Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Marta Bauer

Próba zastosowania peptydów przeciwdrobnoustrojowych w prewencji infekcji bakteryjnych związanych z wykorzystaniem biomateriałów

Praca doktorska wykonana

w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik Katedry i Zakładu:

Prof. dr hab. Wojciech Kamysz

Promotor pracy:

Prof. dr hab. Wojciech Kamysz

Gdańsk 2019

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej w części finansowane były przez MNiSW, grant ***MN 01-0227/08/508***

Składam podziękowania na ręce Promotora mojej pracy doktorskiej, Pana Profesora Wojciecha Kamysza, za możliwość zdobycia wiedzy i nowych umiejętności.

Pragnę podziękować również:
Mgr. Maciejowi Jaśkiewiczowi i mgr. inż. Damianowi Neubauerowi za nieocenioną pomoc i wsparcie okazywane przez wszystkie lata naszej wspólnej pracy.

Panu Profesorowi Grzegorzowi Nałęcz-Jaweckiemu i Pani mgr Annie Zgadzaj za pomoc przy wykonywaniu testu cytotoksyczność na linii komórkowej mysich fibroblastów.

Pani dr hab. Magdalenie Prokopowicz i mgr. Adrianowi Szewczykowi za możliwość współpracy i pomoc w interpretacji wyników analiz ATR-FTIR.

Rodzinie – za wiarę we mnie.

Spis treści

Streszczenie 6

Abstract 9

Wykaz zastosowanych skrótów 11

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA 13

1. Biomateriały 13

1.1 Definicja i podstawowe terminy 13

1.2 Podział i zastosowanie 17

1.3 Systemy dostarczania substancji leczniczych jako szczególny sposób wykorzystania biomateriałów 22

1.4 Problemy związane z wykorzystaniem biomateriałów w medycynie 24

2. Biofilm bakteryjny i jego wpływ na terapię infekcji 25

2.1 Definicja i podstawowe cechy 26

2.2 Etapy powstawania biofilmu na powierzchni abiotycznej 28

2.3 Oporność biofilmu na antybiotykoterapię konwencjonalną 31

2.4 Infekcje związane z rozwojem biofimu 33

2.4.1 Infekcje związane z biofilmem utworzonym na tkankach organizmu 33

2.4.2 Zakażenia towarzyszące wykorzystaniu biomateriałów 34

3. Metody zwalczania biofilmu bakteryjnego 36

3.1 Biologiczne metody zwalczania biofilmu 37

3.2 Fizyczne metody zwalczania biofilmu 39

3.3 Chemiczne metody zwalczania biofilmu 41

4. Zapobieganie rozwojowi biofilmu na powierzchni materiałów medycznych 44

5. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs) 47

5.1 Klasyfikacja 48

5.1.1 Podział AMPs ze względu na pochodzenie 48

5.1.2 Podział ze względu na budowę chemiczną 50

5.2 Mechanizmy działania 51

5.3 AMPs o aktywności przeciwbiofilmowej 52

5.4 Zastosowania AMPs w modyfikacji powierzchni materiałów medycznych oraz nowe perspektywy 53

II. CEL PRACY 56

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA 58

1. Odczynniki, materiały i aparatura – synteza, analiza i oczyszczanie peptydów 58

1.1 Odczynniki 58
1.2 Materiały 59
1.3 Aparatura 59
2. Odczynniki, materiały i aparatura - modyfikacje powierzchni i mikrobiologia 60
2.1 Odczynniki 60
2.2 Materiały 60
2.3 Aparatura 61
3. Synteza i oczyszczanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych 62
4. Warunki prowadzenia badań mikrobiologicznych 64
5. Oznaczenie aktywności badanych związków w stosunku do form planktonowych 66
6. Wyznaczenie aktywności peptydów w stosunku do biofilmu 66
6.1 Aktywność przeciwadhezyjna 67
6.2 Aktywność wobec dojrzałego biofimu 68
7. Toksyczność AMPs w stosunku do ludzkich krwinek czerwonych 70
8. Wybrane wyroby medyczne 70
9. Metody modyfikacji powierzchni biomateriałów 71
10. Wyznaczenie toksyczności peptydów w stosunku do linii komórkowej mysich fibroblastów 74
11. Potwierdzenie obecności badanych związków na powierzchni zmodyfikowanych materiałów 75
11.1 Próba oszacowania ilościowego związania się związków z powierzchnią materiałów 75
11.2 Analiza powierzchni materiałów – ATR-FTIR 77
12. Oznaczenie aktywności mikrobiologicznej zmodyfikowanych wyrobów medycznych 78
12.1 Metoda modyfikacji w roztworze 79
12.1.1 Pomiar gęstości optycznej inokulum 79
12.1.2 Określenie żywotności komórek za pomocą resazuryny 79
12.1.3 Posiew próbek na podłoże stałe 80
12.2 Metoda modyfikacji wykorzystująca EDC 80
IV. OMÓWIENIE WYNIKÓW 81
1. Aktywność AMPs w stosunku do form wolnopływających drobnoustrojów oraz biofilmu 81
2. Ocena cytotoksyczności związków 86
3. Analizy potwierdzające obecność badanych związków na powierzchni materiałów medycznych 89
3.1 Analiza chromatograficzna 89
3.2 Analiza widm ATR-FTIR 90

4. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa zmodyfikowanych materiałów 97
4.1 Aktywność modyfikacji przeprowadzonych metodą inkubacji w roztworze 98
4.1.1 Pomiar gęstości optycznej inokulum..... 98
4.1.2 Określenie żywotności komórek za pomocą resazuryny 102
4.1.3 Obserwacja wzrostu kolonii bakteryjnych 105
4.2 Aktywność powierzchni zmodyfikowanej wiązaniem chemicznym..... 107
V. DYSKUSJA 109
VI. WNIOSKI..... 117
VII. PIŚMIENNICTWO..... 118

Streszczenie

Intensywny rozwój medycyny przyczynia się do wprowadzania nowych strategii ratowania oraz wspierania ludzkiego zdrowia i życia. Cel ten osiągany jest przede wszystkim poprzez zastosowanie materiałów medycznych oraz projektowanie biomateriałów o nowych, lepszych właściwościach.

Szerokie wykorzystanie różnego rodzaju biomateriałów w postaci implantów, systemów dostarczania substancji leczniczych lub jako środka mającego poprawić komfort życia człowieka (np. cewniki urologiczne, soczewki kontaktowe, specjalistyczne opatrunki) przyczyniło się do powstania problemu jakim są infekcje związane z zastosowaniem biomateriałów. W dobie rosnącej antybiotykooporności występowanie zakażeń bakteryjnych wiąże się z ryzykiem niepowodzenia terapii, a w przypadku kolonizacji materiałów medycznych może skutkować koniecznością reoperacji pacjenta. Problem występowania infekcji bakteryjnych związanych z zastosowaniem biomateriałów jest poważny także ze względu na obecność biofilmu. Udowodniona podatność materiałów medycznych na kolonizację bakteryjną oraz wielokrotnie większa oporność drobnoustrojów tworzących biofilm na konwencjonalną antybiotykoterapię spowodowały, że obecnie jednym z głównych kierunków badań na świecie jest opracowywanie nowych biomateriałów lub modyfikacje ich powierzchni w taki sposób, aby zapobiegały zjawisku adhezji bakteryjnej.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie możliwości zastosowania peptydów przeciwdrobnoustrojowych, jako związków mogących zmieniać właściwości powierzchni materiałów medycznych tak, aby zapobiegały powstawaniu biofilmu. Związki wykorzystane w czasie doświadczeń otrzymano metodą syntezy na nośniku stałym w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej GUMed. Do testów włączono także polimyksynę B (lipopeptyd, wykorzystywany w terapii infekcji wywołanych obecnością drobnoustrojów Gram-ujemnych) w celu porównania aktywności wybranych związków.

Grupa wybranych AMPs składała się z 8 krótkich lipopeptydów (od 2 do 4 reszt aminokwasowych) zawierających w sekwencji różne połączenia lizyny i argininy oraz resztę kwasu tłuszczowego. We wstępnych badaniach wykorzystano także citropinę 1.1 oraz wspomnianą wcześniej polimyksynę B. Testy mikrobiologiczne prowadzono

wykorzystując szczepy referencyjne drobnoustrojów: *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 2532, *E. coli* ATCC 25922 oraz *P. aeruginosa* ATCC 9027. Na podstawie oznaczeń minimalnego stężenia hamującego wzrost, wpływu związków na tworzenie się biofilmu, ich aktywności w stosunku do dojrzałej struktury oraz wyników testu toksyczności względem ludzkich krwinek czerwonych wybrano 6, które zastosowano w procesach modyfikacji powierzchni materiałów: Palm-KK-NH_2, Palm-KR-NH_2, Palm-KRKK- NH_2, K-Dap(Palm)-K- NH_2, K-Orn(Palm)-K- NH_2, polimyksyna B.

Doświadczenia przeprowadzano wykorzystując komercyjnie dostępne wyroby medyczne: silikonowo-lateksowy cewnik urologiczny oraz hydrożelowe jednodniowe soczewki kontaktowe. Wybrane związki łączono z powierzchnią materiałów za pomocą inkubacji w roztworze (zarówno fragmenty cewnika jak i soczewki) oraz poprzez wiązanie kowalencyjne (soczewki). Obecność peptydów na powierzchni materiałów została zweryfikowana na podstawie spektroskopii w podczerwieni (ATR-FTIR). Przeprowadzono także próbę obserwacji procesu uwalniania związków z powierzchni.

Aktywność mikrobiologiczną zmodyfikowanych materiałów sprawdzono poprzez umieszczanie ich w inokulum bakteryjnym i weryfikację redukcji wzrostu drobnoustrojów (m.in. pomiar gęstości optycznej inokulum, posiew na agarze). Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy obejmowały także testy toksyczności wyżej wymienionych związków względem komórek mysich fibroblastów.

Otrzymane wyniki sugerują, że wybrane lipopeptydy mogą mieć zastosowanie w modyfikacji powierzchni biomateriałów, a w przypadku wykorzystanych wyrobów medycznych osiągają wyższą aktywność niż citropina 1.1. Dla większości związków redukcja wzrostu drobnoustrojów była widoczna dla materiałów modyfikowanych w stężeniach 16–32 µg/ml (inkubacja w roztworze) zarówno w przypadku fragmentów cewnika jak i przy wykorzystaniu soczewek kontaktowych.

Spośród zastosowanych metod najbardziej uniwersalna okazała się modyfikacja poprzez inkubację, a największą redukcję wzrostu bakterii osiągnięto dla soczewek kontaktowych (w zakresie stężeń aktywnych redukcja była równa bądź bliska 100%).

Streszczenie

Badania cytotoksyczności peptydów względem linii komórkowej mysich fibroblastów potwierdziły, że związki te nie powodują spadku przeżywalności komórek poniżej 70% od stężenia 128 µg/ml (przy niższych wartościach przeżywalność wynosiła ok. 90–100%). Nie zaobserwowano także działania hemolitycznego peptydów w zakresie ich aktywności mikrobiologicznej.

Otrzymane wyniki potwierdzają, że warto rozwijać tematykę związaną z możliwościami wykorzystania AMPs w technologii biomateriałów charakteryzujących się właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Dla lepszego określenia ich biomedycznego przeznaczenia oraz wartości aplikacyjnych niezbędne są dalsze badania.

Abstract

Intensive development in medicine contributes to the implementation of new strategies for saving and supporting human health and life. This purpose is achieved by designing of medical materials with improving properties.

Extensive use of various types of plastics in the form of implants, drug delivery systems caused the problem called biomaterials–related infections. In the era of increasing antibiotic resistance, the occurrence of bacterial infections is connected with the risk of therapy failure. Bacterial colonization of medical materials may result in the necessity of the patient's reoperation. The problem of bacterial infections related to the use of biomaterials is also serious because of the presence of biofilm. Proven susceptibility of medical materials to bacterial colonization and much greater resistance of biofilm-forming microorganisms to conventional antibiotic therapy resulted in need of developing new biomaterials or modifying their surface to prevent the phenomenon of bacterial adhesion.

The aim of this PhD thesis was to investigate the possibility of using antimicrobial peptides (AMPs) as compounds that may change the properties of surfaces of medical materials in order to prevent the development of biofilm. The compounds used in the experiments were obtained by solid-phase peptide synthesis protocol in the Department of Inorganic Chemistry, MUG. Polymyxin B (lipopeptide, used in the therapy of Gram-negative bacterial infections) was also included in the tests in order to compare the activity of selected compounds.

The group of selected AMPs consisted of 8 short lipopeptides containing in a sequence different combinations of lysine/arginine and fatty acid residue. Citropin 1.1 and the polymixin B were also used in the preliminary studies. Microbiological tests were carried out using reference strains of bacteria:*S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* ATCC 2532, *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 9027. Based on the determination of the minimum inhibitory concentration, the effect of compounds on the formation of biofilm, their activity against mature structure and the results of the human red blood cell toxicity test, following lipopeptides were chosen: Palm-KK-NH_2, Palm-KK-KR-NH_2, Palm-KRKK-NH_2, K-Dap(Palm)-K-NH_2, K-Orn(Palm)-K-NH_2, Polymyxin B. They were used in the processes of material surface modifications.

Abstract

The experiments were conducted using commercially available medical devices: silicone-latex urinary catheter and hydrogel, daily disposable contact lenses. Selected compounds were combined with the surface of materials by incubation in solution (both catheter fragments and lenses) and by covalent bonding (lenses). The presence of peptides on the surface of the materials was verified by infrared spectroscopy (AT-FTIR). The degree of release of compounds from the surface of materials was also evaluated.

Antimicrobial activity of modified materials was examined by incubation in bacterial inoculums. Reduction of bacterial growth was observed using e.g. spectrophotometric measurement of inoculum density, agar culture. The studies carried out during this study included also tests of toxicity of the above mentioned compounds to mice fibroblast cells.

Obtained results suggest that selected lipopeptides may be useful in the reduction of microbial growth on medical materials. Modified surfaces were effective in concetration 16–32 μg/ml (incubation in solution) for both catheter fragments and contact lenses.

Among the methods which were used, modification by incubation proved to be more effective and the greatest reduction of bacterial growth was achieved for contact lenses (in the range of active concentrations the reduction was equal or close to 100%).

Studies on the toxicity of peptides to mice fibroblast line confirmed that these compounds do not cause a decrease in cell survival below 70% from 128 μg/ml (at lower concentration survival values were about 90–100%).

The results obtained in this study show that it is worthwhile to develop the following topics with the potential use of antimicrobial peptides in biomaterials technology. Further research is needed to better define their biomedical application values.

Wykaz zastosowanych skrótów

Skróty 1-literowe aminokwasów:

Alanina – A

Arginina – R

Fenyloalanina – F

Glicyna – G

Izoleucyna – I

Kwas asparaginowy – D

Leucyna – L

Lizyna – K

Seryna – S

Walina – V

AMPs – *peptydy przeciwdrobnoustrojowe*

ATR-FTIR – *spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera*

CFU – jednastki tworzące kolonię

CLSI – *Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych*

DAP – *kwas 2,3-diaminopropionowy*

DCM – *dichlorometan*

DIC – *N,N'-diizopropylokarbodiimid*

DIPEA – *N,N-diizopropyloetyloamina*

DMF – *N,N-dimetyloformamid*

DMSO – *dimetylosulfotlenek*

EDC – *chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropylo)karbodiimidu*

EPM – *zewnątrzkomórkowa macierz polimerowa*

EPS – *egzopolisacharyd*

ESI – *jonizacja przez elektrorozpylanie*

Fmoc – *osłona 9-fluorenylometoksykarbonylowa*

Laur – *reszta kwasy laurynowego (reszta kwasu dodekanowego)*

Wykaz zastosowanych skrótów

MBEC – *minimalne stężenie eliminujące biofilm*

McF – *jednostka McFarlanda*

MHB II – *Mueller Hinton II Broth podłoże płynne*

MIC – *minimalne stężenie hamujące wzrost*

Mir – *reszta kwasu mirystynowego (reszta kwasu tetradekanowego)*

MS – *spektrometria mas*

ORN – L-ornityna

Palm – *reszta kwasu palmitynowego (reszta kwasu heksadekanowego)*

PBS – *bufor fosforanowy*

PCL - *poli(ε-kaprolakton)*

PDMS – *poli(dimetylosiloksan)*

PGA – *poliglikolid*

PLA – *polilaktyd*

PMMA – *poli(metakrylan metylu)*

PU – *poliuretan*

RP-HPLC – *wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz*

SDS – *laurylosiarczan(VI) sodu*

SPPS – *synteza peptydów na nośniku stałym*

TFA – *kwas trifluorooctowy*

TIS - *triizopropylosilan*

QS – *quorum sensing*

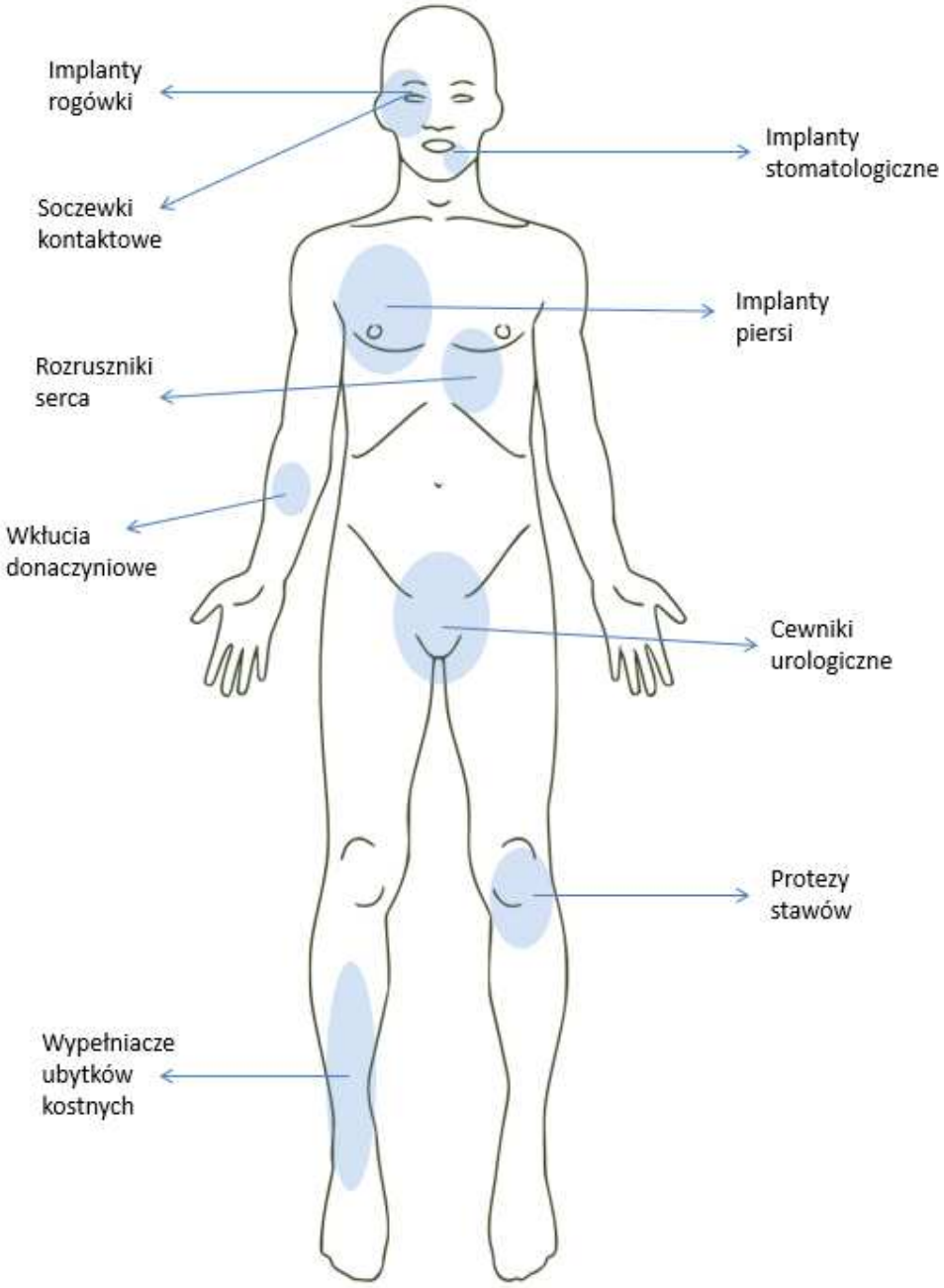
I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Biomateriały

Wykorzystanie biomateriałów do wspierania lub „naprawy" ciała ludzkiego ma swój początek w starożytności. Pierwotnie w tym celu stosowano łatwo dostępne materiały, takie jak drewno. Powstanie biomateriałów w formie jaka jest obecnie znana datowane jest na początek XX wieku. Do powszechnego stosowania wprowadzono polimery naturalne, syntetyczne i półsyntetyczne, ceramikę oraz metale i ich stopy [1]. Najszybszy rozwój w dziedzinie biomateriałów nastąpił w latach 70. ubiegłego wieku o czym świadczy sukcesywnie wzrastająca liczba doniesień naukowych. Obecnie materiały medyczne stanowią przedmiot badań wielu grup naukowych na całym świecie. W ciągu ostatnich dziesięcioleci bardzo zauważalny jest postęp w dziedzinie implantologii oraz projektowaniu nowoczesnego sprzętu medycznego mającego poprawiać jakość życia człowieka lub umożliwiać precyzyjną diagnostykę chorób.

1.1 Definicja i podstawowe terminy

Pierwsza, oficjalna definicja pojęcia „biomateriałów" została ogłoszona w roku 1982 podczas Konferencji Biomateriałów jako *Clinical Applications of Biomaterials. NIH Consens Statement*. Ze względu na fakt, iż od tamtej pory minęło już prawie 40 lat ma ona znaczenie przede wszystkim historyczne, jednak do przedstawienia ogólnego opisu grupy materiałów medycznych jest wystarczająca i wciąż używana. Zapisy porozumienia definiują „biomateriały" jako „każdą substancję inną niż lek albo kombinację substancji syntetycznych lub naturalnych, która może być użyta w dowolnym czasie, a której zadaniem jest uzupełnienie lub zastąpienie tkanek narządu lub jego części w celu spełnienia ich funkcji" [2]. Przykłady wykorzystania biomateriałów zamieszczono na poniżej rycinie (**Rycina 1**)



Rycina 1. Przykłady zastosowania biomateriałów.

Biomateriałem nazywa się substancje proste lub złożone, które mają bezpośredni kontakt z ciałem człowieka, a przy tym nie wywołują żadnej negatywnej reakcji organizmu (np. w postaci stanu zapalnego).

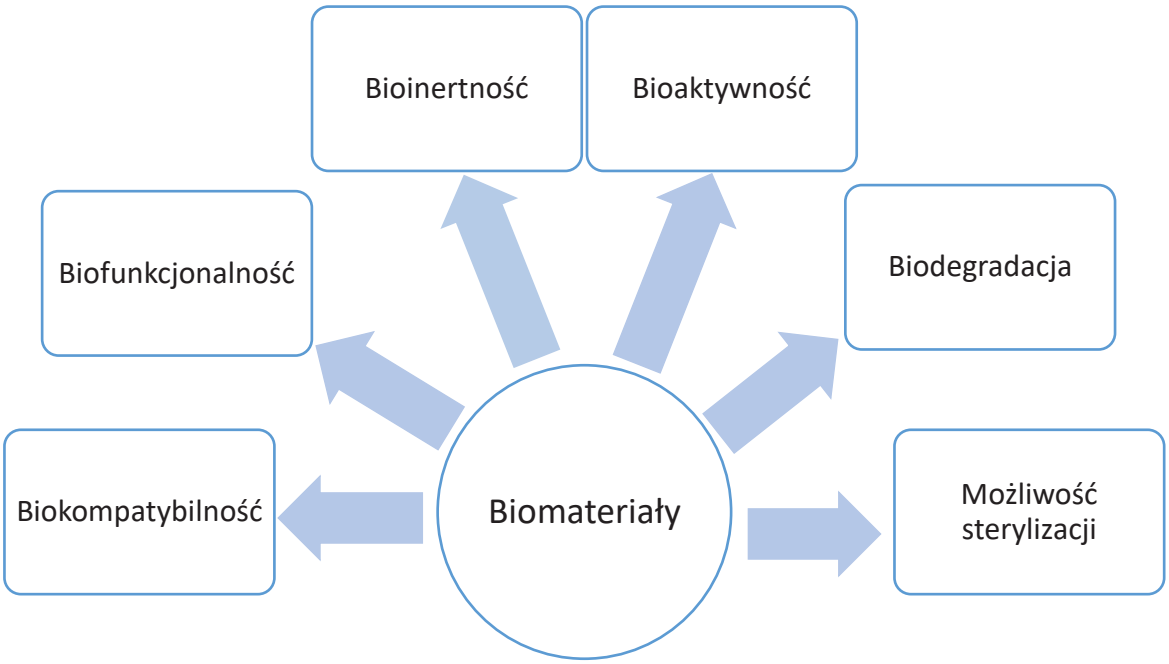
Definicja biomateriałów (inaczej nazywanych materiałami medycznymi) bezpośrednio wiąże się z pojęciem wyrobu medycznego oraz jego szczególnym rodzajem jakim jest

implant. W obu przypadkach są to produkty, do wytworzenia których wykorzystuje się biomateriały. Polski Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych jasno określa, czym jest wyrób medyczny oraz implant:

„Wyrób medyczny – narzędzie, przyrząd, urządzenie, oprogramowanie, materiał lub inny artykuł, stosowany samodzielnie lub w połączeniu, w tym z oprogramowaniem przeznaczonym przez jego wytwórcę do używania specjalnie w celach diagnostycznych lub terapeutycznych i niezbędnym do jego właściwego stosowania.

Implant (wyrób medyczny do implantacji) – wyrób medyczny przeznaczony do wprowadzania w całości do ludzkiego ciała albo zastępowania powierzchni nabłonka lub powierzchni oka, za pomocą zabiegu chirurgicznego, i pozostający tam po zakończeniu zabiegu oraz wyrób medyczny przeznaczony do wprowadzania w części do ludzkiego ciała, za pomocą zabiegu chirurgicznego, i pozostający tam po zakończeniu zabiegu co najmniej przez 30 dni” [3].

Przepisy oraz normy określają podstawowe cechy materiału, które pozwalają zaklasyfikować go do grupy biomateriałów medycznych.



Rycina 2. Najważniejsze cechy biomateriałów [3].

Biomateriał musi spełniać wymagania dotyczące biokompatybilności. Zagadnienie to związane jest z akceptacją wykorzystanego materiału przez organizm. Badania biozgodności obejmują toksyczność wszystkich rodzajów biomateriałów, ich kompatybilność z tkankami, hemokompatybilność (oddziaływania z krwią) oraz właściwości biofunkcjonalne. Ostatnia kategoria określa na ile dany materiał spełnia swoją funkcję oraz czy zachowuje swoje właściwości przez wystarczająco długi okres. Regulacje dotyczące badania biozgodności biomateriałów zawarte są w normie ISO 10993 [5].

Kolejną cechą, jaka brana jest pod uwagę przy ocenie materiału, który ma mieć zastosowanie w celach medycznych jest jego bioinertność, czyli zdolność do zachowania odpowiednich właściwości mechanicznych i chemicznych. Bioinertność opisywana jest także pod kątem uwalniania do otoczenia tkanek substancji (składników), które budują biomateriał oraz zachodzenia reakcji chemicznych między materiałem a tkankami. Biomateriał uznawany jest za bioinertny, kiedy jest w pełni tolerowany przez organizm i w środowisku tkanek nie zachodzą reakcje chemiczne. Za najbardziej bioinertne uważane są stopy metali: węgla, tytanu [6].

W przypadku niektórych kategorii materiałów medycznych (np. implantów kostnych) ważną cechą jest ich bioaktywność. Cecha ta określa zdolność materiału do tworzenia połączeń z tkanką. Najczęściej bioaktywność oceniana jest pod kątem zachodzenia osteointegracji. Podczas tego procesu tkanka kostna łączy się z powierzchnią implantu, który sukcesywnie pokrywany jest komórkami kostnymi. Wysoką bioaktywnością charakteryzuje się hydroksyapatyt, fosforan(V) wapnia lub materiały ceramiczne [7].

Niektóre biomateriały umieszczane są w organizmie na określony czas. W tym przypadku pożądaną cechą jest biodegradowalność. Pozwala to uniknąć konieczności powtórnego zabiegu chirurgicznego. Przez biodegradowalność materiału rozumie się jego rozpad, rozpuszczenie lub absorbcję po upłynięciu danego okresu. Przykładem biomateriału o wysokiej biodegradowalności są biopolimery [8].

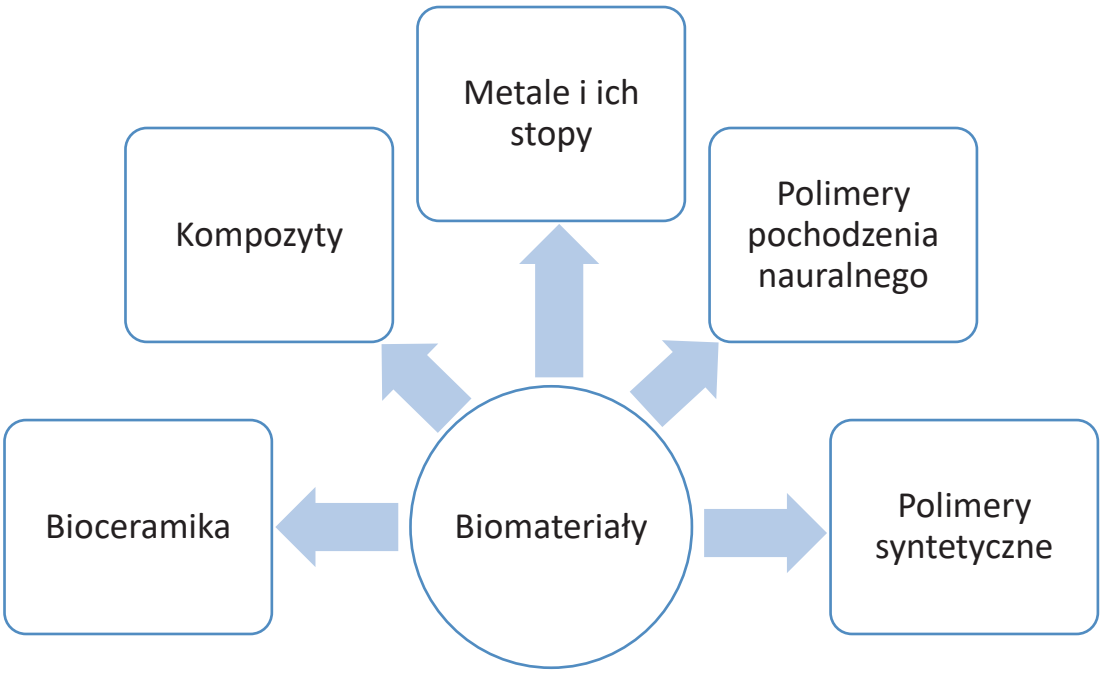
Biomateriały mogą zostać wykorzystane do implantacji i produkcji wyrobów medycznych tylko wtedy, kiedy wykazują odporność na sterylizację. Konieczne jest, aby

przed kontaktem materiału medycznego z organizmem usunąć z jego powierzchni zanieczyszczenia oraz mikroorganizmy [9].

Wybór odpowiedniego biomateriału uzależniony jest przede wszystkim od jego właściwości fizycznych, które w bezpośredni sposób determinują oddziaływania z tkankami.

1.2 Podział i zastosowanie

Intensywny rozwój w dziedzinie materiałów medycznych powoduje, że wraz z upływem czasu powstają nowe i bardziej szczegółowe metody klasyfikacji biomateriałów. Ogólny podział biomateriałów uwzględniający ich budowę chemiczną dzieli je na 5 głównych grup: bioceramikę, kompozyty, metale i ich stopy, polimery pochodzenia naturalnego oraz polimery syntetyczne (**Rycina 3**) [10].



Rycina 3. Podstawowy podział biomateriałów [10].

Bioceramika – jest to grupa biomateriałów obejmująca materiały ceramiczne, które wraz z metalami i ich stopami, zaliczane są do najbardziej trwałych. Bioceramiką można nazwać tworzywa, które składają się przede wszystkim ze składników nieorganicznych. Specyficzna budowa chemiczna umożliwia zastosowanie bioceramiki w postaci implantów tkanek twardych, czyli kości lub zębów [11]. Najczęściej wykorzystywanym materiałem ceramicznym jest hydroksyapatyt przedstawiany stechiometrycznie wzorem $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Jest to minerał z grupy fosforanów wapniowych, który w postaci niestechiometrycznej (z substutucjami i defektami w sieci krystalicznej) występuje jako podstawowy składnik tkanek twardych – kości i zbębów. Ceramika hydroksyapatytowa jest w 100% kompatybilna z chemiczną budową ludzkich kości. Hydroksyapatyt można modyfikować poprzez wzbogacenie go o takie pierwiastki jak węgiel, magnez lub sód, co wpływa na oddziaływanie materiału z osteoblastami i wytwarzenie połączeń implantu z tkanką kostną [12]. Do bioceramiki zaliczane są także bioszkła, które w organizmie wykazują właściwości podobne do hydroksyapatytu. Głównym składnikiem jest krzemionka, tlenek wapnia oraz tlenek sodu lub tlenek magnezu [13].

Materiały kompozytywe (kompozyty) – jest to grupa biomateriałów, do której zalicza się tworzywa składające się z kilku (co najmniej 2) faz o różnych właściwościach chemicznych, a fazy te mogą ze sobą reagować. W zależności od pełnionej funkcji wyróżnia się komponent zbrojący (włókna, cząsteczki) oraz osnowę (polimery lub metale i ich stopy). Zadaniem osnowy jest stabilizowanie struktury materiału poprzez zapewnienie właściwego położenia fazie zbrojącej. Jako osnowę wykorzystuje się np. stopy żelaza oraz materiały ceramiczne. Komponentem zbrojącym mogą być tlenki metali oraz włókna polimerowe, szklane i metalowe. Kompozyty znajdują zastosowanie w chirurgii ortopedycznej [14].

Metale i ich stopy – materiały metalowe należą do biomateriałów, które jako jedne z pierwszych zaczęto stosować w produkcji implantów. Ze względu na wysoką wytrzymałość na uszkodzenia mechaniczne oraz procesy zmęczeniowe metale wykorzystywane są w produkcji implantów kostnych, protez, śrub ortopedycznych. Z powodzeniem stosowane są także w stomatologii oraz protetyce. Obecnie coraz rzadziej wykorzystuje się implanty wykonane z jednego rodzaju metalu. Najczęściej

stosowane są różnego rodzaju stopy: tytanu, kobaltu lub metale szlachetne [15]. Często używane są stopy będące roztworem stałym węgla w żelazie z dodatkiem innych metali, tzw. stale austenityczne. Najbardziej znanym przykładem austenitu, który rutynowo stosuje się w implantologii, jest stop Cr-Ni-Mo (stal 316L). Udowodniono jednak, że stopy zawierające nikiel są dość podatne na korozję, co powoduje uwalnianie jonów metali do środowiska organizmu [3, 16]. Ważną grupą materiałów są stopy z pamięcią kształtu zaliczane do tzw. inteligentnych biomateriałów. Stopy te charakteryzuje „pamięć" pierwotnego kształtu oraz jego zaprogramowane odtwarzanie, które inicjowane jest w odpowiednich warunkach. Przedstawicielem tej grupy jest stop Ni-Ti wykorzystywany w chirurgii ortopedycznej oraz w ochronie tkanek miękkich związanych z kośćmi [17]. Biomateriały metalowe dzieli się na 2 grupy w zależności od okresu na jaki są wszczepiane. Stopy krótkoterminowe implantowane są na maksymalnie 2 lata (np. austenity), natomiast materiały długoterminowe mogą przebywać w środowisku tkanek nawet do 25 lat (np. stopy tytanu) [3]. Obecnie opracowuje się metale biodegradowalne, które znajdują zastosowanie np. w terapii chorób wieńcowych jako biodegradowalne stenty metaliczne [18].

Polimery naturalne – to grupa związków wielkocząsteczkowych, które wywodzą się ze źródeł naturalnych. Do grupy tej zalicza się m.in. kolagen, chitozan, polisacharydy, kwas hialuronowy, agarozę. Polimery naturalne z powodzeniem wykorzystywane są w produkcji specjalistycznych materiałów opatrunkowych (nazywane także materiałami aktywnymi) oraz w dermatologii i kosmetologii. W związku z ich zdolnością do biodegradacji nie są one odpowiednie do zastosowań długoterminowych. Ich główną zaletą jest zdolność do bezpiecznej biodegradacji [19, 20].

