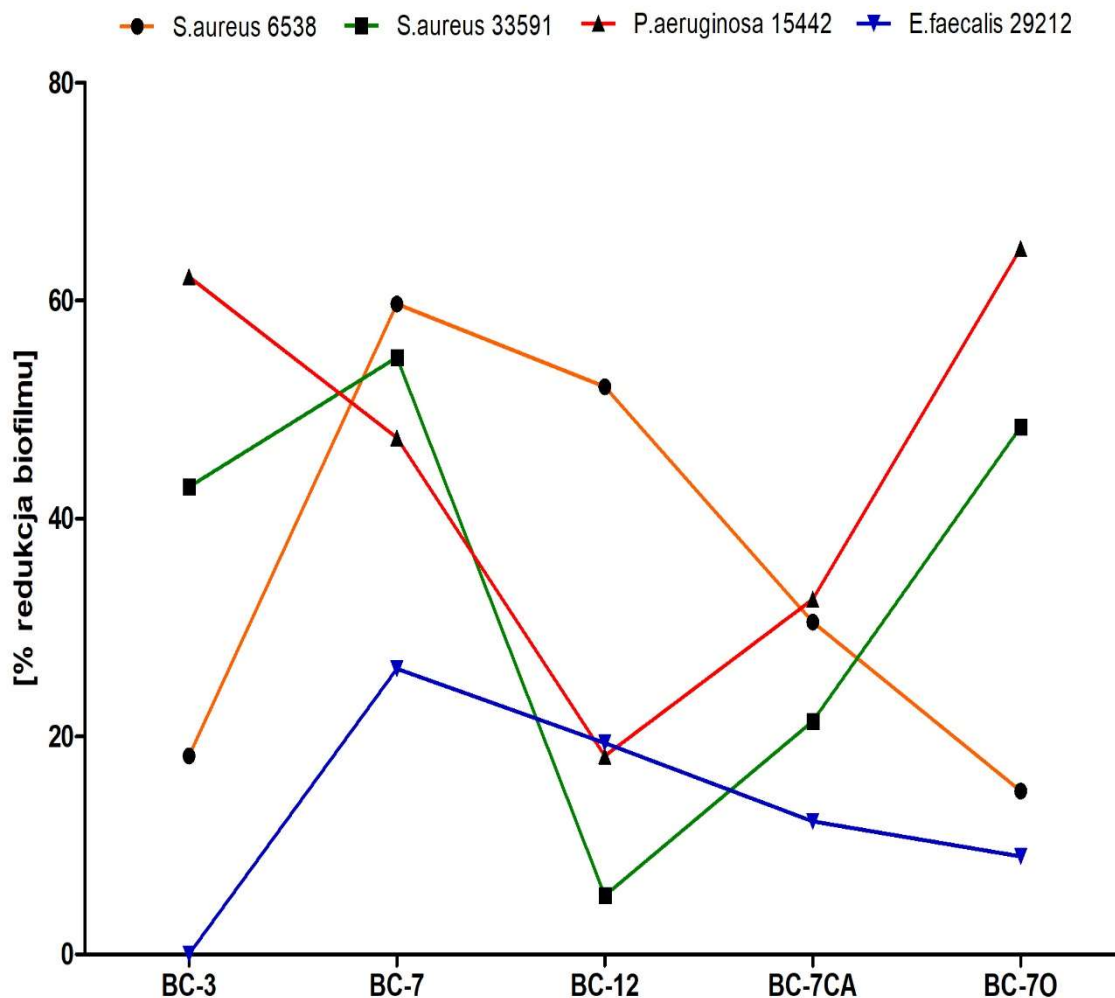
Nośnik: BC-7O	[% redukcji biofilmu <i>P.aeruginosa</i> 15442 na dyskach agarowych]		
Antyseptyk/Antybiotyk	Dysk Podstawny [B]	Dysk Środkowy [M]	Dysk Kontaktowy [C]
PHMB	45	59	74
PVP-I	67	69	84
GENTA	64	73	74

Tabela 7. Redukcja biofilmu *P.aeruginosa* 15442 oceniana za pomocą testu A.D.A.M.
BC-3,7,12: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; **BC-7CA:** celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; **BC-7O,** celuloza 7-dniowa modyfikowana olejem. **PVP-I:** powidon jodu, **PHMB** –poliheksanidyna, **G** –gentamycyna.

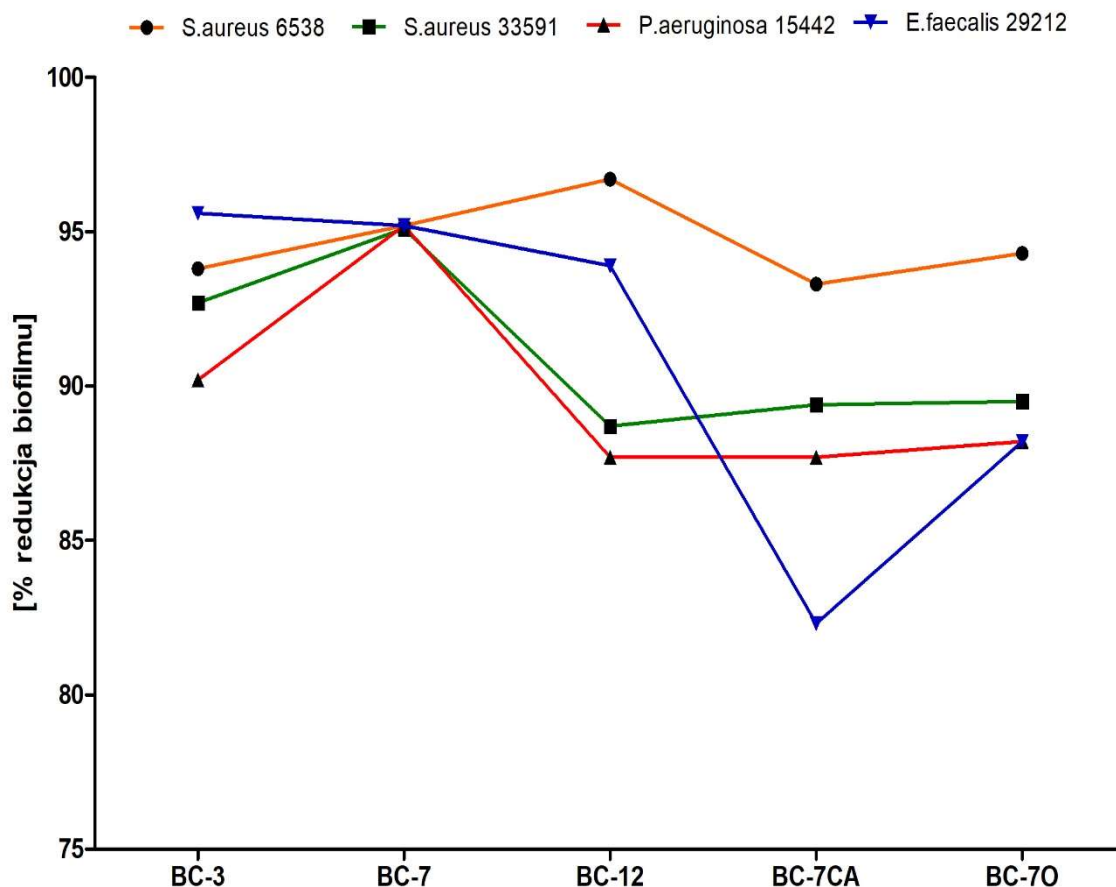
Wyniki przedstawione w **Tabelach 4-7** w wyraźny sposób uwidaczniają zmniejszającą się skuteczność gentamycyny oraz poliheksanidyny w zdolności do eradykacji niżej położonych warstw struktury biofilmu. Natomiast powidon jodu, niezależnie od typu nośnika z którego był uwalniany, cechował się nie tylko najwyższą zdolnością do eradykacji biofilmu, ale także najwyższą zdolnością penetracyjną w głąb jego struktury.