Polimery syntetyczne – są to przede wszystkim związki z grupy polimerów. Ich synteza przeprowadzana jest najczęściej w znanych, określonych warunkach, dlatego możliwe jest otrzymanie tworzywa o ściśle znanych właściwościach. Szeroko stosowanym materiałem w lecznictwie są silikony (polisiloksany), których łańcuch główny składa się przede wszystkim z cząsteczek krzemu połączonych cząsteczkami tlenu i w zależności od zastosowania mogą być modyfikowane odpowiednimi dodatkami, np. emulgatorami. Polisiloksany mogą być wykorzystywane również pod postacią polidimetylosiloksanu (PDMS), który powstaje podczas reakcji polikondensacji silanoli. Wysoka przejrzystość

tego materiału oraz jego bezpieczeństwo spowodowały, że PDMS stosowany jest do wytwarzania soczewek kontaktowych. Wykorzystywany jest także do produkcji elementów jednorazowych używanych podczas pracy z urządzeniami diagnostycznymi. Silikony wykorzystuje się m.in. do produkcji cewników urologicznych, implantów w medycynie estetycznej czy plastrów leczących blizny [21, 22]. Polietylen będący polimerem etenu wykorzystywany jest w ortopedii, głównie jako materiał do produkcji endoprotez. Stosowany jest także w stomatologii [23]. W chirurgii ortopedycznej wykorzystywany jest cement kostny. Jest to materiał akrylowy używany przy implantacji endoprotez oraz jako wypełniacz przy urazach kostnych [24]. Do grupy polimerów syntetycznych zalicza się również polimery biodegradowalne: polilaktyd (PLA), poli(ε-kaprolakton) (PCL, otrzymywany w wyniku polimeryzacji z otwarciem pierścienia), poliglikolid (PGA) oraz kopolimery laktydu, glikolidu. PLA, PCL oraz PGA pod kątem budowy chemicznej zaliczane są do poliestrów alifatycznych. Ich najważniejszą zaletą jest zdolność do bezpiecznej degradacji w środowisku tkanek organizmu. W zależności od budowy łańcucha polimerowego materiały te pozostają stabilne przez okres od 2–3 tygodni do kilku lat [25]. Innym przykładem polimerów biodegradowalnych są poliuretany alifatyczne lub cykloalifatyczne stosowane m.in. do wytwarzania opatrunków lub błon półprzepuszczalnych [26]. Polimery biodegradowalne stosuje się przede wszystkim w inżynierii tkankowej jako wsparcie przy regeneracji tkanek lub narządów. Tworzywa te znajdują szerokie zastosowanie w ortopedii jako elementy do mocowania, np. szpilki, pręty, śruby. Z substancji, które ulegają degradacji wykonywane są także nici chirurgiczne i sztuczne więzadła [25]. W ostatnim czasie opisane zostało wykorzystanie polimerów biodegradowalnych (sztucznych i naturalnych) jako systemów dostarczania substancji leczniczych (**Część I, *Część teoretyczna***, **Podrozdział 1.3**) [27].

Biomateriały wybierane są pod kątem ich przeznaczenia. W **Tabeli 1.** znajduje się porównanie opisanych wyżej materiałów medycznych uwzględniające ich wady i zalety.

Tabela 1. Zestawienie zalet i wad głównych rodzajów biomateriałów stosowanych w medycynie [28].

Rodzaj biomateriału	Zalety	Wady
Bioceramika (materiały ceramiczne)	Podobieństwo do tkanki kostnej, biokompatybilność i aktywacja komórek kostnych;	Kruchość i podatność na uszkodzenia;
Kompozyty	Integracja materiału z tkankami, podobieństwo chemiczne i mechaniczne z tkankami;	Zwiększona złożoność wytworzenia;
Metale i ich stopy	Wysoka wytrzymałość mechaniczna i odporność na uszkodzenia;	Prawdopodobieństwo uwolnienia toksycznych produktów degradacji (szczególnie stopy badane pod kątem biodegradowalności), immunogenność;
Polimery naturalne	W większości biokompatybilne, aktywne oddziaływania z tkankami;	Trudne w przetwarzaniu; Duże zróżnicowanie między różnymi partiami tego samego materiału otrzymanych tę samą metodą; Niska wytrzymałość mechaniczna;
Polimery syntetyczne	Duża dostępność, niski koszt otrzymywania i przetwarzania, możliwość otrzymania materiału o konkretnych właściwościach;	Zmniejszone oddziaływanie z komórkami, potencjalne uwalnianie produktów degradacji do otoczenia tkanek;

1.3 Systemy dostarczania substancji leczniczych jako szczególny sposób wykorzystania biomateriałów

Dostarczanie substancji leczniczych obejmuje procesy i sposoby podawania substancji aktywnych farmakologicznie tak, aby osiągnąć efekt terapeutyczny. Wraz z powstawaniem nowych postaci leku pojawiła się potrzeba opracowania odpowiednich sposobów wprowadzania ich do organizmu oraz możliwości zwiększenia efektywności ich działania. Uważa się, że niektóre z systemów dostarczania substancji leczniczych mogą mieć zastosowanie w celowanej terapii nowotworów redukując tym samym wpływ toksycznych związków przeciwnowotworowych na zdrowe komórki. Systemy dostarczania substancji leczniczych obejmują głównie podawanie leków w postaci koniugatów (lek związany jest z nośnikiem) lub zamkniętych w liposomach i micelach. Literatura opisuje także zastosowanie nanocząstek, gdzie substancja lecznicza jest rozproszona wewnątrz nanocząstki, przyłączona chemicznie lub zaadsorbowana na jej powierzchni. Duże nadzieje wiąże się z możliwością zastosowania nanocząstek jako celowanego systemu transportującego lek do mózgu, którego właściwości pozwolą na pokonanie bariery krew-mózg. Rodzajem systemu dostarczania substancji leczniczych jest także transport transdermalny (transport leku przez skórę). Ze względu na trudności w projektowaniu leków, które docierałyby do głębszych warstw skóry jest to wciąż badane zagadnienie. Jego dużą zaletą jest nieinwazyjność podania oraz możliwość kontrolowanego uwalniania substancji aktywnej w czasie [29].

Opracowywanie nowych rodzajów biomateriałów oraz badania nad możliwościami ich wykorzystania spowodowały, że znalazły zastosowanie w farmakologii jako nośniki substancji leczniczych. Spośród wszystkich znanych dotąd rodzajów materiałów medycznych najwięcej uwagi poświęca się polimerom. Doniesienia literaturowe potwierdzają skuteczność wykorzystania w tym celu zarówno polimerów naturalnych jak i syntetycznych [30].

Reprezentantem grupy polimerów naturalnych, który znalazł zastosowanie w transporcie substancji leczniczych jest m.in. kolagen. Na rynku światowym dostępne są preparaty, gdzie polimer ten wykorzystano jako nośnik antybiotyku – gentamycyny [31]. Kolagen używany jest także jako film pokrywający implanty i uwalniający określone

substancje do otoczenia tkanek, w tym substancje o aktywności przeciwnowotworowej [32]. Z powodzeniem wykorzystywany jest do produkcji tzw. gąbek kolagenowych, których zadaniem jest ochrona ran. Opracowano połączenia kolagenu z białkiem rhBMP-2, które uwalniane z gąbki kolagenowej stymuluje regenerację kości [33].

Kolejnym przykładem naturalnego polimeru wykorzystywanego jako element systemu dostarczania substancji leczniczych jest kwas hialuronowy. Badana jest możliwość zastosowania kwasu hialuronowego jako transportera dla czynników wzrostu i komórek macierzystych, co wspomagać ma leczenie ran [34].

Doniesienia literaturowe opisują doświadczenia, w których jako nośnik leku wykorzystano chitozan. Polisacharyd ten w postaci nanocząstek wykazał właściwości przeciwdrobnoustrojowe w testach *in vivo* [35]. Przypuszcza się, że materiały oparte na chitozanie/chitynie mogą być wykorzystywane w terapii HIV. Udowodniono, że nanocząstki chitozanowe mogą mieć zdolność do przechodzenia przez barierę krew-mózg i w ten sposób zwiększać dostępność leków hamujących replikację wirusa w układzie nerwowym [36]. Na bazie chitozanu opracowywane są także systemy dostarczania insuliny.

Główną zaletą polimerów naturalnych jest zdolność do ich rozpadu po określonym czasie. Produkty biodegradacji są w większości bezpieczne dla człowieka i łatwo usuwane są z organizmu [20].

Drugi rodzaj polimerów, które wykorzystywane są przy projektowaniu systemów dostarczania substancji leczniczych są polimery syntetyczne. Wśród nich wyróżnić można 2 grupy: polimery nie ulegające biodegradacji oraz polimery biodegradowalne.

Polimery, które nie ulegają rozpadowi w organizmie najczęściej są usuwane po uwolnieniu leku. Substancja aktywna w takim przypadku przyłączana jest do powierzchni tworzywa np. poprzez wiązanie kowalencyjne utworzone z wykorzystaniem łącznika. Związek pełniący rolę łącznika leku z polimerem powinien ulegać kontrolowanej degradacji uwalniając substancję leczniczą. Podobne rozwiązanie stosowane jest w przypadku implantów, które wszczepiane są długoterminowo, a efekt terapeutyczny ma utrzymywać się tylko przez określony czas [36]. Przykładem systemu dostarczania leku, gdzie substancja aktywna tworzy powłokę na materiale są cewniki

urologiczne pokryte srebrem lub antybiotykami [37]. Innym rodzajem materiału, który nie ulega biodegradacji i wykorzystuje się go do transportu leku jest cement kostny, którego głównym składnikiem jest PMMA. Opisuje się zastosowanie cementu kostnego do transportu gentamycyny, co zapobiegać ma potencjalnym infekcjom bakteryjnym po zabiegach ortopedycznych [38]. Jako system dostarczania leku badane są także soczewki kontaktowe, do których przyłączane są antybiotyki lub substancje przeciwbólowe [39].

Syntetyczne polimery biodegradowalne używane w systemach dostarczania substancji leczniczych należą przede wszystkim do grupy poliestrów alifatycznych oraz ich kopolimerów. Wykorzystywane są również poliuretany alifatyczne i cykloalifatyczne oraz zmodyfikowane hydrożele. Rozkład tworzyw biodegradowalnych zachodzi *in vivo* przy udziale enzymów lub zostaje zainicjowany odpowiednimi warunkami [40]. W przypadku tej kategorii polimerów możliwe są 2 metody połączenia z substancją leczniczą: lek może być związany z powierzchnią materiału lub stanowić składnik mieszaniny, z której powstaje dany materiał. Polimery biodegradowalne zastosowane jako systemy dostarczania leków umożliwiają celowane podawanie substancji leczniczej bez konieczności usuwania materiału z organizmu. Uważa się także, że ich wykorzystanie redukuje prawdopodobieństwo wystąpienia skutków ubocznych po podaniu substancji aktywnej. Opisywane jest wykorzystanie polimerów biodegradowalnych w terapii genowej lub jako nośniki substancji przeciwnowotworowych, leków przeciwzapalnych lub psychotropowych [41].

1.4 Problemy związane z wykorzystaniem biomateriałów w medycynie

Wprowadzenie i rozpowszechnienie biomateriałów znacznie wpłynęło na wydłużenie i poprawę jakości życia człowieka. Obecnie wartość rynku materiałów medycznych szacowana jest na ok. 100 bilionów dolarów, a ich łączna sprzedaż przekracza 200 bilionów dolarów (dane z roku 2013). Poza licznymi zaletami wynikającymi z zastosowania biomateriałów w lecznictwie i diagnostyce warto wspomnieć o najistotniejszych wadach.

Jednym z wyzwań jest często niewystarczająca wytrzymałość mechaniczna i biostabilność zastosowanych implantów i konieczność wymiany wszczepu po upływie

określonego czasu. Niezbędne jest powtórne wykonanie zabiegu chirurgicznego, co jest szczególnie niebezpieczne dla osób starszych. Kolejnym problemem są potencjalnie niebezpieczne produkty degradacji lub oddziaływań tkanka-biomateriał. Jest to istotne ze względu na dużą różnorodność międzyosobniczą i związaną z tym wrażliwością na substancje chemiczne [28, 42].

Innym zagadnieniem, o którym należy wspomnieć, jest problem infekcji bakteryjnych związanych z zastosowaniem biomateriałów. Może on dotyczyć zarówno implantów stałych jak i materiałów umieszczonych w ciele na krótki czas. Tworzywa, z których produkowane są materiały medyczne często wykazują dużą podatność na kolonizację przez drobnoustroje. Infekcje spowodowane zabiegiem implantacji lub obecnością biomateriału w środowisku tkanek stanowią obecnie jeden z kluczowych problemów terapeutycznych. Zakażenia te należą do trudnych w eradykacji, co spowodowane jest wysoką opornością bakterii na stosowane antybiotyki oraz rozwojem struktury biofilmu [43]. Problem ten zostanie omówiony w kolejnym rozdziale.

2. Biofilm bakteryjny i jego wpływ na terapię infekcji

Tematyka związana z zagadnieniem biofilmu jest znana nie tylko z punktu widzenia medycyny. Biofilm tworzy się m.in. w rurach wodociągowych, wykorzystywany jest w procesach związanych z ochroną środowiska [44]. Jednak ze względu na fakt, że zdolność do bytowania w postaci biofilmu mają również drobnoustroje patogenne powstawanie tej wielokomórkowej struktury jest jednym z wyzwań, z którymi mierzy się służba zdrowia. Potwierdzone jest, że biofilm tworzony przez bakterie odpowiedzialny jest za powstawanie trudnych w leczeniu infekcji szpitalnych. Opisana wysoka oporność biofilmu na konwencjonalną antybiotykoterapię powoduje, że infekcje z nim związane stanowią niebezpieczeństwo dla życia człowieka [43].

2.1 Definicja i podstawowe cechy

W środowisku naturalnym komórki drobnoustrojów rzadko występują w postaci wolnopływającej. Badania wykazały, że mikroorganizmy najczęściej przyjmują formę biofilmu.

Biofilmem określa się specyficzny sposób organizacji mikroorganizmów. Jest to wielokomórkowy i wielowarstwowy twór, który powstawać może zarówno na powierzchni biotycznej (np. tkanka) jak i abiotycznej (np. powierzchnia implantu). Zorganizowana grupa komórek otoczona jest zewnątrzkomórkową macierzą (EPM*, ang. extracellular polymeric matrix*). W skład biofilmu mogą wchodzić jednocześnie różne rodzaje i gatunki drobnoustrojów - jest to tzw. biofilm mieszany. Udowodnione jest, że zdolność do bytowania w postaci biofilmu posiadają zarówno bakterie, grzyby i pierwotniaki [45].

Produkcja zewnątrzkomórkowej macierzy inicjowana jest w początkowej fazie kolonizowania powierzchni. Zadaniem EPM jest nadanie i utrzymanie zwartej struktury oraz ochrona komórek przed szkodliwym działaniem środowiska zewnętrznego, np. antybiotyków w przypadku terapii infekcji, stresu osmotycznego czy promieniowania UV.

Głównym składnikiem macierzy są polisacharydy, białka i kwasy nukleinowe. Zadaniem polisacharydów jest udział w procesach adhezji oraz tworzeniu połączeń między komórkami w biofilmie. Białka budujące EPM wraz z polisacharydami zapewniają ochronę przed działaniem układu odpornościowego gospodarza. Ochrona przed wpływem toksyn związana jest także z obecnością enzymów, które rozkładają szkodliwe substancje. Obecność kwasów nukleinowych zapewnia wymianę materiału genetycznego między komórkami. Potwierdzone jest, że udział poszczególnych składników macierzy może różnić się w zależności od składu biofilmu. Istnieją też składniki EPM, które są specyficzne dla danej grupy bakterii [46]. Szczep *Pseudomonas aeruginosa* produkuje kwas alginowy jako podstawowy składnik substancji zewnątrzkomórkowej otaczającej biofilm [47].

Struktura biofilmu posiada rozwinięty system wymiany składników odżywczych i wody. Substancje pokarmowe docierają do kolejnych warstw biofilmu za pośrednictwem sieci kanałów. System ten wykorzystywany jest również do usuwania produktów przemiany materii [45].

Kolejną cechą biofilmu jest obecność specyficznego systemu komunikacji międzykomórkowej. Mikroorganizmy oddziałują na siebie wzajemnie za pomocą charakterystycznych dla danej grupy mikroorgonizmów substancji chemicznych, co jest swoistym sposobem „porozumiewaia się" mikroorganizmów. Zjawisko to określane jest jako *quorum sensing*. Istnienie QS po raz pierwszy opisano ok. 40 lat temu przeprowadzając doświadczenia na bakteriach morskich. Wyizolowano wówczas specyficzne substancje nazwane autoinduktorami. Komunikacja poprzez *quorum sensing* może odbywać się nie tylko w ramach jednego gatunku. Sygnały mogą być wysyłane również między odmiennymi rodzajami mikroorganizmów. Drobnoustroje wykorzystują zjawisko *quorum sensin*g to wzajemnego ostrzegania przed niebezpieczeństwem. Dzięki autoinduktorom wysyłany jest także sygnał do zapoczątkowania kolonizacji nowych powierzchni. Poprzez *quorum sensing* bakterie są w stanie wpływać na poziom wirulencji i patogenności. Obecnie uważa się, że chemiczna komunikacja wewnątrz struktury biofilmu odpowiedzialna jest za rozwój zakażeń opornych na terapię antybiotykami [48].

Komórki tworzące poszczególne warstwy biofilmu różnią się w zależności od położenia. Ponieważ w głębszych warstwach struktury trudniej jest o substancje odżywcze i tlen mikroorganizmy pozostają tam w stanie uśpienia i charakteryzują się wolniejszym metabolizmem.

Specyficzne cechy biofilmu w znacznym stopniu odróżniają go od komórek bakteryjnych występujących w formie planktonu. Podsumowanie tych różnic przedstawiono w **Tabeli 2.**

Tabela 2. Porównanie form bytowania drobnoustrojów [49].

Forma wolnopływająca	Biofilm
Pojedyncze komórki	Agregaty komórkowe
Komórki zawieszone w środowisku płynnym	Twory wielokomórkowe związane z powierzchnią
Aktywna odpowiedź na antybiotykoterapię	Wysoka oporność na konwencjonalne leczenie
Wrażliwe na działanie układu odpornościowego	Oporne na działanie układu opornościowego
Szybki metabolizm i intensywny wzrost komórek	Spowolnione procesy życiowe i różnicowanie komórek mikroorganizmów

2.2 Etapy powstawania biofilmu na powierzchni abiotycznej

Jak wspomniano w **Podrozdziale 2.1** drobnoustroje wykazują zdolność do kolonizowania powierzchni ożywionej i nieożywionej. Ze względu na poruszony problem infekcji związanych z biofilmem wytworzonym na powierzchni biomateriałów w dalszej części omówiony zostanie proces powstawania biofilmu na powierzchni abiotycznej ze szczególnym uwzględnieniem kolonizowania implantów.

Literatura opisuje 4 najważniejsze etapy formowania się struktury biofilmu:

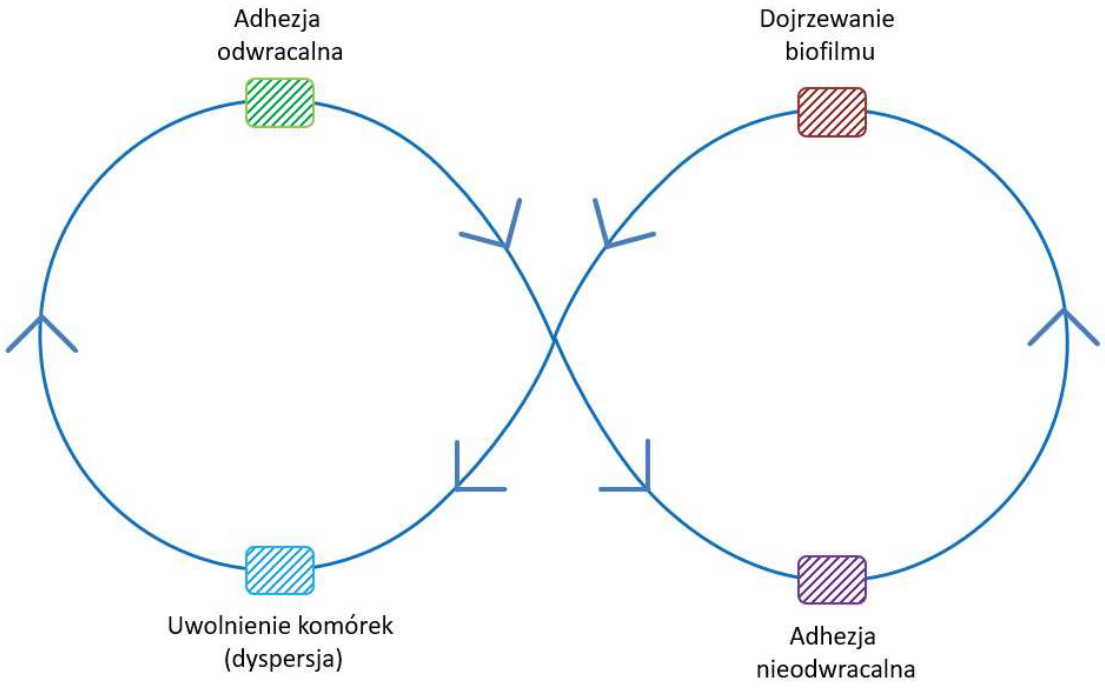
- Adhezja odwracalną;
- Adhezja nieodwracalną;
- Dojrzewanie biofilmu;
- Uwolnienie komórek do otoczenia;

Proces adhezji odwracalnej zachodzi, gdy komórki mikroorganizmów w formie planktonowa znajdą się w odległości > 50 nm od powierzchni. W przyłączaniu się bakterii do podłoża główną role odgrywają słabe oddziaływania chemiczna, np. siły van der Waalsa oraz siły hydrofobowe. Jest to etap, w którym warstwa komórek jest łatwa do usunięcia i nie rozwinęły się jeszcze czynniki wirulencji. Kiedy komórki znajdą się bliżej podłoża uruchamiane są siły elektrostatyczne i powstają wiązania niekowalencyjne.

Kolejnym etapem formowania się biofilmu jest adhezja nieodwracalna. Komórki łączą się z powierzchnią za pomocą adhezyn: pilli, fimbrii i rzęsek. Wytwarzane są silniejsze wiązania chemiczne i rozpoczyna się produkcja zewnątrzkomórkowej macierzy oraz proliferacja komórek tworzących mikrokolonie.

Trzecia faza powstawania biofilmu to dojrzewanie struktury. W dalszym ciągu produkowany jest EPS. Komórki różnicują się i intensywnie namnażają. Tworzą się makrokolonie, które układają się w warstwy. W etapie tym ważny udział pełnią polisacharydy i białka macierzy, które zabezpieczają i stabilizują tworzący się biofilm. Dojrzewanie struktury stymulowane jest także przez *quorum sensing*. Komórki mikroorganizmów łączą się ze sobą, tworzona jest sieć kanałów, którymi przesyłane są substancje odżywcze i cząsteczki sygnałowe. W biofilmie rozwijane są czynniki wirulencji.

Gdy komórki tworzące biofilm nie są już w stanie utrzymać zwartej struktury lub zostanie wysłany odpowiedni sygnał następuje faza rozproszenia (dyspersji). Ze struktury uwalniane są formy wolnopływające drobnoustrojów, które mogą kolonizować kolejne powierzchnie wykorzystując np. układ krwionośny jako drogę przemieszczania [50].



Rycina 4. Ogólny schemat powstawaniu biofilmu bakteryjnego.

Postać wielokomórkowego aglomeratu zależna jest od warunków, w jakich tworzony jest biofilm. Biorąc pod uwagę warunki środowiska zewnętrznego i dostępność składników pokarmowych struktura może tworzyć model:

- Płaski – cienka warstwa komórek rozciągnięta wzdłuż powierzchni, charakterystyczna dla warunków, w których występuje przepływ;
- Kolumnowy – bakterie zamiast warstw tworzą pionowe skupiska prostopadłe do podłoża;
- Model grzyba – najbardziej popularna forma występowania biofilmu. Warstwy komórek ułożone są w sposób przypominający grzyb z szerszą częścią u góry [51].

Sposób powstawania biofilmu na powierzchni implantów medycznych jest podobny do ogólnego, opisanego powyżej wzoru. Formowanie biofilmu rozważane jest jako poważny problem opieki zdrowotnej, ponieważ zakażenia szpitalne najczęściej związane są z zabiegami wszczepienia implantów lub wykorzystaniem materiałów medycznych w czasie hospitalizacji. Predyspozycje do kolonizowanie powierzchni biomateriałów zależą od rodzaju tworzywa i jego właściwości fizycznych, np. hydrofobowości, która sprzyja adhezji bakteryjnej. Doniesienia literaturowe opisują także, że drobnoustroje wykazują większe powinowactwo do kolonizowania powierzchni szorstkich i porowatych [52]. Potwierdzono m.in., że szczep *Staphylococcus aureus* wykazuje powinowactwo do implantów metalowych, natomiast szczep *Staphylococcus epidermidis* do polimerów [53]. Wpływ na adhezję bakteryjna mają także komórki i białka organizmu, który pokrywają powierzchnię implantu.

Patogeneza rozwoju zakażenia związana jest przede wszystkim z wszczepieniem materiału oraz powstaniem rany po zabiegu. Dochodzi wówczas do połączenia sterylnych i niesterylnych przedziałów organizmu i rozwinięcia odpowiedzi zapalnej. Płyny komórkowe i składniki krwi poprzez ranę kontaktują się z powierzchnią materiału, co wzmaga aktywność układu immunologicznego oraz uruchamia kaskadę krzepnięcia. Białka organizmu (albumina, fibryna) oddziałują z warstwą zewnętrzną implantu oraz drobnoustrojami, co sprzyja ich adhezji do powierzchni i rozwojowi zakażenia spowodowanego biofilmem [54].

Czynniki związane z budowa wielokomórkowej struktury oraz duża podatność materiałów medycznych na kolonizację przez drobnoustroje powodują, że wielokomórkowa struktura oporna jest na działanie konwencjonalnych środków leczniczych wywołując tym samym trudne w leczeniu infekcje. Problem ten zostanie szerzej opisany w kolejnym podrozdziale **(Podrozdział 2.3)**.

2.3 Oporność biofilmu na antybiotykoterapię konwencjonalną

Bakterie tworzące biofilm mają zdolność do przetrwania w niekorzystnych warunkach nawet przez długi czasu, co jest jedną z najważniejszych cech inwazyjności tej struktury. Z punktu widzenia medycyny najistotniejsze są czynniki odpowiedzialne za ochronę biofilmu przed antybiotykoterapią.

Pierwszą z cech zapewniających oporność biofilmu na szkodliwe czynniki środowiska jest obecność zewnątrzkomórkowej, polisacharydowej macierzy. Składniki EPM, w szczególności polisacharydy i białka, uniemożliwiają dotarcie substancji toksycznych do wnętrza struktury lub powodują, że związki te nie osiągają stężenia efektywnego. Zewnętrzna warstwa polimerowa może hamować wnikanie związków leczniczych np. poprzez wiązanie cząsteczek leków z ujemnie naładowaną macierzą [55]. Opisane jest, że obecności antybiotyków w stężeniach poniżej wartości wywołującej efekt eradykacji komórek bakteryjnych stymuluje drobnoustroje do zwiększenia produkcji niektórych składników macierzy. Przykładem jest szczep *Pseudomonas aeruginosa,* który w środowisku związków o stężeniu poniżej wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC) zwiększa produkcję alginianów, które dodatkowo zwiększają oporność na penetrację antybiotyków w głąb biofilmu [56].

Kolejnym czynnikiem chroniącym wielokomórkowy aglomerat przed działaniem substancji toksycznych jest spowolnienie metabolizmu komórek znajdujących się w dolnych warstwach struktury. Jest to skutek przystosowania bakterii do warunków beztlenowych i utrudnionego dostępu składników odżywczych. Udowodniono, że związki przeciwdrobnoustrojowe wykazują większą aktywność w stosunku do intensywnie rosnących komórek mikroorganizmów. Potwierdzono, że taki sposób działania jest charakterystyczny dla antybiotyków z grupy β-laktamów. Spowolnienie

procesów metabolicznych, a co za tym idzie zahamowanie wzrostu komórek, obniża wrażliwość biofilmu na działanie substancji leczniczych [57].

Oporność biofilmu na czynniki szkodliwe jest zapewniona także dzięki powstawaniu tzw. komórek przetrwałych (ang. *persister cells*), bytujących w postaci uśpionej. Należą one do populacji komórek wolnorosnących lub takich, które utraciły zdolność do wzrostu. Ich różnicowanie stymulowane jest spowolnieniem procesów metabolicznych. Komórki przetrwałe są szczególnie trudne do wyeliminowania, ponieważ charakteryzują się wysoką opornością na nawet najbardziej zaawansowaną i długotrwałą antybiotykoterapię. Dodatkowo, uśpione komórki mogą wznowić swoją aktywności w sprzyjających warunkach, co może przyczynić się do rozwoju infekcji [58].

Zabezpieczeniem przed działaniem substancji leczniczych jest także opisany wcześniej mechanizm *quorum sensing*. Bakterie wysyłają między sobą sygnały chemiczne w odpowiedzi na obecność niekorzystnych substancji w środowisku. Odebrany sygnał aktywuje geny odpowiedzialne za wytwarzanie czynników wirulencji w postaci enzymów lub toksyn. Może także uczestniczyć w ochronie przed odpowiedzią systemu odpornościowego. W związku z dużym udziałem zjawiska *quorum sensing* w tworzeniu oporności biofilmu na antybiotyki wiele grup badawczych skupia się na opisie mechanizmu jego działania oraz poszukiwaniu cząsteczek blokujących jego aktywność.

Z aktywnością *quorum sensing* związany jest specyficzny system usuwający związki toksyczne z wnętrza biofilmu, tzw. *efflux pumps*. Jest to układ pomp, który reguluje skład środowiska wewnętrznego wielokomórkowej struktury eliminując substancje przeciwdrobnoustrojowe oraz metabolity. Przypuszcza się, że za pomocą systemu pomp transportowane są cząsteczki autoinduktorów [59].

Oporność biofilmu na antybiotykoterapię zapewnia także możliwość zmian genetycznych wewnątrz struktury. Udowodnione jest, że komórki rosnące w postaci biofilmu posiadają znacznie większe predyspozycje do tworzenia mutacji, co jest związane z możliwością przekazywania materiału genetycznego. Dzięki wymianie genów bakterie szybko rozwijają oporność względem czynnika szkodliwego i mogą przekazywać tę informację kolejnym komórkom [57].

2.4 Infekcje związane z rozwojem biofimu

Zakażenia bakteryjne, którym towarzyszy powstanie biofilmu można podzielić na 2 grupy: infekcje spowodowane kolonizacją tkanek organizmu oraz infekcje spowodowane kontaminacją (zanieczyszczeniem) implantów komórkami drobnoustrojów i rozwinięciem biofilmu. W dalszej części pracy zostaną omówione obie grupy infekcji, przy czym ze względu na tematykę badań więcej miejsca zostanie poświęcone tzw. infekcjom „odbiomateriałowym".

2.4.1 Infekcje związane z biofilmem utworzonym na tkankach organizmu

Adhezja bakteryjna do tkanek organizmu jest przyczyną poważnych zakażeń. Istnieje wiele jednostek chorobowych, których czynnikiem etiologicznym jest biofilm bakteryjny. Choroby związane z obecnością wielokomórkowej struktury to m.in.: przewlekłe infekcje dróg oddechowych, chroniczne obstrukcyjne choroby płuc, gruźlica, przewlekłe infekcje ran (np. stopa cukrzycowa), przewlekłe zapalenie ucha środkowego, infekcje dróg żółciowych, zapalenie wsierdzia lub zapalenie ozębnej. W przypadku infekcji ran jednym z najczęściej izolowanych drobnoustrojów jest *S. aureus*. Formowanie biofilmu związanie jest w tym przypadku ze zdolnością bakterii do wiązania się z fibrynogenem i kolagenem. Zakażenia układu moczowego powodowane są przez kolonizację szczepami gronkowców i komórkami *E. coli*. Mogą one rozprzestrzeniać się na sąsiadujący układ rozrodczy, co powoduje powstawanie biofilmu, np. na błonie śluzowej pochwy. Spośród zakażeń dróg oddechowych związanych z biofilmem do najtrudniejszych w leczeniu zalicza się infekcje rozwinięte u osób z mukowiscydozą. Trudnym w eradykacji czynnikiem etiologicznym jest szczep *P. aeruginosa*. Opisywane są także przypadki, gdzie biofilm powstały na tkankach dróg oddechowych składał się z różnych rodzajów drobnoustrojów [60].

2.4.2 Zakażenia towarzyszące wykorzystaniu biomateriałów

Infekcje bakteryjne związane z wykorzystaniem biomateriałów stanowią obecnie poważny problem terapeutyczny. Spowodowane jest to dużą popularnością i szerokimi możliwościami zastosowania materiałów medycznych oraz ich podatnością na kolonizację przez mikroorganizmy. Szacuje się, że ok. 50–70% zakażeń bakteryjnych wymagających hospitalizacji spowodowany jest zastosowaniem biomateriałów. Rozwój infekcji może być związany z każdym rodzajem tworzywa, które wykorzystuje się w medycynie. Dodatkowo, problemem jest możliwość transferu komórek bakteryjnych z powierzchni implantu na tkanki organizmu. Powstanie biofilmu na powierzchni materiału może prowadzić do zniszczenia tkanek oraz samego wszczepu. Groźne dla zdrowia i życia pacjenta jest także ryzyko rozprzestrzenienia się komórek mikroorganizmów [61]. W **Tabeli 3.** zestawiono przykłady najczęstszych infekcji związanych z wykorzystaniem materiałów medycznych.

Tabela 3. Przykłady implantów, których obecność najczęściej wiąże się z rozwojem zakażenia [62].

Implant lub urządzenie medyczne	***Prawdopodobieństwo (%) rozwoju zakażenia w czasie używania***
Cewniki urologiczne	33
Elementy wlewów dożylnych	5–10
Implanty stomatologiczne	5–10
Wkłucia centralne	2–10
Rozruszniki serca	4
Protezy biodra	3–4
Implanty sutka	1–2

Głównymi czynnikami etiologicznymi tzw. zakażeń odbiomateriałowych są drobnoustroje Gram-dodatnie: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus viridans* oraz niektóre szczepy Gram-ujemne: *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*. Opisywane są także liczne przypadki, gdzie przyczyną zakażenia był biofilm grzybiczy. Poniższa tabela (**Tabela 4**) zawiera przykłady materiałów medycznych wraz z najczęściej izolowanymi patogenami związanymi z rozwojem infekcji.

Tabela 4. Zestawienie rodzajów implantów wraz z czynnikami etiologicznymi zakażeń z nimi związanych [63].

Rodzaj implantu	Główne patogeny
Implant biodra	*S. aureus*, *P. mirabilis*, *Escherichia coli*, koagulazo (-) gronkowce, *Streptococcus sp.*
Rozruszniki serca	*S. aureus*
Implanty piersi	*S. aureus*, *Enterococcus sp.*, *S. epidermidis*
Cewniki urologiczne	*S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*
Implanty stomatologiczne	Gram-ujemne bakterie beztlenowe
Soczewki kontaktowe	*P. aeruginosa*, bakterie Gram-dodatnie

Najważniejszym czynnikiem ryzyka, który może być odpowiedzialny za wywołanie zakażenia bakteryjnego związanego z zabiegiem wszczepienia implantu, jest kontakt materiału medycznego z zewnętrznymi powłokami ciała pacjenta. Z tego względu do najczęstszych zakażeń należą te, które wywołane są obecnością cewników dożylnych, cewników urologicznych lub elementów potrzebnych do przeprowadzania dializy otrzewnowej. Drogą transportu komórek bakteryjnych może być także środowisko, w jakim przeprowadzany jest zabieg implantacji. Mikroorganizmy mogą być obecne w powietrzu wypełniającym wnętrze sali operacyjnej. W takim przypadku do kolonizacji materiału medycznego dochodzi jeszcze przed wprowadzeniem implantu do ciała pacjenta. Do rozwoju infekcji bakteryjnych związanych z wykorzystaniem biomateriałów może dojść także poprzez transfer drobnoustrojów znajdujących się na skórze personelu medycznego. Ponadto, komórki bakteryjne znajdujące się na skórze chorego lub osób

mających z nim kontakt mogą prowadzić do rozwinięcia stanu zapalnego rany pooperacyjnej, która stać się może wrotami zakażenia. Udowodnione jest, że mikroorganizmy są w stanie dotrzeć do powierzchni implantu wykorzystując zjawisko dyfuzji, transportu hematogennego (poprzez naczynia krwionośne) lub przemieszczać się w sposób aktywny. W przypadku niektórych materiałów medycznych na rozwinięcie infekcji wpływa zachowanie ich prawidłowej higieny. Dotyczy to m.in. soczewek kontaktowych lub opatrunków polimerowych. Szczególnym przypadkiem zakażeń są infekcje stomatologiczne, gdzie bakterie zasiedlające implant lub ranę pochodzą z płytki nazębnej [64, 65].

Rutynowa diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń bakteryjnych związanych z wykorzystaniem materiałów medycznych obejmuje pobranie próbek do badań, hodowlę, identyfikację patogenów praz przeprowadzenie testów wrażliwości na antybiotyki. Do tej pory nie opracowano standardu, który pozwalałby na celowaną diagnostykę infekcji związanych z biomateriałami. W zależności od budowy i przeznaczenia implantu protokół postępowania może się różnić, głównie w kwestii rodzajów próbek potrzebnych do badań. Szczegółowe wytyczne odnośnie metod diagnostycznych oraz antybiotykoterapii ustalone są indywidualnie przez poszczególne kraje [66].

3. Metody zwalczania biofilmu bakteryjnego

Zakażenia, którym towarzyszy rozwój biofilmu należą do trudnych w terapii, co stanowi zagrożenie dla zdrowia pacjenta i znacznie podnosi koszty związane z hospitalizacją. Obecnie rozwijane są 2 strategie walki z infekcjami związanymi z biofilmem. Pierwsza z nich obejmuje poszukiwanie nowych związków mogących w przyszłości zastąpić lub wspomóc konwencjonalną antybiotykoterapię, która często okazuje się nieskuteczna w związku z rosnącą lekoopornością drobnoustrojów. Obejmuje także metody walki z problemem biofilmu w przemyśle spożywczym i ochronie środowiska. Pracuje się nad dokładnym opisem i charakterystyką powstawania biofilmu, co ma być pomocne w zrozumieniu procesów zachodzących w strukturze. Podejście to skupia się przede wszystkim na rozwijaniu sposobów eradykcji

dojrzałego biofilmu, które można podzielić na metody biologiczne, fizyczne i chemiczne (**Podrozdziały 3.1, 3.2, 3.3**) [67].

Drugi kierunek badań obejmuje opracowywanie możliwości zapobiegania powstawania infekcji związanych z biofilmem. Poszukiwane są metody, które uniemożliwiłyby kolonizację bakteryjną. Strategia ta dotyczy głównie zakażeń wywołanych lub współtowarzyszących wykorzystaniu materiałów medycznych w medycynie i obejmuje procesy związane z modyfikacjami powierzchni biomateriałów. Podejście to szerzej omówione zostanie w kolejnym rozdziale (**Rozdział 4**) [68].

3.1 Biologiczne metody zwalczania biofilmu

Wśród biologicznych metod eliminacji uformowanego biofilmu wiele uwagi poświęca się zastosowaniu bakteriofagów. Są to naturalnie występujące wirusy, które posiadają zdolność do wnikania do komórek bakteryjnych. Drobnoustroje nie rozwijają oporności w odpowiedzi na ich aktywność. Ponadto, fagi mogą bytować w środowisku wewnętrznym gospodarza przez długi okres i poza pojedynczymi komórkami bakteryjnymi atakować także te tworzące biofilm. Bakteriofagi mogą oddziaływać z genomem drobnoustrojów (fagi lizogenne) lub niszczyć komórki bakterii (fagi lityczne). Potwierdzona jest skuteczność wykorzystania terapii fagowej w eliminacji biofilmów *P. aeruginosa* oraz *S. aureus*. Przykładowe mechanizmy działania bakteriofagów to m.in.:

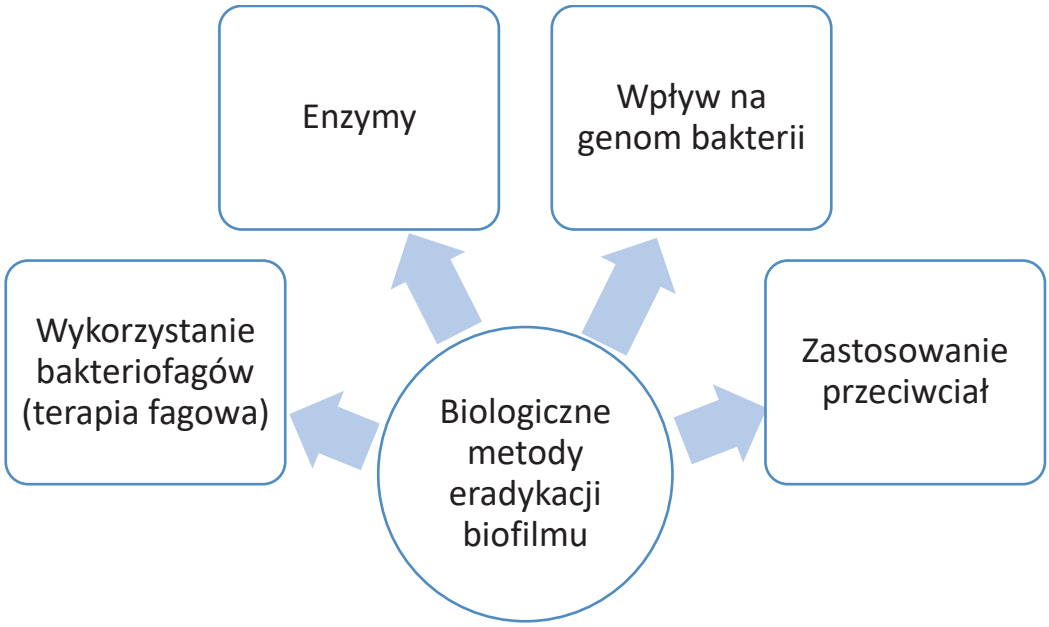
- Wniknięcie do wnętrza biofilmu i namnażanie się w komórkach bakteryjnych, co prowadzi do rozprzestrzenienia się fagów w całej strukturze hamując produkcję zewnątrzkomórkowej macierzy;
- Wytwarzanie enzymów destabilizujących biofilm;
- Zdolność do infekowania komórek przetrwałych [69].

Biologiczne metody eradykacji biofilmu bakteryjnego obejmują także zastosowanie enzymów. Bakterie tworzące biofilm wytwarzają substancje, które umożliwiają im zainicjowanie etapu dyspersji. Enzymy te to przede wszystkim związki oddziałujące ze składnikami macierzy otaczającej biofilm: proteazy, egzopolisacharydazy lub deoksyrybonukleazy, nazywane także *matrix-targeting enzymes.* Przypuszcza się, że

wyizolowanie tych enzymów oraz podanie ich do środowiska biofilmu zwiększa wrażliwość drobnoustrojów na aktywność układu immunologicznego oraz działanie antybiotyków [70].

Regulacja funkcjonowania drobnoustrojów w zorganizowanej strukturze odbywa się poprzez wysyłanie sygnałów w postaci materiału genetycznego. Najważniejszą rolę w procesie dojrzewania biofilmu oraz zapewnianiu oporności na czynniki szkodliwe odgrywa mechanizm *quorum sensing*. Doniesienia literaturowe podają, że geny odpowiedzialne za istnienie tego sposobu komunikacji stanowią ok. 10% genomu drobnoustrojów. Poszukiwane są cząsteczki, które oddziaływałyby z receptorami dla autoinduktorów. Opisane jest także, że regulacja procesu budowy biofilmu zależy od cyklicznego di-GMP, który jest przekaźnikiem w transdukcji sygnałów (głównie dotyczących wytwarzanie polimerowej macierzy) oraz sRNA uczestniczącego w posttranskrypcyjnej regulacji genów odpowiedzialnych za procesy metaboliczne oraz rozwój czynników determinujących patogenność. Obecnie badania skupiają się na ingerencji w działanie wspomnianych wyżej cząsteczek sygnałowych [71].

Pośród biologicznych metod walki z biofilmem bakteryjnym literatura wyróżnia także zastosowanie przeciwciał. Opisane jest doświadczenie, w którym zastosowano przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko białku AAP (*accumulation asociated protein*) produkowanym przez szczep *S. epidermidis*. Białko to odpowiada za zachodzenie procesu adhezji bakteryjnej oraz akumulację komórek na powierzchni. Zablokowanie jego aktywności przez przeciwciało wpływa na redukcję lub powoduje całkowitą eradykcję drobnoustrojów z powierzchni materiału medycznego [72]. Ludzkie przeciwciało monoklonalne TRL1068 okazało się skuteczne w blokowaniu aktywności czynników genetycznych odpowiedzialnych za powstawanie biofilmu. Badane jest także pod kątem możliwości zastosowania w terapii łączonej wykorzystującej antybiotyki konwencjonalne w terapii zakażeń związanych z użyciem biomateriałów. Testy *in vivo* na mysim modelu infekcji potwierdziły większą efektywność połączenia przeciwciało/antybiotyk w redukcji komórek bakteryjnych niż uzyskano dla samego antybiotyku [73].



Rycina 5. Przykłady metod biologicznych wykorzystywanych do walki z biofilmem.

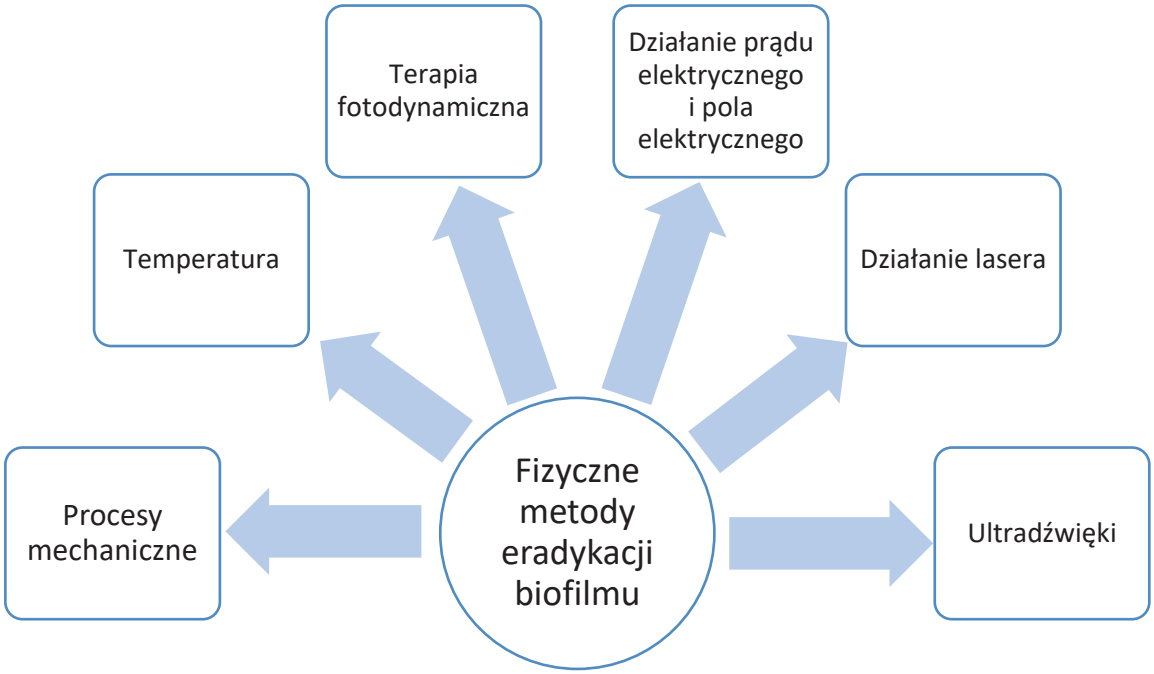
3.2 Fizyczne metody zwalczania biofilmu

Wszędzie tam, gdzie problem biofilmu dotyczy powierzchni zastosowanie znajdują metody fizyczne eliminacji drobnoustrojów. Ich działanie opiera się głównie na procesach mechanicznych, np. skrobaniu czy szorowaniu. Udowodnione jest, że takie postępowanie nie jest skuteczne w każdym przypadku i zależy od właściwości powierzchni. Wśród wykorzystywanych metod fizycznych o potwierdzonym działaniu wyróżnia się zastosowanie temperatury. Zdolność do eliminacji wielokomórkowej struktury potwierdzono dla procesu zamrażania oraz warunków wysokiej temperatury (ok. 100°C) [67]. Nowoczesne podejścia opisują także możliwości wykorzystania promieniowania UV. Opisywane są badania, gdzie do eliminacji biofilmu użyto promieniowania UVA – LED o niskiej częstotliwości pulsacyjnej [74]. Duże nadzieje pokłada się także w przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej, która opiera się na zastosowaniu procesu światłouczulenia, wykorzystaniu tlenu cząsteczkowego oraz światła widzialnego o odpowiedniej długości, tak aby spowodować powstawanie wysokoreaktywnych form tlenu, które niszczą strukturę biofilmu [75]. Potwierdzona jest także skuteczność zastosowania prądu elektrycznego w eradykacji komórek bakteryjnych. Uważa się, że oparta na zastosowaniu prądu metoda elektrochemiczna może być wykorzystana do usuwania biofilmu z powierzchni implantów. Warunkiem jest

jednak rodzaj materiału, z jakiego wykonany jest wszczep. Do zajścia procesu wymagana jest powierzchnia o właściwościach przewodzenia prądu elektrycznego. Skutkiem działania tej metody jest m.in. zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej drobnoustrojów i utlenienie białek wewnątrzkomórkowych. Doniesienia literaturowe opisują także wysoką efektywność pola elektrycznego w zwalczaniu biofilmu poprzez zaburzanie struktury błony komórkowej [76]. Inną z metod, która okazała się skuteczna w walce z biofilmem jest wykorzystanie wiązek laserowych. Badania wskazują, że fala uderzeniowa jest w stanie rozbić zwartą strukturę, w której bytują drobnoustroje. Potwierdzono również, że generowana laserowo wiązka wpływa na destabilizację biofilmu. Metoda ta może być pomocna np. w eradykacji drobnoustrojów zasiedlających tkanki skóry [77].

Wykorzystanie ultradźwięków o niskiej częstotliwości jest kolejnym przykładem metody fizycznej badanej pod kątem zastosowanie w eliminacji biofilmu. Potwierdzono, że ultradźwięki mogą wpływać na zwiększenie bójczego działania antybiotyków poprzez ułatwienie ich penetracji przez kolejne warstwy komórek. Zaletą tej metody jest także możliwość mechanicznego naruszenia stabilności struktury. Potwierdzono, że częstotliwość ok. 70 kHz hamuje transport substancji odżywczych i tlenu w głąb biofilmu [78].

Podsumowanie najpopularniejszych metod fizycznych badanych pod kątem zastosowania w eliminacji biofilmu przedstawia **Rycina 6.**



Rycina 6. Przykłady metod fizycznych wykorzystywanych w badaniach nad eliminacją biofilmu bakteryjnego.

3.3 Chemiczne metody zwalczania biofilmu

Chemicznych metody zwalczania biofilmu opierają się na poszukiwaniu nowych substancji o działniu przeciwdrobnoustrojowym. Obecnie wykorzystywane antybiotyki są nieskuteczne wobec zakażeń spowodowanych biofilmem a ich nadużywanie może prowadzić do selekcji szczepów opornych. Grupą związków o udowodnionej aktywności przeciwbiofilmowej są surfaktanty. Potwierdzono skuteczność dodecylosiarczanu(VI) sodu w zwalczaniu biofilmu poprzez rozbicie jego struktury i inicjowanie dyspersji. Opisane jest także wykorzystanie Tweenu 20 oraz Tritonu-X jako substancji, które powodują odczepienie się biofilmu od kolonizowanej powierzchni [79]. Do grupy surfaktantów zalicza się także tzw. biosurfaktanty, których przedstawicielem są lipopeptydy produkowane przez niektóre szczepy bakteryjne [80].

Opisywane są badania z wykorzystaniem wolnych kwasów tłuszczowych, które wykazują aktywność podobną do surfaktantów. Kwas *cis*-2-dekanowy posiada udowodnioną skuteczność w indukowaniu rozpadu struktury biofilmu. Niektóre z kwasów tłuszczowych biorą udział w regulowaniu produkcji enzymów

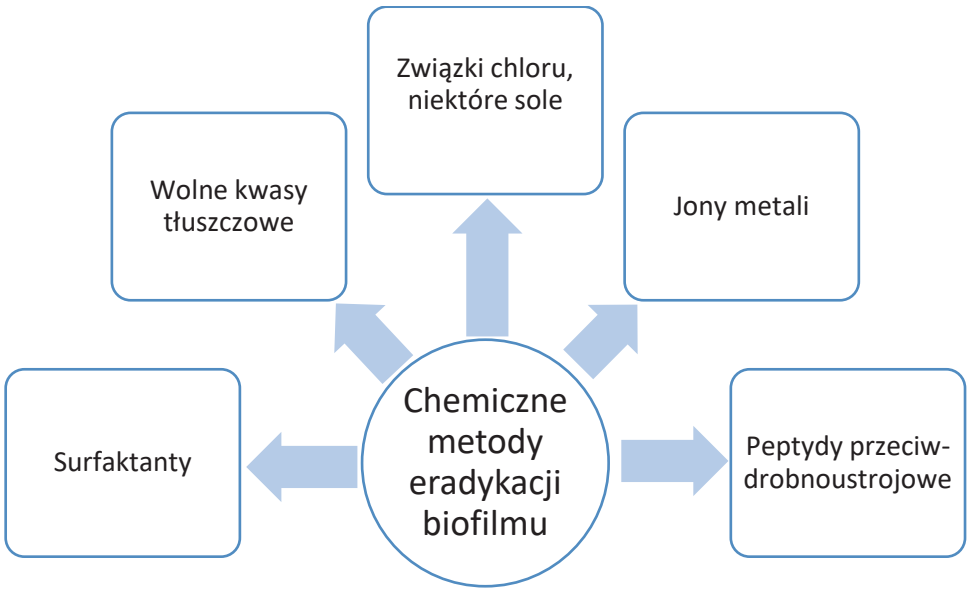
odpowiedzialnych za rozkład egzopolisacharydu. Przypuszcza się, że wybrane związki mogą oddziaływać na bardziej złożone procesy zachodzące w biofilmie, np. aktywność białek, regulacje metabolizmu [81].

Celem prac grup badawczych jest także opisanie możliwości wykorzystania związków chemicznych o charakterze biobójczym. Badane jest zastosowanie związków chloru oraz soli nieorganicznych w eliminacji biofilmu, których mechanizm działania opiera się głównie na utlenianiu elementów struktury bakteryjnej [82]. Specyficzna budowa chemiczna tych związków ogranicza ich zastosowanie przede wszystkim do dezynfekcji powierzchni. Spośród związków nieorganicznych potwierdzoną aktywność antybiofilmową posiada m.in. chlorowodorek oktenidyny, którego preparaty używana są do dezynfekcji ran [83].

Do chemicznych metod eradykacji biofilmu zalicza się także wykorzystanie jonów metali. Badania *in vitro* potwierdzają, że skuteczne w eliminacji biofilmu *P. aeruginosa* są jony miedzi lub tytanu. Przeprowadzono doświadczenia, w których testowano aktywność jonów srebra i złota [78]. Do tej pory jednak lepsze rezultaty otrzymywano dla zastosowania metali w zapobieganiu kolonizacji powierzchni przez drobnoustroje niż eliminacji biofilmu. Przykładem może być zastosowanie jonów srebra do modyfikacji powierzchni cewników urologicznych. W tym przypadku warstw srebra efektywnie chroniła powierzchnię materiału przed kolonizacją przez szczep *E. coli* [84]. Jednym z podejść jest zastosowanie jonów galu. Metal ten posiada chemiczne podobieństwo do jonów żelaza, dlatego może być wykorzystywany do hamowaniu procesów przeprowadzanych przez komórki bakteryjne, które zależne są od obecność jonów Fe^{3+}. Rozważa się także zastosowanie galu jako środka efektywnie eliminującego biofilm *P. aeruginosa* powodującego infekcje dróg oddechowych u osób z mukowiscydozą [85].

W odpowiedzi na rosnącą antybiotykooporność poszukuje się alternatywy dla obecnie stosowanych antybiotyków i chemioterapeutyków. Duże nadzieje pokłada się w zastosowaniu peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs). Jest to grupa związków głównie pochodzenia naturalnego. Obecność AMPs potwierdzono u wszystkich organizmów żywych, w tym roślin i mikroorganizmów. Ich główną rolą jest uczestniczenie we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Grupa peptydów przeciwdrobnoustrojowych obejmuje związki posiadające zwykle od 10 do 50 reszt

aminokwasowych. Mechanizm działania AMPs polega przede wszystkim na niszczeniu błony komórkowej drobnoustrojów. Badania potwierdziły szerokie spektrum ich aktywności, które obejmuje zarówno bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne oraz grzyby. Opisywane są także peptydy o działaniu przeciwwirusowym i przeciwpasożytniczym. Pośród peptydów przeciwdrobnoustrojowych wyróżnia się związki, które wykazują większą efektywność działania wobec struktury biofilmu niż w stosunku do form planktonicznych drobnoustrojów. Przykładem są np. peptyd LL-37 (ludzka katelicydyna) lub melityna (związek wyizolowany z jadu pszczoły miodnej *Apis mellifera*) [86]. Poza naturalnym peptydami przeciwdrobnoustrojowymi opracowuje się związki o charakterze syntetycznych lipopeptydów, które charakteryzuje wysoka aktywność zarówno w stosunku do pojedynczych komórek bakterii jak i biofilmu [87]. Opisuje się także wykorzystanie AMPs jako substancji zapobiegających rozwojowi wielokomórkowej struktury, m.in. w modyfikacji powierzchni biomateriałów. Dokładniejsze omówienie grupy peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz ich wykorzystanie przedstawiono w **Rozdziale 5.**



Rycina 7. Przykłady metod chemicznych stosowanych pod kątem eliminacji biofilmu.

4. Zapobieganie rozwojowi biofilmu na powierzchni materiałów medycznych

Z punktu widzenia medycyny i epidemiologii lepszym podejściem wydaje się być zapobieganie powstawaniu biofilmu bakteryjnego i tym samym uniknięcie rozwoju infekcji związanej z jego obecnością.

Szerokie zastosowanie biomateriałów w lecznictwie przyczyniło się do wyodrębnienia nowej grupy zakażeń określanych jako *biomaterials-related infections* (zakażenia związane z biomateriałami). Problem kolonizacji powierzchni implantów lub elementów sprzętu medycznego przez drobnoustroje spowodował, że wiele grup badawczych jako temat swoich badań wybrało poszukiwanie efektywnych sposobów chroniących materiały medyczne przed adhezją bakteryjną [88]. W dalszej części rozdziału przedstawione zostaną przykłady modyfikacji powierzchni biomateriałów jako metody zapobiegającej powstawaniu biofilmu.

W przypadku większości stosowanych biomateriałów strategią wpływającą na powinowactwo do kolonizacji przez drobnoustroje jest regulowanie ich składu, co wpływa na właściwości fizyczne powierzchni. Potwierdzone jest, że komórki bakteryjne łatwiej przyczepiają się do podłoży hydrofobowych o wysokiej szorstkości i porowatości. W związku z tym, że liczba możliwych kombinacji składników budujących dany biomateriał jest ograniczona (nie wszystkie spełniają wymagania dla biomateriałów do zastosowań medycznych) alternatywą są procesy modyfikacji powierzchni materiałów [89].

Opisanych jest wiele metod fizykochemicznych, które wykorzystuje się do zmiany właściwości zewnętrznej warstwy biomateriałów. Pierwszą z nich jest zastosowanie reakcji chemicznych wykorzystujących wiązanie kowalencyjne lub słabsze wiązanie elektrostatyczne. Metoda ta używana jest m.in. do immobilizacji substancji przeciwdrobnoustrojowych (antybiotyków, peptydów przeciwdrobnoustrojowych) [90].

W przypadku implantów metalowych zastosowanie znajduje elektrochemiczne utlenianie. Potwierdzono, że wytworzony w ten sposób tlenek tytanu aktywnie

oddziałuje z komórkami *S. aureus* oraz *E. coli* i może być wykorzystywany w prewencji powstawania biofilmu bakteryjnego [91].

Kolejną metodą modyfikacji powierzchni biomateriałów jest rozpylanie plazmowe. Metod ta polega na wprowadzeniu substratu modyfikującego w strumień plazmy, gdzie jest szybko podgrzewany i z dużą prędkością kierowany w stronę podłoża. Doświadczenia opisują wykorzystanie plazmy do wiązaniu substancji przeciwdrobnoustrojowych do powierzchni polietylenu [92]. Podobne zastosowanie przypisuje się zimnej plazmie (tzw. plazmie niskotemperaturowej), którą wykorzystano do modyfikacji powierzchni implantów stomatologicznych. Uzyskane wyniki nie potwierdzają całkowitej eliminacji biofilmu, ale metoda ta wciąż jest rozwijana [93].

Elektrostatyczne rozpylanie (ESD*,* ang. *electrostatic spray deposition*) polega na zastosowaniu procesu atomizacji cieczy (rozbiciu na drobne krople) przy udziale sił elektrostatycznych. Technika ESD wykorzystywana jest np. do modyfikacji powierzchni metalowych warstwą hydroksyapatytu [94].

Zmiana właściwości materiału, z jakiego wykonywane są implanty może nastąpić także poprzez zastosowanie nakładania elektroforetycznego (EPD*,* ang. *electrophoretic deposition*). Metoda ta wykorzystuje ruchy naładowanych cząsteczek w zawiesinach, które poruszają się w kierunku elektrody o przeciwnym ładunku [95].

Pośród sposobów modyfikacji powierzchni materiałów wyróżnia się także pulsacyjne nakładanie laserowe (PLD*,* ang. *pulsed laser deposition*). Jest to jedna z bardziej zaawansowanych technik, która wykorzystuje działanie lasera o wysokiej energii. Strumień lasera wspomaga łączenie się substratu, który stanowi czynnik modyfikujący, z powierzchnią materiału. Przypuszcza się, że zastosowanie lasera może być pomocne w zmianach właściwości fizycznych tworzyw polimerowych [96].

Modyfikacja biomateriałów może odbywać się także poprzez wprowadzenie znanej i opisanej substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej do jego składu. Metoda ta jest wykorzystywana przede wszystkim w przypadku polimerów biodegradowalnych i projektowaniu systemów dostarczania substancji leczniczych o czym wspomniano we wcześniejszych rozdziałach.

W projektowaniu powłok, które mają charakteryzować się działaniem zapobiegającym adhezji bakteryjnej, a tym samym rozwojowi biofilmu wyróżnić można 3 strategie:

- Wytworzenie powłok, które uwalniać będą substancję przeciwdrobnoustrojową do otoczenia;
- Opracowywanie powłok, które powodować będą eliminację mikroorganizmów w drodze bezpośredniego kontaktu;
- Wykorzystanie warstw o właściwościach odpychających komórki bakteryjne [97].

Modyfikacje biomateriałów, które pozwalają na uwalnianie substancji aktywnej przeciwdrobnoustrojowo mogą działać dwukierunkowo: eliminować komórki, które rozpoczęły proces formowania biofilmu oraz oddziaływać z komórkami, które przebywają w formie wolnopływającej. Antybiotyk lub inny związek przeciwdrobnoustrojowy może być uwalniany z biomateriału w odpowiedzi na kontakt ze środowiskiem wodnym, poprzez erozję lub degradację wiązań chemicznych. Udowodnione jest, że najbardziej obiecującymi biomateriałami do opracowywania systemów uwalniania substancji przeciwdrobnoustrojowych są PMMA, kwas poliakrylowy (PAA), hydroksyapatyt, PU, hydrożele [98].

Tabela 5. Przykłady związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, które stosowane są w celu zapobiegania rozwojowi biofilmu poprzez uwalnianie ich do otoczenia [99].

Antybiotyki konwencjonalne	Gentamycyna, ciprofloksacyna, ampicilina, wankomycyna
Peptydy przeciwdrobnoustrojowe	Magaininy, katelicydyny
Metale	Srebro, miedź, cynk, gal
Enzymy	Lizozym
Związki organiczne	Oktenidyna, chlorheksydyna, sole amoniowe

Zastosowanie mają także powłoki o działaniu bakteriobójczym, których funkcjonalność polega na eliminacji mikroorganizmów w wyniku ich kontaktu z substancją toksyczną znajdującą się na powierzchni materiału medycznego. Strategia tego typu modyfikacji opiera się na immobilizacji związku o aktywności przeciwdrobnoustrojowej do podłoża

wykorzystując wiązania kowalencyjne. Mechanizm działania powłok opiera się na kontaktowym oddziaływaniu substancji z błoną komórkową bakterii. Udowodnione jest, że największą efektywność wykazują modyfikacje wykorzystujące związki kationowe, np. peptydy przeciwdrobnoustrojowe [100].

Trzecia strategia opisująca metody zapobiegania powstawania biofilmu bakteryjnego również dotyczy wczesnej fazy jego formowania, czyli etapu adhezji. Opracowuje się możliwości modyfikacji powierzchni biomateriałów tak, aby zmienić ich właściwości fizyczne. Celem zmian jest stworzenie niekorzystnych warunków dla komórek bakteryjnych, odpychanie ich oraz ograniczenie adsorpcji białek organizmu, co także sprzyja rozwojowi biofilmu [90].

5. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs)

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe uważane są za obiecującą alternatywę dla współcześnie stosowanych antybiotyków i chemioterapeutyków. Ze względu na nadużywanie antybiotykoterapii oraz związane z tym powstawanie opornych szczepów bakterii AMPs stały się jednym z głównych kierunków badań. Potwierdzone jest, że mikroorganizmy wolno rozwijają czynniki oporności na ich aktywność. Dodatkową cechą, która wpływa na duże zainteresowanie AMPs jest ich bezpieczeństwo dla komórek ludzkich. Celowane działanie peptydów związane jest z różną budową błony komórkowej drobnoustrojów i komórek ludzkich. Obecność kwasu tejchojowego w ścianie komórkowej bakterii Gram-dodatnich oraz lipopolisacharydu u bakterii Gram-ujemnych zapewnia ujemny ładunek, co powoduje, że dodatnio naładowane AMPs wykazują powinowactwo do drobnoustrojów zamiast komórek ludzkich. Dużą zaletą jest także możliwość wielokierunkowego zastosowania peptydów. Ich aktywność obejmuje działanie przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe lub immunomodulujące [101].

Jak wspomniano we wcześniejszym rozdziale (**Podrozdział 3.3**) występowanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych jest szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Źródła podają, że do tej pory opisano kilka tysięcy sekwencji o potencjalnej lub już udowodnionej aktywności przeciwbakteryjnej. Obiecujące wyniki badań prowadzonych z udziałem

AMPs pozwoliły na dopuszczenie ich do badań klinicznych. Przykładem jest pexiganan (MSI-78), peptyd wyizolowany ze skóry żaby afrykańskiej *Xenopus laevis*, który badano pod kątem możliwości zastosowania w leczeniu stopy cukrzycowej. Innym z AMPs, który opisywano w ramach badań klinicznych jest omiganan (MBI-226), syntetyczny analog indolicydyny wyizolowanej z ziarnistości neutrofili bydlęcych. Związek ten testowano pod kątem skuteczności w terapii trądziku różowatego. Mimo wysiłku wielu grup badawczych nie udało się opracować związku, który pozytywnie przeszedł wszystkie etapy badań klinicznych. Ze względu na wiele pozytywnych aspektów, jakimi charakteryzują się peptydy przeciwdrobnoustrojowe nadal rozwija się temat możliwości ich zastosowania [102].

5.1 Klasyfikacja

Grupa peptydów przeciwdrobnoustrojowych obejmuje związki o różnej strukturze, różnej długości łańcucha aminokwasowego oraz spektrum działania. Poniżej zostaną opisane 2 główne sposoby klasyfikacji AMPs:

- Podział ze względu na pochodzenie;
- Podział ze względu na strukturę.

5.1.1 Podział AMPs ze względu na pochodzenie

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe stanowią element odporności organizmów żywych. Wiele ze związków produkowanych jest przez szczepy bakteryjne. W przypadku drobnoustrojów AMPs wykorzystywane są do eliminacji innych komórek z otoczenia na zasadzie konkurencji, np. w warunkach niedostatecznej ilości składników odżywczych. Grupą peptydów przeciwdrobnoustrojowych produkowanych przez bakterie są bakteriocyny. Wyróżnia je wąskie spektrum aktywności w porównaniu do innych AMPs, obejmujące jedynie pojedyncze szczepy. Udowodniono, że szczepy bakterii Gram-ujemnych są zazwyczaj odporne na działanie bakteriocyn produkowanych przez szczepy Gram-dodatnich [103].

Kolejną grupa peptydów przeciwdrobnoustrojowych są związki wytwarzane przez organizmy roślinne. Rośliny produkują AMPs w odpowiedzi na infekcje wywołane obecnością bakterii, wirusów lub grzybów i poza aktywnością przeciwdrobnoustrojową mogą działać antyoksydacyjnie lub hamować niektóre enzymy. Peptydy izolowane z roślin w większości należą do związków bogatych w reszty cysteiny. Przykładem AMPs wytwarzanych przez organizmy roślinne są tioniny, snakiny i defensyny [104].

Spośród peptydów przeciwdrobnoustrojowych największą grupę stanowią związki wytwarzane w organizmach zwierząt. Ich obecność potwierdzono w wielu komórkach, m.in. komponentach krwi (makrofagi, limfocyty, neutrofile), komórkach nabłonka błony śluzowej czy płynach ustrojowych (np. płynie łzowym). AMPs produkowane przez zwierzęta wykazują szerokie spektrum działania i wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową [105]. Katelicydyny należą do jednej z najlepiej opisanych grup peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Obecne są m.in. w organizmach ssaków, ryb, płazów. Najbardziej znanym reprezentantem katelicydyn jest peptyd LL-37. Jego funkcja polega na regulowaniu odpowiedzi zapalnej, wspomaganiu gojenia się ran oraz działaniu przeciwdrobnoustrojowym. W organizmie człowieka AMPs produkowane są głównie przez komórki tkanek skóry, dróg oddechowych, płuc lub jelit. Do grupy ludzkich peptydów przeciwdrobnoustrojowych zalicza się głównie defensyny i katelicydyny (peptydy kationowe, często bogate w reszty cysteiny) oraz histatyny (peptydy obecne głównie w ślinie, bogate w reszty histydyny) [106]. Doniesienia literaturowe wymieniają niedobór defensyn i katelicydyn jako jeden z głównych czynników powstawania atopowego zapalenia skóry oraz choroby Leśniowskiego-Crohna [107].

Opisane powyżej AMPs należą do związków występujących naturalnie. Nowe kierunki badania nad peptydami coraz częściej obejmują prace nad ich syntetycznymi analogami. Do grupy peptydów przeciwdrobnoustrojowych zalicza się także syntetyczne lipopeptydy będące połączeniem sekwencji aminokwasów z resztą kwasu tłuszczowego. Stosunkowo łatwe otrzymywanie tych związków oraz wysoka aktywność w stosunku do bakterii powodują, że jest to jedno z głównych zagadnień rozwijanych przez grupy badawcze zajmujące się projektowaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych [108].

5.1.2 Podział ze względu na budowę chemiczną

W opisywaniu aktywności oraz projektowaniu peptydów przeciwdrobnoustrojowych ważne jest określenie ich struktury drugorzędowej (ułożenia przestrzennego łańcuchów). Pozwala to także na zrozumienie zależności między sekwencją aminokwasów a formą jaką przyjmują. W oparciu o strukturę drugorzędową AMPs zostały podzielone na związki tworzące α-helisy, β-kartki, pętle lub formy wydłużone, których nie można zaklasyfikować do pierwszej lub drugiej grupy [109].

Peptydy o budowie α-helisy, np. magaininy, należą do najlepiej poznanych związków. Dużą grupę stanowią AMPs o charakterze kationowym, choć wyróżnia się także peptydy posiadające właściwości amfipatyczne lub anionowe. Biorąc pod uwagę ich potencjalne zastosowanie jako substancje lecznicze korzystne jest otrzymywanie peptydów kationowych, ponieważ ich działanie jest bardziej selektywne w stosunku do drobnoustrojów. Udowodnione jest, że helikalność AMPs wpływa na ich aktywność. Cecha ta może być modulowana dzięki substytucji odpowiednich aminokwasów.

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe posiadające budowę β-kartki stabilizowane są przez wiązania disiarczkowe. Dużą grupę stanowią związki o budowie cyklicznej, która może zostać osiągnięta także poprzez cyklizację szkieletu peptydowego. AMPs o budowie β-kartki ze względu na sztywną strukturę nie ulegają silnym zmianom konformacyjnym w trakcie oddziaływania z błoną komórkową bakterii. Najlepiej opisanymi AMPs należącymi do tej grupy są defensyny.

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe, których nie można zaklasyfikować do żadnej z opisanych powyżej grup charakteryzują się brakiem struktury drugorzędowej i często posiadają w sekwencji wiele reszt danego aminokwasu, np. tryptofanu lub proliny. Przykładem takiego związku jest indolicydyna produkowana przez bydlęce leukocyty [102, 110].

5.2 Mechanizmy działania

Mechanizm działania większości peptydów przeciwdrobnoustrojowych opiera się na niszczeniu błony komórkowej mikroorganizmów, przenikaniu przez nią oraz wewnątrzkomórkowym oddziaływaniu z określonymi celami w komórce. Ważną rolę w procesie przenikania peptydów w głąb błony komórkowej odgrywają siły elektrostatyczne, które powstają pomiędzy AMPs o dodatnim ładunku a ujemnie naładowaną powierzchnią mikroorganizmów. Większość peptydów posiada w swojej strukturze region hydrofobowy, który ułatwia cząsteczkom związków wejście w błonę komórkową. Proces ten powoduje przerwanie jej ciągłości, utworzenie porów i uwolnienie cytoplazmy z wnętrza komórki.