W kolejnym etapie doświadczenia, do oceny skuteczności badanych związków przeciwdrobnoustrojowych uwalnianych z poszczególnych typów nośnika posłużono się

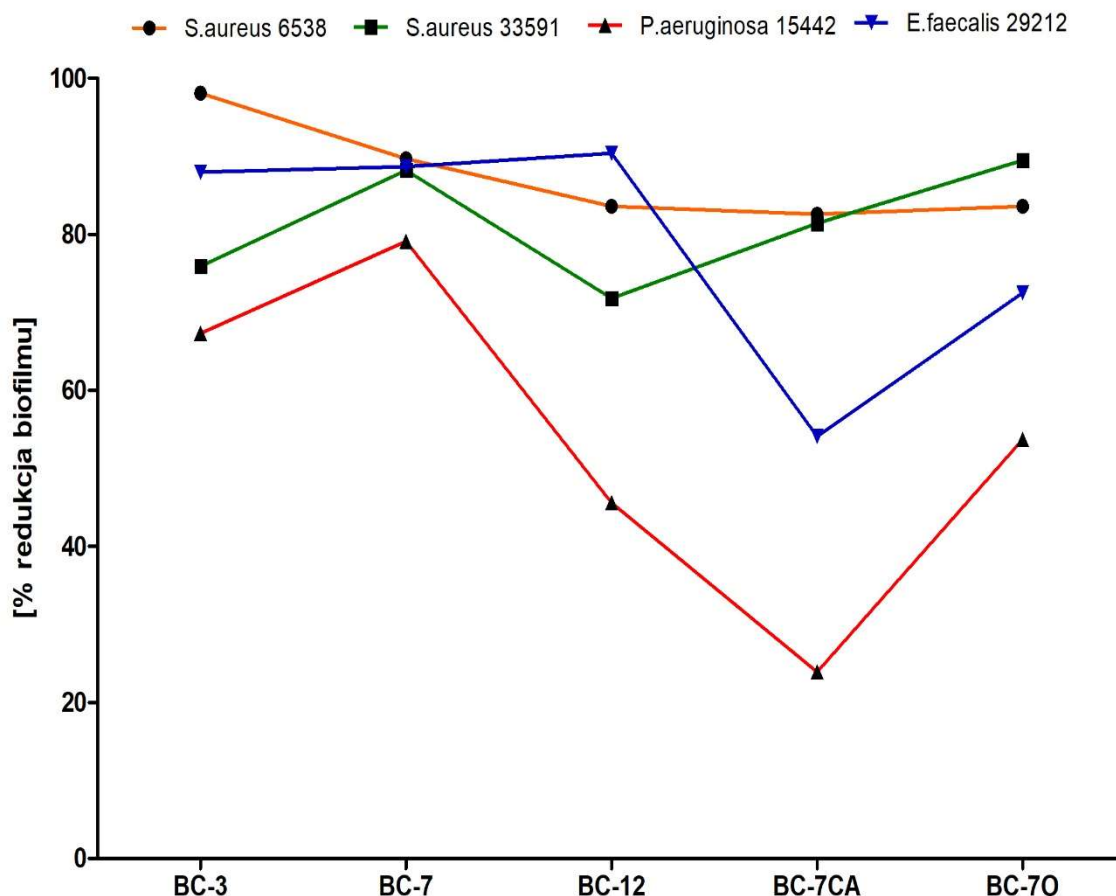
zmodyfikowaną metodyką testu A.D.A.M., w której układ eksperymentalny imituje środowisko rany przewlekłej, wysiękującej. Wyniki przedstawiono na **Wykresach 23-25**.



Wykres 23. [%] redukcja biofilmu badanych szczepów na skutek aktywności przeciwdrobnoustrojowej poliheksanidyny wydzielającej się z poszczególnych typów nośników. BC-3,7,12: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; BC-7CA: celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; BC-7O, celuloza 7-dniowa modyfikowana olejem.



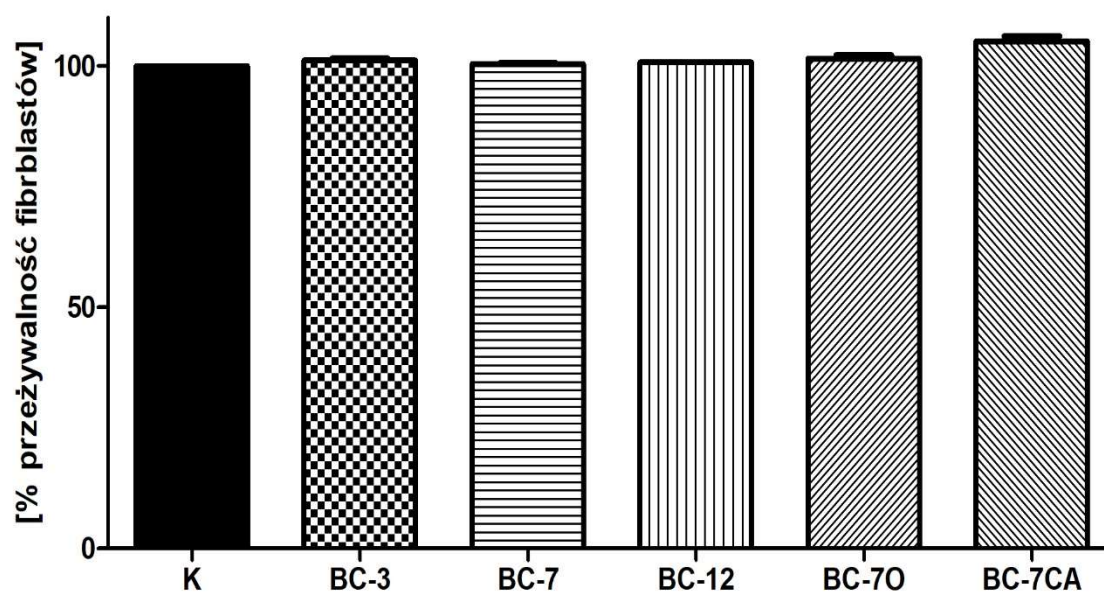
Wykres 24. [%] redukcja biofilmu badanych szczepów na skutek aktywności przeciwdrobnoustrojowej powidonu jodu wydzielającego się z poszczególnych typów nośników. **BC-3,7,12**: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; **BC-7CA**: celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; **BC-7O**, celuloza 7-dniowa modyfikowana olejem.



Wykres 25. [%] redukcja biofilmu badanych szczepów na skutek aktywności przeciwdrobnoustrojowej gentamycyny wydzielającej się z poszczególnych typów nośników. BC-3,7,12: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; BC-7CA: celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; BC-7O, celuloza 7-dniowa modyfikowana olejem.

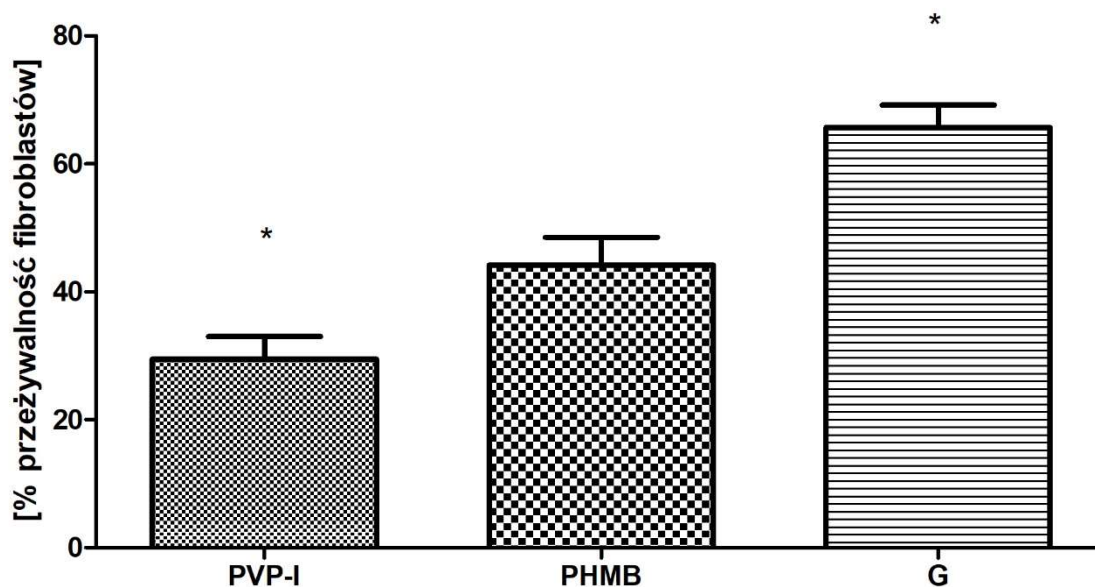
Wyniki uzyskane za pomocą zmodyfikowanego testu A.D.A.M. wykazują najwyższą skuteczność powidonu jodu w eradykacji analizowanych biofilmów, niezależnie od gatunków drobnoustrojów je tworzących oraz typów nośników, do których PVP-I był wprowadzony. Gentamycyna i poliheksanidyna cechowały się zróżnicowaną aktywnością, zależną od typu nośnika oraz od gatunku drobnoustroju tworzącego biofilm w zastosowanym układzie badawczym.

Ostatnim zadaniem badawczym wykonanym w ramach niniejszej pracy doktorskiej była ocena cytotoksyczności analizowanych antyseptyków oraz antybiotyku, a także poszczególnych typów nośników względem linii komórkowej fibroblastów – jednego z dwóch typów komórek odpowiedzialnych za proces gojenia się rany. Wyniki przedstawiono na **Wykresach 26, 27**



Wykres 26. [%] przeżywalność linii komórkowej fibroblastów poddanych hodowli w obecności medium inkubowanego uprzednio w obecności nośników celulozowych.

K – próbka kontrolna; **BC-3,7,12**: nośnik niemodyfikowany, 3,7,12 dni hodowli, odpowiednio; **BC-7CA**: celuloza 7-dniowa, modyfikowana kwasem cytrynowym; **BC-7O**, celuloza 7-dniowa modyfikowana olejem.



Wykres 27. [%] przeżywalność linii komórkowej fibroblastów poddanych działaniu analizowanych substancji przeciwdrobnoustrojowych. PVP-I: powidon jodu; PHMB: poliheksanidyna; GENTA: gentamycyna. Asterisk – różnice istotne statystycznie (K-W test, $p < 0,5$; analiza post hoc Dunneta).

Wyniki przedstawione na **Wykresie 25 i 26** wykazały brak wpływu cytotoksycznego analizowanych nośników BC (zarówno niemodyfikowanych, jak i modyfikowanych) względem linii komórkowej fibroblastów. Z kolei najwyższy efekt cytotoksyczny względem tej linii komórek eukariotycznych wykazywał powidon jodu; niższą (60%) cytotoksycznością charakteryzowała się poliheksanidyna, a najniższą (30%) cytotoksycznością - gentamycyna.

6. Dyskusja

Przyczyną, dla której podjąłem się badań przedstawionych w niniejszej pracy, jest fakt, że mimo stosowania coraz bardziej zaawansowanych technik diagnostycznych i leczniczych, infekcje ran przewlekłych pozostają istotnym problemem współczesnej medycyny. Zdecydowałem się na wytworzenie i analizę fizyczną oraz biologiczną aktywnych przeciwdrobnoustrojowo nośników celulozowych nie tylko dlatego, że bioceluloza [BC] jest uważana za jeden z najbardziej obiecujących biopolimerów ostatnich lat; miałem na względzie również czynniki ekonomiczne oraz obciążenia finansowe, które muszą ponosić moi pacjenci i ich rodzina pragnąca zapewnić choremu odpowiednie standardy leczenia z wykorzystaniem kosztownych, nowoczesnych opatrunków.

W warunkach laboratoryjnych wytworzenie bakteryjnego biopolimeru celulozowego polega na hodowli niepatogennego szczepu *Komagataibacter xylinus* w płynnym podłożu Herstina-Schramma charakteryzującym się ściśle zdefiniowanym składem chemicznym, a co za tym idzie wysoką ceną. Należy zwrócić jednak uwagę na fakt, że w skład podłoża, poza cukrami oraz składnikami mineralnymi wchodzi kosztowny baktopepton oraz ekstrakt drożdżowy. Obecnie prowadzone są badania nad wykorzystaniem jako podstawy do tworzenia medium hodowlanego znacznie tańszych komponentów takich jak na przykład różnego rodzaju pulpy owocowe (w tym jabłkowe) będące materiałami odpadowymi podczas procesów produkcji między innymi soków owocowych [50]. Prawdopodobnym zatem jest znaczne obniżenie w przyszłości kosztów uzyskania celulozy i tym samym zwiększenie opłacalności procedury wytwarzania tego biopolimeru. Powyższe stwierdzenie jest tym bardziej prawdziwe, że również proces oczyszczania BC z komórek *K.xylinus* może być zoptymalizowany. Jak wykazał Junka i wsp., którzy przetestowali kilkanaście sposobów oczyszczania bakteryjnej celulozy za pomocą ługu sodowego, możliwe jest zastosowanie względnie niskich (niższych

niż tych standardowo stosowane w praktyce laboratoryjnej) stężeń zasady sodowej z zachowaniem takich istotnych parametrów BC (w kontekście zastosowania jako opatrunku) jak niska cytotoksyczność czy brak właściwości pobudzających makrofagi do wytwarzania reaktywnych form tlenu [51].

Drugim impulsem do wykonania przedstawionych w niniejszej pracy badań były dwie publikacje dotyczące możliwości modyfikacji cech nośnika celulozowego poprzez zastosowanie prostych i tanich procedur związanych ze zmianą środowiska hodowlanego *K.xylinus* bądź poddaniu nośników działaniu odczynników chemicznych oraz wysokiej temperatury.