Opisuje się 3 metody oddziaływań AMPs z powierzchnią błony komórkowej drobnoustrojów:

- Model „klepek beczki", gdzie cząsteczki peptydu wchodzą prostopadle w błonę komórkową;
- Model „dywanowy", gdzie AMPs pokrywają fragment błony, tak aby część hydrofobowa skierowana była do wewnątrz;
- Model „toroidalny", gdzie pory tworzone są podobnie jak w modelu „klepek beczki". Część hydrofobowa peptydu pozostaje związana z fosfolipidami, co powoduje jej zakrzywienie [101].

Peptydy mogą także oddziaływać z błoną komórkową na zasadzie aktywności charakterystycznej dla detergentów. Dochodzi do rozbicia lipidów błony oraz utworzenia miceli składających się z cząsteczek substancji przeciwdrobnoustrojowej oraz lipidów. Proces ten powoduje rozluźnienie struktury błony komórkowej [109].

Niektóre AMPs oddziałują ze strukturami wewnątrzkomórkowymi lub wpływają na procesy zachodzące w komórce. Możliwe jest, że związki docierają do wnętrza cytoplazmy bez ingerencji w ciągłość błony komórkowej wykorzystując białkowe transportery. Przykładem AMPs o aktywności wewnątrzkomórkowej jest indolicydyna, której mechanizm działania opiera się na wiązaniu DNA i hamowaniu syntezy białek.

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe mogą także blokować enzymy bakteryjne lub wykazywać złożoną aktywność. Związkiem o podwójnym mechanizmie działania jest seminalplazmina hamująca syntezę RNA jednocześnie aktywując procesy autodestrukcji komórki.

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa peptydów zależy także od ich działania na układ odpornościowy. Badania opisują, że AMPs działają immunomodulująco poprzez stymulowanie hemotaksji oraz różnicowania komórek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej [111].

5.3 AMPs o aktywności przeciwbiofilmowej

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe dzięki aktywności wykazywanej przeciwko mikroorganizmom uznawane są za związki, które mogą okazać się skuteczne w eradykacji biofilmu bakteryjnego. Potwierdzone jest, że wielokomórkowa struktura jest nawet 1000 razy bardziej oporna na działanie antybiotyków konwencjonalnych. W związku z tym pojawiła się konieczność poszukiwania nowych substancji aktywnych.

W ostatnim czasie dużo uwagi poświęca się tematowi terapii infekcji bakteryjnych związanych z biofilmem. Badania pozwoliły na wyodrębnienie osobnej grupy AMPs o aktywności przeciwbiofilmowej obejmującej zarówno eradykację struktury jak i zapobieganie jej tworzeniu. Peptydy te mogą także stanowić wsparcie w zwalczaniu biofilmu poprzez działanie synergistyczne z antybiotykami. Mechanizm działania przeciwbiofimowego peptydów przeciwdrobnoustrojowych polega przede wszystkim na zaburzaniu stabilności struktury oraz oddziaływaniu na procesy wewnątrzkomórkowe związane z odpowiedzią na stres komórkowy, który jest jednym z czynników inicjujących formowanie biofilmu. Obecność czynnika szkodliwego w środowisku uaktywnia produkcję cząsteczek sygnałowych, które zapewniają komórkom możliwość przetrwania. Przykładem peptydów o aktywności skierowanej w strukturę biofilmu jest DJK-5 oraz DJK-8, które degradują cząsteczki odpowiedzialne za przystosowanie się drobnoustrojów do niekorzystnych warunków. Udowodnioną aktywność w eradykacji wielokomórkowej struktury posiada laktoferryna, której mechanizm działania polega na

wiązaniu jonów żelaza niezbędnych w procesie formowania biofilmu. Kolajnymi przykładami AMPs, które okazały się efektywne w zwalczaniu zorganizowanej formy bytowania drobnoustrojów są LL-37 oraz jego fragmenty, baktenecyna oraz melittyna [112].

Przeciwbiofilmowa aktywność peptydów wiąże się także z koniecznością rozwiązania problemów dotyczących toksyczności związków. W przypadku peptydów, których efektem działania jest dyspersja komórek zagrożeniem jest możliwość kolonizacji sąsiednich tkanek przez uwolnione drobnoustroje [113].

AMPs charakteryzujące się efektywnością w zwalczaniu biofilmu często wykazują także aktywność w zapobieganiu adhezji bakteryjnej. Prewencja rozwoju infekcji, także tych związanych z wykorzystaniem biomateriałów, jest jednym z kierunków badań prowadzonych przez ośrodki naukowe. Jednym z nowych podejść jest wykorzystanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych do modyfikacji powierzchni materiałów medycznych.

5.4 Zastosowania AMPs w modyfikacji powierzchni materiałów medycznych oraz nowe perspektywy

Wykorzystanie urządzeń medycznych oraz implantów w lecznictwie stało się jednym z głównych elementów nowoczesnej medycyny. Postępujący rozwój w dziedzinie biomateriałów oraz ich rozpowszechnienie spowodowały wyodrębnienie nowej grupy zakażeń bakteryjnych, których patogeneza ma związek z zastosowaniem materiału medycznego.

Jednym z głównych czynników ryzyka dla rozwinięcia się infekcji bakteryjnej jest miejscowy spadek efektywności działania układu odpornościowego spowodowany obecnością implantu. Druga przyczyna powstawania zakażeń związana jest ze zdolnością drobnoustrojów do przyczepiania się do powierzchni ciała obcego, co zapoczątkowuje proces formowania się biofilmu [114].

Jednym z obiecujących kierunków badań dotyczących zapobiegania tzw. infekcjom „odbiomateriałowym” jest wykorzystanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych.

Literatura opisuje kilka strategii zastosowanie AMPs w prewencji zakażeń bakteryjnych związanych z obecnością ciała obcego w organizmie. Strategie te opierają się na założeniach opisanych w **Rozdziale 4.** i dotyczą wytwarzania powierzchni o charakterze bakteriobójczym oraz systemów uwalniających peptyd do otoczenia.

Otrzymywanie powierzchni o charakterze bakteriobójczym możliwe jest przede wszystkim dzięki wykorzystaniu reakcji chemicznych, za pomocą których związek o aktywności przeciwdrobnoustrojowej immobilizowany jest do podłoża. Przykładem takiego wykorzystania AMPs są powierzchnie hydrożelowe z przyłączonym peptydem CysHHC10. Doświadczenia przeprowadzana z wykorzystaniem powłoki potwierdziły jej skuteczność w stosunku do szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis*. Peptydy mogą być także wiązane z powierzchnią poprzez szczotki polimerowe. Jest to szczególny rodzaj modyfikacji powierzchni biomateriału polegający na wytworzeniu długich, cienkich włókien polimerowych. Sposób wiązania AMPs do powierzchni za pomocą szczotek okazał się efektywny w zapobieganiu kolonizacji cewników urologicznych [115].

Dobrze opisanym przykładem są doświadczenia wykorzystujące peptyd meliminę do immobilizowania na powierzchni soczewek kontaktowych. Obecność cząsteczek peptydu na powierzchni materiału spowodowała eliminację drobnoustrojów odpowiedzialnych za infekcje oka, w tym eradykację szczepu *P. aeruginosa.* Ponadto, potwierdzono bezpieczeństwo tego typu połączenia dla tkanek oka [116]. Wadą wykorzystywania procesu wytwarzania powłok przeciwdrobnoustrojowych jest ich późniejsze pokrywanie przez białka, komórki krwi oraz martwe komórki drobnoustrojów, co sprawia, że peptydy przestają być „widoczne" dla bakterii [115].

Ciekawą formą modyfikacji pozwalającą wykorzystać AMPs są systemy pozwalające na ich uwalnianie z powierzchni. W tym celu stosuje się np. powłoki hydrożelowe lub nanorurki z tlenku tytanu. Modyfikacja polegająca na zastosowaniu mikroporowatego fosforanu(V) wapnia jako nośnika uwalniającego peptyd Tet213 z powierzchni stopów tytanu efektywnie hamowała wzrost szczepu *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Może także działać stymulująco na procesy regeneracji kości [117].

Wraz z postępem technologicznym pojawiły się nowe możliwości wykorzystania peptydów przeciwdrobnoustrojowych w zapobieganiu infekcjom związanym

z zastosowaniem biomateriałów. Popularną metodą produkcji implantów jest druk 3D. Zaletą wykorzystania tego procesu jest możliwość personalizacji wszczepu. Badania potwierdziły, że możliwe jest stosowanie AMPs jako dodatków do materiału używanego w druku 3D. W celu zwiększenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej peptydów związki używane są w formie nanocząstek, co ma na celu zwiększenie stabilności substancji oraz zmniejszenie ich toksyczności [114]. Nowoczesną metodą wytwarzania biomateriałów jest tzw. elektroprzędzenie (ang. *electrospinning*). Peptydy mogą być inkorporowane do polimerów wykorzystywanych w produkcji nanowłókien budujących materiał [118].

Inżynieria materiałów medycznych jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin. Możliwe, że wraz z postępem dotyczącym projektowania biomateriałów powstaną także nowe możliwości zastosowania peptydów przeciwdrobnoustrojowych, które pozwolą na zwiększenie ich efektywności.

II. CEL PRACY

Współcześnie stosowane biomateriały są nieodłącznym elementem terapii i diagnostyki medycznej. Ze względu na kontakt ze środowiskiem wewnętrznym organizmu niezbędne jest zapewnienie bezpieczeństwa ich stosowania. Udowodnione jest, że wiele materiałów medycznych wykazuje powinowactwo do kolonizacji przez drobnoustroje co niesie ryzyko rozwoju infekcji, również tych związanych z biofilmem.

Celem niniejszej pracy było zbadanie możliwości zastosowania wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych w modyfikacji powierzchni biomateriałów oraz zbadanie skuteczności połączenia biomateriał – peptyd w zapobieganiu kolonizacji powierzchni przez bakterie. Do przeprowadzenia doświadczeń wybrano komercyjnie dostępne wyroby medyczne: hydrożelowe soczewki kontaktowe oraz cewniki silikonowe-lateksowe. Skuteczność modyfikacji sprawdzano wykorzystując szczepy referencyjne bakterii, które stanowią najczęstsze czynniki etiologiczne infekcji związanych z wykorzystaniem biomateriałów. Zastosowanie krótkich, syntetycznych lipopeptydów w projektowaniu powierzchni o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych nie jest szeroko opisywane w literaturze, co wpływa pozytywnie na innowacyjność prowadzonych prac. Ich wykorzystanie w połączeniu z wybranymi metodami modyfikacji także posiada charakter nowatorski.

Doświadczenia przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy były skupione na zagadnieniu adhezji bakteryjnej jako najważniejszego etapu w powstawaniu biofilmu. Udowodnione jest, że struktura biofilmu jest trudna w eradykacji, co często powoduje konieczność usunięcia implantu, reoperacji pacjenta lub długotrwałą antybiotykoterapię. Celem badań było opracowanie metody, która mogłaby być potencjalnie skuteczna w zapobieganiu adhezji bakteryjnej do powierzchni materiałów medycznych, a tym samym metody, która zapobiegałby rozwojowi biofilmu bakteryjnego. Ponadto, w trakcie prowadzenia doświadczeń obrano za cel optymalizację wykorzystania badanych związków. W przypadku soczewek kontaktowych wzięto także pod uwagę kwestie ekonomiczne związane z koniecznością ich zakupu. Praca prowadzona była w taki sposób, aby jej kolejne etapy prowadziły do wyłonienia

najbardziej aktywnych peptydów. Poniżej znajduje się ramowy plan prowadzonych badań uwzględniający cele cząstkowe.

Weryfikacja głównego celu pracy została przeprowadzona w następujących etapach:

1) Wybranie grupy peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej spośród związków syntezowanych w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej GUMed;
2) Wykonanie podstawowych testów mikrobiologicznych potwierdzających wysoką aktywność peptydów:
    - Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów (MIC);
    - Oznaczenie minimalnego stężenia zapobiegającego powstawaniu biofilmu bakteryjnego;
    - Oznaczenie minimalnego stężenia eliminującego biofilm (MBEC).
3) Określenie toksyczności AMPs w stosunku do ludzkich erytrocytów (test hemolizy);
4) Modyfikacje powierzchni wyrobów medycznych z wykorzystaniem związków o najwyższej aktywności i charakteryzujących się niską toksycznością:
    - Modyfikacja poprzez inkubację;
    - Modyfikacja poprzez wiązanie chemiczne.
5) Oznaczenie toksyczności AMPs na podstawie testu wychwytu czerwieni obojętnej na linii komórkowej mysich fibroblastów BALB/c 3T3 clone A31;
6) Potwierdzenie związana się peptydów z powierzchnią biomateriałów:
    - Próba określenia stopnia związania i uwalniania związków z powierzchni materiałów;
    - Spektroskopia ATR-FTIR (spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera).
7) Testy mikrobiologiczne materiałów o zmodyfikowanej powierzchni;

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Odczynniki, materiały i aparatura – synteza, analiza i oczyszczanie peptydów

1.1 Odczynniki

Acetaldehyd (*Sigma-Aldrich, Niemcy*)

Acetonitryl (*Sigma-Aldrich, Niemcy*)

Chloranil (*Sigma-Aldrich, Niemcy*)

Ciekły azot (*Air Products, Polska*)

Dichlorometan (*POCH SA, Polska*)

Etanol (*Sigma Aldrich, USA*)

Eter dietylowy (*POCH SA, Polska*)

Kwas laurynowy (*Sigma-Aldrich, Niemcy*)

Kwas mirystynowy (*Sigma-Aldrich, Niemcy*)

Kwas palmitynowy (*Sigma-Aldrich, Niemcy*)

Kwas trifluorooctowy (*Iris Biotech GmbH, Niemcy*)

L-aminokwasy z osłoną Fmoc (*Orpegen, Niemcy*)

Metanol (*POCH SA, Polska*)

DIC (*Iris Biotech GmbH, Niemcy*)

DIPEA (*Iris Biotech GmbH, Niemcy*)

Oxyma Pure (*Iris Biotech GmbH, Niemcy*)

Piperydyna (*Sigma-Aldrich, Niemcy*)

TIS (*Iris Biotech GmbH, Niemcy*)

Woda demineralizowana (*Hydrolab, Polska*)

Żywica Rink Amide AM Resin (100-200 mesh) 0,4-0,74 mmol/g (*Sigma-Aldrich, Niemcy*)

1.2 Materiały

Fiolki szklane *(Anchem, Polska)*

Kapilary szklane *(Medlab Products, Polska)*

Kolumna analityczna Phenomenex Luna C18, 4,6 × 150 mm, 100 Å

(*Phenomenex Companies, USA*)

Kolumna analityczna Agilent, ZORBAX Extend C18, 4,6 × 50 mm, 100 Å

(*Agilent, USA*)

Kolumna semipreparatywna Phenomenex Luna C18, 10 × 250 mm, 100 Å

(*Phenomenex Companies, USA*)

Końcówki do pipet automatycznych

(PZ – HTL, Polska; VWR International, Polska; Eppendorf, Niemcy)

Naczynia szklane ze spiekiem przeznaczone do SPPS

(Peptideweb.com, Polska)

Strzykawki szklane do HPLC *(J. S. Hamilton*, *Sigma-Aldrich, Niemcy)*

1.3 Aparatura

Liofilizator Christ Alpha 2-4 Plus (*Christ, Niemcy*)

Łaźnia ultradźwiękowa CD4800

Mikrofalowy syntezator peptydów Liberty Blue *(CEM, USA)*

Pipety automatyczne Discovery Comfort (*PZ HTL SA, Polska*)

Termostat do kolumn Shimadzu CTO-10ASVP (*Shimadzu Corporation, Japonia*)

Waga analityczna AS 60/220/C/2 (*Radwag, Polska*)

Wysokosprawny chromatograf cieczowy HPLC ECOM (*Ecom, Czechy*)

z oprogramowaniem do akwizycji danych LP-Chrom *(Lipopharm.pl, Polska)*

Wysokosprawny chromatograf cieczowy Waters Alliance z detektorem QDA i PDA

z oprogramowaniem Empower *(Waters, USA)*

Wysokosprawny chromatograf cieczowy HPLC Varian z detektorem UV – VIS

z oprogramowaniem do akwizycji danych Galaxy (*Varian, USA*)

Wytrząsarka prętowa LP015RSk (*Kamush, Polska*)

2. Odczynniki, materiały i aparatura- modyfikacje powierzchni i mikrobiologia

2.1 Odczynniki

Bufor fosforanowy pH 7,4 (*AppliChem GmbH, Niemcy*)

Bufor octanowy pH 5 (*Sigma-Aldrich, Niemcy*)

Chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropylo)karbodiimidu (*Sigma-Aldrich, Niemcy*)

Dimetylosulfotlenek (*Sigma-Aldrich, Niemcy*)

Podłoże DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium (*Gibco, USA*)

Podłoże płynne Mueller Hinton II (*Becton Dickinson, Francja*)

Podłoże stałe Mueller Hinton II (*Becton Dickinson, Francja*)

Polimyksyna B *(Fluka, USA)*

Resazuryna (*Sigma-Aldrich, Niemcy*)

SDS (*Sigma-Aldrich, Niemcy*)

Triton-X 100 (*Merck Millipore, USA*)

Woda demineralizowana (*Hydrolab, Polska*)

2.2 Materiały

Cewniki silikonowe-lateksowe (*Unomedical, USA*)

Ezy jałowe, jednorazowe *(Alchem, Polska)*

Końcówki do pipet automatycznych *(PZ – HTL, Polska; VWR International, Polska; Eppendorf, Niemcy)*

Pęsety jednorazowe *(Bionovo, Polska)*

Płytki 24-dołkowe z dnem płaskim *(GenoPlast Biochemicals, Polska)*

Płytki 96-dołkowe z dnem okrągłym *(Medlab Products, Polska)*

Płytki 96-dołkowe z dnem płaskim *(Medlab Products, Polska)*

Probówki polistyrenowe do hodowli mikroorganizmów *(Medlab Products, Polska)*

Probówki typu „eppendorf" 2 ml, 5 ml

Soczewki kontaktowe jednodniowe (*Johnson & Johnson Acuvue 1-Day Moist, USA*)

Szalki Petriego śr. 90 mm (*Margomed, Polska*)

Szczepy wzorcowe drobnoustrojów *(Polska Kolekcja Mikroorganizmów PAN, Wrocław, Polska)*:

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Staphylococcus epidermidis PCM 2532

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

2.3 Aparatura

Autoklaw mikrofalowy *(Enbiojet, Enbio, Polska)*

Autoklaw niskociśnieniowy TAU CLAVE 3000 *(Tau Steril, Włochy)*

Autoklaw niskociśnieniowy Tuttnauer 2540L *(Tuttnauer, USA)*

Inkubator z wytrząsaniem Benchmark Incu – Shaker 10LR *(Benchmark Scientific, USA)*

Inkubator z wytrząsaniem IKA KS400 i Control *(IKA, Niemcy)*

Komora laminarna Alpina *(Alpina, Polska)*

Łaźnia ultradźwiękowa CD4800

Mieszadło magnetyczne, jednostanowiskowe Heidolph MR3001 *(Heidolph, Niemcy)*

Pipety automatyczne Discovery Comfort/Eppendorf Research plus *(PZ HTL SA, Polska/Eppendorf, Niemcy)*

Spektrofotometr Multiskan Go + SkanIt Software 3.2 *(Thermo Fisher Scientific, USA*)

Spektrometr Spectrum Two Spectrometer z przystawką ATR (*PerkinElmer, USA*)

Waga laboratoryjna WTB200 *(Radwag, Polska)*

Waga analityczna AS60/220/C/2 *(Radwag, Polska)*

Wytrząsarka orbitalna Biosan PSU – 10i *(Biosan, Litwa)*

Wytrząsarka wibracyjna Multi-Vortexer V-32 *(Grant Instruments, Wielka Brytania)*

Zamrażarka niskotemperaturowa Uni Freez U80 *(Daihan Scientific, Korea Południowa)*

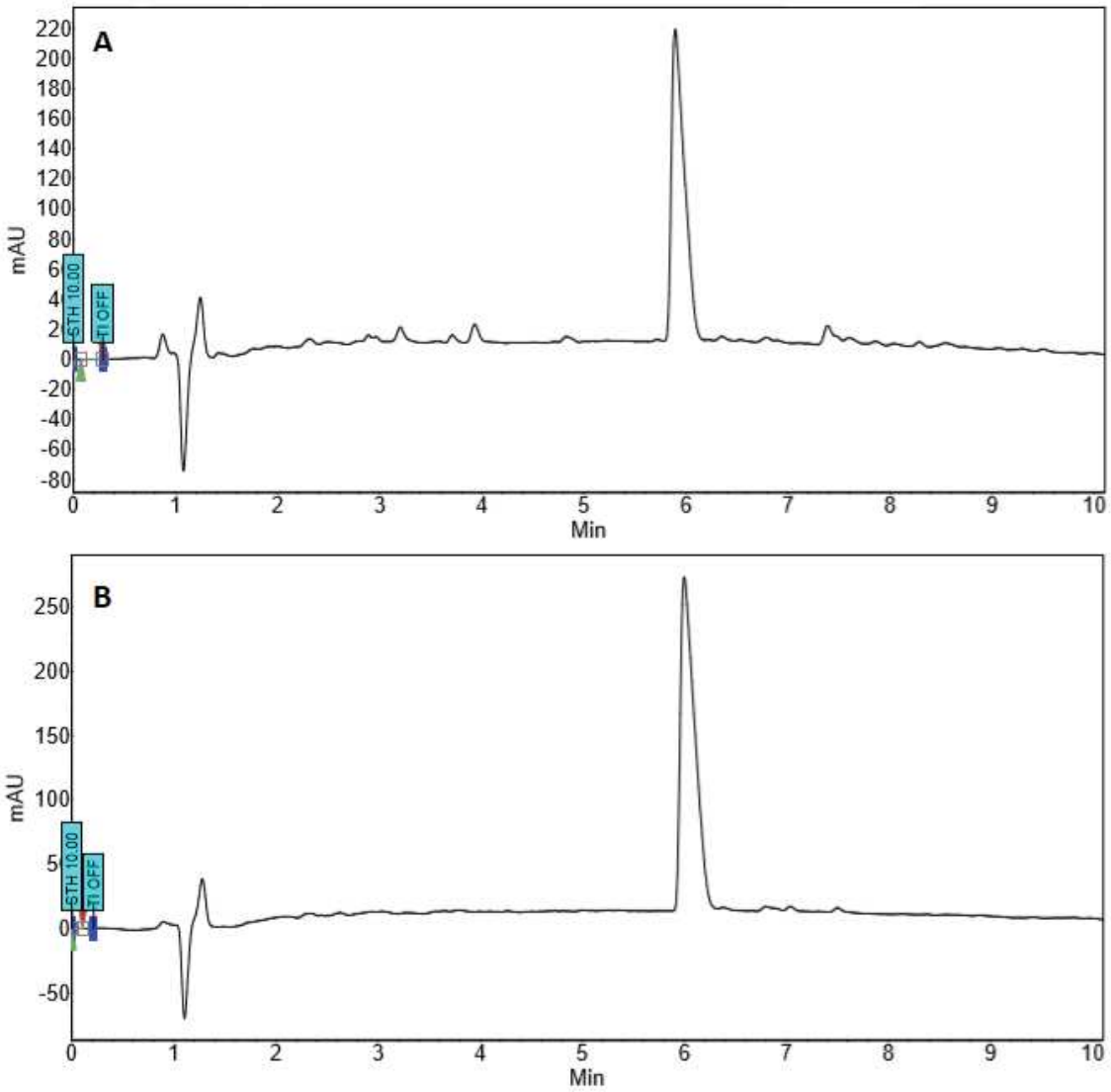
3. Synteza i oczyszczanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Syntezę grupy peptydów wybranych do badań w ramach rozprawy doktorskiej (**Tabela 6.**) przeprowadzałam zgodnie z chemią Fmoc z wykorzystaniem nośnika stałego na bazie polistyrenu sieciowanego diwinylobenzenem (nośnik AM RAM o osadzeniu 0,67 mmol/g) zgodnie z protokołem opisanym poniżej [119]. Proces syntezy przeprowadzałam manualnie w specjalnie przeznaczonych do tego naczyniach ze spiekiem, a w przypadku citropiny 1.1 wykorzystałam syntezator mikrofalowy. Odszczepienie grupy Fmoc odbywało się poprzez zastosowanie 20% (v/v) roztworu piperydyny w DMF. Proces przeprowadzałam przez 15 min. Etap acylowania (przyłączenia aminokwasów z grupami ochronnymi) wykonywałam w środowisku mieszaniny DMF/DCM wykorzystując odczynniki sprzęgające: DIC oraz Oxyma Pure. Acylowanie poszczególnych aminokwasów przeprowadzałam przez 1,5 h. Każdy etap wykonywanej syntezy poprzedzało przemywanie żywicy roztworami DMF i DMF/DCM. Prawidłowość przeprowadzonego acylowania kontrolowałam wykonując test chloranilowy. Powyższe czynności powtarzałam do momentu uzyskania pożądanej sekwencji aminokwasowej. Peptydy odszczepiałam od żywicy za pomocą mieszaniny TFA, TIS oraz wody (95:2,5:2,5 v/v). Po odsączeniu nośnika surowy peptyd wytrącałam z roztworu schłodzonym eterem dietylowym. Wytrącony osad oddzielałam od roztworu przez wirowanie, a następnie rozpuszczałam w wodzie i poddawałam liofilizacji. W przypadku problemów z rozpuszczeniem surowych peptydów stosowałam dodatek kwasu octowego.

Surowe peptydy po liofilizacji poddawałam analizie z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC). Zastosowałam metodę gradientową 30–80% stężenia fazy B (acetonitryl z dodatkiem 0,1% TFA) w fazie A (woda z dodatkiem 0,1% TFA) przy przepływie 2 ml/min. Stosowałam kolumnę Phenomenex Luna C18 (4,6 × 150 mm, 100 Å) oraz detekcję przy długości fali 214 nm.

Peptydy oczyszczałam wykorzystując preparatywną chromatografię HPLC na kolumnie Phenomenex Luna C18 (10 × 250 mm, 100 Å) przy przepływie 5 ml/min oraz detekcji przy długości fali 214 nm.

Oczyszczone frakcje peptydów poddawałam ponownie analizom HPLC a ich tożsamość potwierdzałam wykorzystując spektrometrię mas (spektrometr Waters LCQ z metodą jonizacji ESI – MS). Oczyszczone peptydy liofilizowałam wykorzystując liofilizator Christ Alpha 2-4 Plus. Związki, które wykorzystałam w badanich posiadały czystość min. 95%. Uzyskane wartości stosunku masy do ładunku (*m/z*), jonów pseudomolekularnych były zgodne z wartościami obliczonymi (**Tabela 6**). Przykładowe chromatogramy dla związku surowego oraz oczyszczonego zostały zamieszczone na **Rycinie 8.**



*Rycina 8. Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy peptydu Palm-KK-NH_2 (**A** – peptyd surowy, **B** – peptyd oczyszczony). Metoda 30–80%, 2 ml, 10 min, λ = 214 nm. Kolumna Phenomenex Luna 4,6 × 150 mm, 100 Å.*

Tabela 6. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe wykorzystane w badaniach.

Nazwa peptydu	Sekwencja	Śr. masa cząsteczkowa	Masa monoizotopowa
Citropina 1.1	GLFDVIKKVASVIGGL-NH_2	1614,993 Da	1613,987 Da
Lipopeptyd 1	Palm-KK-NH_2	511,792 Da	511,446 Da
Lipopeptyd 2	Palm-KR-NH_2	567,819 Da	567,458 Da
Lipopeptyd 3	Laur-KR-NH_2	483,698 Da	483,390 Da
Lipopeptyd 4	Mir-KR-NH_2	511,421 Da	511,421 Da
Lipopeptyd 5	Palm-KKKK- NH_2	768,141 Da	767,636 Da
Lipopeptyd 6	Palm-RKKK- NH_2	796,154 Da	795,642 Da
Lipopeptyd 7	Palm-KRKK- NH_2	796,154 Da	795,642 Da
Lipopeptyd 8	Palm-RRRR-NH_2	880,195 Da	879,661 Da
Lipopeptyd 9	K-Dap(Palm)-K-NH_2	597,876 Da	597,494 Da
Lipopeptyd 10	K-Orn(Palm)-K-NH_2	625,930 Da	625,525 Da

4. Warunki prowadzenia badań mikrobiologicznych

Doświadczenia wymagające pracy z drobnoustrojami oraz zachowania warunków jałowych prowadziłam w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Przed rozpoczęciem badań wnętrze komory sterylizowane było promieniowaniem UV (20 min ekspozycji). W czasie pracy powierzchnia robocza dezynfekowana była roztworem alkoholu etylowego i izopropanolu (Line – Antybacteria). Pracę prowadziłam w rękawiczkach ochronnych jednorazowych oraz fartuchu ochronnym. Końcówki do pipet automatycznych oraz probówki typu „eppendorf" sterylizowane były w autoklawie niskociśnieniowym (121°C, 1 atm, 15 min). W trakcie doświadczeń korzystałam z fabrycznie jałowych, jednorazowych materiałów plastikowych (płytki 96-dołkowe, płytki 24-dołkowe, ezy, szalki Petriego). Podłoża mikrobiologiczne

przygotowywałam w kolbach szklanych zgodnie z instrukcją producenta, a do ich sterylizacji wykorzystywałam autoklaw mikrofalowy (135°C, 7 min). Ponadto, do przeprowadzenia testów używałam fabrycznie sterylnych, pakowanych pojedynczo soczewek kontaktowych. Fragmenty cewników urologicznych wyjaławiałam w autoklawie niskociśnieniowym w warunkach jak opisano powyżej. Szczepy wzorcowe drobnoustrojów przechowywano w zamrażarce w temp. -80°C w komercyjnie dostępnych fiolkach ze środkiem krioprotekcyjnym. Przed wykonaniem testów przygotowywałam hodowle płynne lub hodowle na podłożu stałym. Związki przeznaczone do badań przechowywałam w postaci liofilizatów. Przed rozpoczęciem prac naważki rozpuszczałam w jałowym buforze fosforanowym. W przypadku substancji trudniej rozpuszczalnych stosowałam dodatek DMSO, w takiej ilości, aby jego zawartość nie przekraczała 10% objętości. W celu uzyskania jednorodnych roztworów rozpuszczanie wspomagano ultradźwiękami lub wykorzystując wytrząsarkę wibracyjną (vortex).

Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost oraz testy aktywności wobec biofilmu posłużyły jako test wstępny do wybrania najbardziej aktywnych związków, które zostały wykorzystane w kolejnych etapach pracy dotyczących modyfikacji powierzchni biomateriałów.

Polimyksyna B w przeprowadzanym doświadczeniu była związkiem odniesienia dla działania wybranych peptydów. Jako antybiotyk lipopeptydowy wykorzystywany w terapii infekcji bakteryjnych posłużyła także do przeprowadzenia pozostałych testów, także tych dotyczących modyfikacji powierzchni.

Peptydy testowano pod kątem ich aktywności w stosunku do szczepów referencyjnych Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, natomiast polimyksynę B jedynie w stosunku do szczepów Gram-ujemnych.

5. Oznaczenie aktywności badanych związków w stosunku do form planktonowych

Aktywność wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz antybiotyku konwencjonalnego – polimyksyny B (antybiotyk rutynowo stosowany w terapii, lipopeptyd) zbadałam zgodnie z zaleceniami CLSI wykorzystując metodę mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym Mueller Hinton II Broth [120]. Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego wzrost przeprowadzałam na 96-dołkowych płytkach polistyrenowych z zaokrąglonym dnem. Do wykonania doświadczeń wykorzystywałam 18-godzinne hodowle płynne drobnoustrojów referencyjnych oraz roztwory badanych związków w PBS lub PBS z DMSO. Na płytkę polistyrenową nanosiłam inokulum bakteryjne o gęstości 5×10^5 CFU/ml. Drobnoustroje poddawane były działaniu roztworów peptydów i polimyksyny B o rosnących stężeniach (1–512 µg/ml). Dla każdej płytki przygotowywana była kontrola dodatnia (kontrola żyzności podłoża) oraz kontrola ujemna (kontrola jałowości pracy). Po 18-godzinnej inkubacji płytek w temperaturze 37°C dokonywałam wizualnego odczytu wyników. Za MIC uznawałam najniższe stężenie, przy którym wzrost drobnoustrojów nie był zauważalny. Test powtarzałam do momentu uzyskania jednakowych wyników w 3 kolejnych powtórzeniach.

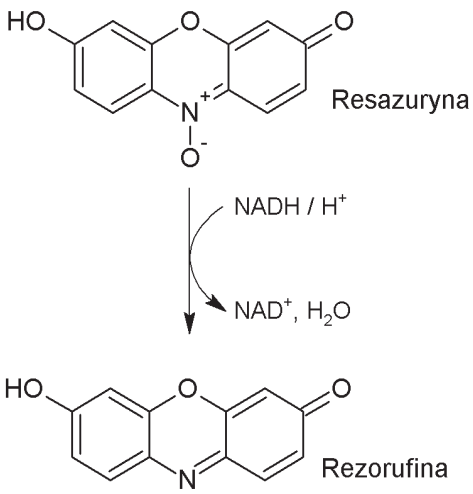
6. Wyznaczenie aktywności peptydów w stosunku do biofilmu

Tematem badań opisywanych w niniejszej rozprawie jest problem zakażeń spowodowanych przez drobnoustroje kolonizujące powierzchnie materiałów medycznych. Z zagadnieniem tym wiąże się powstawanie biofilmu bakteryjnego, którego obecność dodatkowo utrudnia terapię infekcji. Kolejnym etapem prac było określenie skuteczności działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych w zapobieganiu adhezji bakteryjnej oraz sprawdzenie ich aktywności w stosunku do uformowanego biofilmu. Dla obu doświadczeń podstawą był schemat badania dotyczący eliminacji dojrzałego biofilmu [121]. W przypadku testów dotyczących wpływu substancji

przeciwdrobnoustrojowych na powstawanie biofilmu protokół zmodyfikowałam jak opisano poniżej (**Podrozdział 6.1**). Związki wybrałam na podstawie oznaczeń MIC.

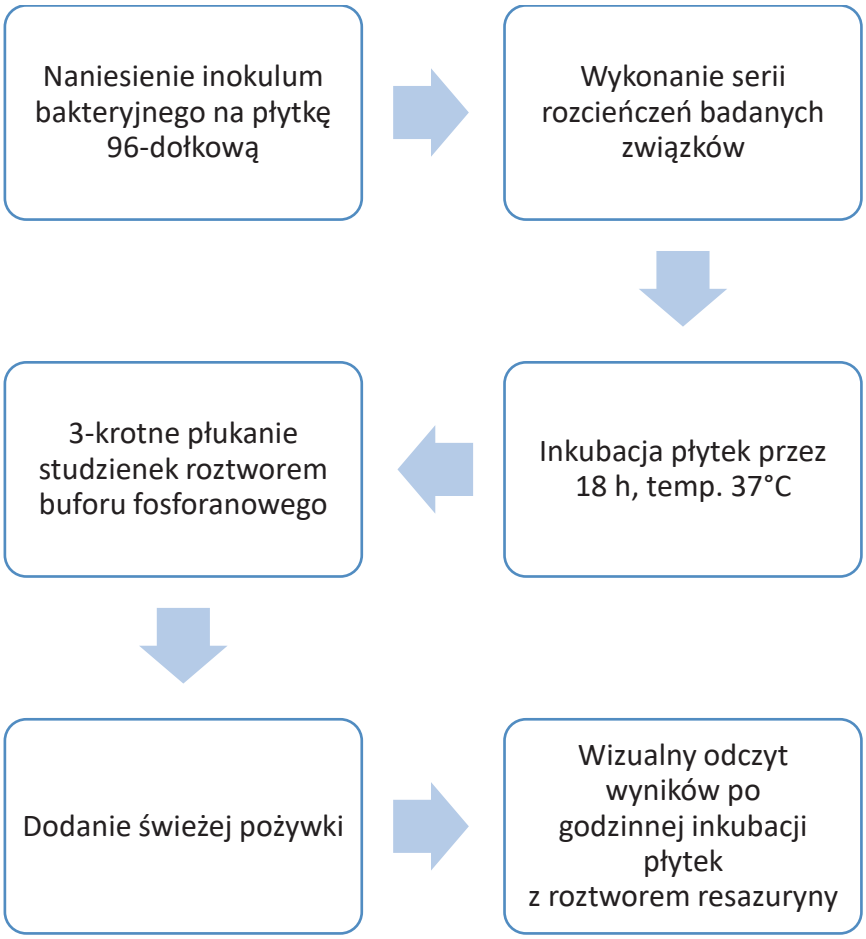
6.1 Aktywność przeciwadhezyjna

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe o najwyższej aktywności przebadałam pod kątem skuteczności w zapobieganiu powstawania biofilmu. Schemat wykonywania doświadczenia przedstawiłam na **Rycinie 10**. Do badań wykorzystałam 96-dołkowe płytki polistyrenowe z płaskim dnem. Inokulum bakteryjne o gęstości 5 × 10^5 przygotowane w pożywce MHB II dodawałam do studzienek, a następnie sporządzałam serię rozcieńczeń badanych związków (1–512 µg/ml). Dla każdej płytki przygotowywałam kontrolę dodatnią i ujemną. Płytki inkubowałam przez 18 godzin w temp. 37°C. Po wyznaczonym czasie usuwałam inokulum bakteryjne i dołki przepłukiwałam 3-krotnie jałowym buforem fosforanowym w celu usunięcia wolnopływających komórek drobnoustrojów, które nie przyczepiły się do dna i ścianek studzienki. Następnie płytkę wypełniałam świeżą pożywką i dodawałam roztworu resazuryny – odczynnika żywotności komórek, który zmienia barwę z granatowej na różową pod wpływem działania dehydrogenaz bakteryjnych. Reakcję redukcji barwnika przedstawiono na **Rycinie 9**.