Badanie wykonane przez polski zespół badawczy wykazało, że wprowadzenie do środowiska hodowlanego *K.xylinus* oleju rzepakowego o stężeniu finalnym wynoszącym 1% prowadzi do zwiększenia masy uzyskanej celulozy sięgające 500% [37], natomiast w pracy, której wyniki zostały opublikowane przez Ruhsa i wsp. przedstawiono sposób modyfikacji BC zmieniający diametralnie (w porównaniu do celulozy natywnej, niemodyfikowanej) jej porowatość oraz właściwości mechaniczne i strukturalne [38].

Co więcej, ponieważ proces sieciowania bakteryjnej celulozy jest zjawiskiem czaso-zależnym, także nośniki celulozowe inkubowane w różnych okresach czasowych, cechują się zróżnicowaną porowatością, a co za tym idzie zróżnicowaną zdolnością do pochłaniania i uwalniania cieczy ze swojej struktury [52].

Powyższe rozważania skłoniły mnie do wytworzenia 3 typów niemodyfikowanych nośników celulozowych (celulozy 3,7 i 12-dniowej; celuloza 7-dniowa jest najczęściej stosowanym typem nośnika BC) oraz dwóch typów celulozy modyfikowanej - olejem (w procesie hodowlanym) oraz kwasem cytrynowym i wysoką temperaturą (modyfikacja miała miejsce po wytworzeniu 7-dniowego nośnika).

Główną przesłanką, jaka stała za moimi poczynaniami, była hipoteza, że różne nośniki celulozowe charakteryzować się będą różną zdolnością do pochłaniania substancji aktywnych oraz różnym czasem ich uwalniania.

Cechy te są kluczowym czynnikiem w aspekcie skutecznego leczenia ran przewlekłych objętych procesem infekcyjnym. W przypadku ran przewlekłych objętych silnym, rozwijającym się gwałtownie procesem infekcji, korzystne jest zastosowanie wysokiego stężenia związku przeciwdrobnoustrojowego, który uwalnia się gwałtownie z nośnika w krótkim czasie, a następnie - po wstępnym opanowaniu zakażenia - zastosowanie nośnika, z którego związek przeciwdrobnoustrojowy wydziela się w sposób przedłużony chroniąc ranę zarówno od wewnątrz (niszcząc odtwarzające się struktury biofilmu), jak i od zewnątrz (nie dopuszczając do rany drobnoustrojów ze środowiska zewnętrznego).

W celu weryfikacji prawdziwości hipotezy podjąłem się produkcji wyżej wymienionych i scharakteryzowanych w sekcji Materiały i Metody nośników celulozowych.

Określiłem także Minimalne Stężenia Hamujące Wzrost oraz Minimalne Stężenia Eradykujące Biofilm patogenów, które wywoływać mogą infekcje ran przewlekłych, mianowicie *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterococcus faecalis*.

Jak wykazałem w **Tabeli 1** oraz na **Wykresach 1-13**, biofilm badanych bakterii charakteryzował się znacząco, w porównaniu do form planktonicznych, wyższą tolerancją na zastosowane środki antyseptyczne: poliheksanidynę, oktenidynę, powidon jodu, chlorheksydynę oraz antybiotyk gentamycynę. W przypadku antyseptyków, minimalne stężenie tych związków przeciwdrobnoustrojowych konieczne do eradykacji biofilmu było średnio 2 - 5-krotnie wyższe w porównaniu do stężeń antyseptyków koniecznych do zabicia form planktonicznych tych samych szczepów. Należy zauważyć, że różnica w tolerancji na gentamycynę między biofilmem a planktonem wykazywana przez szczep *S.aureus* 6538 sięgała ponad 30000x. Uzyskane przeze mnie wyniki są zgodne z danymi przedstawianymi przez

innych badaczy i w naoczny sposób wykazują konieczność usuwania z rany patogenów zanim z formy planktonicznej przekształcą się w formę biofilmową [53]. Dane przedstawione na **Wykresach 1-16** są godne uwagi również ze względu na zróżnicowanie krzywych przedstawiających stężenia badanych związków konieczne do usunięcia biofilmu tworzonego przez badane drobnoustroje. Można zauważyć dwa wyraźne trendy w stopniu nachylenia się krzywej – jeden łagodny, charakteryzujący w większości przypadków oddziaływanie bójcze antyseptyku oktenidyny, poliheksanidyny i chlorheksydyny oraz drugi, ostry, charakteryzujący w większości przypadków oddziaływanie bójcze wykazywane przez antyseptyk powidon jodu oraz antybiotyk gentamycynę. Różnice te w pewnej mierze mogą być uwarunkowane różnicami w budowie chemicznej i mechanizmie aktywności bójczej wykazywanej pomiędzy antyseptykami z grupy biguanidyn a pierwiastkowym jodem, a także dawko-zależną aktywnością antybiotyku gentamycyny.

Znamienna jest także i charakterystyczna, w aspekcie narastającej oporności mikroorganizmów na antybiotyki, niezwykle niska wrażliwość szczepu z gatunku *Enterococcus faecalis* na antybiotyk gentamycynę oraz zdolność tego antybiotyku do przełamania oporności przy zastosowaniu jego wysokich stężeń (jak ma to miejsce w przypadku stosowania gąbki garamycynowej) [54, 55].

Określenie wartości MIC i MBEC użytych środków przeciwdrobnoustrojowych względem form planktonicznych i biofilmu tworzonego przez analizowane szczepy bakteryjne było warunkiem koniecznym do przeprowadzenia badań nad skutecznością biologiczną poszczególnych typów nośników celulozowych. Określenia ich właściwości fizycznych dokonano natomiast w serii doświadczeń dotyczących przede wszystkim ich stopnia uwodnienia oraz oddawania/utrzymania cieczy. Parametry te w sposób nierozzerwalny związane są z grubością/masą i porowatością nośników, dlatego też po zakończonym procesie

wytworzenia prototypowych opatrunków dokonano ich oceny z zastosowaniem Skaningowej Mikroskopii Elektronowej oraz ich oceny wagowej w stanie mokrym i suchym.

Mikro-obrazowanie SEM wykazało istotne różnice w porowatości poszczególnych typów nośników – nośniki niemodyfikowane 3 dniowe charakteryzowały się wyższą porowatością niż te 7 dniowe, a te z kolei miały wyższą porowatość od nośnika niemodyfikowanego 12-dniowego. Ponadto, oczyszczone nośniki 3-dniowe cechowały się na poziomie makroskopowym wyższą przejrzystością oraz niższą wysokością (grubością) od nośników niemodyfikowanych 7- i 12-dniowych [**Zdjęcie 1**]. Podobną zależność zaobserwowano analizując wagi poszczególnych typów nośników niemodyfikowanych, co wiąże się ze wzmiankowanym już procesem sieciowania celulozy (a co za tym idzie zmniejszaniem się w czasie wielkości porów).

Najniższą gęstością porów w obrazowaniu SEM charakteryzował się nośnik modyfikowany kwasem cytrynowym (BC-7CA), był on także najgrubszy. Porowatość nośnika modyfikowanego olejem (BC-7O) cechowała się najwyższą zmiennością; pory będące efektem odparowania oleju miały średnicę sięgającą kilkuset mikrometrów lub nawet kilku milimetrów w obrazie makroskopowym [**Zdjęcie 1**] zaś usieciowanie będące efektem nakładania się na siebie włókien celulozy w obszarach, w których olej nie występował – od kilku do kilkunastu mikrometrów [**Zdjęcie 2**]. Dane te pozostają w zgodności z wynikami zaprezentowanymi przez Żywicką i wsp [37].

Mokra masa nośnika BC-12 prawie dwukrotnie przekraczała masy nośników BC-3 oraz BC-7; podobną zależność zaobserwować można było w przypadku nośników BC-7O oraz BC-7CA (ten ostatni nośnik był ponad 2-krotnie lżejszy od nośnika BC-7O). Wydaje się to być intrygujące biorąc pod uwagę niską porowatość nośnika BC-7CA oraz jego najwyższą, spośród analizowanych nośników, grubość [**Wykres 17**]. Przyczyną tego stanu rzeczy może być wykorzystanie standardowej preparatyki zastosowanej do utrwalenia tej struktury przed

mikro-obrazowaniem SEM, która doprowadziła (w warunkach próżni) do nałożenia się poszczególnych warstw włókien celulozowych na siebie. W dalszych etapach swojej pracy badawczej planuję zatem wykorzystanie technik mikroskopowych nie wymagających preparatyki próbki (np. mikroskopu laserowego technicznego stosowanego do analiz zmian w materiałach metalicznych), które jednak w chwili obecnej pozostają poza moim zasięgiem.

Badania nad suchą masą nośników celulozowych wykazały wysokie uwodnienie nośnika BC-3, BC-7O oraz BC-7CA w porównaniu do pozostałych typów nośników [**Wykres 18**]. Oznacza to, że właśnie te typy nośników mogą być szczególnie predysponowane do roli opatrunków w leczeniu ran średnio oraz wysoko-wysiękujących a także jako nośniki substancji przeciwdrobnoustrojowych [6,7].

Analiza parametru zdolności do pochłaniania (i utrzymania wody) wykazała, że im starsza (im dłuższy jest proces hodowlany) jest niemodyfikowana bakteryjna celuloza, tym niższa jest jej zdolność do pochłaniania cieczy [**Wykres 19**]. Oznacza to, że nośnik typu BC-3 może być wykorzystywany na podobnej zasadzie co opatrunki hydrokolidowe i hydrowłókniste (absorpcja i sekwestracja wysięku) a także do magazynowania wysokich objętości środków przeciwdrobnoustrojowych koniecznych do zwalczania infekcji przy pierwszym nałożeniu opatrunku aktywnego. Z kolei nośniki typu BC-12 mogą znaleźć zastosowanie jako opatrunki wtórne zabezpieczające opatrunek BC-3 oraz chroniące ranę przed drobnoustrojami ze środowiska zewnętrznego (z racji wyższej niż BC-7 grubości oraz niższej porowatości). Bardzo istotnym faktem jest także zdolność wszystkich analizowanych nośników niemodyfikowanych do pochłaniania zbliżonej objętości roztworów zawierających środki przeciwdrobnoustrojowe w porównaniu do czystej chemicznie wody. Oznacza to brak interakcji chemicznej między badanymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi a cząsteczkami polimeru celulozowego (posiadających wystające z łańcucha grupy hydroksylowe), co jest warunkiem koniecznym do efektywnego uwalniania substancji czynnych. Należy zauważyć, że nośnik BC-7O

charakteryzował się zdolnością do pochłaniania cieczy zbliżoną do nośnika BC-3. Biorąc pod uwagę jego większą grubość (a co za tym idzie wyższą odporność na rozciąganie i rozerwanie) również nośnik BC-7O może zatem znaleźć zastosowanie w charakterze opatrunku pierwotnego do stosowania na rany przewlekłe cechujące się nadmiernym poziomem wysięku [6,7]. Modyfikowany nośnik BC-7O oraz BC-7CA charakteryzowały się najkorzystniejszą wartością parametru zdolności do utrzymania wody w czasie [**Wykres 20**] – oznacza to, że są one w stanie najdłużej sekwestrować nie tylko wodę, ale i potencjalnie wysięk utrzymując konieczne do zapewnienia prawidłowych warunków gojenia się rany, optimum poziomu wilgoci. A zatem nośniki BC zmodyfikowane w sposób opisany w niniejszej pracy mogą pełnić rolę, jaką obecnie pełnią kosztowne opatrunki z pianki poliuretanowej [29]. Odwrotny trend zaobserwowano w przypadku nośnika BC-3 – w związku z najniższym usieciowaniem celulozy nie tylko szybko absorbował, ale i oddawał wodę.

Kolejnym analizowanym aspektem była prędkość uwalniania substancji przeciwdrobnoustrojowych z poszczególnych typów nośników [**Wykres 21**]. Powtarzalnym dla każdego z typów nośników trendem było najwyższe i najgwałtowniejsze uwalnianie powidonu jodu oraz oktenidyny, a najwolniejsze – antybiotyku gentamycyny. Poliheksanidyna oraz chlorheksydydina uwalniały się z nośników szybciej od antybiotyku, ale wolniej niż PVP-I oraz OCT. Zaskakującym efektem było niższe stężenie uwalniającego się z nośnika BC-3 powidonu jodu w porównaniu do stężenia tego antyseptyku uwalniającego się z nośnika BC-7. Można było zakładać, w oparciu o przeprowadzone wcześniej analizy, że nośnik BC-3 z racji swej niskiej masy i usieciowania będzie uwalniał ze swojego wnętrza antyseptyk szybciej niż BC-7. W chwili obecnej, z racji braku istniejących danych piśmienniczych dotyczących omawianego zjawiska, nie jestem w stanie znaleźć wytłumaczenia dla tego powtarzalnego trendu oraz określić jego przyczyny.

Specyficznym tempem uwalniania PVP-I, OCT oraz PHMB charakteryzował się nośnik BC-7O, z którego znacząca część tych antyseptyków przechodziła do środowiska reakcyjnego znacznie szybciej niż miało to miejsce w przypadku innych nośników. Można spekulować, że makroskopowe pory będące pozostałością po oleju nie były w stanie utrzymać roztworów zawierających powidon jodu, poliheksanidynę oraz oktenidynę, co skutkowało ich gwałtownym uwolnieniem.