Rycina 9. Reakcja redukcji resazuryny zachodząca w obecności żywych komórek.

Wizualnego odczytu wyników dokonywałam po godzinnej inkubacji płytek w 37°C. Za minimalne stężenie zapobiegające rozwojowi biofilmu uznawałam studzienkę o najmniejszej zawartości badanego związku, w której kolor pozostał granatowy (nie znajdowały się w niej żywe komórki bakterii). Doświadczenie powtarzałam do momentu uzyskania jednakowych wyników w 3 kolejnych seriach.

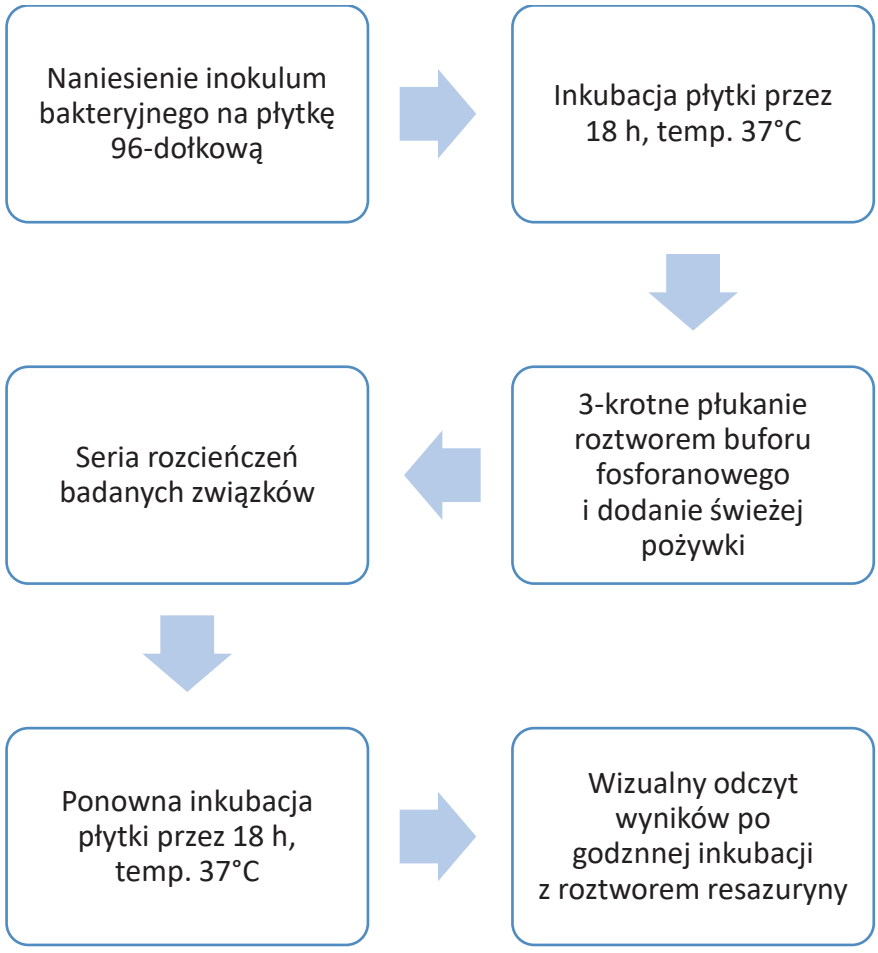


Rycina 10. Schemat doświadczenia sprawdzającego wpływ badanych substancji na tworzenie biofilmu.

6.2 Aktywność wobec dojrzałego biofimu

Kolejnym etapem prac było zbadanie efektywności wybranych AMPs i polimyksyny B w eradykacji uformowanego biofilmu. Doświadczenie przeprowadziłam podobnie jak opisano powyżej (**Podrozdział 6.1**). Różnica dotyczyła momentu dodania badanych związków. Płytki z inokulum bakteryjnym po 18-godzinnej inkubacji w temp. 37°C

i wytworzeniu warstwy biofilmu na dnie studzienek płukałam roztworem PBS. Następnie dodawałam świeżą pożywkę i dopiero wówczas wykonywałam serię rozcieńczeń peptydów i antybiotyku konwencjonalnego. Płytki ponownie pozostawiałam do inkubacji na 18 godzin w temp. 37°C. Po upływie wyznaczonego czasu dokonywałam wizualnego odczytu wyników za pomocą resazuryny. Za MBEC uznawałam najmniejsze stężenie badanych związków, przy którym nie obserwowałam obecności żywych komórek bakteryjnych.



Rycina 11. Schemat doświadczenia sprawdzającego aktywność badanych związków w stosunku do uformowanego biofilmu.

7. Toksyczność AMPs w stosunku do ludzkich krwinek czerwonych

Test sprawdzający toksyczność peptydów względem krwinek czerwonych przeprowadziłam wykorzystując krew pełną pochodzącą od zdrowego dawcy. Materiał pobierany był metodą próżniową do probówek zawierających EDTA jako antykoagulant. W pierwszym etapie krew płukałam buforem fosforanowym, a następnie poddawałam wirowaniu przez 10 min, 800 rpm w celu oddzielenia surowicy. Płukanie prowadziłam do momentu uzyskania klarownego supernatantu. Na płytce 96-dołkowej przygotowywałam seryjne rozcieńczenia badanych peptydów w zakresie 1–512 µg/ml. Zawiesinę krwinek czerwonych o stężeniu 4% (v/v) dodawałam do wszystkich dołków płytki zawierających badane związki. Dodatkowo sporządziłam kontrolę ze 100% hemolizą (1% Triton-X 100) oraz kontrolę, w której hemoliza nie zachodziła (jałowy roztwór PBS). Płytki inkubowałam przez 1 h w temp. 37°C, następnie wirowałam je przez 7 min w temperaturze 4°C, 1000 rpm. Supernatant pobierałam do nowej płytki i oznaczałam ilość uwolnionej hemoglobiny poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 540 nm. Stopień hemolizy obliczany był w odniesieniu do wartości absorbancji uzyskanych dla kontroli, w której nastąpiła całkowita hemoliza krwinek czerwonych [122].

8. Wybrane wyroby medyczne

Podczas przygotowywania doświadczeń i wyborze materiałów do badań skupiłam się przede wszystkim na popularności oraz częstości występowania zakażeń związanych z ich wykorzystaniem.

Spośród gotowych produktów wybrałam jednodniowe hydrożelowe soczewki kontaktowe (wykonane z materiału etafilcon A) oraz lateksowy cewnik urologiczny pokryty silikonem. Wybór rodzaju soczewek podyktowany był właściwościami chemicznymi ich powierzchni. Tworzywo z jakiego są wykonane umożliwiło przeprowadzenie modyfikacji powierzchni polegającej na wytworzeniu wiązania kowalencyjnego (materiał etafilcon A zawiera grupy karboksylowe, których obecność

związana jest z dodatkiem kwasu metakrylowego, co ułatwia umożliwia związanie grup aminowych peptydów poprzez wytworzenie wiązania amidowego).

9. Metody modyfikacji powierzchni biomateriałów

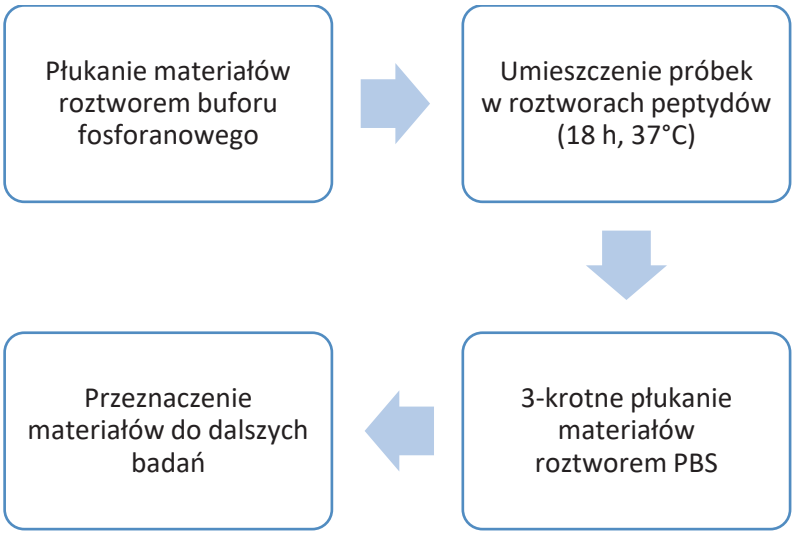
Jak opisano we wcześniejszych rozdziałach modyfikacje powierzchni biomateriałów są jednym z wiodących kierunków rozwijanych w celu zapobiegania infekcjom związanym z wykorzystaniem materiałów medycznych. W swojej pracy skupiłam się na możliwości przyłączenia cząsteczek peptydów przeciwdrobnoustrojowych do powierzchni komercyjnie dostępnych wyrobów medycznych za pomocą prostej inkubacji w roztworze oraz poprzez wytworzenie wiązania chemicznego z wykorzystaniem EDC (chlorowodorek 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropylo)karbodiimidu), który posłużył jako aktywator grupy karboksylowej. W kolejnych etapach przeprowadziłam m.in. testy potwierdzające obecność związków na zmodyfikowanych powierzchniach oraz badanie skuteczności przeciwadhezyjnej/bakteriobójczej wytworzonych powłok. Doświadczenia te zostały opisane w kolejnych rozdziałach (**Rozdział 11, 12**).

Wszystkie wykorzystane materiały w chwili przeprowadzania badań mikrobiologicznych były jałowe. Podczas pracy wykorzystałam grupę 6 peptydów, które wyselekcjonowałam na podstawie wcześniejszych doświadczeń biorąc pod uwagę ich aktywność oraz toksyczność względem krwinek czerwonych. Należały do nich: Palm-KK-NH_2, Palm-KR-NH_2, Palm-KRKK-NH_2, K-Dap(Palm)-K-NH_2, K-Orn(Palm)-K-NH_2 oraz polimyksyna B jako związek odniesienia. W pierwszym etapie modyfikowałam powierzchnie cewnika urologicznego poprzez inkubację i na podstawie otrzymanych wyników wybrałam 3 związki, które posłużyły mi do testów połączenia peptydów z powierzchnią soczewek kontaktowych w doświadczeniach obejmujących oba rodzaje modyfikacji. Były to lipopeptydy: Palm-KK-NH_2, K-Dap(Palm)-K-NH_2 i polimyksyna B. Etapowa redukcja ilości badanych związków wynikała z podobnego poziomu aktywności całej grupy peptydów oraz próby zmniejszenia kosztów poniesionych na zakup soczewek kontaktowych.

Zastosowane metody modyfikacji powierzchni przedstawiono poniżej. Do każdej z nich dołączono schemat przeprowadzania procesu (**Rycina 12, 13**).

Modyfikacja poprzez inkubację

Materiały płukałam buforem fosforanowym i umieszczałam w roztworze badanego peptydu. Doświadczenia prowadziłam w zakresie stężeń 1–512 µg/ml. Biomateriały pozostawiałam na okres inkubacji w temperaturze 37°C, 18 h. Po upływie ustalonego czasu ponownie przemywałam materiały roztworem PBS w celu wypłukania niezwiązanych cząsteczek związków. Następnie próbki przeznaczałam do kolejnych doświadczeń [123].

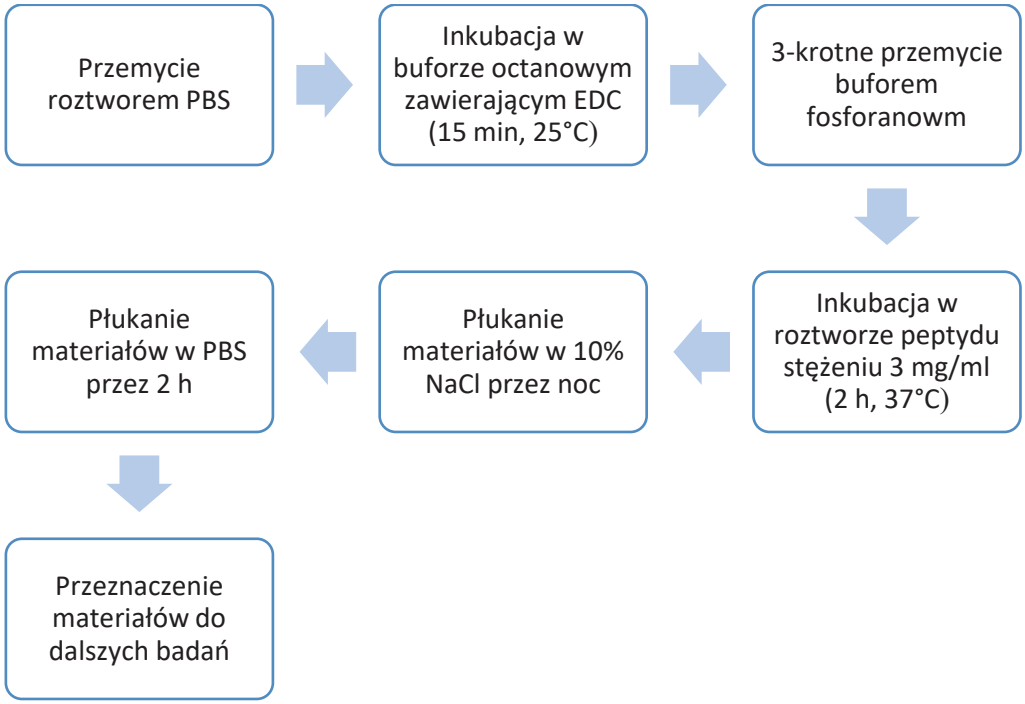


Rycina 12. Modyfikacja powierzchni biomateriałów wykorzystując proces inkubacji.

Modyfikacja z wykorzystaniem EDC

Materiały przemywałam jałowym roztworem PBS. Następnie próbki umieszczałam w 0,1 M buforze octanowym o pH 5 zawierającym EDC o stężeniu 2 mg/ml. Inkubację prowadziłam 15 min w temperaturze 25°C. Następnie materiały przemywałam trzykrotnie buforem fosforanowym i pozostawiałam do inkubacji w roztworze peptydu

o stężeniu 3 mg/ml przez 2 h, temp. 37°C z wytrząsaniem. Po upływie ustalonego czasu materiały płukałam roztworem PBS i przeznaczałam do dalszych badań [124].



Rycina 13. Schemat przeprowadzania modyfikacji powierzchni biomateriałów z wykorzystaniem EDC.

Opisane powyżej procedury wykonywałam w taki sam sposób, niezależnie od rodzaju materiału. Powierzchnię soczewek kontaktowych modyfikowałam zarówno poprzez inkubację w roztworze peptydu jak i wykorzystując EDC jako odczynnik sprzęgający. Fragmenty cewnika poddawałam modyfikacji jedynie na drodze inkubacji. Próba związania peptydów poprzez wiązanie kowalencyjne okazała się w tym przypadku nieskuteczna.

10. Wyznaczenie toksyczności peptydów w stosunku do linii komórkowej mysich fibroblastów

W związku z wykorzystaniem związków do badań na materiałach medycznych przeprowadzono ocenę cytotoksyczności peptydów zgodnie z normą ISO 10993-5 [125]. Doświadczenie zostało wykonana we współpracy z Zakładem Badań Środowiska Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego przez magister Annę Zgadzaj pod kierownictwem profesora Grzegorza Nałęcza-Jaweckiego za pomocą testu wychwytu czerwieni obojętnej na linii komórkowej mysich fibroblastów BALB/c 3T3 clone A31. Testowi zostały poddane wszystkie peptydy, które uwzględniono w etapie modyfikacji powierzchni materiałów medycznych. Komórki mysich fibroblastów (10^4) posiano na płytkach 96-dołkowych, a następnie inkubowano przez 24 godziny (5% CO_2, 37°C, wilgotność > 90%) w pożywce DMEM (Lonza) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej oraz 100 IU/ml penicyliny i 0,1 mg/ml streptomycyny. Po tym czasie monowarstwę komórek w dołkach oceniano pod mikroskopem. Następnie pożywkę znad komórek zastępowano przez roztwory badane. Sporządzono je przez rozpuszczenie poszczególnych próbek w PBS, następnie roztwory wyjałowiono przez sączenie na filtrze strzykawkowym i 10-krotnie rozcieńczono w świeżej pożywce DMEM ze zredukowaną zawartością surowicy (5%). Dla każdej próbki najwyższe stężenie badane w pożywce do hodowli komórkowych wynosiło 512 µg/ml. Cytotoksyczność każdego roztworu oznaczano w szeregu dziesięciu kolejnych dwukrotnych rozcieńczeń (1–512 µg/ml), każde w trzech powtórzeniach. Komórki pozostawiono do inkubacji na 24 h. Następnie medium znad komórek usuwano, studzienki płytki przemywano buforem fosforanowym i dodawano 100 µl pożywki z czerwienią obojętną. Po 2 h medium z barwnikiem usuwano, dołki ponownie przepłukiwano PBS i do każdego dodawano wodny roztwór etanolu z kwasem octowym w celu uwolnienia barwnika z komórek. Płytki wytrząsano przez 15 min, a następnie intensywność czerwonego zabarwienia w poszczególnych dołkach odczytywano spektrofotometrycznie przy długości fali 540 nm. Jako kontrolę negatywną, pozytywną oraz kontrolę rozpuszczalnika wykorzystano odpowiednio: świeżą pożywkę DMEM, laurylosiarczan sodu oraz DMEM z dodatkiem PBS (9:1). Próbka

o danym stężeniu uznawana była za cytotoksyczną, jeśli powodowała spadek przeżywalności komórek w porównaniu do kontroli negatywnej poniżej 70%.

11. Potwierdzenie obecności badanych związków na powierzchni zmodyfikowanych materiałów

Równocześnie z pracami związanymi z potwierdzeniem przeciwdrobnoustrojowych właściwości otrzymanych powierzchni wykonałam testy, mające zweryfikować obecności wykorzystanych substancji na powierzchniach materiałów poddanych modyfikacji. W tym celu, na wybranych przykładach, przeprowadziłam analizy, których celem było oszacowanie ilości związanej substancji przeciwdrobnoustrojowej oraz obserwacja, czy zastosowane związki uwalniają się z powierzchni matrycy. Dodatkowo, wykorzystałam technikę spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia ATR-FTIR, co pozwoliło mi na ocenę obecności związków i określenie ewentualnych oddziaływań. W związku z podobnymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi całej grupy badanych peptydów analizy przeprowadzałam wykorzystując lipopeptyd Palm-KK-NH_2 oraz polimyksynę B.

11.1 Próba oszacowania ilościowego związania się peptydów z powierzchnią materiałów

Doświadczenie polegało na przeprowadzeniu próby oznaczenia ilościowego związków, które połączyły się z powierzchnią materiałów. W tym celu wykonałam analizy odpowiednich roztworów wykorzystując technikę chromatografii cieczowej. Dokonałam także próby obserwacji uwalniania peptydu z matrycy.

W przypadku modyfikacji fragmentów cewnika i soczewek kontaktowych metodą inkubacji przeanalizowałam następujące próbki:

a) Wyjściowe roztwory peptydów o danych stężeniach, w których inkubowałam materiały;
b) Roztwory buforu fosforanowego po godzinnej inkubacji ze zmodyfikowanymi materiałami;
c) Roztwory buforu fosforanowego po całonocnej inkubacji, której poddano materiały po zakończeniu procesu z punktu B.

W trakcie przeprowadzania modyfikacji wykorzystując wiązanie kowalencyjne związku próbki pobrane do analiz uwzględniały:

a) Wyjściowe roztwory peptydów o stężeniu 3 mg/ml po 2-godzinnej inkubacji z materiałami;
b) Roztwory 10% NaCl po całonocnej inkubacji materiałów;
c) Roztwory PBS po 2-godzinnej inkubacji materiałów po zakończeniu procesu z punktu B.

Zawartość peptydu w próbkach badałam przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz. Do tego celu wykorzystałam chromatograf cieczowy – Waters e2695, detektor – Waters, 2998 PDA Detector oraz kolumnę – Agilent, ZORBAX Extend-C18, 4,6 × 50 mm, 1,8 µm. Jako eluenty zastosowałam wodę dejonizowaną oraz acetonitryl zawierające 0,1% (v/v) kwas trifluorooctowy. Obserwowałam pojawianie się sygnału o znanym czasie retencji charakterystycznego dla danego związku w pobranych przeze mnie próbkach pobranych z kolejnych etapów procesów modyfikacji.
Analiza próbek zawierających Palm-KK-NH_2 przebiegała w podanych niżej warunkach:

- Liniowy gradient 30–90% acetonitrylu w wodzie dejonizowanej;
- Czas trwania analizy: 10 min;
- Przepływ fazy ruchomej: 0,5 ml/min;
- Detekcja przy długości fali 214 nm.

Analizę próbek zawierających polimyksynę B przeprowadzałam w warunkach:

- Liniowy gradient 10-100% acetonitrylu w wodzie dejonizowanej;
- Czas trwania analizy: 10 min;
- Przepływ fazy ruchomej: 0,5 ml/min;
- Detekcja przy 214 nm.

Objętość dozowanej próbki wynosiła 50 µL. Temperatura, w której prowadziłam analizy wynosiła 25°C.

11.2 Analiza powierzchni materiałów – ATR-FTIR

Skuteczność przeprowadzonych modyfikacji powierzchni materiałów medycznych sprawdziłam także wykorzystując technikę spektroskopii w podczerwieni ATR z transformacją Fouriera (ATR-FTIR). Wykonanie analizy było możliwe dzięki współpracy z Katedrą i Zakładem Chemii Fizycznej GUMed.

ATR-FTIR jest to rodzaj spektroskopii w podczerwieni wykorzystujący metodę osłabionego całkowitego odbicia, gdzie promieniowanie padające na powierzchnię kryształu ATR ulega całkowitemu odbiciu. Widma uzyskane tą techniką obrazujące zmiany transmitancji pozwalają na interpretację zmian powierzchniowych badanej próbki. Jest to technika, którą z powodzeniem wykorzystuje się do analizy powierzchni biomateriałów [126]. Przygotowanie materiałów medycznych przeznaczonych do analizy polegało na dokładnym odparowaniu rozpuszczalnika, który pozostał na ich powierzchni po procesach modyfikacji. Analizę prowadziłam na osuszonych fragmentach cewnika i soczewek kontaktowych. Każda zbadana grupa materiałów zawierała wzorzec (związek wykorzystany do procesu modyfikacji), próbkę nietraktowaną roztworem substancji przeciwdrobnoustrojowej oraz materiał zmodyfikowany. Praca odbywała się w temperaturze pokojowej. Kryształ, na którym umieszczałam badaną próbkę wykonany był z diamentu.

12. Oznaczenie aktywności mikrobiologicznej zmodyfikowanych wyrobów medycznych

Materiały z wytworzonymi powłokami zawierającymi wybrane peptydy przeciwdrobnoustrojowe lub polimyksynę B przebadałam pod kątem ich aktywności w zapobieganiu kolonizacji bakteryjnej. W niniejszym rozdziale opisane zostały doświadczenia, które pozwoliły na sprawdzenie efektywności modyfikacji powierzchni gotowych wyrobów medycznych – soczewek kontaktowych i fragmentów cewnika urologicznego. Jak wspomniano we wstępie do **Części doświadczalnej** pracy (**Rozdział 8**) wszystkie wykorzystane materiały były jałowe w momencie rozpoczęcia badań mikrobiologicznych.

Metody oceny opierały się na zastosowaniu hodowli płynnej drobnoustrojów, podobnie jak opisano w pracy dotyczącej modyfikacji soczewek kontaktowych wykorzystując EDC [124]. Poza posiewem na podłoże stałe doświadczenia mikrobiologiczne rozszerzyłam wykorzystując resazurynę oraz pomiar gęstości optycznej inokulum co zostanie opisane poniżej (**Podrozdział 12.1.1, 12.1.2**) Spośród szczepów referencyjnych do badań mikrobiologicznych z wykorzystaniem materiałów medycznych wybrałam szczepy: *S. epidermidis* oraz *E. coli* (patogeny często izolowane podczas zakażeń związanych ze stosowaniam materiałów medycznych, **Tabela 4**). Posłużyły one jako szczepy reprezentatywne dla bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Materiały o zmodyfikowanej powierzchni umieszczałam w inokulum bakteryjnym o gęstości początkowej 0,1 McFarlanda. Dla prób przygotowywałam kontrolę dodatnią (inokulum bakteryjne o danej gęstości optycznej bez dodatku badanego związku) oraz kontrolę ujemną (jałowa pożywka mikrobiologiczna). Doświadczenia prowadziłam wykorzystując 24-dołkowe płytki polistyrenowe. Materiały inkubowane były w temp. 37°C przez 18 h. Po ustalonym czasie przeprowadzałam testy potwierdzające aktywność mikrobiologiczną zmodyfikowanych powierzchni soczewek kontaktowych oraz fragmentów cewnika. Protokoły wykonywania doświadczeń dla poszczególnych metod modyfikacji powierzchni zostały opisane w poniższych podrozdziałach (**Podrozdział 12.1, 12.2**).

12.1 Metoda modyfikacji w roztworze

Potwierdzenie skuteczności przeprowadzonych modyfikacji polegało na wykonaniu 3 testów, które pozwoliły zaobserwować redukcję wzrostu bakteryjnego wynikającą z aktywności otrzymanych powłok. Opisane poniżej doświadczenia wykonałam w taki sam sposób dla obu rodzajów materiałów.

12.1.1 Pomiar gęstości optycznej inokulum

Po upłynięciu czasu inkubacji próbek materiałów medycznych w inokulum bakteryjnym o gęstości 0,1 McF pobierałam po 100 µl zawiesiny bakteryjnej do płytki 96-dołkowej i dokonywałam pomiaru absorbancji przy długości fali 600 nm. Weryfikację zmian gęstości optyczej inokulum bakteryjnego spowodowanych zastosowaniem materiałów jako nośników peptydów przeprowadziłam w celu ustalenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz obserwacji ewentualnej redukcji wzrostu bakterii. Wpływ modyfikacji powierzchni materiałów medycznych na wzrost bakterii oceniałam poprzez porównanie gęstości inokulum w próbkach pobranych ze studzienek płytki, w których znajdowały się zmodyfikowane materiały z gęstością inokulum wyznaczoną dla kontroli dodatniej.

12.1.2 Określenie żywotności komórek za pomocą resazuryny

Druga metoda oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej połączeń peptyd – materiał medyczny opierała się na wykorzystaniu reakcji barwnej redukcji resazuryny. Po upływie 18 h inkubacji materiałów w inokulum bakteryjnym do wszystkich dołków płytki dodawałam roztwór resazuryny. Płytki pozostawiałam do ponownej inkubacji w 37°C przez 1 h. Aktywność materiałów o zmodyfikowanej powierzchni oceniałam wizualnie oraz przez pomiar spektrofotometryczny roztworu zawierającego rezorufinę, która jest produktem metabolizmu resazurny.

12.1.3 Posiew próbek na podłoże stałe

Weryfikację wpływu modyfikacji powierzchni na wzrost drobnoustrojów przeprowadziłam także poprzez pobranie próbek (10 µl) inokulum bakteryjnego z dołków płytki 24-dołkowej zawierającej testowane materiały i ich posiew na podłoże stałe Mueller Hinton II Agar. Szalki Petriego z posianymi próbkami pozostawiałam do inkubacji na 18 h, 37°C. Po upływie ustalonego czasu porównywałam wzrost drobnoustrojów dla danych stężeń peptydów do wzrostu charakterystycznego dla kontroli dodatniej.

12.2 Metoda modyfikacji wykorzystująca EDC

Metodę wykorzystującą EDC jako odczynnik sprzęgający do połączenia peptydu z powierzchnią pierwotnie testowałam zarówno na fragmentach cewnika jak i soczewkach kontaktowych. Doświadczenia potwierdziły, że wykorzystanie wiązania kowalencyjnego jest skuteczne jedynie w przypadku powierzchni soczewek. Efektywność działania przeciwadhezyjnego zmodyfikowanego materiału określałam badając wpływ wytworzonej powłoki na redukcję ilości komórek bakteryjnych, które przyłączyły się do jego powierzchni.

Po zakończeniu inkubacji materiału w inokulum soczewki umieszczałam w 2 ml roztworu PBS i poddawałam procesowi sonikacji (5 min) w łaźni ultradźwiękowej w celu usunięcia drobnoustrojów z powierzchni badanej próbki. Następnie wykonywałam rozcieńczenia buforu zawierającego komórki bakterii, z których pobierałam po 10 µl i wykonywałam posiew na podłoże stałe. Płytki z agarem pozostawiałam na czas inkubacji w 37°C, 18 h. Wzrost bakteryjny otrzymany dla próbek, gdzie znajdował się zmodyfikowany materiał porównywałam do wzrostu charakterystycznego dla kontroli dodatniej.

Dodatkowo, wykonałam pomiar spektrofotometryczny zawiesiny bakteryjnej pozostałej po całonocnej inkubacji zmodyfikowanych materiałów. Pobrałam także próbki inokulum i wykonałam posiew na podłoże stałe w celu potwierdzenia wyników.

IV. OMÓWIENIE WYNIKÓW

1. Aktywność AMPs w stosunku do form wolnopływających drobnoustrojów oraz biofilmu

Grupa peptydów przeciwdrobnoustrojowych wybranych do badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej obejmowała przede wszystkim krótkie, syntetyczne lipopeptydy. Powodem, dla którego zdecydowałam się uwzględnić głównie te związki jest ich wysoka aktywność przeciwdrobnoustrojowa (**Tabela 7**) oraz prosta budowa chemiczna. Lipopeptydy wykorzystane do przeprowadzenia doświadczeń składały się z krótkiej sekwencji aminokwasowej (2 – 4 reszty lizyny i argininy) oraz reszty nasyconego kwasu tłuszczowego: palmitynowego, mirystynowego lub laurynowego. W celu porównania aktywności lipopeptydów w stosunku do innych grup peptydów w pierwszych etapach badań uwzględniłam również citropinę 1.1 oraz rutynowo stosowany antybiotyk lipopeptydowy – polimyksynę B. Sprawdziłam także wpływ długości łańcucha kwasu tłuszczowego na aktywność związków. Wyznaczono wartości MIC dla lipopeptydów: Palm-KR-NH_2, Laur-KR-NH_2 oraz Mir-KR-NH_2.

Tabela 7. Wartości MIC [µg/ml] uzyskane dla wybranych AMPs i antybiotyku konwencjonalnego.

	***S. aureus* ATCC 6538**	***S. epidermidis* PCM 2532**	***E. coli* ATCC 25922**	***P. aeruginosa* ATCC 9027**
Citropina 1.1	8	16	16	256
Palm-KK-NH_2	8	8	8	16
Palm-KR-NH_2	8	8	8	16
Laur-KR-NH_2	64	32	512	512
Mir-KR-NH_2	32	8	32	64
Palm-KKKK-NH_2	8	8	16	32
Palm-RKKK-NH_2	16	8	8	16
Palm-KRKK-NH_2	16	8	8	16
Palm-RRRR-NH_2	16	8	16	32
K-Dap(Palm)-K-NH_2	8	8	8	8
K-Orn(Palm)-K-NH_2	4	8	8	32
Polimyksyna B	-	-	< 1	16

W **Tabeli 7.** zamieściłam wyznaczone stężenia aktywne w stosunku do form wolnopływających drobnoustrojów Gram-dodatnich (*S. aureus* i *S. epidermidis*) oraz drobnoustrojów Gram-ujemnych (*E. coli* i *P. aeruginosa*). Oznaczone wartości wskazują na wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową badanych związków, szczególnie w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, gdzie MIC dla wszystkich szczepów mieścił się w przedziale stężeń 4–16 µg/ml. Wyjątkiem był lipopeptyd Laur-KR-NH_2, którego aktywność w stosunku do szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis* wynosiła odpowiednio 64 i 32 µg/ml. Niższą aktywność w stosunku do szczepu *S. aureus* wykazała także peptyd Mir-KR-NH_2 (MIC = 32 µg/ml). Analizując powyższe wyniki można stwierdzić, że długość łańcucha kwasu tłuszczowego wpływa na aktywność związków. Spośród 3 lipopeptydów o takiej samej sekwencji aminokwasowej różniących się rodzajem kwasu tłuszczowego najniższe stężenie hamujące wzrost wyznaczono dla lipopeptydu Palm-KR-NH_2 (8 µg/ml dla obu szczepów). Spośród drobnoustrojów Gram-dodatnich bardziej wrażliwym szczepem na działanie związków był *S. epidermidis*. Aktywność citropiny 1.1 wyznaczona

dla drobnoustrojów Gram-dodatnich znajdowała się na poziome aktywności otrzymanych dla lipopeptydów.

Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost, które zbadałam dla szczepów Gram-ujemnyh obejmują zakres stężeń 8–512 µg/ml. Świadczy to o niższej aktywności lipopeptydów w stosunku do tej grupy bakterii. Podobnie jak w przypadku drobnoustrojów Gram-dodatnich najniższą aktywność wyznaczono dla peptydów Laur-KR-NH_2 oraz Mir-KR-NH_2 (32–512 µg/ml). Lipopeptyd Palm-KR-NH_2 wykazał działanie podobne do tego, jakie wyznaczyłam dla szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis*. Spośród wybranych do wykonania doświadczeń bakterii Gram-ujemnych bardziej wrażliwym szczepem na działanie związków był szczep *E. coli*, dla którego aktywność większości peptydów mieściła się w zakresie 8–16 µg/ml. Analizując wyznaczone wartości stężeń hamujących wzrost dla citropiny 1.1 można zauważyć, że wyższą aktywność peptyd ten wykazał w stosunku do szczepu *E. coli* (MIC = 16 µg/ml) niż *P. aeruginosa* (256 µg/ml). Do badań z wykorzystaniem drobnoustrojów Gram-ujemnych włączyłam także polimyksynę B. Antybiotyk najwyższą aktywność wykazał w stosunku do komórek bakterii szczepu *E. coli* (MIC < 1 µg/ml). W przypadku *P. aeruginosa* oznaczone stężenie hamujące wzrost było podobne jakie otrzymano dla krótkich lipopeptydów (MIC = 16 µg/ml).

W związku z tym, iż temat pracy dotyczy zagadnienia biofilmu bakteryjnego określiłam aktywność lipopeptydów, citropiny 1.1 oraz polimyksyny B w zapobieganiu powstawania struktury (**Tabela 8.**). Zbadałam także działanie związków wobec dojrzałego biofilmu (**Tabela 9.**). Do przeprowadzenia doświadczeń wybrałam lipopeptydy o najwyższej aktywności sugerując się wyznaczonymi wcześniej minimalnymi stężeniami hamującymi wzrost.

Tabela 8. Stężenia skuteczne w zapobieganiu powstawania biofilmu bakteryjnego [µg/ml].

	S. aureus	***S. epidermidis***	***E. coli***	***P. aeruginosa***
Citropina 1.1	16	32	32	128
Palm-KK-NH_2	16	8	8	32
Palm-KR-NH_2	16	8	16	32
Palm-KKKK-NH_2	32	16	32	32
Palm-RKKK-NH_2	16	8	16	32
Palm-KRKK-NH_2	16	16	16	32
K-Dap(Palm)-K-NH_2	16	8	32	32
K-Orn(Palm)-K-NH_2	8	8	16	32
Polimyksyna B	-	-	8	32

Analiza wyników doświadczenia sprawdzającego wpływ badanych związków na proces powstawania biofilmu na powierzchni polistyrenowej wskazuje na wysoką efektywność działania wybranych lipopeptydów. Związki wykazały podobną aktywność w zapobieganiu formowania się biofilmu zarówno dla szczepów Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Stężenia, przy których nie obserwowałam powstania wielokomórkowej struktury mieściły się w zakresie 8–32 µg/ml i były takie same lub 2-krotnie wyższe od wartości MIC. Najbardziej podatnym szczepem na zahamowanie procesu formowania się biofilmu był szczep *S. epidermidis*, a spośród drobnoustrojów Gram-ujemnych – *E. coli*. Aktywność citropiny 1.1 oraz polimyksyny B była porównywalna do aktywności lipopeptydów.

Tabela 9. Aktywność badanych związków w zwalczaniu dojrzałej struktury biofilmu [µg/ml].