Wykres 22 pokazuje, który ze związków przeciwdrobnoustrojowych uwalnia się z poszczególnych nośników w najwyższym stężeniu oraz daje ogłęd o szybkości jego uwalniania. Z wyjątkiem PVP-I, do uwalniania najwyższych stężeń wszystkich badanych substancji przeciwdrobnoustrojowych dochodziło nieodmiennie w przypadku nośnika BC-7O (PVP-I uwalniany był w najwyższym stężeniu z nośnika BC-7, natomiast z nośnika BC-7O uwalniało się drugie co do wartości stężenie tego antyseptyku). Opisywana różnica sięga rzędu zaledwie kilku procent i może być traktowana jako błąd pomiarowy dopuszczalny w badaniach wykorzystujących biomateriały pochodzenia naturalnego [36], co stawia nośnik BC-7O na pierwszym miejscu pod względem zdolności do uwalniania substancji aktywnych ze swojej struktury. Z kolei fakt uwalniania najniższego stężenia środków przeciwdrobnoustrojowych z nośnika BC-3 wiąże się prawdopodobnie z jego najniższą masą, a co za tym idzie najniższą bezwzględną zdolnością do adsorpcji poszczególnych roztworów antyseptyków i antybiotyku. Analizy przedstawione na **Wykresach 17-22** służyły ocenie i wyborze nośników charakteryzujących się najkorzystniejszymi parametrami pochłaniania substancji przeciwdrobnoustrojowych i mogących służyć jako opatrunki o znanej a zatem kontrolowanej szybkości ich uwalniania. Kolejnym etapem było określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej antyseptyków i antybiotyku uwalnianych z nośników w podstawowym układzie doświadczalnym będącym modyfikacją metody dyfuzyjno-krażkowej stosowanej do oceny lekowrażliwości drobnoustrojów. Jak można zauważyć na podstawie

poglądowego **Zdjęcia 2** oraz zawierających szczegółowe dane **Tabel 2 i 3** czynnikami wpływającymi na wielkość stref zahamowania wzrostu były wszystkie zmienne wchodzące w skład modelu badawczego: gatunek drobnoustroju, rodzaj zastosowanego nośnika oraz typ substancji przeciwdrobnoustrojowej. Można jednak zauważyć wyraźny trend uwidaczniający silne strefy zahamowania wzrostu dookoła nośników BC nasączonych powidonem jodu, mniejsze i porównywalne strefy zahamowania wzrostu w przypadku antyseptyków biguanidynowych (CHX, OCT, PHMB) oraz zmienną (w zależności od poziomu wrażliwości danego drobnoustroju) wielkość stref zahamowania dookoła nośników BC nasączonych gentamycyną.

Następnie, aktywność związków przeciwdrobnoustrojowych wydzielających się z poszczególnych typów nośników BC poddałem analizie za pomocą testów, w których imitowane jest środowisko rany przewlekłej, mianowicie metody A.D.A.M [**Tabele 4-7**] [49] oraz jego modyfikacji zaprojektowanej z myślą o imitacji środowiska rany przewlekłej wysiękującej [**Wykresy 23-25**]. Do tego celu, w oparciu o poprzednie zestawy otrzymanych danych, wybrałem dwa antyseptyki, powidon jodu oraz poliheksanidynę i antybiotyk gentamycynę.

Uzyskane wyniki wykazują bardzo wysoką zdolność powidonu jodu do penetracji nawet do najniższych warstw biofilmu, co jest zgodne z istniejącymi danymi piśmienniczymi dotyczącymi tego zagadnienia [56]. Zaskakująca była natomiast niska zdolność penetracyjna poliheksanidyny do biofilmu utworzonego na dysku podstawnym i przeciętna zdolność tego antyseptyku do eradykacji biofilmu z dysku szczytowego. Biorąc pod uwagę dane wykazujące wysoką przydatność PHMB w zwalczaniu infekcji wywołanych przez biofilmy w ranach i na skórze [57] należy rozważyć czy stosowany model badawczy nie powinien uwzględniać również wprowadzenia do niego dodatków symulujących wysięk komórek eukariotycznych bądź same komórki eukariotyczne. Dowiedziono bowiem, że poliheksanidyna

cechuje się zdolnością do osadzania się na tych elementach pozakomórkowych (a także na samych komórkach eukariotycznych) i uwalniania w obecności drobnoustrojów [57]. Model badawczy A.D.A.M zaprojektowany był z myślą o testach przeprowadzanych głównie w słabo finansowanych laboratoriach przyszpitalnych [49], stąd nie uwzględnia możliwości wprowadzenia do układu eksperymentalnego takich kosztownych składników jak kolagen czy fibroblasty/keratynocyty. Wyniki zaprezentowane w tej pracy skłaniają jednak do wypracowania kolejnej modyfikacji testu A.D.A.M. która umożliwiłaby jeszcze bardziej realną ocenę aktywności antyseptyków, w tym tych, które cechują się wzmiankowaną zdolnością (jest to tzw. „residual effect”, proponowane tłumaczenia tego zwrotu na język polski to „efekt utrzymującego się działania”, który jednak w mojej ocenie nie jest w pełni ścisły).

Wyniki uzyskane dzięki wykonaniu zmodyfikowanego testu A.D.A.M. [Wykresy 23-25] pozwoliły jednoznacznie ocenić zdolność eradykacji biofilmu badanych drobnoustrojów przez poszczególne związki przeciwdrobnoustrojowe wydostające się z poszczególnych typów nośników. Może mieć to szczególne znaczenie w sytuacji, gdy dysponujemy wiedzą na temat czynnika etiologicznego zakażenia. I tak wywnioskować możemy, że w celu eradykacji biofilmu *P.aeruginosa* za pomocą poliheksanidyny najkorzystniejsze jest stosowanie nośników BC-3 oraz BC-7O; niską skutecznością cechuje się natomiast nośnik BC-12 [Wykres 23]. W przypadku stosowania PVP-jodu do leczenia infekcji o charakterze mieszanym najskuteczniejsze byłoby sprzężenie tego antyseptyku z nośnikiem BC-7, ale jeśli za infekcję rany przewlekłej odpowiadałby gronkowiec złocisty należałoby rozważyć zastosowanie nie tylko nośnika BC-7, ale i BC-12. Dane takie jak te zaprezentowane powyżej służyć mogą do personalizacji i optymalizacji sposobów leczenia ran zainfekowanych przez specyficzne szczepy drobnoustrojów.

Niezwykłe zastanawiającym wynikiem jest spadek aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych związków wydostających się z nośników BC-12 oraz BC-7CA względem biofilmu

E.faecalis. Wyżej wzmiankowane typy nośników różnią się od pozostałych niską porowatością, a co za tym idzie charakteryzują się niższym poziomem wymiany gazowej. Można założyć, że obniżona dostępność tlenu doprowadziła badany szczep do przełączenia swojego metabolizmu w tryb beztlenowy, co przełożyć się może na zmiany w strukturze jego ściany komórkowej (możliwość taką wykazał Chang i wsp. w roku 2018 [58]), a w efekcie na obniżoną wrażliwość na antyseptyki i na zmniejszoną zdolność gentamycyny do przenikania przez warstwę peptydoglikanu tworzącą ścianę komórki *Enterococcus*.

Nowoczesny opatrunek aktywny przeciwdrobnoustrojowo powinien cechować się niską cytotoksycznością bądź jej brakiem. W piśmiennictwie naukowym dostępne są dane udawadniające brak cytotoksyczności natywnych form nośników celulozowych [51] oraz celulozy modyfikowanej olejem [wzmiankowana już praca Żywickiej i wsp. [37]. Na **Wykresie 26** przedstawiłem dane potwierdzające prawdziwość wyżej wzmiankowanego twierdzenia nie tylko dla już zbadanych nośników celulozowych, ale i dla nośnika celulozowego modyfikowanego kwasem cytrynowym. Uzyskane przeze mnie wyniki stoją w zgodności z cytowanymi już pracami i dodatkowo potwierdzają prawidłowość wyników uzyskanych przeze mnie dla nośnika BC-7CA. Z kolei wyniki dotyczące cytotoksyczności samych antyseptyków i antybiotyku [**Wykres 27**] stoją w zgodności z danymi przedstawianymi przez innych badaczy [19].

Praca jaką wykonałem w celu wytworzenia aktywnych przeciwdrobnoustrojowo nośników celulozowych i oceny ich właściwości uzmysłowiła mi, dlaczego bioceluloza znajduje coraz szersze zastosowanie w medycynie. Za pomocą względnie prostych metod hodowlanych i modyfikacji uzyskałem prototypowe opatrunki cechujące się zróżnicowaną prędkością uwalniania substancji przeciwdrobnoustrojowych, brakiem cytotoksyczności, wysoką zdolnością do absorpcji wysięku, a przede wszystkim niskim kosztem wytworzenia. Pisząc niniejszą pracę przeszukiwałem bazy artykułów naukowych szukając prac o zbliżonej

tematyce, ale dostępne dane piśmiennicze były niezwykle skąpe, stąd w znacznej części dyskusji nie miałem możliwości podpierania się autorytetami naukowymi; zmuszony byłem opierać się jedynie na własnej rzetelnej ocenie uzyskanych przeze mnie wyników. W dzisiejszych czasach, gdy dostęp do danych dotyczących szczegółowych cech zaawansowanych technicznie opatrunków jest własnością globalnych koncernów, możliwość samodzielnego stworzenia opatrunku, którego cechy dorównują a często przewyższają wytwory działów Research and Development korporacji medycznych, pozwala z optymizmem spojrzeć w przyszłość i żywić nadzieję, że nie wszystko odbywać się musi pod dyktando ceny i praw podaży oraz popytu. Nie należy bowiem nigdy zapomnieć o tym, że odbiorcą każdej, nieważne jak zaawansowanej technologii medycznej, jest zawsze człowiek potrzebujący pomocy.

7. Wnioski

- **Wytworzone typy prototypowych opatrunków z bakteryjnej celulozy mogą stanowić funkcjonalną i ekonomicznie opłacalną alternatywę dla zaawansowanych nowoczesnych opatrunków stosowanych do leczenia ran przewlekłych**
- **Modyfikacje nośników celulozowych prowadzić mogą do uzyskania opatrunków o kontrolowanej szybkości uwalniania substancji przeciwdrobnoustrojowej**
- **Opatrunki celulozowe wysycone powidonem jodu mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu silnie zainfekowanych ran przewlekłych**
- **Opatrunki celulozowe o wysokiej gęstości usieciowania i wysokiej objętości mogą służyć jako opatrunki wtórne dla nośników celulozowych nisko usieciowanych i szybko uwalniających ze swojej struktury substancje przeciwdrobnoustrojowe**

8. Streszczenie

W mojej pracy podjąłem się wytworzenia pięciu typów prototypowych opatrunków z celulozy bakteryjnej oraz charakterystyki ich właściwości fizycznych oraz biologicznych. Uzyskane przeze mnie opatrunki zmodyfikowałem dodatkowo poprzez wysycenie ich czterema antyseptykami – poliheksanidyną, oktenidyną, powidonem jodu i chlorheksydyną oraz antybiotykiem gentamycyną. Cechy fizyczne nośników oceniałem za pomocą określenia ich masy, parametrów związanych ze zdolnością do absorbowania i uwalniania cieczy, porowatością i kształtem. Następnie poddałem wytworzone opatrunki celulozowe ocenie ich przydatności do eradykacji biofilmów *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterococcus faecalis* - drobnoustrojów zakażających rany przewlekłe - za pomocą techniki Antimicrobial Dressing Activity Measurement oraz modyfikacji tej metody służącej do określania przydatności opatrunków do zwalczania zakażeń w ranach o obfitym wysięku. Wykazałem, że nośniki celulozowe charakteryzujące się najwyższą porowatością mogą stanowić alternatywę dla stosowanych w praktyce klinicznej opatrunków hydrożelowych i hydrowłóknistych, a opatrunki celulozowe o niskiej porowatości mogą być używane w charakterze opatrunków wtórnych. Wykazałem także wysoką przydatność PVP-jodu uwalnianego z nośnika celulozowego do eradykacji biofilmów *S.aureus*, *P.aeruginosa* oraz *E.faecalis*. Udowodniłem też brak cytotoksyczności wytworzonych przeze mnie prototypowych opatrunków celulozowych względem linii fibroblastów – komórek odpowiedzialnych za proces gojenia się rany.

Słowa kluczowe: opatrunki z biocelulozy, antyseptyki, antybiotyki, biofilm, rany przewlekłe

9. Abstract

In my work, I undertook the creation of five types of prototypical bacterial cellulose dressings and performed characteristics of their physical and biological properties. I additionally modified the dressings by saturating them with four antiseptics - polyhexanidine, octenidine, povidone-iodine and chlorhexidine and gentamicin antibiotic. I evaluated the physical properties of carriers by determining their mass, water-related parameters, porosity and shape. Subsequently I subjected the cellulose dressings to the assessment of their suitability for eradication of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* biofilms which are microorganisms infecting chronic wounds. For this purpose I applied Antimicrobial Dressing Activity Measurement technique and its modification which allows to determine the suitability of dressings to combat infections in exudating wounds. I have shown that cellulose carriers with the highest porosity can be an alternative to the hydrogel and hydrofibrous dressings used in clinical practice, while cellulose dressings of low porosity can be used as secondary dressings. I have also demonstrated the high suitability of PVP-iodine released from a cellulose carrier for the eradication of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. faecalis* biofilms. I also proved the lack of cytotoxicity of the prototypical cellulose dressings I made, towards the fibroblast cell line responsible for the wound healing process.

Keywords: biocellulose dressings, antiseptics, antibiotics, biofilms, chronic wounds

10. Piśmiennictwo

1. 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

2. Ubbink DT, Brölmann FE, Peter M, Vermeulen H: *Evidence-Based Care of Acute Wounds: A Perspective*. Adv Wound Care 2015; 4(5): 286–294

3. Han G, Ceilley R: *Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments*. Adv Ther. 2017; 34(3): 599–610

4. Ning X, Dongqing L, Stahel M. *Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing*. Cell Mol Life Sci. 2016; 73(20): 3861–3885.

5. Bartoszewicz M, Junka A, Smutnicka D, Przondo-Mordarska A. Mikrobiologiczny aspekt oceny rany zagrożonej ryzykiem W.A.R. Forum Zakażeń 2011; 2(3) 85-88

6. Kramer A, Dissemond J, Kim S et al. *Consensus on Wound Antisepsis: Update 2018*. Skin Pharmacol Physiol 2018;31(1):28–58

7. 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

8. Zhou K, Jia P: *Depressive symptoms in patients with wounds: A cross-sectional study*. Wound Repair Regen. 2016;24(6):1059-106

9. Bartoszewicz M et al.: *Zasady postępowania miejscowego i ogólnego w ranach/owrzodzeniach przewlekłych objętych procesem infekcji*. Forum Zakażeń 2019;10(1):1-30

10. Strohal R, Dissemond J, Jordan O'Brien J, Piaggese A, Rimdeika R, Young T: *EWMA Document: Debridement. An updated overview and clarification of the principle role of debridement*. J Wound Care, 2013;22(1):5