	S. aureus	***S. epidermidis***	***E. coli***	***P. aeruginosa***
Citropina 1.1	32	64	64	512
Palm-KK-NH_2	16	16	32	256
Palm-KR-NH_2	32	16	64	256
Palm-KKKK-NH_2	32	32	32	256
Palm-RKKK- NH_2	32	16	32	256
Palm-KRKK-NH_2	32	32	32	256
K-Dap(Palm)-K-NH_2	16	32	64	512
K-Orn(Palm)-K-NH_2	16	32	64	512
Polimyksyna B	-	-	8	256

Równocześnie z doświadczeniem opisującym wpływ badanych związków na proces powstawania biofilmu przeprowadziłam badanie ich aktywności wobec dojrzałej struktury. Wartości minimalnych stężeń eliminujących biofilm, które przedstawiłam w **Tabeli 9.** wskazują, że lipopeptydy charakteryzują się podobną aktywnością w stosunku do wszystkich drobnoustrojów. Wyjątkiem jest szczep *P. aeruginosa*, którego biofilm okazał się najmniej podatny na działanie wybranych związków, a wartości MBEC były wyższe lub równe 256 µg/ml. Stężenia aktywne w stosunku do biofilmu były 2- lub 3-krotnie wyższe niż minimalne stężenia hamujące wzrost wyznaczone dla form planktonowych. Aktywność citropiny 1.1 była niższa w porównaniu do aktywności lipopeptydów. Eliminacja biofilmu była widoczna w zakresie stężeń 32–512 µg/ml. Spośród wszystkich badanych związków najbardziej aktywnym wobec szczepu *E. coli* była polimyksyna B (MBEC = 8 µg/ml). Antybiotyk nie wykazał aktywności wobec biofilmu utworzonego przez *P. aeruginosa*.

2. Ocena cytotoksyczności związków

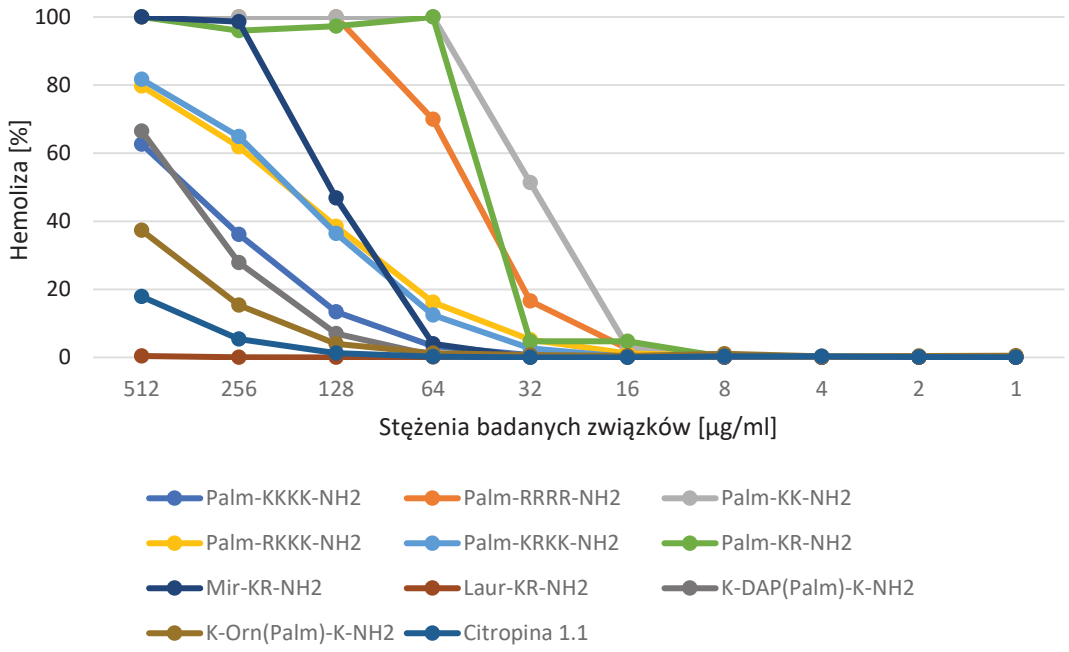
Jednym z etapów badań było określenie toksyczności wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Wstępną ocenę przeprowadziłam na podstawie testu hemolizy ludzkich krwinek czerwonych. W związku z przeznaczeniem badanych związków do procesów modyfikacji powierzchni materiałów medycznych wykonano także test NRU (test wychwytu czerwieni obojętnej) wykorzystując linię komórkową mysich fibroblastów BALB/c3T3 clone A31, który jest zalecanym testem cytotoksyczności przez normę ISO10993-5 opisującą badania biologiczne dla materiałów medycznych. Rezultaty obu testów przedstawiłam poniżej w formie tabel (**Tabela 10, 11**) oraz w formie graficznej (**Rycina 14, 15**).

Test hemolizy

Doświadczenie polegało na obserwacji ilości hemoglobiny uwolnionej z erytrocytów, które zostały zniszczone pod wpływem działania związków. Otrzymane wyniki (**Tabela 10**) sugerują, że lipopeptydy charakteryzują się brakiem toksyczności poniżej stężenia 64 µg/ml. Wyjątkiem są związki Palm-KK-NH_2 oraz Palm-KR-NH_2, które powodowały wzmożoną hemolizę krwinek czerwonych odpowiednio do 32 µg/ml i 64 µg/ml. Jednocześnie oba peptydy należały do najbardziej toksycznych związków, ponieważ powodowały hemolizę erytrocytów sięgającą 100%. Poza wspomnianymi wcześniej lipopeptydami: Palm-KK-NH_2 oraz Palm-KR-NH_2, badane związki nie powodowały niszczenia krwinek czerwonych w zakresach stężeń, które były aktywne przeciwdrobnoustrojowo oraz przeciwbiofilmowo wobec szczepów Gram-dodatnich i szczepu *E. coli*.

Tabela 10. Stopień hemolizy (%) uzyskany dla badanego zakresu stężeń (1–512 µg/ml) wybranych peptydów (wyniki zaokrąglone do całości).

	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
Citropina 1.1	17	5	1	0	0	0	0	0	0	0
Palm-KK-NH_2	100	100	100	100	51	3	1	0	0	0
Palm-KR-NH_2	100	96	97	100	5	5	0	0	0	0
Palm-KKKK-NH_2	63	36	13	3	1	0	0	0	0	0
Palm-RKKK-NH_2	80	62	38	16	5	1	0	0	0	0
Palm-KRKK-NH_2	82	65	36	12	3	0	0	0	0	0
K-Dap(Palm)-K-NH_2	66	28	7	1	0	0	0	0	0	0
K-Orn(Palm)-K-NH_2	37	15	4	1	1	0	1	0	0	0



Rycina 14. Porównanie stopienia hemolizy wywołanej zastosowaniem peptydów w zależności od stężenia.

Analizując dane znajdujące się w powyższej tabeli oraz porównanie aktywności hemolitycznej związków przedstawione w postaci wykresu (**Rycina 14**) można stwierdzić, że najmniej toksycznym lipopeptydem jest K-Orn(Palm)-K-NH_2, dla którego

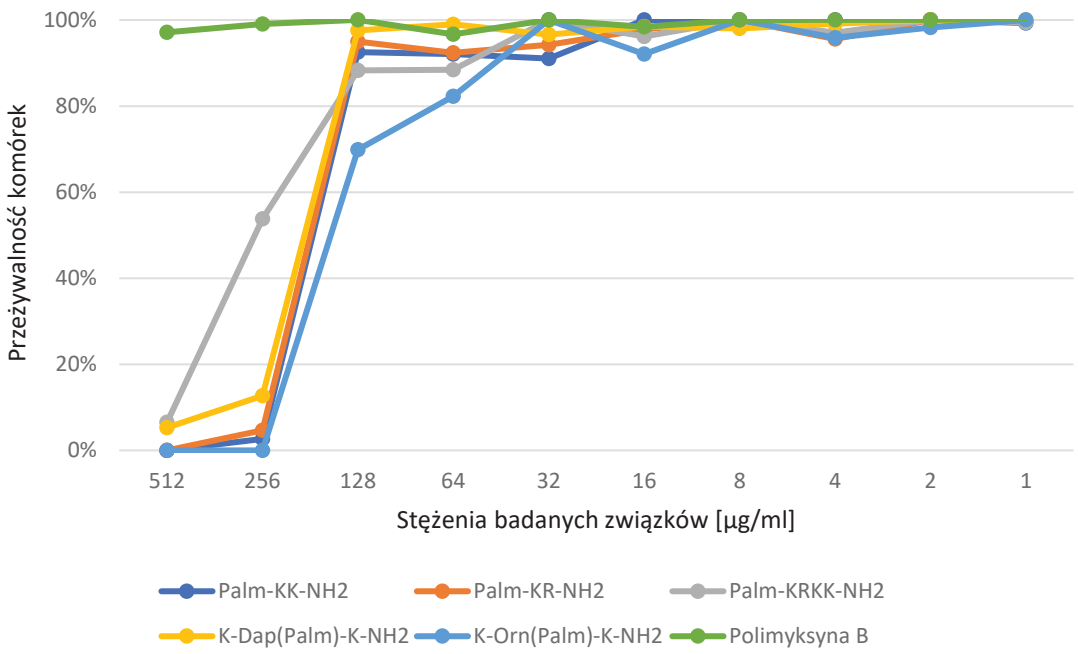
nawet przy najwyższym stężeniu hemoliza nie osiągnęła 40%. Podsumowując wyniki uzyskane dla wszystkich peptydów za najbardziej bezpieczny związek można uznać citropinę 1.1, dla której hemoliza erytrocytów przy stężeniu 512 µg/ml osiągnęła jedynie 17%.

Test cytotoksyczności NRU

Podstawą doświadczenia było określenie wpływu badanych związków na przeżywalność komórek fibroblastów. Otrzymane wyniki świadczą o braku cytotoksyczności lipopeptydów poniżej stężania 128 µg/ml – przeżywalność komórek była bliska 100% (z wyjątkiem peptydu K-Orn(Palm)-K-NH_2, dla którego wyznaczono przeżywalność na poziomie 70%). W zakresie stężeń, które wykazywały aktywność w testach mikrobiologicznych związki nie powodowały spadku przeżywalności fibroblastów. Najbardziej toksycznym związkiem okazał się lipopeptyd zawierający resztę ornityny, natomiast najmniejszy wpływ na ilość żywych komórek zaobserwowano dla peptydu K-Dap(Palm)-K-NH_2. Wyniki testów zamieszczone poniżej nie uwzględniają citropiny 1.1. Peptyd ten został przebadany pod kątem cytotoksyczność względem komórek mysich fibroblastów podczas przygotowywania publikacji: Piotrowska U., Olędzka E., Zgadzaj A., Bauer M., Sobczak M.: *A novel delivery system for the controlled release of antimicrobial peptides: Citropin 1.1 and Temporin A*, Polymers (2018), 10: 489. Citropina 1.1 nie wykazywała toksyczności nawet przy stężeniu 512 µg/ml.

Tabela 11. Przeżywalność komórek mysich fibroblastów (%) dla badanego zakresu stężeń (1–512 µg/ml) wybranych peptydów (wyniki zaokrąglone do całości).

	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
Palm-KK-NH_2	0	3	93	92	91	100	100	100	100	99
Palm-KR-NH_2	0	5	95	92	94	98	100	96	100	100
Palm-KRKK-NH_2	7	54	88	88	100	96	100	97	100	99
K-Dap(Palm)-K-NH_2	5	13	98	99	97	98	98	99	100	100
K-Orn(Palm)-K-NH_2	0	0	70	82	100	92	100	96	98	100
Polimyksyna B	97	99	100	97	100	98	100	100	100	100



Rycina 15. Wykres przedstawiający porównanie przeżywalności komórek mysich fibroblastów po traktowaniu roztworami peptydów.

3. Analizy potwierdzające obecność badanych związków na powierzchni materiałów medycznych

Poniżej zostały opisane wyniki doświadczeń wykorzystujących technikę HPLC i ATR-FTIR, które przeprowadziłam w celu weryfikacji powodzenia przeprowadzonych modyfikacji powierzchni materiałów. Rezultaty badań miały być pomocne przy określaniu zachodzenia procesów uwalniania lub oddziaływań związek – matryca.

3.1 Analiza chromatograficzna

Podjęto próbę oznaczenia ilościowego peptydów związanych z powierzchnią oraz próbę obserwacji procesu uwalniania związków ze zmodyfikowanych materiałów. W badanych próbkach (**Część III *Część doświadczalna*, Podrozdział 11.1**) nie zaobserwowałam obecności związku w roztworach wyjściowych (zastosowanych do modyfikacji) oraz zachodzenia procesu uwalniania z powierzchni, co może być związane

z granicą wykrywalności, która dla wykorzystanej metody (HPLC z detekcją UV) wynosiła 16 µg/ml. Udało się oznaczyć ilość peptydu Palm-KK-NH_2 uwolnionego z powierzchni fragmentów cewnika poddanych wcześniej inkubacji w roztworach związku o stężeniach 512 µg/ml i 256 µg/ml. Analiza próbek po godzinnej inkubacji materiałów w PBS pozwoliła na obliczenie ilości uwolnionego peptydu odpowiednio dla stężenia 512 µg/ml – 387,46 µg, dla stężenia 256 µg/ml – 35,60 µg.

3.2 Analiza widm ATR-FTIR

Obecność związków wykorzystanych do modyfikacji powierzchni materiałów medycznych zweryfikowano także wykorzystując technikę spektroskopii w podczerwieni. Analizę przeprowadziłam zarówno dla metody modyfikacji przez inkubację w roztworze związków jak i dla metody wykorzystującej wiązanie chemiczne. W każdej grupie pomiarowej uwzględniłam analizę wzorca (związek wykorzystany do modyfikacji powierzchni: Palm-KK-NH_2 i polimyksyna B), analizę próbki materiału o niezmienionej powierzchni oraz analizę materiału poddanego modyfikacji. Przykłady otrzymanych widm zamieściłam na poniższych rycinach (**Rycina 16, 17, 18, 19.**)

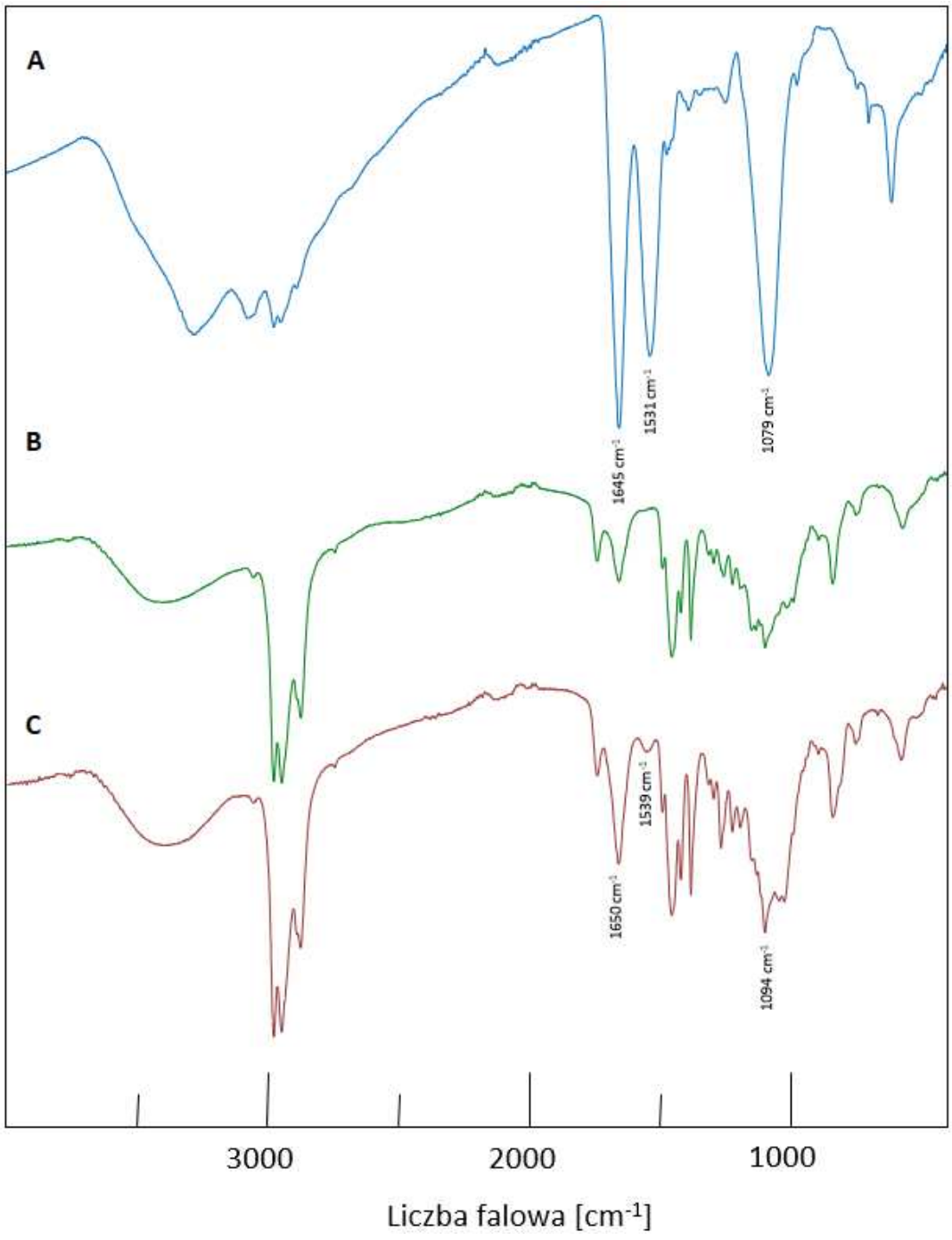
Na **Rycinie 16.** przedstawiłam porównanie widm ATR-FTIR uzyskanych dla analizy powierzchni fragmentów cewnika urologicznego wykorzystując metodę inkubacji w roztworze, gdzie związkiem badanym była polimyksyna B. Dla wzorca (**widmo A**) można wyznaczyć 3 charakterystyczne pasma, których obecność stwierdziłam także w widmie uzyskanym dla próbki zmodyfikowanego materiału. Dane zamieściłam w poniższej tabeli:

Tabela 12. Identyfikacja pasm charakterystycznych dla substancji wzorcowej – polimyksyny B, których obecność stwierdzono na powierzchni zmodyfikowanych fragmentów cewnika.

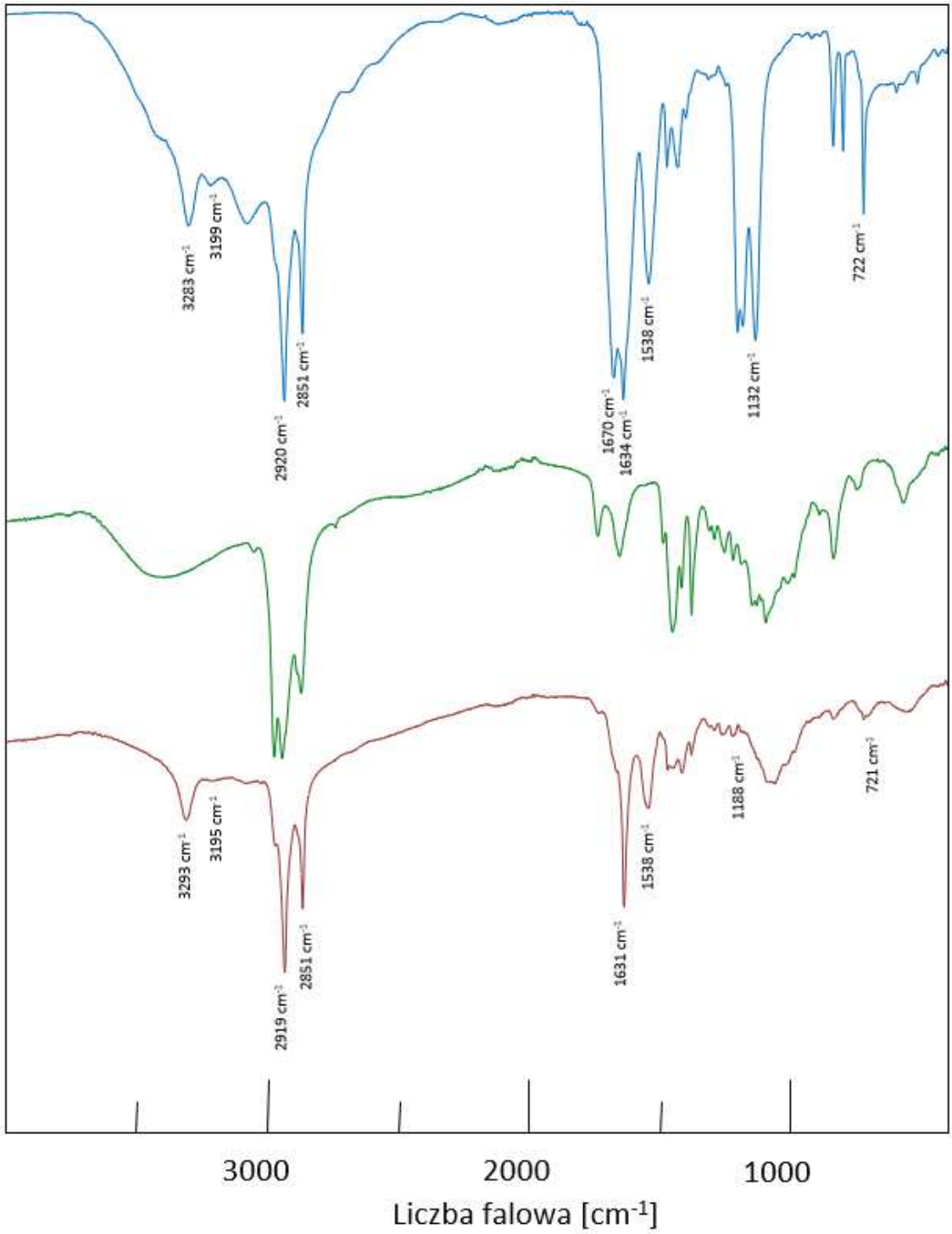
Pasmo charakterystyczne dla wzorca	Rodzaj zidentyfikowanego wiązania	Odpowiadające pasma dla zmodyfikowanego materiału
1654 cm^{-1}	drgania rozciągające wiązania C=O grupy amidowej	1650 cm^{-1}
1531 cm^{-1}	drgania deformacyjne wiązania N-H grupy amidowej	1539 cm^{-1}
1079 cm^{-1}	drgania rozciągające wiązania S-O*	1094 cm^{-1}

* Polimyksyna B wykorzystana w doświadczeniach miała postać siarczanu(VI).

Porównując wartości liczb falowych uzyskanych w toku analizy powierzchni cewnika niezmodyfikowanego i powierzchni cewnika poddanego modyfikacji zauważyć można wzmocnienie charakterystycznych pasm (**Tabela 12**). Niewielkie przesunięcia mogą świadczyć o zachodzeniu interakcji między powierzchnią a badanym związkiem (można spodziewać się, występują oddziaływania wodorowe).



*Rycina 16. Porównanie widm ATR-FTIR uzyskanych dla: **A** – polimyksyny B, **B** – powierzchni cewnika nie poddanego modyfikacji, **C** – powierzchni cewnika zmodyfikowanego metodą inkubacji w roztworze.*



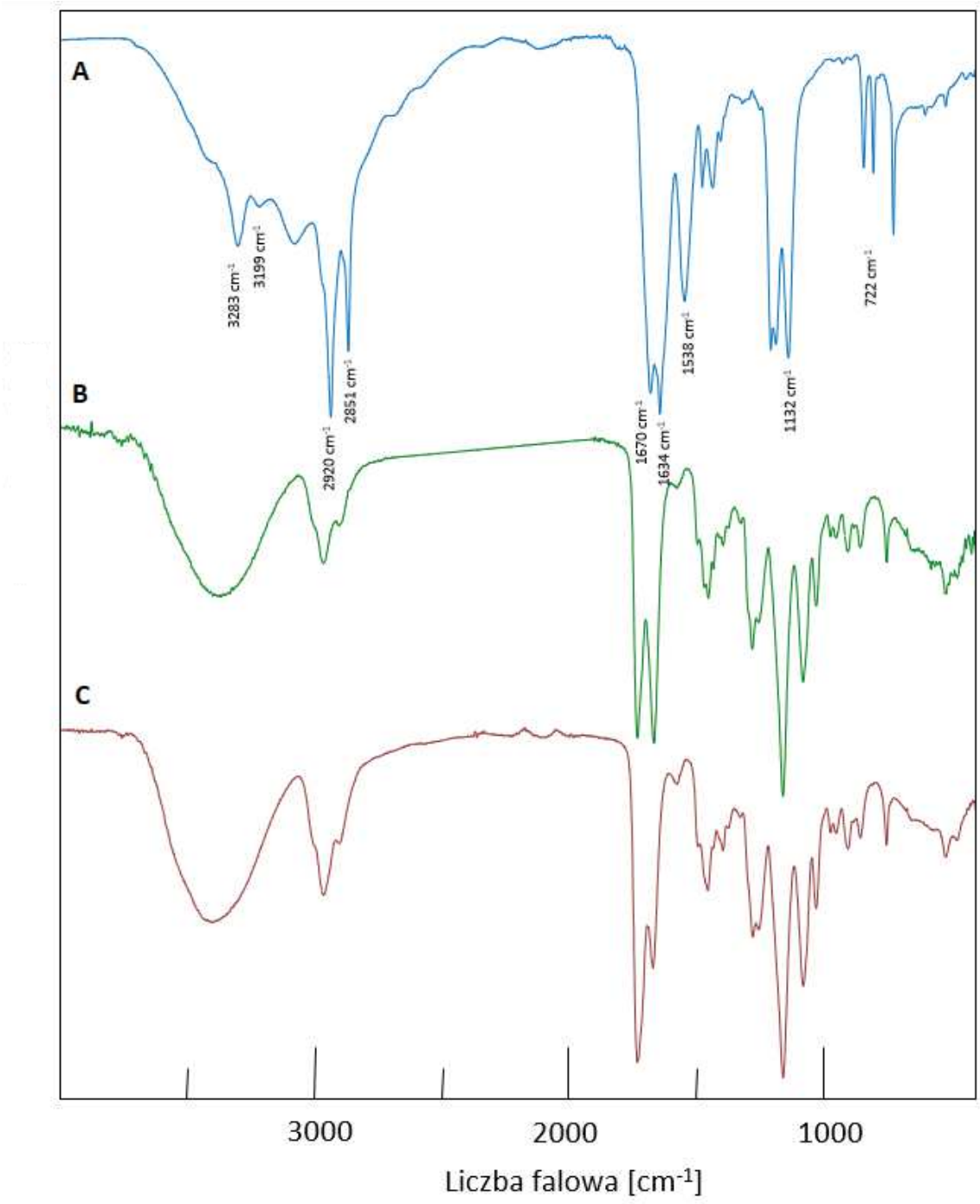
*Rycina 17. Porównanie widm ATR-FTIR uzyskanych dla: **A** – Palm-KK-NH_2, **B** – powierzchni cewnika nie poddanego modyfikacji, **C** – powierzchni cewnika zmodyfikowanego metodą inkubacji w roztworze.*

Porównanie widm otrzymanych przy zastosowaniu Palm-KK-NH_2 znajduje się na **Rycinie 17**. Ponadto, w **Tabeli 12.** zamieściłam opis wyróżniających się pasm wraz z opisem wiązań, które mogą świadczyć o obecności tego lipopeptydu na powierzchni cewnika. W tym przypadku również widoczne są niewielkie przesunięcia pasm oraz ich wzmocnienie.

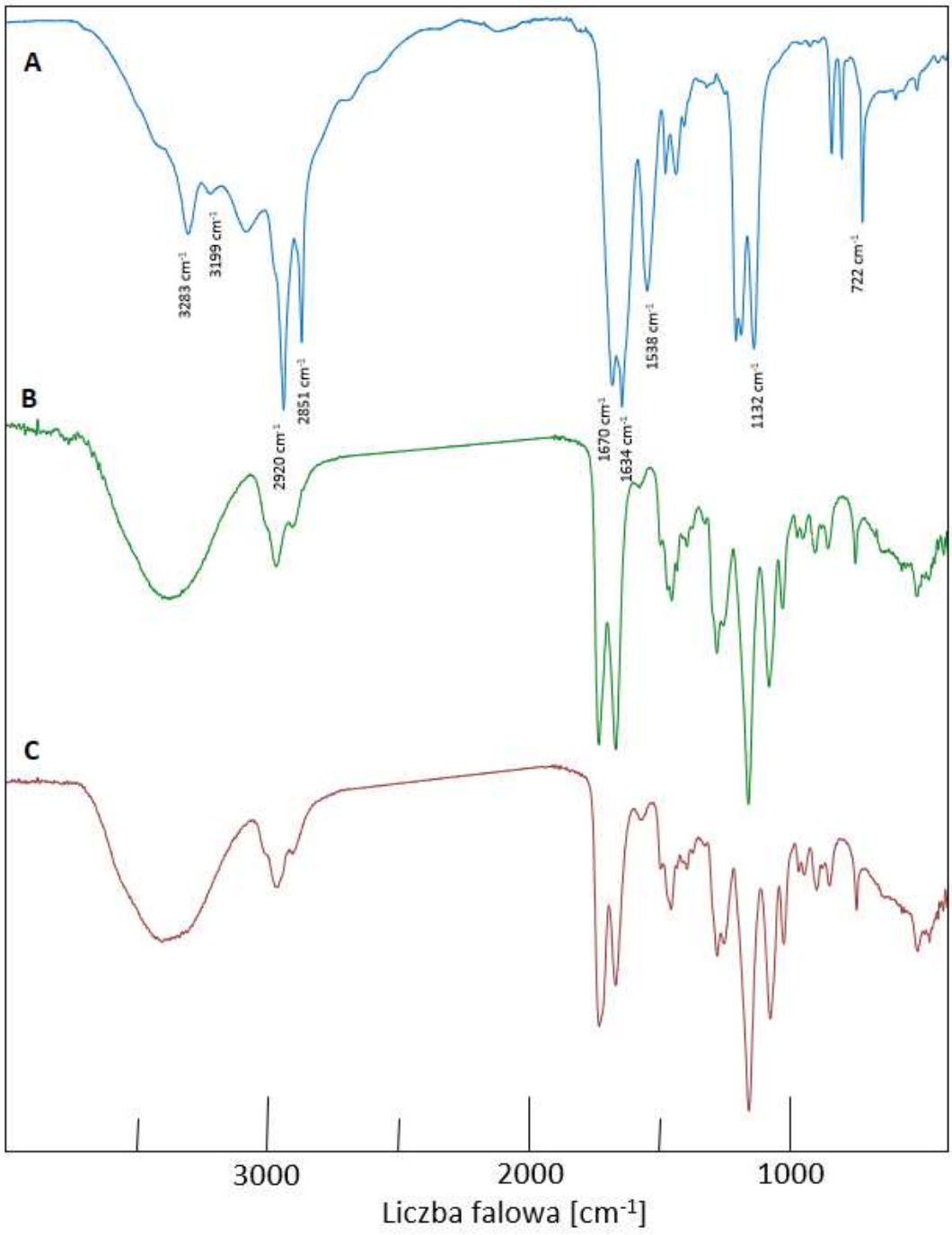
Tabela 12. Identyfikacja pasm charakterystycznych dla substancji wzorcowej – Palm-KK-NH_2, których obecność stwierdzono na powierzchni zmodyfikowanych fragmentów cewnika.

Pasmo charakterystyczne dla wzorca	Rodzaj zidentyfikowanego wiązania	Odpowiadające pasma dla zmodyfikowanego materiału
3283 cm^{-1}, 3199 cm^{-1}	drgania rozciągające wiązania N-H	3283 cm^{-1}, 3199 cm^{-1}
2920 cm^{-1}, 2851 cm^{-1}	drgania rozciągające wiązania C-H	2920 cm^{-1}, 2851 cm^{-1}
1676 cm^{-1}	drgania rozciągające C=O grupy karboksylowej	1670 cm^{-1}
1634 cm^{-1}	drgania rozciągające C=O grupy amidowej	1634 cm^{-1}
1538 cm^{-1}	drgania deformacyjne wiązania N-H grupy amidowej	1538 cm^{-1}
1146 cm^{-1}	drgania deformacyjne wiązania C-H	1132 cm^{-1}
700 cm^{-1}	drgania deformacyjne wiązania N-H	722 cm^{-1}

Badanie wykorzystujące spektroskopię w podczerwieni uwzględniało także analizę widm uzyskanych dla powierzchni soczewek kontaktowych. Rezultaty doświadczeń przeprowadzonych dla modyfikacji poprzez inkubację w roztworze związku (**Rycina 18**) oraz modyfikacji wykorzystującej EDC (**Rycina 19**) przedstawiłam poniżej.



*Rycina 18. Widma ATR-FTIR uzyskane dla: **A** – Palm-KK-NH_2, **B** – powierzchni niezmodyfikowanej soczewki, **C** – powierzchni soczewki po inkubacji w roztworze peptydu.*



*Rycina 19. Widma ATR-FTIR uzyskane dla: **A** – Palm-KK-NH_2, **B** – powierzchni niezmodyfikowanej soczewki, **C** – powierzchni soczewki poddanej modyfikacji z użyciem EDC.*

Porównanie widm uzyskanych dla wzorca oraz widm otrzymanych dla powierzchni soczewek kontaktowych poddanych modyfikacji obiema metodami (**Rycina 18, 19**) świadczy jedynie o wzmocnieniu pasma amidowego, co może potwierdzić obecności substancji przeciwdrobnoustrojowej (w związku z podobnymi wynikami analizy zarówno

dla polimyksyny B jak i lipopeptydu jako przykład uwzględniony w niniejszej pracy wykorzystałam jedynie soczewki poddane modyfikacji z wykorzystaniem Palm-KK-NH_2). Odnosząc się do metodyki przygotowania próbek do pomiaru techniką ATR-FTIR można spodziewać się, że materiał hydrożelowy, z którego wykonane są soczewki, po wysuszeniu zmienił swoje właściwości, co mogło znacząco wpłynąć na otrzymany wynik (zagadnienie zostanie opisane szerzej w **Części V *Dyskusja***).

4. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa zmodyfikowanych materiałów

Wybrane peptydy posłużyły do przeprowadzenia prób zmiany właściwości powierzchni materiałów medycznych tak, aby stały się mniej podatne na kolonizację bakteryjną. W przypadku fragmentów cewnika urologicznego skuteczna okazała się jedynie modyfikacja poprzez inkubację w roztworze związku, natomiast soczewki kontaktowe poddałam dodatkowo modyfikacji chemicznej wykorzystując EDC, który umożliwiał połączenie peptydu z powierzchnią.

Skuteczność przeprowadzonych modyfikacji oraz ich wpływ na adhezję bakteryjną dla próbek materiałów inkubowanych w roztworze związku przeciwdrobnoustrojowego sprawdziłam 3 metodami opisanymi we wcześniejszej części pracy (**Część III, *Część doświadczalna***, **Rozdział 12**): poprzez obserwację zmian w gęstości inokulum, poprzez określenie żywotności komórek oraz poprzez posiew próbek zawiesiny bakteryjnej na agar. W przypadku prób połączenia badanych związków z powierzchnią materiału aktywność modyfikacji także oceniałam na podstawie ewentualnej redukcji wzrostu bakterii.

Badania z wykorzystaniem soczewek kontaktowych prowadziłam wykorzystując związki: Palm-KK-NH_2, K-Dap(Palm)-K-NH_2 oraz polimyksynę B. Redukcja ilości badanych związków została podyktowana dość dużym podobieństwem w aktywnościach całej grupy lipopeptydów oraz próbą zmniejszenia kosztów przeprowadzenia doświadczeń.

Wspomniane niżej wartości stężeń badanych związków odnoszą się do zakresu jaki wykorzystałam w procesach modyfikacji (nie odnoszą się do ilości związku jaki w rzeczywistości pozostał na powierzchni materiału).