11. Bazaliński D, Karnas M, Wołkowicz M : *Zastosowanie larw *Lucilia sericata* w oczyszczaniu ran przewlekłych – opis trzech przypadków*. Leczenie Ran 2018;15(3):153–159

12. Bernard FX, Barault C, Juchaux F, Laurensou C, Apert L: *Stimulation of the proliferation of human dermal fibroblasts in vitro by lipidocolloid dressing*. J Wound Care, 2005;14(5):215–220
13. 35. Ustawa z dnia 20 maja 2010 r. O wyrobach medycznych. Dz.U. 2010 nr 107 poz. 679.
14. Ustawa z dnia 11 września 2015 r. O zmianie ustawy o wyrobach medycznych oraz niektórych innych ustaw. Dz.U. 2015 poz. 1918.
15. Ustawa z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne. Dz.U. 2008 nr 45 poz. 271.
16. Rutala WA, Weber DJ, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC): Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. 2008, update 2017. Online: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/disinfection-guidelines.pdf>
17. Szkiler E: *Poliheksanid w miejscowym leczeniu ran – przegląd piśmiennictwa i doświadczenia własne*. Forum Zakażeń, 2018;9(5), 16-31
18. Willy, C., Scheuermann-Poley, C., Stichling, M., von Stein, T., Kramer, A: *Importance of wound irrigation solutions and fluids with antiseptic effects in therapy and prophylaxis*. Update 2017. Der Unfallchirurg, 2017;120(7):549–560
19. Kramer A, Müller O, Reichwagen G, Widulle S, Heldt H, Nürnberg P: *Octenidine, Chlorhexidine, Iodine and Iodophores*: Stuttgart, New York: Georg Thieme, 2008
20. McDonell G, Russell AD.: *Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance*. Clin Microbiol Rev 1999;12(1):147–179
21. 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
22. Dhivyaa S, Padmab VV, Santhina E: *Wound dressings – a review*. BioMedicine 2015, 5; 4, 24-28
23. EWMA position document: Wound Bed Preparation in Practice
https://ewma.org/fileadmin/user_upload/EWMA.org/Position_documents_2002-2008/pos_doc_English_final_04.pdf

24. 40. Iwanek K: *Zasady stosowania środków opatrunkowych i antyseptycznych. Opieka farmaceutyczna*. Lek w Polsce, 2015;25(6–7):16–26
25. Jałowska M, Adamska K: Opatrunki hydrowłókniste w leczeniu owrzodzeń. *Dermatologia*, 2016;16:30–34
26. Elbadawy A, Kamoun A, El-Refaie S, Kenawy B, Chenc X: *A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings*. J Adv Res. 2017; 8(3): 217–233
27. Ring E: *Opatrunki hydrokoloidowe w dermatologii i medycynie estetycznej*. Aesthetica, 2016;14:36–40
28. Majchrzyk I: *Najważniejsze informacje na temat aktualnych rodzajów opatrunków w leczeniu ran w opiece długoterminowej*. Biuletyn Geriatria, 2016;2(5):10–11
29. Namviriyachote N. *Development of polyurethane foam dressing containing silver and asiaticoside for healing of dermal wound*. Asian J Pharm Scien 2019; 14, 1: 63-77
30. Meaume, S, Senet, P, Dumas, R: *Urgotul: a novel non-adherent lipido-colloid dressing*. Br J Nurs 2002; 1: (16 Suppl), S42-S50
31. Parulkar B G, Sobti M K, Pardanani D S. *Dextranomer dressing in the treatment of infected wounds and cutaneous ulcers*. J Postgrad Med 1985;31:28-33
32. Antolak H, Kręgiel D: Bakterie kwasu octowego – taksonomia, ekologia oraz wykorzystanie przemysłowe. *ŻNTJ*, 2015, 4(101), 21–35
33. 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
34. Kubiak K., Kalinowska H., Peplińska M., Bielecki S.: *Celuloza bakteryjna jako nanobiomaterial*. Post Biol Kom 2009; 36: 85–98
35. Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown RM.: *Microbial cellulose – the natural power to heal wounds*. Biomaterials 2006; 27, 145–151
36. Bhat S Kumar K: *Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare*. Biomatter 2013; 1: 3(3): e24717; doi: 10.4161/biom.24717

37. 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
38. Meftahi A, Khajav A, Rashidi M, K. Rahimi A: *Preventing the collapse of 3D bacterial cellulose network via citric acid*. npj Biofilms and Microbiomes (2018) 4:21 ; doi:10.1038/s41522-018-0064-3
39. 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
40. Gagné-Thivierge C, Barbeau J, Levesque R, Charette S: *A new approach to study attached biofilms and floating communities from Pseudomonas aeruginosa strains of various origins reveals diverse effects of divalent ions*. FEMS Microbiol Lett. 2018; 1: 365(14). doi: 10.1093/femsle/fny155
41. Bryers JD: *Medical Biofilms*. Biotechnol Bioeng 2008; 100: 1–18
42. Omar A, Wright JB, Schultz G, Burrell R, Nadworny P. *Microbial Biofilms and Chronic Wounds*. Microorganisms 2017;5(1):9. doi:10.3390/microorganisms5010009
43. 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
44. Brackman G, Coenye T: *In Vitro and In Vivo Biofilm Wound Models and Their Application*. Adv Exp Med Biol, 2016;897:15-32
45. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MD: *Mikrobiologia medyczna*. wyd. 8; red. pol. Anna Przondo-Mordarska. Edra Urban & Partner, Wrocław 2018.
46. 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
47. Bassetti Mateo: *How to manage Pseudomonas aeruginosa infections*. Drugs Context. 2018; 7: 212527

48. Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A: Enterococcal infections & antimicrobial resistance. Indian J Med Res. 2008;128:111-21
49. 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
50. Vazquez A, Foresti ML, Cerrutti, P: *Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by Gluconacetobacter xylinus*. J Polym Environ 2013; 21: 545. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0541-3>
51. 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
52. 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
53. 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
54. Karta charakterystyki produktu leczniczego. http://chpl.com.pl/data_files/2012-07-16_20120704_garamycin_gabka_chpl-urclean.pdf (dostęp: 07.10.2018).
55. Mączyńska B, Junka A, Rurańska-Smutnicka D: *Oporność bakterii na gentamycynę a zastosowanie miejscowe antybiotyku w ortopedii, chirurgii i kardiochirurgii - badania in vitro*. IX Ogólnopolskie Sympozjum z cyklu "Biofilm tworzony przez drobnoustroje w patogenezie zakażeń" - "Poszukiwanie nowych rozwiązań diagnostycznych i terapeutycznych w wykrywaniu i eradykacji biofilmu"
56. Johani K: *Evaluation of short exposure times of antimicrobial wound solutions against microbial biofilms: from in vitro to in vivo*. J Antimicrob Chemother. 2018; 73(2): 494–502

57. Hübner NO, Kramer A: *Review on the Efficacy, Safety and Clinical Applications of Polihexanide, a Modern Wound Antiseptic.* Skin Pharmacol Physiol 2010;23(suppl 1):17–27
58. Chang JD, Wallace AG, Foster AF, Kim SJ: *Peptidoglycan compositional analysis of Enterococcus faecalis biofilm by stable isotope labeling by amino acids in bacterial culture.* Biochemistry. 2018; 57(7): 1274–1283. doi:10.1021/acs.biochem.7b01207