4.1 Aktywność modyfikacji przeprowadzonych metodą inkubacji w roztworze

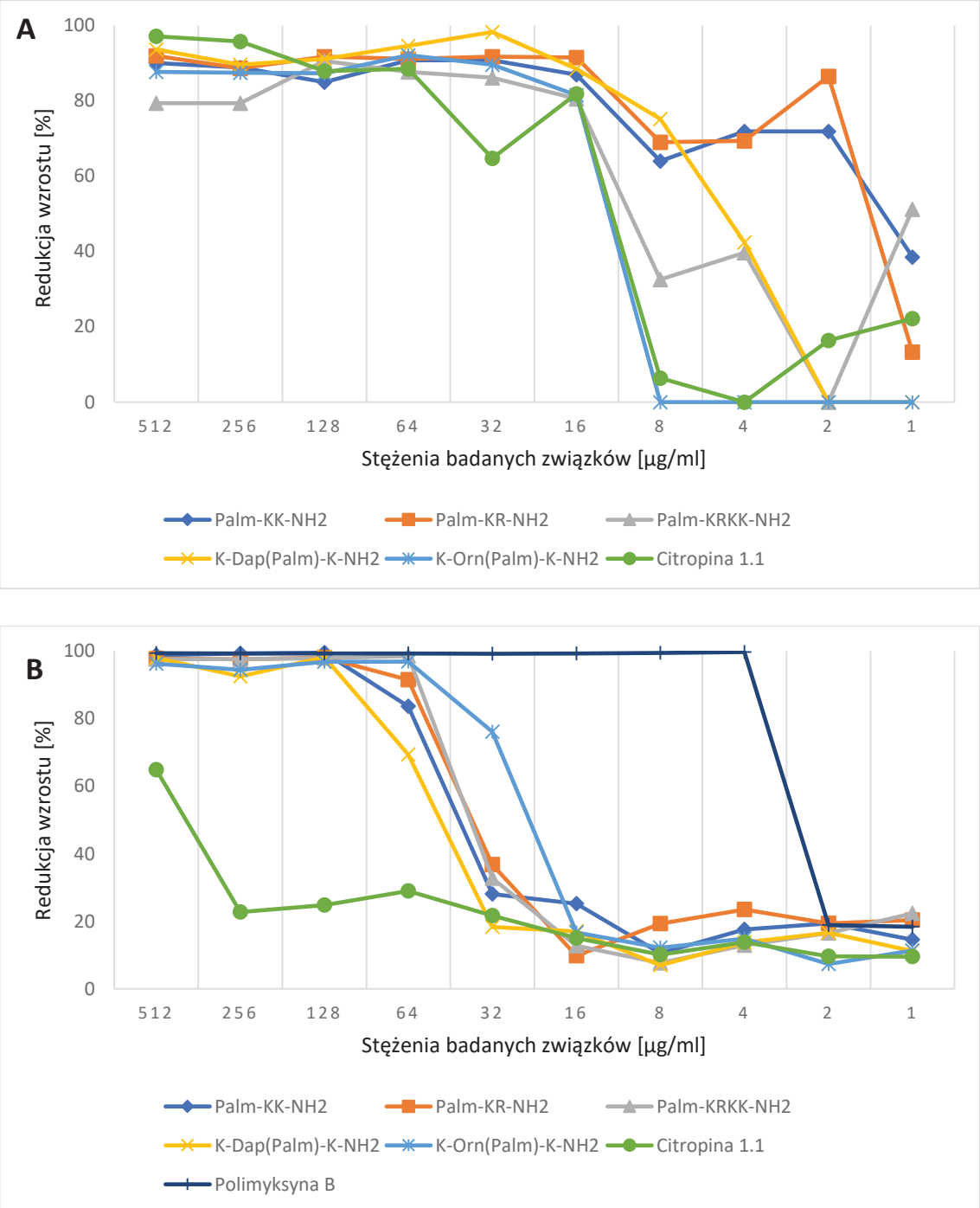
Pierwsze doświadczenie, którego celem było otrzymanie aktywnych mikrobiologicznie materiałów, polegało na przeprowadzeniu modyfikacji powierzchni wykorzystując proces inkubacji w roztworze związku. Poniżej przedstawiłam wyniki opisujące działanie przeciwdrobnoustrojowe fragmentów cewnika i soczewek kontaktowych.

4.1.1 Pomiar gęstości optycznej inokulum

Poziom redukcji wzrostu bakteryjnego po inkubacji zmodyfikowanych fragmentów cewnika w inokulum zaprezentowałam na **Rycinie 20**. W przypadku szczepu *S. epidermidis* (**wykres A**) znaczny spadek ilości komórek bakteryjnych zaobserwowałam dla przedziału stężeń 16–512 µg/ml dla wszystkich wykorzystanych peptydów. Redukcja wzrostu drobnoustrojów osiągała poziom 70–100%. Spośród wybranych związków 3 z nich: Palm-KK-NH_2, Palm-KR-NH_2 oraz K-Dap(Palm)-K-NH_2 powodowały widoczne zahamowanie wzrostu bakterii także w niższym zakresie stężeń obejmującym przedział 1–8 µg/ml.

Na **wykresie B** przedstawiłam wyniki uzyskane po inkubacji fragmentów cewnika w zawiesinie szczepu *E. coli*. Największą redukcję wzrostu wyznaczyłam dla lipopeptydów a jej wartość mieściła się w przedziale 70–100% (stężenia od 64 do 512 µg/ml). Dla niższego przedziału stężeń (1–32 µg/ml) zaobserwowałam wzrost bakterii o ok. 20% mniejszy niż dla kontroli dodatniej, nietraktowanej badanymi związkami. Niską aktywność osiągnęła citropina 1.1, dla której redukcja nie była większa niż ok. 65% dla

stężenia 512 µg/ml. Polimyksyna B w zakresie stężeń 4–512 µg/ml całkowicie hamowała wzrost bakterii (redukcja 100%).

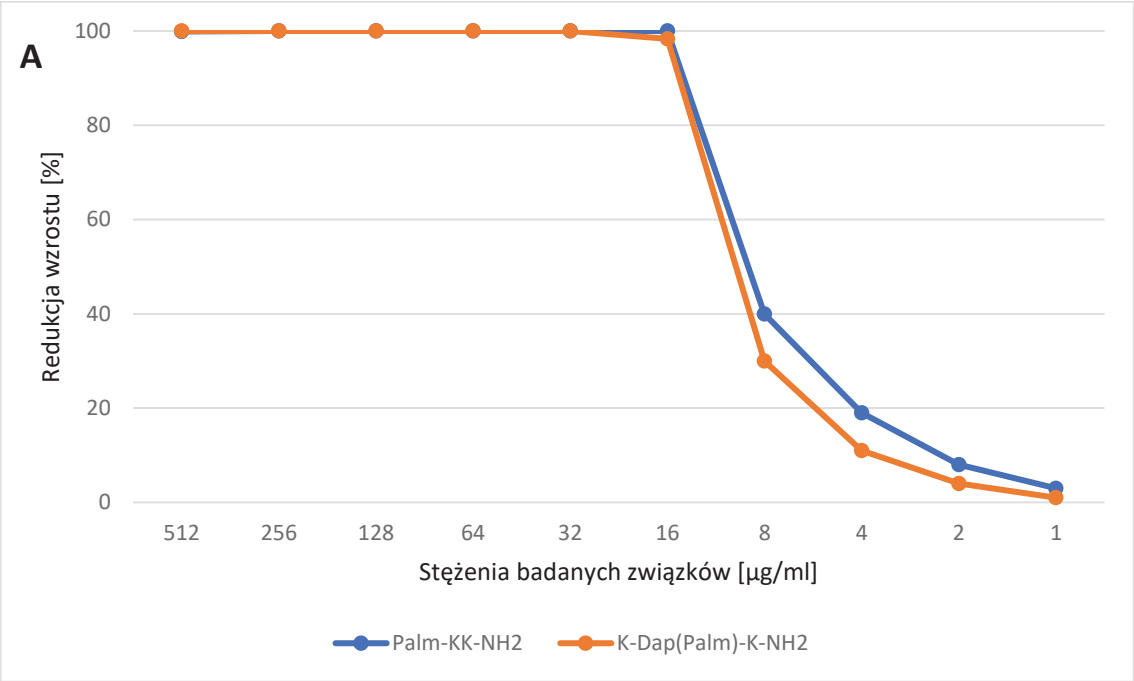


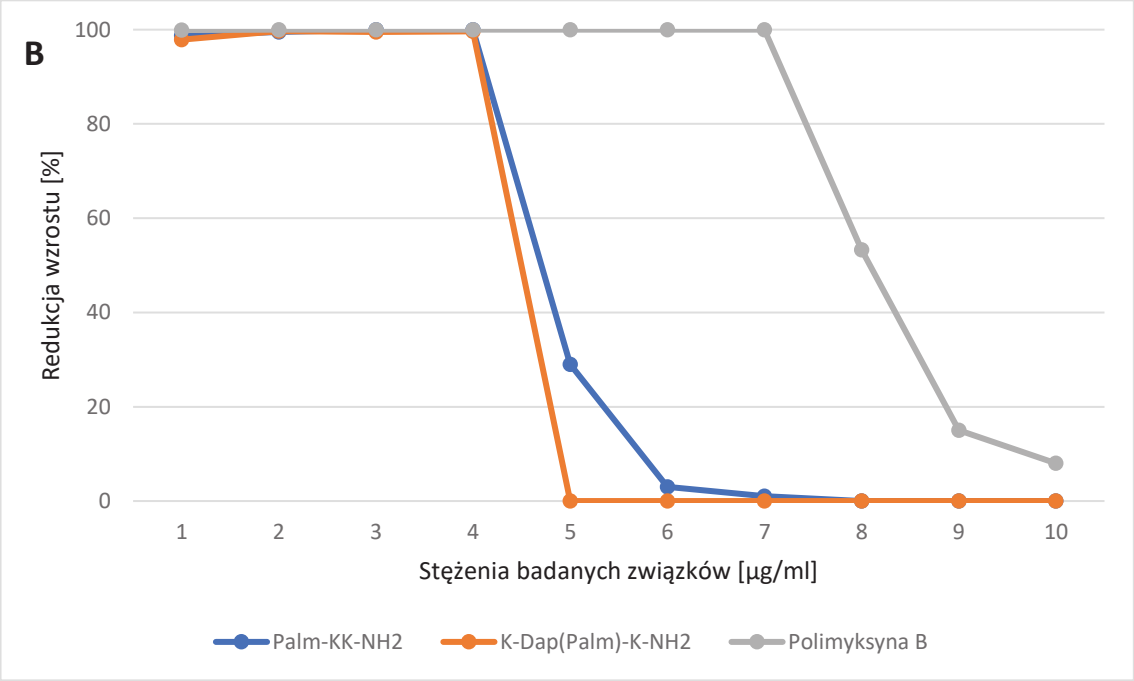
Rycina 20. Redukcja wzrostu drobnoustrojów po inkubacji zmodyfikowanych fragmentów cewnika w inokulum bakteryjnym: ***A – S. epidermidis, B – E. coli****.*

Omówienie wyników

Na **Rycinie 21.** przedstawiłam wpływ inkubacji soczewek kontaktowych o zmodyfikowanej powierzchni na wzrost drobnoustrojów. **Wykres A** jednoznacznie wskazuje na 100% redukcję wzrostu bakterii w zakresie stężeń 16–512 µg/ml zarówno przy zastosowaniu związku Palm-KK-NH_2 jak i K-Dap(Palm)-K-NH_2 do zmiany właściwości powierzchni materiału. Poniżej stężenia 16 µg/ml wpływ obecności lipopeptydów był niewielki.

Redukcja wzrostu dla szczepu Gram-ujemnych (**wykres B**) była widoczna jedynie w zakresie stężeń 64–512 µg/ml. W przypadku polimyksyny B wpływ związku na wzrost bakterii obserwowałam w całym zakresie badanych stężeń (1–512 µg/ml) .





Rycina 21. Redukcja wzrostu drobnoustrojów po inkubacji zmodyfikowanych soczewek kontaktowych w inokulum bakteryjnym: ***A – S. epidermidis, B – E. coli.***

4.1.2 Określenie żywotności komórek za pomocą resazuryny

Aktywność powierzchni wyrobów medycznych zmodyfikowanych badanymi związkami określiłam również wykorzystując odczynnik żywotności komórek – resazurynę. Wpływ materiałów na wzrost bakterii, które miały wcześniej kontakt ze zmodyfikowanymi materiałami oceniałam wizualnie po godzinnej inkubacji inokulum z roztworem barwnika. Jeśli zabarwienie w studzience płytki pozostało niebieskie świadczyło to o przeciwdrobnoustrojowej aktywności powierzchni. W przypadku zmiany barwy na różową wynik interpretowałam jako brak wpływu na wzrost bakterii.

W **Tabeli 13.** przedstawiłam wyniki uzyskane dla doświadczenia przeprowadzonego dla zmodyfikowanych fragmentów cewnika urologicznego. Uwzględnione stężenia związków to najniższe wartości, przy których nie obserwowałam obecności żywych komórek drobnoustrojów (studzienka pozostała niebieska).

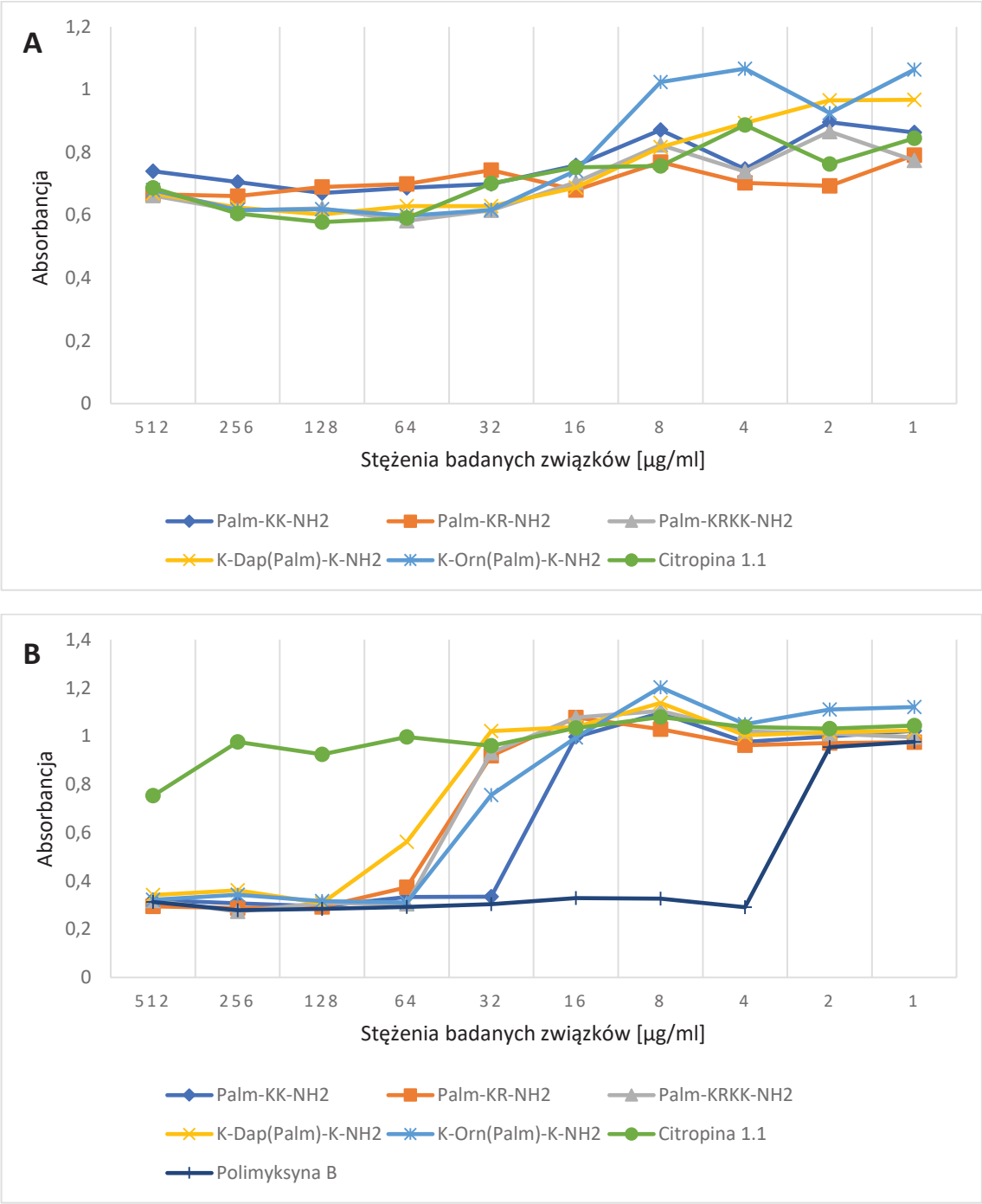
Tabela 13. Stężenia [µg/ml], przy których wzrost drobnoustrojów był zahamowany wyznaczone dla zmodyfikowanej powierzchni fragmentów cewnika. Odczyt wizualny za pomocą resazuryny, inkubacja 1 h, 37°C.

	S. epidermidis	***E. coli***
Citropina 1.1	256	> 512
Palm-KK-NH_2	32	32
Palm-KR-NH_2	16	64
Palm-KRKK-NH_2	32	64
K-Dap(Palm)-K-NH_2	16	128
K-Orn(Palm)-K-NH_2	32	64
Polimyksyna B	-	4

Najwyższą aktywność w stosunku do szczepu Gram-dodatniego dla zmodyfikowanych powierzchni cewnika uzyskałam wykorzystując Palm-KK-NH_2 oraz K-Dap(Palm)-K-NH_2. Fragmenty cewnika po inkubacji w roztworach wspomnianych lipopeptydów o stężeniu 16 µg/ml wciąż wykazywały działanie przeciwdrobnoustrojowe. Spośród badanych lipopeptydów najwyższą aktywność

w stosunku do szczepu *E. coli* uzyskałam dla materiału modyfikowanego z wykorzystaniem roztworu Palm-KK-NH_2 o stężeniu 32 µg/ml. Jednocześnie dla żadnego ze związków nie otrzymałam wyników porównywalnych do aktywności polimyksyny B. Fragment cewnika inkubowany w roztworze antybiotyku o stężeniu 4 µg/ml wykazał wysoką efektywność w eliminacji drobnoustrojów. Powierzchnia zmodyfikowana z wykorzystaniem citropiny 1.1 charakteryzowała się brakiem aktywności w stosunku do obu testowanych szczepów.

Poza oceną wizualną polegającą na obserwacji zmiany zabarwienia resazuryny dokonałam także pomiaru absorbancji rezorufiny (produkt metabolizmu resazuryny), której powstawanie związane jest z obecnością żywych komórek bakterii. Wyniki pomiaru spektrofotometrycznego przedstawiłam na **Rycienie 22.** Absorbancja rosnąca wraz z malejącym stężeniem związku świadczy o wzrastającym udziale żywych mikroorganizmów w próbce. Uzyskane rezultaty odpowiadają wynikom odczytanym metodą wizualną.



Rycina 22. Wartości absorbancji zmierzone przy długości fali 575 nm dla rezorufiny: ***A – S. epidermidis, B – E. coli****.*

Poza cewnikiem urologicznym testy skuteczności modyfikacji przeprowadziłam wykorzystując soczewki kontaktowe. W **Tabeli 14**. zebrałam wyniki wyznaczone na podstawie zmiany barwy resazuryny. Podobnie jak w przypadku fragmentów cewnika, wartości stężeń, przy których powierzchnia soczewek wykazywała działanie przeciwdrobnoustrojowe są bliskie wartościom MBEC.

Tabela 14. Stężenia [µg/ml], przy których wzrost drobnoustrojów był zahamowany wyznaczone dla zmodyfikowanej powierzchni soczewek. Odczyt wizualny za pomocą resazuryny, inkubacja 1 h, 37°C.

	S. epidermidis	***E. coli***
Palm-KK-NH_2	32	64
K-Dap(Palm)-K-NH_2	32	64
Polimyksyna B	-	16

4.1.3 Obserwacja wzrostu kolonii bakteryjnych

Podsumowanie obserwacji wzrostu kolonii bakteryjnych na podłożu stałym przedstawiają poniższe tabele (**Tabela 15, 16**). Ocenę redukcji przeprowadzałam w odniesieniu do posiewu próbki, w której drobnoustroje nie miały kontaktu ze zmodyfikowanym materiałem. Próbki pobierałam jedynie z tych studzienek płytki 24-dołkowej, gdzie znajdowały się materiały wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową.

W celu łatwiejszego opisu wyników zastosowałam oznaczenia jak przedstawiono poniżej:

Liczba – CFU

BW – brak wzrostu bakterii

WR – widoczna redukcja (kolonie trudne do policzenia)

BR – brak redukcji

Tabela 15. Ocena wzrostu drobnoustrojów z próbek pobranych po inkubacji zmodyfikowanych fragmentów cewnika w inokulum bakteryjnym przeprowadzona dla stężeń 16–512 µg/ml.

	S. epidermidis						***E. coli***					
	512	**256**	**128**	**64**	**32**	**16**	**512**	**256**	**128**	**64**	**32**	**16**
Citropina 1.1	WR	WR	BR	BR	BR	BR	2	BW	BW	BR	BR	BR
Palm-KK-NH_2	BW	BW	BW	BW	BW	BR	BW	BW	BW	BR	BR	BR
Palm-KR-NH_2	BW	BW	BW	BW	2	BR	1	BW	2	3	BR	BR
Palm-KRKK-NH_2	BW	BW	BW	BW	32	BR	BW	BW	BR	BR	BR	BR
K-Dap(Palm)-K-NH_2	BW	BW	BW	BW	45	WR	WR	WR	WR	WR	BR	BR
K-Orn(Palm)-K-NH_2	BW	BW	BW	BW	15	BR	BR	BR	BR	BR	BR	BR
Polimyksyna B	-	-	-	-	-	-	BW	BW	BW	12	BW	BW

Wyniki posiewów próbek pobranych po inkubacji zmodyfikowanych fragmentów cewnika w zawiesinie bakteryjnej (**Tabela 15**) także pokrywają się z aktywnościami związków wyznaczonymi metodami opisanymi we wcześniejszych podrozdziałach (**Podrozdział 4.1.1**, **4.1.2**). Wyjątkiem są obserwacje wzrostu kolonii szczepu *E. coli*. Dla większości związków zidentyfikowałam wzrost licznych kolonii lub brak redukcji przy stężeniu 64 µg/ml, gdzie test z resazuryną wskazywał na aktywność modyfikacji. Hodowle na podłożu stałym potwierdzają niską aktywność mikrobiologiczną fragmentów cewnika zmodyfikowanych poprzez inkubację w roztworze citropiny 1.1 zarówno wobec szczepu *S. epidermidis* jak i szczepu *E. coli*. Dodatkowo, wyniki świadczą o wysokiej skuteczności zastosowania polimyksyny B.

W poniższej tabeli (**Tabela 16**) znajdują się wyniki otrzymane dla zmodyfikowanych soczewek kontaktowych. W przypadku szczepu *S. epidermidis* znaczną redukcję wzrostu zauważyłam dla lipopeptydu Palm-KK-NH_2. Mniejsza ilość kolonii bakteryjnych była widoczna także dla materiału inkubowanego w roztworze związku o stężeniu poniżej 32 µg/ml. Wyniki oceny wzrostu na podłożu stałym dla szczepu *E. coli* odpowiadają wynikom wyznaczonym przy pomocy resazuryny.

Tabela 16. Ocena wzrostu drobnoustrojów z próbek pobranych po inkubacji zmodyfikowanych soczewek kontaktowych w inokulum bakteryjnym przeprowadzona dla stężeń 16–512 µg/ml.

	S. epidermidis						***E. coli***					
	512	**256**	**128**	**64**	**32**	**16**	**512**	**256**	**128**	**64**	**32**	**16**
Palm-KK-NH_2	BW	BW	BW	46	100	WR	BW	BW	BW	6	BR	BR
K-Dap(Palm)-K-NH_2	BW	BW	BW	59	62	BR	BW	BW	BW	BW	BR	BR
Polimyksyna B	-	-	-	-	-	-	BW	BW	BW	BW	6	BR

Porównanie rezultatów doświadczeń mikrobiologicznych przeprowadzonych dla materiałów o powierzchniach zmodyfikowanych metodą inkubacji w roztworze z wcześniej opisanymi analizy potwierdzającymi obecność badanych związków na powierzchniach fragmentów cewnika oraz soczewek można przypuszczać, że efekt bakteriobójczy związany jest z uwalnianiem zaadsorbowanych cząsteczek peptydów. Obserwacja ta zostanie omówiona w **Części V *Dyskusja*** niniejszej rozprawy.

4.2 Aktywność powierzchni materiału zmodyfikowanej za pomocą wiązania chemicznego

Podobnie jak w przypadku określania aktywności modyfikacji przeprowadzonych metodą inkubacji w roztworze do testów mikrobiologicznych powierzchni otrzymanych z wykorzystaniem EDC wykorzystałam inokulum o gęstości 0,1 McFarlanda, a podstawą oceny były zmiany ilości komórek drobnoustrojów. W związku z faktem, iż metoda modyfikacji poprzez wytworzenie wiązania kowalencyjnego obejmowała jedynie soczewki kontaktowe oraz 3 związki omówienie testów mikrobiologicznych zebrano w jednym podrozdziale.

Wynik pomiaru gęstości optycznej zawiesiny bakteryjnej świadczą o wysokim stopniu redukcji wzrostu mikroorganizmów w obecności próbek zmodyfikowanych materiałów. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa zastała potwierdzona dla obu szczepów: *S. epidermidis* i *E. coli* oraz wszystkich zastosowanych związków: Palm-KK-NH_2, K-Dap(Palm)-K-NH_2 i polimyksyny B.

Tabela 17. Poziom redukcji wzrostu bakterii (%) uzyskany przy zastosowaniu soczewek kontaktowych zmodyfikowanych metodą wykorzystującą EDC.

	S. epidermidis	***E. coli***
Palm-KK-NH_2	98	98
K-Dap(Palm)-K-NH_2	98	97,5
Polimyksyna B	-	99

Wyniki potwierdziłam także pobierając próbki inokulum po zakończonej inkubacji z materiałem i wykonując posiewy. Obserwowałam brak wzrostu kolonii drobnoustrojów w próbkach, które pobrałam z inokulum po inkubacji ze zmodyfikowanymi materiałami. Rezultaty te korespondują z wynikami otrzymanymi dzięki pomiarowi spektrofotometrycznemu. Tak znaczna redukcja wzrostu może świadczyć o kontaktowym działaniu bójczym otrzymanych powierzchni, co zostanie omówione w dalszej części pracy.

Aktywność przeciwadhezyjną zmodyfikowanych soczewek określiłam posiewając próbki bakterii usuniętych z powierzchni materiału wykorzystując ultradźwięki. Analiza opisanych powyżej wyników sugerowała, że nie należy spodziewać się wystąpienia adhezji bakteryjnej i zapoczątkowania powstawania biofilmu, ze względu na aktywność bakteriobójczą zmodyfikowanych materiałów. Wyniki posiewów uzyskane dla obu wykorzystanych szczepów oraz badanych związków potwierdziły brak żywych komórek bakteryjnych.

V. DYSKUSJA

Nowoczesna medycyna zmaga się z wieloma problemami związanymi z rozwojem cywilizacyjnym. Jednym z nich jest coraz większa selekcja szczepów opornych na antybiotyki, które rutynowo stosowane są w terapii infekcji bakteryjnych. Sytuacja ta jest niebezpieczna także ze względu na spowolnienie prac związanych z wprowadzaniem nowych substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej [127]. Obecnie dużo uwagi poświęca się zakażeniom spowodowanym stosowaniem materiałów medycznych oraz związanym z nim problemem powstawania biofilmu bakteryjnego i jego eliminacji.

Celem niniejszej rozprawy było zbadanie możliwości zastosowania wybranych związków z grupy peptydów przeciwdrobnoustrojowych w modyfikacji powierzchni komercyjnie dostępnych materiałów medycznych. Główną motywacją do przeprowadzenia doświadczeń była szeroko opisana w literaturze wysoka aktywność przeciwdrobnoustrojowa AMPs oraz próba wykorzystania ich w zapobieganiu kolonizacji materiałów medycznych.

W pierwszym etapie prowadzonych prac wykonałam podstawowe testy mikrobiologiczne peptydów uwzględniające oznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost mikroorganizmów oraz wpływ tych związków na strukturę biofilmu. Największą grupę związków stanowiły krótkie, syntetyczne lipopeptydy. W celu porównania ich aktywności wykorzystałam także naturalnie występujący peptydu – citropinę 1.1 oraz antybiotyk stosowany w lecznictwie – polimyksynę B. Ostatni z wymienionych związków został włączony do badań także ze względu na postępującą oporność bakterii na jego stosowanie. Polimyksyny wykorzystywane są w terapii w przypadku identyfikacji zakażeń spowodowanych obecnością wielolekoopornych drobnoustrojów. Na przestrzeni lat obserwuje się jednak spadek skuteczności tych antybiotyków [128]. Ze względu na fakt, iż największa grupę badanych związków stanowiły lipopeptydy dalsza część dyskusji będzie skupiona przede wszystkim na omówieniu ich aktywności i możliwości wykorzystania.

Krótkie lipopeptydy należą do jednej z najbardziej aktywnych grup peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Rezultaty przeprowadzonych przeze mnie doświadczeń

omawiane w **Części IV *Omówienie wyników*, Rozdział 1** niniejszej pracy świadczą o wysokiej skuteczność krótkich lipopetydów w hamowaniu wzrostu form wolnopływających drobnoustrojów. W przypadku prowadzonych przeze mnie testów najbardziej wrażliwym drobnoustrojem okazał się gronkowiec skórny (*S. epidermidis*). Wysoką aktywność związków potwierdzają nie tylko otrzymane przeze mnie wyniki, ale także liczne doniesienia literaturowe. Jedno z doświadczeń opisuje wykorzystanie krótkich lipopeptydów z resztami kwasu palmitynowego, mirystynowego i laurynowego oraz ich aktywność przeciwdrobnoustrojową i hemolityczną. Podobnie do omawianych przeze mnie rezultatów badań największą aktywność peptydy wykazały w stosunku do szczepu Gram-dodatniego, w tym przypadku – gronkowca złocistego. Opisane w przytaczanej pracy wyniki potwierdzają także wpływ długości łańcucha kwasu tłuszczowego na aktywność lipopeptydów – bardziej korzystne okazało się zastosowanie reszty kwasu palmitynowego [129]. Analizując wartości stężeń, które wyznaczyłam w testach MIC, wyraźnie widoczny jest wzrost aktywności związków Laur-KR-NH_2, Mir-KR-NH_2 i Palm-KR-NH_2 w zależności od użytego kwasu tłuszczowego w kolejności C_{12} < C_{14} < C_{16}. Podobną obserwację przedstawiono w pracy opisującej aktywność mikrobiologiczną lipopeptydów posiadających w sekwencji głównie reszty lizyny (2 – 4). Najbardziej obiecujące wyniki otrzymano dla związków zmodyfikowanych resztą kwasu palmitynowego. Ponadto, w pracy opisano wyniki oznaczeń MIC dla peptydu Palm-KK-NH_2, których wartości korespondują z otrzymanymi przeze mnie wynikami [130]. W literaturze można także odnaleźć informacje świadczące o spadku aktywności przeciwdrobnoustrojowej przy zastosowaniu kwasy palmitynowego. Opisywane są badania, w których oznaczono działanie związków zawierających w sekwencji 2 reszty ornityny i 2 reszty tryptofanu oraz resztę jednego z kwasów tłuszczowych (C_6 – C_{16}). W tym przypadku aktywność peptydu była wyższa dla zastosowania kwasu laurynowego. Sugerować to może wpływ udziału poszczególnych reszt aminokwasowych na aktywność przeciwdrobnoustrojową [131].

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej związane są bezpośrednio z zagadnieniem powstawania biofilmu bakteryjnego. Liczne prace naukowe donoszą o możliwościach zastosowania krótkich lipopeptydów w eliminacji struktury. Peptydy Mir-KK-NH_2 oraz Mir-RRR-NH_2 skutecznie zwalczały biofilm

utworzony przez szczepy *S. aureus*. Dodatkowo, Mir-KK-NH_2 okazał się bardziej efektywny w eradykcji struktury niż antybiotyk konwencjonalny – wankomycyna [132]. Grupa lipopeptyów, którą uwzględniłam w badaniach także wykazała wysoką aktywność, zarówno w zapobieganiu powstawania biofilmu jak i jego eradykacji. W odróżnieniu od wyników przytoczonych w literaturze wykorzystany przeze mnie antybiotyk – polimyksyna B – w przypadku szczepu *E. coli* działał bardziej skutecznie niż zastosowane krótkie lipopeptydy. Kolejna z prac opisuje aktywność grupy peptydów z resztami kwasu palmitynowego. Otrzymane wartości MBEC dla testowanych szczepów gronkowca złocistego mieszczą się w zakresie 32–128 µg/ml. Odnosząc opisywaną aktywność do otrzymanych przeze mnie wyników grupa związków, którą wybrałam do badań charakteryzuje się wyższą aktywnością wobec szczepu *S. aureus* (16–32 µg/ml) [133].

Oddzielną część niniejszej pracy poświęcono na omówienie testów cytotoksyczności wybranej grupy lipopeptydów. W ramach badań dokonałam wstępnej oceny bezpieczeństwa zastosowania tych związków. Opisane wyniki wskazują na brak toksyczność peptydów w zakresach ich aktywność przeciwdrobnoustrojowej i rezultaty te pokrywają się zarówna dla testu hemolizy krwinek czerwonych jak i dla testu określającego przeżywalność komórek mysich fibroblastów (**Tabela 10, 11**). Hemoliza nie przekraczała 16% dla większości testowanych związków poza Palm-KK-NH_2 i Palm-KR-NH_2, które powodowały 100% hemolizy przy stężeniu 64 µg/ml będącym równocześnie stężeniem aktywnym przeciwbiofilmowo dla tych lipopeptydów. Wysoki stopień oddziaływania peptydu Palm-KK-NH_2 z ludzkimi krwinkami czerwonymi został opisany w literaturze. Spośród omawianej grupy związek składający się z reszty kwasu palmitynowego oraz 2 reszt lizyny okazał się najbardziej toksyczny [132]. Wyniki testów wykorzystujących linie komórkowe zwracają uwagę na wysoką cytotoksyczność lipopeptydów, co uznawane jest za ich największe ograniczenie. Jedna z prac dotyczących aktywności mikrobiologicznej grupy peptydów przeciwdrobnoustrojowych uwzględniającej Palm-KK-NH_2 opisuje także testy toksyczności na linii keratynocytów ludzkich HaCaT. Wykorzystany lipopeptyd charakteryzował się największą toksycznością spośród wybranych związków [134]. W tym przypadku wysoka cytotoksyczność

lipopeptydów w stosunku do komórek ludzkich może być związana z nieselektywnym oddziaływaniem kwasu palmitynowego z błoną komórkową bakterii [135].

Mimo opisywanej toksyczności peptydy przeciwdrobnoustrojowe wciąż pozostają szeroko rozwijana grupą związków ze względu na wiele potencjalnych możliwości ich zastosowania, także w terapii infekcji związanych z biofilmem. W **Części I *Część teoretyczna*** (**Podrozdział 5.4**) zostały omówione możliwości wykorzystania AMPs jako środków, które mogą być skuteczne w zapobieganiu powstawania biofilmu na powierzchni materiałów medycznych. Przytoczone przykłady świadczą o dużym potencjale peptydów przeciwdrobnoustrojowych w pracach nad opracowywaniem biomateriałów o lepszych właściwościach. Przegląd literatury dotyczący możliwości zastosowania AMPs w zapobieganiu infekcjom bakteryjnym związanym z wykorzystaniem biomateriałów potwierdza celowość przeprowadzonych przeze mnie doświadczeń. W trakcie prac badawczych jako materiał testowy wykorzystałam komercyjnie dostępne cewniki urologiczne oraz soczewki kontaktowe. Dane źródłowe podają, że infekcje układu moczowego spowodowane cewnikowaniem stanowią ok. 70-80% zakażeń związanych z opieką zdrowotną [136]. W przypadku soczewek najczęściej diagnozowanym problemem jest bakteryjne zapalenie rogówki, które może dotyczyć nawet 25% użytkowników [137].

Równocześnie z prowadzeniem badań mikrobiologicznych wykonałam analizy wykorzystujące technikę chromatografii cieczowej oraz technikę spektroskopii w podczerwieni w celu potwierdzenia obecności wykorzystanych związków na powierzchniach zmodyfikowanych materiałów. Większość uzyskanych wyników pozwala wnioskować o powodzeniu przeprowadzonych zmian właściwości próbek cewnika urologicznego i soczewek kontaktowych (**Część IV *Omówienie wyników*, Podrozdziały 3.1, 3.2**). W związku z niską granicą wykrywalności metody zastosowanej w oznaczeniach HPLC nie było możliwości, aby obserwować ilość związanej/uwolnionej substancji przeciwdrobnoustrojowej. Obecność związku mogła zostać potwierdzona dla próbek, które pobrano dla materiałów modyfikowanych w wysokich stężeniach. Dotyczyło to metody poprzez inkubację w roztworze i może świadczyć o zachodzeniu adsorpcji fizycznej. Dane literaturowe potwierdzają możliwość tego typu związania się AMPs z powierzchnią. Cechą charakterystyczną adsorpcji jest stopniowe uwalnianie się

przyłączonych cząsteczek związków [138]. Analizy widm ATR-FTIR potwierdziły związanie się peptydów z powierzchnią materiałów. Otrzymane wyniki sugerują, że związki uległy adsorpcji, co widoczne jest zwłaszcza dla materiałów poddanych procesowi inkubacji w roztworach peptydów. Analiza widm uzyskanych dzięki zastosowaniu spektroskopii w podczerwieni dla wzorców związków oraz badanych powierzchni może świadczyć o zachodzeniu interakcji między matrycą a peptydami (przesunięcia charakterystycznych pasm). Opisane przeze mnie wyniki nie potwierdziły jednoznacznie obecności związków na powierzchni soczewek kontaktowych zmodyfikowanych poprzez inkubację oraz wykorzystując EDC. Porównując materiał nie poddany modyfikacji z materiałem zmodyfikowanym obserwowałam jedynie wzmocnienie pasma amidowego. Otrzymane wyniki mog być związane ze zmianami właściwości materiału pod wpływem procesu suszenia, który jest niezbędny do odpowiedniego przygotowania próbek do analiz ATR-FTIR. Hydrożel, z którego wykonane są soczewki, po odparowaniu wody, przybiera postać odpowiadającą kserożelowi. Materiał traci elastyczność i twardnieje, stając się jednocześnie kruchym [139].

We wcześniejszej części pracy omówiono strategie jakie wykorzystuje się w celu zapobiegania kolonizacji bakteryjnej powierzchni implantów lub urządzeń medycznych wykorzystując peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Podejścia te obejmują m. in. wykorzystanie AMPs w kontrolowanych systemach uwalniających substancje o aktywności przeciwbakteryjnej ze specjalnie zaprojektowanej powłoki lub zmiany właściwości fizykochemicznych powierzchni materiałów medycznych. Opracowuje się także warstwy składające się z peptydu związanego z powierzchnią, której działanie opiera się na kontaktowej eliminacji komórek bakteryjnych. Wybrane przeze mnie metody modyfikacji opierały się na powierzchniowych oddziaływaniach matrycy z badanymi związkami, co w konsekwencji miało prowadzić do zmiany właściwości wybranych materiałów.

Wykorzystałam metodę modyfikacji powierzchni poprzez inkubację próbek w roztworach peptydów oraz modyfikację polegającą na wytworzeniu się wiązania kowalencyjnego. Oba protokoły obejmowały także wykorzystanie antybiotyku – polimyksyny B. Użycie procesu inkubacji w modyfikacji biomateriałów za pomocą AMPs

opisują dane literaturowe, co potwierdza, że metoda ta może być skuteczna. Za przykład może posłużyć praca, w której opisano immobilizowanie peptydu na powierzchni hydroksyapatytu. Analogicznie do wykorzystanego przeze mnie protokołu (**Rozdział 9.**) stosowano roztwory związków w PBS, a czas inkubacji obejmował 12 godzin. Zmiana, którą wprowadziłam dotyczyła temperatury inkubacji. W przypadku wykonanych przeze mnie testów temperatura pokojowa (ok. 25°C) nie miała pozytywnego wpływu na łączenie się związków z powierzchnią materiałów. Z tego względu wyniki te nie zostały przedstawione w niniejszej pracy. Proces inkubacji przeprowadzałam w temperaturze 37°C. Wyniki testów mikrobiologicznych dla zmodyfikowanego hydroksyapatytu potwierdzają jego aktywność w hamowaniu wzrostu bakteryjnego szczepów klinicznych *S. aureus* [123].

Druga z zastosowanych metod modyfikacji polegała na wykorzystaniu właściwości materiału etafilcon A, z którego wykonane są użyte przeze mnie soczewki kontaktowe. Materiał hydrożelowy, który zastosowano do ich produkcji posiada grupy kwasu karboksylowego, co umożliwia kowalencyjne wiązanie grup aminowych peptydów. Skuteczność tego typu, chemicznego przyłączenia związków potwierdzają dane literaturowe. Soczewki kontaktowe zmodyfikowane poprzez związanie peptydu – meliminy – charakteryzowały się zredukowanym wzrostem szczepu *P. aeruginosa* [124]. Innym przykładem efektywnego działania peptydu przyłączonego do powierzchni hydrożelowej jest wykorzystanie związku HHC10, który powodował redukcję adhezji bakteryjnej szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis* [134].

Analizując podane powyżej przykłady, omówione metody przyłączania AMPs do powierzchni są skuteczne, a otrzymane materiały nabywają właściwości, które wpływają na redukcję adhezji bakteryjnej. Wyniki opisane w **Części IV *Omówienie wyników*, Rozdział 4**. nawiązują do przedstawionych wniosków i potwierdzają aktywność przeciwdrobnoustrojową zmodyfikowanych materiałów. Odwołując się do wspomnianych wcześniej strategii zapobiegania kolonizacji bakteryjnej materiałów medycznych można wnioskować o możliwych oddziaływaniach między zmodyfikowaną powierzchnią a komórkami drobnoustrojów. W tym celu pomocne są także otrzymane wyniki analiz chromatograficznych i spektroskopowych. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa otrzymanych przeze mnie materiałów polegała nie tylko na

zapobieganiu procesowi adhezji. Widoczne było również działanie bakteriobójcze otrzymanych powierzchni, co potwierdza m. in. znaczna redukcja wzrostu mikroorganizmów po inkubacji zmodyfikowanych próbek w zawiesinie bakteryjnej. Fakty te mogą świadczyć o uwalnianiu cząsteczek związanych substancji przeciwdrobnoustrojowych. W przypadku powierzchni hydrożelowych zawierających przyłączone kowalencyjnie AMPs przypisywany im mechanizm działania polega na kontaktowym niszczeniu komórek bakteryjnych (drobnoustroje eliminowane są po zetknięciu się ze zmodyfikowaną powierzchnią). Sposób, w jaki peptydy wpływają na mikroorganizmy, jest wówczas podobny do tego, jaki charakterystyczny jest dla peptydów przeciwdrobnoustrojowych, których cząsteczki znajdują się wolno rozproszone w środowisku bakterii. Ich działanie opera się przede wszystkim na oddziaływaniu z błoną komórkową [115].

Podstawowe testy mikrobiologiczne oraz metoda modyfikacji powierzchni poprzez inkubację w roztworze peptydu uwzględniały wykorzystanie citropiny 1.1 oraz polimyksyny B. W przypadku pierwszego z wymienionych związków, mimo wysokiej aktywności w stosunku do form wolnopływających drobnoustrojów (dla szczepów *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* wartość MIC mieściła się w zakresie 8–16 µg/ml), wyłączono go z dalszych badań, ponieważ jego zastosowanie w procesie modyfikacji nie skutkowało znaczącą redukcją wzrostu bakterii. Literatura z kolei potwierdza aktywność citropiny 1.1 wykorzystanej w biodegradowalnych systemach dostarczania substancji przeciwdrobnoustrojowych. Oznaczona ilość uwolnionego peptydu z matrycy składającej się z PCL była wyższa niż wartości MIC wyznaczone dla szczepów Gram-dodatniego, co sugeruje potencjalną skuteczność połączenia citropina 1.1 – PCL w eradykcji drobnoustrojów [141].

Polimyksyna B wykorzystywana była we wszystkich etapach testów przewidzianych w ramach niniejszej rozprawy. Antybiotyk wybrano w celu porównania aktywności wybranych AMPs. Otrzymane przeze mnie wyniki wskazują, że aktywność polimyksyny B była porównywalna lub wyższa (szczególnie w testach mikrobiologicznych zmodyfikowanych materiałów) w odniesieniu do wyników uzyskanych dla lipopeptydów. Dane literaturowe opisują wykorzystanie polimyksyny B w procesie

immobilizacji do powierzchni PDMS i jednocześnie potwierdzają jej skuteczność w zapobieganiu kolonizacji bakteryjnej [142].

Uzyskane przeze mnie wyniki, ich omówienie oraz informacje opisane w powyższej dyskusji potwierdzają zasadność badań nad wykorzystaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych w zapobieganiu infekcjom bakteryjnym związanym ze stosowaniem materiałów medycznych. Zarówno opisane przez mnie rezultaty jak i przykłady zaczerpnięte z literatury dowodzą, że AMPs wykazują wysoką aktywność w postaci związanej z powierzchnią biomateriałów. Największym ograniczeniem zastosowania wielu peptydów przeciwdrobnoustrojowych, w tym lipopeptydów, jest ich toksyczność względem komórek ludzkich. Optymalnym rozwiązaniem wydaje się być opracowywanie związków posiadających aktywność mikrobiologiczną i jednocześnie bezpiecznych dla organizmu człowieka. Obiecujące wyniki doświadczeń przeprowadzonych w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy zachęcają do kontynuowania badań nad wykorzystaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych w modyfikacji powierzchni biomateriałów i prewencji infekcji z nimi związanych.

VI. WNIOSKI

Przeprowadzone próby zastosowania peptydów przeciwdrobnoustrojowych w zapobieganiu infekcjom bakteryjnym związanym z wykorzystaniem biomateriałów. Jako materiały modelowe wykorzystano komercyjnie dostępne wyroby medyczne wykonane z biomateriałów o różnych właściwościach: silikonowo-lateksowe cewniki urologiczne oraz jednodniowe, hydrożelowe soczewki kontaktowe. W celu modyfikacji powierzchni wymienionych materiałów zastosowano 2 metody: modyfikację poprzez inkubację w roztworach związków oraz modyfikację polegającą na wytworzeniu wiązania kowalencyjnego. Na podstawie otrzymanych wyników badań i obserwacji można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Wybrana do badań grupa związków charakteryzowała się wysoką aktywnością przeciwdrobnoustrojową i niską cytotoksycznością w zakresach stężeń wykazujących działanie mikrobiologiczne (z wyjątkiem wartości wyznaczonych dla *P. aeruginosa*);

2. Przeprowadzone próby analiz chromatograficznych nie umożliwiły weryfikacji stopnia związania oraz obserwacji procesu uwalniania peptydów. Pomiary ATR-FTIR potwierdziły obecność badanych związków na powierzchniach materiałów. Jednocześnie technika ATR okazała się mniej odpowiednia do analizy soczewek kontaktowych;

3. Zastosowane przeze mnie metody modyfikacji powierzchni wykorzystujące AMPs okazały się skuteczne w zapobieganiu adhezji bakteryjnej i eliminacji komórek drobnoustrojów;

4. Zastosowanie citropiny 1.1 w procesach modyfikacji nie wpłynęło znacząco na redukcję wzrostu bakterii, lepsze wyniki uzyskano dla lipopeptydów;

5. Większą aktywność przeciwdrobnoustrojową wyznaczono dla zmodyfikowanych powierzchni soczewek kontaktowych (metoda inkubacji);

6. Szczep *S. epidermidis* był bardziej wrażliwy na działanie powłok wytworzonych na powierzchniach materiałów niż Gram-ujemny szczep *E. coli*.

VII. PIŚMIENNICTWO

1. Hildebrand H. F.: *Biomaterials – a history of 7000 years*, BioNanoMaterials (2013), 14: 119–133.

2. *Clinical Applications of Biomaterials. NIH Consens Statement* (1982), 4:1-19.

3. Świeczko-Żurek B.: *Biomateriały*, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej (2009).

4. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych – *Definicje – status produktu*.

5. Onuli Y., Bhardwaj U., Papadimitrakopoulos F., Burgess D. J.: *A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response*, J. Diabets. Sci. Technol. (2008), 2: 1003–1015.

6. Shareef M. Y.: *Biomaterials and their medical application*, United. J. Chem. (2018), 1: 172–183.

7. Rau J. V., Antoniac I., Cama G., Komlev V. S., Ravaglioli A.: *Bioactive materials for bone tissue engineering*, Biomed. Res. Int. (2016), DOI: 10.1155/2016/3741428.

8. Ulery B. D., Nair L. S., Laurencin C. T.: *Biomedical application of biodegradable polymers*, J. Polym. Sci. B. Polym. Phys. (2011), 49: 832–864.

9. Tessarolo F., Nollo G.: *Sterilization of biomedical materials, Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering* (2008), 2501–2510. DOI: 10.3109/E-EBBE-120005526.

10. Parida P., Behera A., Mishra S. C.: *Classification of biomaterials used in medicine*, Int. J. Adv. Appl. Sci. (2012), 1: 125–129.

11. Baino F., Novajra G., Vitale-Brovarone Ch.: *Bioceramics and scaffolds: a winning combination for tissue engineering*, Front. Bioeng. Biotechnol. (2015), 3: 202.

12. Eliaz N., Metoki N.: *Calcium phosphate bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications*, Materials (2017), 10: 334.

13. Krishnan V., Lakshmi T.: *Bioglass: a novel biocompatible innovation*, J. Adv. Pharm. Technol. Res. (2013), 4: 78–83.

14. Wang M.: *Developing bioactive composite materials for tissue replacement*, Biomaterials (2004), 24: 2133–2151.

15. Prased K., Bazaka O., Chua M., Rochford M., Fedriek L. et al.: *Metallic biomaterials: current challenges and opportunieties*, Materials (2017), 10: 884 DOI: 10.3390/ma10080884.

16. Yang K., Ren Y.: *Nickel – free austenitic stainless steel for medical application*, Sci. Technol. Adv. Mater. (2010), 11, DOI: 10.1088/1468-6996/11/1/014105.

17. Tarnita D., Tarnita D. N., Bizdaoaco N., Mindrila I., Vasilescu M.: *Properties and medical application of shape memory alloys*, Rom. J. Morph. Embryol. (2009), 50: 15–21.

18. Moravej M., Mantovani D.: *Biodegradable metals for cardiovascular stent application: interests and new opportunities*, Int. J. Mol. Sci. (2011), 12: 4250–4270.

19. Mano J. F., Silva G. A., Azeviedo H. S., Malafaya P. B., Sousa R. A. et at.: *Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine*: present status and some moving trends, J. R. Soc. Interface. (2007), 4: 999–1030.

20. Kaushik K., Shama R. B., Agarwal S.: *Natural polymers and they applications*, Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. (2016), 37: 30–36.

21. Brook M. A.: *The chemistry and physical properties of biomedical silicones*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials (2012), 3: 52–67.

22. Musgrave C. S. A., Fang F.: *Contact lens materials: a materials science perspectives*, Materials (2019), 12: 261, DOI: 10.3390/ma/12020261.

23. Sobieraj M. C., Rimnac C. M.: *Ultra high weight polyethylene: mechanism, morphology and clinical behavior*, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. (2009), 2: 433–443.

24. Bialoblocka-Juszczyk E., Baleani M., Cristofolini L., Viceconti M.: *Future properties of an acrylic bone cement*, Acta Bioeng. Biomech. (2008), 10: 21–26.

25. Gunatillake P. A., Adhikari R.: *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering*, Eur. Cell Mater. (2003), 2: 1–16.

26. Santerre J. P., Woodhouse K., Laroche G., Labow R. S.: *Understanding the biodegradation of polyurethane: from classical implants to tissue engineering*, Biomaterials (2005), 26: 7457–7470.

27. Gavasane A. J., Pawar H. A.: *Synthetic biodegradable polymers used in controlled drug delivery systems: an overview*, Clin. Pharacol. Biopharm. (2014), 3: DOI: 10.4172/2167-065X.1000121.

28. Smith B. D., Grande D. A.: *The current state of scaffolds for musculosceletal regenerative applications*, Nat. Rev. Rheumatol. (2015), 11: 213–222.

29. Tiwari G., Tiwari R, Sriwastawa B., Bhati L., Pandey P. et al.: *Drug delivery systems: an update review*, Int. J. Pharm. Investig. (2012), 2: 2–11.

30. Joshi J. R., Patel R. P.: *Role of biodegradable polymers in drug delivery* , Int. J. Curr. Pharm. Res. (2012), 4: 74–81.

31. Sionkowska A., Kaczmarek B., Gadzala-Kopciuch R.: *Gentamycin release from chitozan and collagen composite*, J. Drug Deliv. Sci. Technol. (2016), 35: 353–359.

32. Raave R., Kuppevelt T. H., Daamen W. F.: *Chemotherapeutic drug delivery tumoral extracellular matrix targeting*, J. Control. Release (2018), 274: 1–8.

33. Kostantelias A. A., Polyzos K. A., Falagas M. E.*: Gentamycin -collagen sponges for the prevention of surgical site infections: a mata-analysis of randomized controlled trial*, Surg. Infect. (2016), 17: 601–609.

34. Zhu Z., Wang Y.-M., Yang J., Lou X.-S.: *Hyaluronic acid: a versatile biomateriał in tissue engineering*, Plas. Aesth. Res. (2017), 4: 219– 27.

35. Hebeish A., Ramadan M. A., Krupa I., Montaser A. S., Salama A. A. A. et al.: *In vitro and in vivo antibacterial potential of chitozan-g-acrylonite silver nanocomposite against pathogenic bacterium*, Int. J. Microbial. App. Sci (2015), 4: 5–19.

36. Liechty W. B., Kryscio D. R., Slaughter B. K., Peppas N. A.: *Polymers for drug delivery systems*, Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. (2012), 1: 149–173.

37. Anjum S. A., Singh S., Benedicte L., Roger P., Panigrahi M., Gupta B.: *Biomodification strategies for the development of antimicrobial urinary catheters: overview and advances*, Global Challenges (2018), 2 DOI: 10.1002/gch2.201700068.

38. Neut D., Kluin O. S., Thompson J., Mei H. C., Busscher H. J.: *Gentamycin release from commercially-available gentamycin-loaded PMMA bone cements in a prosthesis-related interfacial gap model and their antimicrobial efficacy*, BMS Musculoskelet Disord (2010), 11: 258.

39. Chathana S. R., Ahmed M. G.: *Hydrogel contact lense for extended delivery of antibiotic in combination with anti-inflammatory drug for opthalmic application*, Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences (2015), 5: 16–21.

40. Lyu S., Untereker D.: *Degradability of polymers for implantable biomedical devices*, Int. J. Med. Sci. (2009), 10: 4033–4065.

41. Connor E. F., Lees I., Madean D.: *Polymers as drugs-advances in therapeutic application of polimer binding agents*, Annu. Rev. Chem. Biomol. E. (2012), 1: 149–173.

42. Yin J., Luan S.: *Opportunities and challenges for the development of polimer-based biomaterials and medical devices*, Regen. Biomat. (2016), 3: 129–135.

43. Rimandini L., Fini M., Giardino R.: *The microbial infection of biomaterials: a challange for clinicians and researchers. A short review*, J. Appl. Biomater. Biomech. (2005), 3: 1–10.

44. Douterelo I., Husband S., Loza V., Boxall J.: *Dynamics of biofilm regrowth in drinking water distribution system*, J. Appl. Environ. Microbiol. (2016), 82: 4155–4168.

45. Wilking J. N., Zaburdaev., Volder de M., Losick R., Brenner M. P. et al.: *Liquid transport facilitated by channels in Bacillus subtilis biobilms*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2013), 110: 848 – 852.

46. Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S. J.: *Bacterial biofilms: development, dispersal and therapeutic strategies in the down of the postantibiotic area*, Cold Spring Harb. Perspect. Med. (2013), 3: DOI: 10.1101/cshperspect.a010306.

47. Franklin M. J., Nivens D. E., Weadge J. T., Howell P. L.: *Biosynthesis of the Pseudomonas aeruginosa extracellular polysaccharides, alginate*, Pel and PSL, Front. Microbiol. (2011), 1: 167, DOI: 10.33889/fmicb.2011.00167.

48. Li Y.-H., Tian X.: *Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms*, Sensors (2012), 12: 2519–2538.

49. Barraud N., Kjelleberg S., Rive S. A.: *Dispersal from microbial biofilms*, Microbiol Spectrum (2015), 3: DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0015-2014.

50. Khelissa S. O., Abdallah M., Jama C., Faille C., Chihib N. E: *Bacterial contamination and biofilm formation on abiotic Surface and strategies to overcome their persistance*, J. Mater. Environ. Sci. (2017), 8: 3326–3346.

51. Wimpenny J., Manz W., Szewzyk U.: *Heterogeneity in biofilms*, FEMS Microbial. Rev. (2000), 24: 661–671.

52. Sousa C., Teixeira P., Oliveira R.: *Influence of surface properties on the adhesion of Staphylococcus epidermidis to acrylic and silicone*, Int. J. Biomater. (2009), DOI: 10.1155/2009/718017.

53. Verheyen C. C. P. M., Dhert W. J. A., de Blieck-Hogervorst J. M. A., van der Reijden T. J. L., Petit P. L. C. et al.: *Adherence to a metal, polymere and composite by Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis*, Biomaterials (1993), 14: 303–391.

54. Xu L.-Ch., Bauer J., Siedlecki Ch. A.: *Proteins, platelets and blood ceagulation at biomaterial interfaces*, Colloids Surf. B. Biointerfaces (2014), 124: 49–68.

55. Moryl M.: *Egzopolimery macierzy biofilmu jako czynnik wirulencji mikroorganizmów w rozwoju chorób człowieka*, Postepy Hig. Med. Dosw. (2015), 69: 1485–1498.

56. Aka S. T., Haji S. H.: *Sub-MIC of antibiotics induced biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa in the presence of chlorhexidine*, Braz. J. Microbial. (2015). 46: 149–154.

57. Mah T.-F. C., O'Toole G. A.: *Mechanism of biofilm resistance to antimicrobial agents, Trends Microbiol.* (2002), 9: 34–29.

58. Singh S., Sing S. K., Chowdhury I,. Singh R.: *Understanding the mechanism of bacterial biofilm resistance to antimicrobial agents*, Open Microbiol. J. (2017), 11: 53–62.

59. Soto S. M.: *Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm*, Virulence (2013), 4: 223–229.

60. Lebeaux D., Ghigo J. M., Beloin C.: *Biofilm -related infections: Bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics*, Microbial Mol. Biol. Rev. (2014), 78: 510–543.

61. Khatoon Z., McTiernan C. D., Suuronen E. J., Mah T.-F., Alarcon E. I.: *Bacterial biofilm formations on implantable devices and approaches to its treatment and prevention*, Heliyon (2018), 4: doi:10.1016/j.heliyon.2018.e0106

62. Van Epps J. S., Younger J. G.: *Implantable device related infection*, Shock (2016), 46: 587–608.

63. Veerachamy S., Yarlagadda T., Manivasagam G., Yarlagadda P.: *Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review*, Proc. Inst. Mech. Eng. H. (2014), 228: 1083–1099.

64. Khan H. A., Baig F. K., Mehboob R.: *Nosocomial infection: epidemiology, prevention, control and surveillance*, Asian Pac. J. Trop. (2017), 7: 478–482.

65. Percival S. L., Suleman L., Vuotto C., Donetti G: *Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control*, J. Med. Microbiol (2015), 64: 323–334.

66. Xu Y., Larsen L. H., Lorenz J., Hall-Sloodly L, Kikhney J. et al.: *Microbiological diagnosis of device-related biofilm infections*, APMIS (2017), 125: 289–303.

67. Maciejewska M., Bauer M., Dawgul M.: *Nowoczesne metody zwalczania biofilmu bakteryjnego*, Post. Mikrobiol. (2016), 1: 3–11.

68. Weinstein R. A., Darouiche R. O.: *Device-related infections: a macroproblem that starts with microadhesion*, Clin. Infect. Dis. (2001), 33: 1567–1572.

69. Harper D. R., Parracho H. M. R. T., Walker J., Sharp R., Hughes G. et al.: *Bacteriophages and biofilm*, Antibiotics (2014), 3: 270–284.

70. Chung P. Y., Toh Y. S.: *Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant Staphylococcus aureus*, Pathog. Dos. (2013), 70: 231–239.

71. Wolska K. I., Grudniak A. M., Rudnicka Z., Markowska K.: *Genetic control of bacterial biofilms*, J. Appl. Genet. (2016), 57: 225–238.

72. Sun D., Accavitti M. A., Bryers J. D.: *Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies agains Staphylococcus epidermidis RP620 accumulation-associated protein*, Clin. Diag. Lab. Immunol. (2005), 12: 93–100.

73. Estelles A., Woischnig A. K., Liu K., Stephenson R., Lomongsad E. et al.: *A high-affinity native human antibody disrupts biofilm from Staphylococcus aureus bacteria and potentiates antibiotic efficacy in a mouse implant model*, Antimicrob. Agents Chemother. (2016), 60: 2292–2301.

74. Li J., Hirota K., Yumoto H., Matsuo T., Miyake Y. et al.: *Enhanced germicidal effects of pulsed UV-LED irradiation on biofilms*, J. Appl. Microbiol. (2010), 109: 2183–2190.

75. Briggs T., Blunn G., Hislop S., Ramalhete R., Bagley C. et al.: *Antimicrobial photodynamic therapy – a promising treatment for prosthetic joint infection*, Lasers Med. Sci. (2018), 33: 523–532.

76. Del Pozo J. L., Rouse M. S., Patel R.: *Bioelectric effect and bacterial biofilms. A systematic review*, Int. J. Artif. Organs (2008), 31: 786–795.

77. Tran V. N., Dasagrandhi C., Truong V. G., Kim Y.-M., Kang H.-W.*: Antimicrobial activity of Staphylococcus aureus biofilm under combined exposure of glutaraldehyde, near-infrared light and 405-nm laser*, PLoS One (2018), 13 DOI: 10.1371/journal.pone.0202829.

78. Sadekuzzaman M., Yang S., Mizan M. F. R., Ha S. D.: *Current and recent advanced strategies for combating biofilm*, Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. (2015), 14: 491–509.

79. Cen X., Stewart P. S.: *Biofilm removal caused by chemical treatments*, Water Res. (2000), 34: 4229–4233.

80. Sriram M. I., Kalishwarakal K., Deepak V, Gracerosepat R., Srisakthi K. et al.: *Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain Bacillus cereus NK1*, Colloids Surf. B. Biointerfaces (2011), 85: 174–181.

81. Marques C. H., Davies D. G., Sauer K.: *Control of biofilms with the fatty acids signaling molecule cis-2-decanoic acid*, Pharmaceuticals (2015), 8: 816–835.

82. Kim J., Pitts B., Stewart P. S., Camper A., Yoon J.: *Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion and tobramycin on biofilm*, Antimicrob. Agents Chemother. (2008), 52: 1446–1453.

83. Reśliński A., Dąbrowiecki S., Głowacka K, Szmytkowski J.: *The influence of octenidine dihydrochloride on bacterial biofilm on the surface of polypropylene mesh*, Medical and Biological Science (2013), 27: 41–47.

84. Ogilvie A. T., Brisson B. A., Singh A., Weese J. S.: *In vitro evaluation of the impact of silver coating on Escherichia coli adherence to urinary catheters*, Can. Vet. J. (2015), 56: 490–494.

85. Hijazi S., Visca P., Frangipani E.: *Gallium-protophorphyrin IX inhibits Pseudomonas growth by targeting cytochromes*, Front. Cell Infect. Microbiol. (2017), 7: DOI: 10.3389/FCIMB.2017.00012.

86. Platzer D., Hancock R. E. W.: *Antibiofilm peptides: potential as broad-spectrum agents*, J. Bacteriol. (2016) , 198: 2572–2578.

87. Mishra B., Lushnikova T., Wang G.: *Small lipopeptides posses anti-biofilm capability compareable to daptomycin and vancomycin*, RSC Adv. (2015), 5: 59758–59769.

88. Ofek J., Hast D. L., Sharon N.: *Anti-adhesive therapy of bacterial diseases: prospects and problems*, FEMS Immunol. Med. Microbiol. (2003), 38: 181–191.

89. Chandra J., Petel J. D., Li J., Zhou G., Mukherijee P. K.: *Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of Candida albicans to form biofilms*, Appl. Environ. Microbiol. (2005), 71: 8795–8801.

90. Greenhalgh R., Dempsey-Hibbert N. C., Whitehead K. A.*: Antimicrobial strategies to reduce polimer biomateriał infections and their economic implication and considerations*, Int. Biodeter. Biodegr. (2019), 136: 1–14.

91. Sultana S. T., Babauta J. T., Beyenal H.: *Electrochemical biofilm control: a review,* Biofouling (2015), 31: 745–758.

92. Sourkova H., Primc G., Spatenka P.: *Surface functionalization of polyethylene granules by treatment with low-pressure plasma*, Materials (2018), 11: DOI: 10:3390/ma11060885.

93. Yoshinari M., Matsazuka K., Inoue T.: *Surface modification by cold-plasma technique for dental implants – bio functionalization with binding pharmaceuticals*, Jpn. Dent. Sci. Rev. (2011), 47: 89–101.

94. Bosco R., Beuchen Van Den J., Leeuwenburgh S., Jansen J.: *Surface engineering for bone implants: a trend from passive to active surface*, Coatings (2012), 2: 95–119.

95. Boccaccini A. R., Kein S., Ma R., Li Y., Zhitomirsky I.: *Electrophoretic deposition of biomaterials*, J. R. Soc. Interface (2017), 7: 581–613.

96. Duta L., Popescu A. C.: *Current status on pulsed laser deposition of coatings from animal-origin calcium phosphate sources*, Coatings (2019), 5: DOI:10.3390/coatings9050335.

97. Huang K.-S., Yang C.-H., Huang S.-L., Chen C.-Y., Lu Y.-Y. et al.: Recent advances in antimicrobial polymers: a mini – review, Int. J. Mol. Sci. (2016), 17: DOI:10.3390/ijms17091578.

98. Ulery B. D., Nair L. S., Laurencin C. T.*: Biomedical application of biodegradable polymers*, J. Polym. Sci. B. Polym. Phys. (2011), 49: 832–864.

99. Cloutier M, Mantovanii D., Rosei F.: *Antimicrobial coatings: challenges, perspectives and opportunities*, Trend Biotechnol. (2015), 33: 637–562.

100. Galla J., Holinka M., Moucha C. S.: *Antimicrobial Surface treatment for orthopaedic implants*, Int. J. Mol. Sci. (2014), 15: 13849–13880.

101. Li J., Koh J.-J., Liu S., Lakshminarayanan R., Verma C. S.: *Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insight to design*, Front. Neurosci. (2017), 11: DOI:10.3389/fnins2017.00073.

102. Mahlapuu M., Hakansson J., Ringstad L., Bjorn C.*: Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents*, Front Cell Infect. Microbiol. (2016), 6: DOI:10.3389/fcimb2016.00196.

103. Hassan M., Kjos M., Nes I. F., Diep D. B., Lotfipour F.: *Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential application to fight antimicrobial resistance*, J. Appl. Microbiol. (2012), 113: 723–736.

104. Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W. et al.: *Plant antimicrobial peptides*, Folia Microbiol. (2014), 59: 181–196.

105. Hancock R. E. W., Scott G.: *The role of antimicrobial peptides in animal defense*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000), 97: 8856–8861.

106. Wang G.: *Human antimicrobial peptides and proteins*, Pharmaceuticals (2014), 7: 545–594.

107. Dass M., White M. R., Tecle T., Hartsharn K. L.: *Human defensines and LL-37 in mucosal immunity*, J. Leukoc. Biol. (2010), 87: 79–92.

108. Armac F., Pacor S., Ferrari E., Guida F., Pertinhez A. et al.: *Design, antimicrobial activity and mechanism of action of Arg-rich ultra-short cationic lipopeptides*, PLOS One (2019), 19: DOI:10.1371/journal.pone.0212447.

109. Kumar P., Kizhakkedathu J. N., Straus S. K.: *Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo*, Biomolecules (2018), 8: DOI: 10.3390/biom8010004.

110. Epand R. M., Vogel H. J.: *Diversity of antimicrobial peptides and their mechanism of action*, Biochim. Biophys. Acta (1999), 1492: 11–28.

111. Bahar A. A., Ren D.: *Antimicrobial peptides*, Pharmaceuticals (2013), 6: 1543–1575.

112. Platzer D., Hancock R. E. W.: *Antibiofilm peptides: a potential as broad-spectrum agents*, J. Bacteriol. (2016), 198: 2572–2578.

113. Betoni G., Maissetta G., Esin S.: *Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria*, Biochim. Biophys. Acta (2016), 1858: 1044–1060.

114. Francolini I., Donelli G.: *Prevention and control of biofilm-based-medical-device-related infections*, FEMS Immunol Med. Microbiol. (2010), 59: 227–238.

115. Riool M., de Breij A., Drijfhout J. W., Nibbering P. H., Zaat S. A. J.: *Animicrobial peptides in biomedical device manufacturing*, Front. Chem. (2017), 5: DOI: 10.3389/fchem.2017.00063.

116. Dutta D., Ozkan J., Willcox M. D. P.: *Biocompatibility of antimicrobial melimine lenses: rabbit and human studies*, Optom. Vis. Sci. (2014), 91: 570–581.

117. Kazemzadeh-Narbat M., Kindrachuk J., Duan K., Jenssen H., Hancock R. E. W. et al.: *Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections*, Biomaterials (2010), 31: 9519–9526.

118. Sharma R., Singh H., Joshi M., Sharma A., Garg T.: *Recent advances in polymeric electrospun nanofibers for drug delivery*, Crit. Rev. Ther. Carrier Syst. (2014), 31: 187–217.

119. Neubauer D., Jaśkiewicz M., Migoń D., Bauer M., Sikora K. et al.: *Retro analog concept: comparative study on physico-chemical and biological properties of selected antimicrobial peptides*, Amino Acids (2017), 49: 1775–1771.

120. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*, Clinical and Laboratory Standards Institute (2012).

121. Dawgul M., Maciejewska M., Jaśkiewicz M., Karafova A., Kamysz W.: *Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm*, Acta Pol. Pharm. (2014), 71: 39–47.

122. Avrahami D., Shai Y.: *A new group of antifungal anf antibacterial lipopeptides derived from non-membrane active peptides conjugated to palmitic acid*, J. Biol. Chem. (2004), 279: 12277–12285.

123. Townsend L., Williams R. L., Anuforom O., Berwick M. R., Halstead F. et al.: *Antimicrobial peptide coatings for hydroxyapatite: electrostatic and covalent attachemnt of antimicrobial peptides to surface*, J. Royal Soc. Interface (2017), 14: 20160657, DOI: 10.1098/RSIF.2016.0657.

124. Dutta D., Vijay A. K., Kumar N., Willcox M. D. P.: *Melimine-coated antimicrobial contact lenses reduce microbial keratitis in an animal model*, IOVS (2016), 57: 51616–5624.

125. ISO 10993-5 *„Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 5. Badania cytotoksyczności in vitro*".

126. Mansur H., Orefice R., Pereira M., Lobato Z., Vasconcelos W. et al.: *FTIR and UV-Vis study of chemically engineered biomateriał Surface for protein immobilization*, Spectroscopy (2002), 16: 351–360.

127. Ventola L. C.: *The antibiotic resistance crisis. Part 1.: Causes and Threats*, P. T. (2015), 40: 277–283.

128. Olaiten A. O., Morand S., Rolain J.-M.: *Mechanism of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria*, Front. Microbiol. (2014), 5: 643, DOI: 10.3389/FMICB.2014.00643.

129. Makovitzki A., Avrahami D., Shai Y.: *Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides*. PNAS (2006), 103: 15997–16002.

130. Greber K. E., Dawgul M., Kamysz W., Sawicki W.: *Cationic net charge and counter ion type as antimicrobial activity determinant factors of short lipopeptides*, Front. Microbiol. (2017), 8: 23, DOI: 10.3389/fmicb.2017.00123.

131. Laverty G., McLaughlin M., Shaw C., Gorman S. P., Gilmore B. F.: *Antimicrobial activity of short, synthetic lipopeptides*. Chem. Biol. Drug Des. (2010), 75: 563–569.

132. Mishra B., Lushnikova T., Wang G.: *Small lipopeptides posses anti-biofilm capability comparable to daptomycin and vancomycin*, RSC (2015), 5: 59758–59769.

133. Jaśkiewicz M., Neubauer D., Kamysz W.: *Comparative study on antistaphylococcal activity of lipopeptides in various culture media*, Antibiotics (2017), 6: 15, DOI: 10.3390/antibiotics6030015.

134. Barańska-Rybak W., Pikula M., Dawgul M., Kamysz W., Trzonkowski P. et al.: *Safety profile of antimicrobial peptides: camel, citropin, protegrin, temporin A and lipopeptide on HaCaT keratinocytes*, Acta Pol. Pharm. (2013), 70: 795–801.

135. Dawgul M. A., Greber K. E., Bartoszewska S., Barańska-Rybak W., Sawicki W. et al.: *In vitro evaluation of cytotoxicity and permeation study on lysine- and arginine-based lipopeptides with proven antimicrobial activity*, Molecules (2017), 8: 22, DOI:10.3390/molecules22122173.

136. Nicolle L. E.: *Catheter associated urinary tract infections*, Antimicrob. Resist. Infect. Control (2014), 3: 23, DOI: 10.1186/2047-2994-3-23.

137. Alipour F., Kheheshi S., Soleimanzadeh M., Heidarzadeh S., Heydarzadeh S.: *Contact lens-related complications: a review*, J. Opthalimic. Vis. Res. (2017), 12: 193–204.

138. Francolini I., Vuotto C., Piozzi A., Donelli G.: *Antifouling and antimicrobial biomaterials: an overview*, APMIS (2017), 125: 392–417.

139. Wiglusz R. J.: *Porfiryny zamknięte w żelu krzemionkowym*, Wiadomości Chemiczne (2011), 65: 676–703.

140. Cleophas R. T. C., Riool M., Quarles van Ufford H. C., Zaat S. A. J., Kruijtzer J. A. W. et al.: *Convenient preparation of bactericidal antimicrobial peptides using thiol-ene click chemistry*, ACS Macro. Lett. (2014), 3: 477–480.

141. Piotrowska U., Olędzka E., Zgadzaj A., Bauer M., Sobczak M.: *A novel delivery system for the controlled release of antimicrobial peptides: Citropin 1.1 and Temporin A*, Polymers (2018), 10: 489, DOI: 10.3390/polym10050489.

142. Alves D., Pereira M. O.: *Bio-inspired coating strategies for the immobilization of polymyxins to generate contact-killinf surface*, Macromol. Biosc. (2016), 16: