



**POLITECHNIKA  
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: mgr inż. Grzegorz Gorczyca

Dyscyplina naukowa: Biotechnologia

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

Tytuł rozprawy w języku polskim:

**Otrzymywanie i charakterystyka nowych biomateriałów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej na bazie chitozanu, kolagenu i żelatyny.**

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

**Preparation and characterization of novel chitosan-collagen-gelatin biomaterials with antimicrobial activity.**

Promotor  <i>podpis</i>	Drugi promotor  Nie dotyczy  <i>podpis</i>
Prof. dr hab. inż. Sławomir Milewski	
Promotor pomocniczy Nie dotyczy  <i>podpis</i>	Kopromotor Nie dotyczy  <i>podpis</i>

Gdańsk, rok 2015

*„Wszyscy wiedzą, że czegoś nie da się zrobić  
i wtedy pojawia się ten jeden,  
który nie wie, że się nie da,  
i on właśnie to coś robi.”*

*Albert Einstein*

*Składam serdeczne podziękowania:*

*Promotorowi prof. dr hab. inż. Sławomirowi Milewskiemu  
za umożliwienie realizacji tematu niniejszej rozprawy doktorskiej  
w swoim zespole badawczym, a także za opiekę merytoryczną,  
cenne uwagi i sugestie.*

*prof. dr hab. inż. Ilonie Kołodziejkiej oraz prof. dr hab. inż. Marii Sadowskiej  
za udostępnienie aparatury i laboratoriów  
Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności.*

*Dziękuję również dr inż. Piotrowi Szwedzie,  
dr inż. Robertowi Tylingo za owocną współpracę,  
wskazówki merytoryczne i trud włożony w działania  
związane z komercjalizacją opracowanych w ramach niniejszej  
rozprawy rozwiązań technologicznych.*

*Doktorantom i Pracownikom Katedry Technologii Leków i Biochemii,  
Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności,  
a także Pracownikom Centrum Transferu Technologii  
za niezapomnianą atmosferę, życzliwość i pomoc.*

*Dziękuję Fundacji na rzecz Nauki Polskiej  
za wsparcie finansowe w trakcie realizacji badań.*

*Moim najbliższym za wsparcie w chwilach krytycznych,  
a w szczególności żonie Joannie za cierpliwość,  
uśmiech i pomoc w sprawdzaniu pracy.*

# SPIS TREŚCI

<b>INDEKS SKRÓTÓW .....</b>	<b>6</b>
<b>1. STRESZCZENIE .....</b>	<b>8</b>
<b>2. WPROWADZENIE .....</b>	<b>10</b>
2.1. Ogólna charakterystyka procesu regeneracji rany skórnej. ....	10
2.2. Polimery naturalne (chitozan, kolagen, żelatyna) w konstrukcji materiałów medycznych o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu ran skórnych.....	12
2.2.1.Chitozan – informacje podstawowe. ....	12
2.2.2.Kolagen – informacje podstawowe. ....	14
2.2.3.Żelatyna – informacje podstawowe.....	15
2.2.4.Rola chitozanu, kolagenu i żelatyny w procesie regeneracji ran skórnych.....	17
2.2.4.1.Właściwości przeciwdrobnoustrojowe chitozanu, kolagenu i żelatyny.....	19
2.2.4.2.Właściwości przeciwutleniające chitozanu, kolagenu i żelatyny. ....	23
2.2.5.Przegląd materiałów na bazie chitozanu, kolagenu i żelatyny o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu ran skórnych, a także metod ich otrzymywania. ....	28
2.2.5.1.Wykorzystanie genipiny w procesach wytwarzania materiałów na bazie chitozanu, kolagenu i żelatyny. ....	37
2.3. Metody aktywacji przeciwdrobnoustrojowej materiałów medycznych o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu ran skórnych.....	40
2.3.1.Mechanizm uwalniania czynnika aktywnego z polimerowej matrycy. ....	41
2.3.2.Charakterystyka wybranych grup czynników przeciwdrobnoustrojowych wykorzystywanych w konstrukcji materiałów opatrunkowych. ....	42
2.3.2.1.Antybiotyki. ....	42
2.3.2.2.Związki srebra.....	43
2.3.2.3.Jod.....	45
2.3.2.4.Miód Manuka.....	46
2.3.2.5.Peptydy przeciwdrobnoustrojowe. ....	48
2.3.2.6.1. Lizostafyna.....	54
<b>3. CEL PRACY.....</b>	<b>56</b>
<b>4. MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>58</b>
4.1. Materiały podstawowe i aparatura.....	58
4.1.1.Odczynniki i surowce stosowane podczas badań laboratoryjnych. ....	58
4.1.2.Aparatura stosowana podczas badań laboratoryjnych. ....	59
4.1.3.Podłoża bakteryjne stosowane podczas badań laboratoryjnych. ....	59
4.1.4.Komórki i szczepy bakteryjne stosowane podczas badań laboratoryjnych. ....	60
4.2. Metody stosowane podczas badań laboratoryjnych.....	61
4.2.1.Otrzymywanie biopolimerowych materiałów gąbczastych, z wykorzystaniem standardowych metod przetwarzania chitozanu. ....	61
4.2.2.Otrzymywanie i charakterystyka materiałów chitozanowo-białkowych, z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie. ....	61
4.2.3.Otrzymywanie materiałów chitozanowo-białkowych aktywowanych lizostafyną. ....	63
4.2.4.Charakterystyka biopolimerowych materiałów gąbczastych.....	64
4.2.4.1.Dokumentacja morfologii. ....	64
4.2.4.2.Określanie chłonności / rozpuszczalności. ....	64
4.2.4.3.Wyznaczanie stopnia usieciowania. ....	65
4.2.4.4.Określanie parametrów profilu tekstury.....	65
4.2.4.5.Badanie transmisji par wilgoci. ....	66
4.2.4.6.Badanie degradacji enzymatycznej pod wpływem lizozymu. ....	66
4.2.4.7.Oznaczenie zdolności do neutralizacji rodników – test DPPH.....	67
4.2.4.8.Oznaczenie zdolności do neutralizacji kationo-rodników ABTS. ....	67
4.2.4.9.Oznaczenie zdolności do chelatowania jonów Fe <sup>2+</sup> . ....	68
4.2.4.10.Określanie cytotoksyczności względem komórek NIH-3T3. ....	68
4.2.4.11.Ocena uwalniania lizostafiny z materiałów chitozanowo-białkowych. ....	69

4.2.4.12. Oznaczenie aktywności materiałów chitozanowo-białkowych względem komórek szczepu wzorcowego <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213).	70
4.2.4.13. Oznaczenie aktywności materiałów chitozanowo-białkowych względem komórek szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> pochodzących z różnych populacji.	71
4.2.4.14. Oznaczenie aktywności specyficznej lizostafiny.	71
4.2.4.15. Porównanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie z wybranymi dostępnymi na rynku materiałami opatrunkowymi.	72
4.2.4.16. Analiza podobieństwa biopolimerowych materiałów gąbczastych.	73
<b>5. WYNIKI I DYSKUSJA</b>	<b>74</b>
<b>5.1. Założenia projektu badawczego</b>	<b>74</b>
<b>5.2. Analiza wpływu rodzaju preparatu biopolimerowego (chitozanu, żelatyny i kolagenu) na wybrane właściwości wytworzonych z nich materiałów gąbczastych</b>	<b>77</b>
5.2.1. Analiza wybranych właściwości biopolimerowych materiałów gąbczastych otrzymanych z chitozanu, kolagenu i żelatyny.	79
5.2.2. Analiza podobieństwa biopolimerowych materiałów gąbczastych otrzymanych z chitozanu, kolagenu i żelatyny - analiza głównych składowych (PCA).	90
<b>5.3. Otrzymywanie i charakterystyka materiałów chitozanowo-białkowych z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie</b>	<b>94</b>
5.3.1. Analiza wybranych właściwości gąbczastych materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie.	96
5.3.1.1. Morfologia.	96
5.3.1.2. Stopień usieciowania.	98
5.3.1.3. Chłonność / rozpuszczalność.	99
5.3.1.4. Transmisja par wilgoci.	102
5.3.1.5. Profil tekstury.	102
5.3.1.6. Degradacja enzymatyczna – lizozym.	104
5.3.1.7. Właściwości przeciwutleniające.	106
5.3.1.8. Cytotoksyczność względem komórek NIH-3T3.	108
<b>5.4. Wykorzystanie materiałów chitozanowo-białkowych jako matrycy do inkorporacji lizostafiny</b>	<b>109</b>
5.4.1. Ocena uwalniania lizostafiny z materiałów chitozanowo-białkowych.	110
5.4.2. Charakterystyka aktywności materiałów chitozanowo-białkowych względem komórek szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> pochodzących z różnych populacji.	113
<b>5.5. Porównanie wybranych właściwości materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie z wybranymi dostępnymi na rynku materiałami opatrunkowymi</b>	<b>116</b>
5.5.1. Porównanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych.	117
5.5.2. Porównanie cytotoksyczności względem komórek NIH-3T3.	124
5.5.3. Porównanie wybranych właściwości fizykochemicznych.	127
<b>6. PODSUMOWANIE</b>	<b>134</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>142</b>
<b>8. DOROBEK NAUKOWY</b>	<b>164</b>
<b>9. SUPLEMENT</b>	<b>167</b>
<b>9.1. Optymalizacja ekspresji lizostafiny w układzie <i>Escherichia coli</i> TOP10F'/pBAD2lys prowadzonej w bioreaktorze</b>	<b>167</b>
<b>9.2. Materiały podstawowe i aparatura</b>	<b>168</b>
9.2.1. Odczynniki, surowce, aparatura, szczepy i podłoża mikrobiologiczne stosowane podczas optymalizacji ekspresji lizostafiny w bioreaktorze.	168
<b>9.3. Metody stosowane podczas optymalizacji ekspresji lizostafiny w bioreaktorze</b>	<b>170</b>
9.3.1. Opis sposobu prowadzenia hodowli bakteryjnej w bioreaktorze.	170
9.3.2. Hodowla bakteryjna z wykorzystaniem medium o zmienionym składzie.	171
9.3.3. Oczyszczanie białka rekombinantowego – chromatografia metalopowinowactwa.	173
9.3.4. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących – SDS-PAGE.	174



9.3.5. Dializa .....	174
9.3.6. Oznaczanie stężenia białka - metoda Bradforda.....	174
<b>9.4. Wyniki i dyskusja dotyczące optymalizacji ekspresji lizostafiny w układzie</b>	
<b><i>Escherichia coli</i> TOP10F'/pBAD2lys prowadzonej w bioreaktorze. ....</b>	<b>175</b>
9.4.1. Wpływ intensywności mieszania na parametry procesu produkcji lizostafiny w komórkach <i>E. coli</i> .....	175
9.4.2. Wpływ pH pożywki hodowlanej na parametry procesu produkcji białka w komórkach <i>E. coli</i> . ....	176
9.4.3. Wpływ temperatury pożywki hodowlanej na parametry procesu produkcji białka w komórkach <i>E. coli</i> . ....	177
9.4.4. Wybór optymalnych parametrów (pH, temperatury, rpm) procesu produkcji białka w komórkach <i>E. coli</i> . ....	178
9.4.5. Intensyfikacja wydajności produkcji lizostafiny poprzez zmianę składu pożywki hodowlanej. ....	180
<b>9.5. Literatura. ....</b>	<b>183</b>

## INDEKS SKRÓTÓW

ABTS	2,2-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)
AMP	peptyd przeciwdrobnoustrojowy
ATCC	amerykańska kolekcja typokulturowa
ATP	adenozynotrójfosforan
BSA	surowicza albumina wołowa
CFU	jednostka tworząca kolonię
DMEM	podłoże hodowlane Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	dimetylosulfotlenek
DPPH	2,2-difenylo-1-pikrylhydrazylu
EC <sub>50</sub>	stężenie związku powodujące neutralizację 50% aktywności wolnego rodnika, bądź kationo-rodnika
EDC	1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropylo)karbodiimid
EDTA	sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
FBS	płodowa surowica bydłęca
FGF	czynnik wzrostu fibroblastów
HCDC	hodowla komórkowa wysokiej gęstości
HLF	linia ludzkich embrionalnych komórek płuc
IL-1	interleukina 1
kDa	kilodalton (jednostka masy cząsteczkowej)
LA	liczba aminokwasów
MCP-1	białko chemotaktyczne dla monocytów
MIC	minimalne stężenie hamujące wzrost
MMO	mokra masa osadu
MRSA	oporne na metycylinę szczepy gronkowca złocistego
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowy
MW	masa cząsteczkowa (wyrażona w kDa)
NC	wypadkowy ładunek
NF-κB	czynnik stanu zapalnego, aktywator apoptozy
NHS	N-hydroksysukcynimid
OD	gęstość optyczna
PDGF	płytkowy czynnika wzrostu
PVP	poliwinylopirolidon
ROS	reaktywne formy tlenu
rpm	liczba obrotów na minutę
SC	stopień chelatowania
scCO <sub>2</sub>	ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym
SDS	dodecylosiarczan sodu

SDS-PAGE	elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących
SN	stopień neutralizacji
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TNF- $\alpha$	czynnik nekrozy nowotworów $\alpha$
Tris	2-amino-2-hydroksymetylo-1,3-propanodiol
U	jednostka aktywności enzymatycznej
UMF	unikalny czynnik Manuka
VBNC	żywe, lecz niedające się hodować
VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego
WVTR	przepuszczalność pary wilgoci

## 1. STRESZCZENIE

W niniejszej pracy przedstawiono opis wyników badań poświęconych otrzymywaniu i charakterystyce biomateriałów zbudowanych z chitozanu, kolagenu i żelatyny, o strukturze i właściwościach wymaganych od nowoczesnego materiału opatrunkowego, stanowiącego jednocześnie dogodną matrycę do inkorporacji związków biologicznie czynnych, zwłaszcza lizostafiny. Opracowane materiały stanowią także próbę odpowiedzi na potrzeby medyczne dotyczące pacjentów z trudno gojącymi się ranami skórnymi, w tym szczególnie na skutek zakażeń wywołanych przez bakterie *Staphylococcus aureus*.

Konstrukcję materiałów chitozanowo-białkowych oparto o innowacyjną technologię przetwarzania chitozanu, charakteryzującą się tym, że chitozan rozpuszczany jest w wodzie na skutek saturacji gazowym ditlenkiem węgla wodnej zawiesiny chitozanu mikrokryształicznego, a nie jak w dotychczas znanych postępowaniach, w wodnych roztworach kwasów organicznych. Wykorzystanie zaproponowanej technologii wyeliminowało konieczność przeprowadzania czasochłonnej i energochłonnej procedury związanej z wyłukiwaniem resztkowej zawartości kwasów, jakie prowadzone są w przypadku materiałów otrzymywanych z chitozanu według standardowych procedur i w związku z tym, umożliwiło wprowadzanie do układu związków aktywnych już na etapie wytwarzania biomateriałów, bez obawy o ich częściową utratę (na skutek wymywania) bądź bez obawy o utratę ich aktywności (związaną ze zbyt niskim odczynem środowiska).

Przeprowadzone badania umożliwiły poznanie wpływu stężenia genipiny, użytej jako czynnik sieciujący na wybrane właściwości otrzymanych nową metodą materiałów chitozanowo-białkowych, a także wpływu na profil uwalniania inkorporowanej w tych materiałach lizostafiny. W konsekwencji otrzymano szereg biomateriałów o wysokoporowatej strukturze zdolnej do pochłaniania znacznej ilości cieczy, stabilnych w warunkach docelowego użytkowania, a przede wszystkim niewykazujących efektu cytotoksycznego względem komórek mysich fibroblastów, zachowujących przy tym wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową względem komórek *S. aureus*. Badania przeprowadzone na 143 szczepach pochodzących z różnych populacji (w tym względem sześciu szczepów MRSA) wykazały, że żaden z nich nie był oporny na działanie materiałów chitozanowo-białkowych z inkorporowaną lizostafiną.

W ramach prowadzonych prac badawczych wykazano także relacje właściwości otrzymanego materiału chitozanowo-białkowego, o składzie uznanym za optymalny, względem właściwości piętnastu komercyjnie dostępnych materiałów opatrunkowych. Przeprowadzone przy tej okazji porównanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej umożliwiło porównanie w jednorodnych warunkach skuteczności różnych wykorzystywanych komercyjnie czynników aktywnych, w tym: chlorheksydyny, jodopowidonu, miodu Manuka oraz związków srebra w czterech różnych postaciach: fosforanu srebrno-sodowo-

wodorowo-cyrkonowego, siarczanu srebra, srebra koloidalnego oraz srebra metalicznego, względem czterech szczepów bakteryjnych należących do grupy drobnoustrojów najczęściej wywołujących zakażenia ran: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Otrzymany w ramach niniejszej pracy biomateriał należał do grupy materiałów o najwyższej aktywności względem komórek *S. aureus*, cechował się też najwyższą zdolnością do wiązania cieczy, wysoką aktywnością przeciwutleniającą i jako jedyny nie powodował spadku żywotności komórek mysich fibroblastów.

Równoległe do głównej ścieżki badawczej przeprowadzono badania w ramach dwóch pobocznych wątków tematycznych, z których pierwszy obejmował badania poświęcone optymalizacji ekspresji lizostafiny w bioreaktorze o objętości roboczej 5 l w układzie *E. coli* TOP10F'/pBAD2lys, w celu pozyskania taniego, szybkiego i wydajnego źródła jej otrzymywania. Określono warunki prowadzenia hodowli, pozwalające na uzyskanie wydajności specyficznej procesu ekspresji na poziomie 26000 U/l hodowli oraz enzymu o aktywności specyficznej 728 U/mg, co stanowi wynik ponad ośmiokrotnie wyższy w stosunku do wydajności opisywanych w dotychczasowej literaturze.

Realizacja drugiego pobocznego tematu badawczego umożliwiła poznanie wpływu rodzaju preparatu biopolimerowego (chitozanu, żelatyny bądź kolagenu) na wybrane właściwości wytworzonych z nich materiałów gąbczastych, przy wykorzystaniu standardowych procedur przetwarzania chitozanu (rozpuszczanie w wodnym roztworze kwasu octowego). Wynik przeprowadzonej za pomocą metody głównych składowych analizy porównawczej, jak również analiza wartości zmiennych cząstkowych, wskazuje na wyraźne różnice we właściwościach otrzymanych w 100% z tych biopolimerów, a także, że łącząc dane dwa polimery w tej samej ilości, możliwe jest uzyskanie materiału o właściwościach stanowiących wypadkową właściwości dla materiałów wykonanych z obu polimerów.

Przeprowadzone prace badawcze wskazują na duży potencjał otrzymanych materiałów chitozanowo-białkowych w konstrukcji nowego materiału opatrunkowego przeznaczonego do leczenia trudno gojących się ran skórnych i mogą stanowić dobry wstęp do projektowania badań klinicznych mających na celu potwierdzenie ich skuteczności w warunkach *in vivo*.

## **2. WPROWADZENIE**

### **2.1. Ogólna charakterystyka procesu regeneracji rany skórnej.**

Skóra jest największym organem ludzkiego ciała, zajmując średnio u osoby dorosłej 1,75 m<sup>2</sup> przy wadze około 5 kg. Często, błędnie uznawana jedynie za otoczkę ciała, w rzeczywistości jest ważnym organem zaangażowanym w mechanizmy regulacji środowiska wewnętrznego organizmu (utrzymanie wewnętrznej homeostazy), w tym przede wszystkim za gospodarkę wodną i utrzymywanie temperatury. Ponadto jest integralną częścią nieswoistego układu odpornościowego, tworząc pierwszą linię obrony przed zakażeniami drobnoustrojowymi [Percival i in. 2012]. Naruszenie jej naturalnej ciągłości, z towarzyszącą temu utratą tkanki powoduje powstanie rany, co może nastąpić zarówno wskutek przypadkowego urazu, w sposób zamierzony, bądź wskutek przyczyn patologicznych (owrzodzenia, nowotwory). W zależności od stanu, klasyfikacji ran dokonuje się w oparciu o dwa kryteria: ze względu na kolor warstwy wierzchniej oraz ze względu na ich głębokość. W ten sposób wyróżnia się rany pokryte warstwą w kolorze czarnym (tkanka martwicza), żółtym (tkanka martwicza wilgotna oddzielająca się od zdrowej) lub czerwonym (tkanka ziarnista), a także rany płytkie (powierzchniowe) obejmujące naskórek i/lub bez naruszenia skóry właściwej oraz rany głębokie, obejmujące naskórek, skórę właściwą, tkankę podskórną, a w pewnych przypadkach także mięśnie i kości [Ziółkowski i in. 2011]. Proces gojenia się rany rozpoczyna się bezpośrednio po jej powstaniu i jest procesem bardzo złożonym. Składa się z szeregu następujących po sobie etapów: fazy zapalnej (wysięku), fazy proliferacji (rozrostu, ziarninowania, naskórkowania) oraz fazy remodelowania (dojrzewania i kształtowania się tkanki kolagenowej, wytworzenia blizny) [Boateng i in. 2008, Burek i in. 2000]. Ze względu na tempo procesu regeneracji wyróżnia się rany ostre, szybko przechodzące przez cały proces gojenia, lecz nie dłużej niż od 8 do 12 tygodni oraz rany przewlekłe, w przypadku których normalny proces gojenia został zatrzymany na jednym bądź kilku etapach (zwykle na etapie fazy zapalnej), a cały proces regeneracji może trwać przez kilka miesięcy, a nawet lat [Percival 2002, Harding 2002]. Istnieje wiele czynników, które mogą negatywnie wpłynąć na ten proces, np. chroniczne zapalenie, infekcja patogenów, czy stres oksydacyjny. Także nadmierna produkcja wysięku, przy braku jego odbierania może prowadzić do maceracji zdrowej tkanki wokół miejsca zranienia i tym samym powodować opóźnienia w procesie regeneracji [Cutting i in. 2002]. Skład wysięku wydobywającego się z rany przewlekłej różni się też od tego, jaki wydzielany jest w przypadku rany ostrej, zawierając wyższe stężenia metaloproteinaz, których aktywność dodatkowo prowadzi do degradacji tkanki kolagenowej i opóźnienia procesu gojenia [Chen i in. 1992].

Wybór właściwego materiału opatrunkowego nie jest więc procesem łatwym i wymaga odpowiedniego rozważenia wszystkich wspomnianych wyżej czynników, mogących wpływać na opóźnienie tempa regeneracji rany. Boateng i współpr. w swojej

publikacji przeglądowej zestawili najbardziej pożądane właściwości, jakimi powinien cechować się idealny materiał opatrunkowy [Boateng i.in. 2008]. Wśród nich wyróżnia się; utrzymywanie warunków homeostazy, wilgotnego środowiska, mechanicznej bariery przed czynnikami zewnętrznymi (kurzem, mikroorganizmami), zdolność do wchłaniania nadmiernej ilości wydobywającego się z rany wysięku, zapobieganie infekcjom drobnoustrojowym, niską przyczepność, utrzymywanie temperatury w granicach 35-40<sup>0</sup>C oraz niski stosunek współczynnika kosztu do efektywności terapii.

Tradycyjne materiały obejmują produkty włókniste, takie jak gazy, bandaże i podstawowe opatrunki samoprzylepne oraz wszelkiego rodzaju płyny do zastosowań miejscowych [Stashak i in. 2004]. Pierwotnym celem ich stosowania było utrzymanie suchego środowiska rany, umożliwiającego odparowanie wydobywającego się z niej wysięku oraz zabezpieczanie przed kolonizacją drobnoustrojów ze środowiska zewnętrznego. Dopiero w latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia pojawiła się nowa koncepcja sposobu opatrywania, podając dowody na szybsze i bardziej efektywne leczenie przy zapewnieniu wilgotnych warunków leczenia. Wykazano, że następstwem zapewnienia wilgotnego, wolnego od infekcji środowiska rany, jest podwyższona obecność leukocytów, enzymów, cytokin oraz czynników wzrostu, co znacznie przyspiesza proces jej leczenia [Jones i in. 2001]. Pomimo dowodów popierających zmianę koncepcji leczenia rany, rozwój zaawansowanych materiałów opatrunkowych możliwy był dopiero wraz z postępem technologicznym w dziedzinie materiałów polimerowych i obserwujemy go dopiero w ostatnich kilkunastu latach.

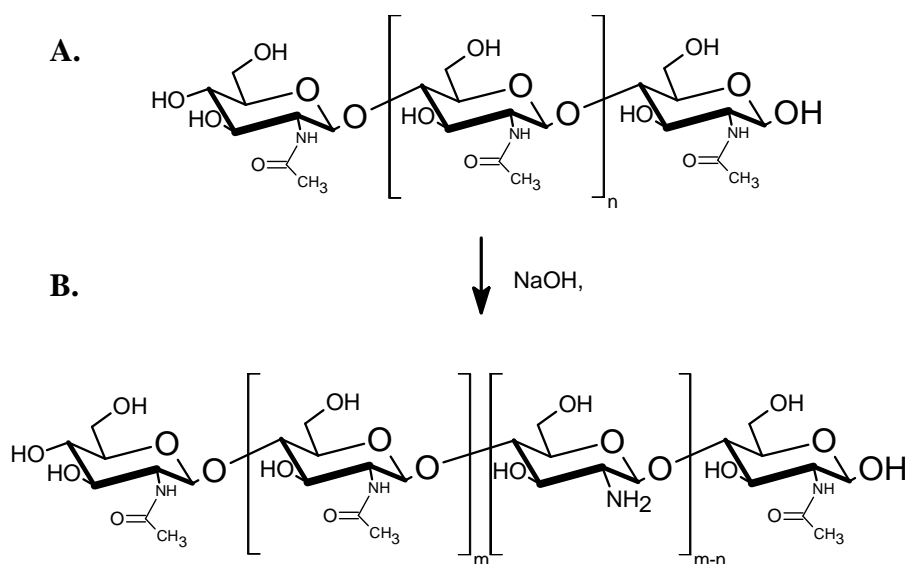
Zaawansowane materiały, często nazywane opatrunkami nowej generacji, są głównie podzielone ze względu na surowce, z jakich zostały wyprodukowane, dlatego też często wyróżnia się takie grupy jak: opatrunki hydrokoloidowe, hydrożelowe, włókniste, które zasadniczo występują w formie żeli, cienkich filmów bądź struktur gąbczastych [Boateng i in. 2008]. Ze względu na przeznaczenie wyróżnia się z kolei te, które zapewniają jedynie wilgotne środowisko rany i te, które dodatkowo zawierają czynnik aktywny. Czynnikami aktywnymi są głównie związki przeciwdrobnoustrojowe, czynniki wzrostu oraz żywe komórki [Stojadinovic i in. 2008]. Wprowadzanie aktywnych wyrobów opatrunkowych stanowi główny trend rozwoju tej gałęzi rynku wyrobów medycznych. Z roku na rok obserwuje się coraz większą liczbę takich opatrunków, wprowadzanych do standardowych metod leczenia. Tak gwałtowny rozwój badań nad nowymi materiałami opatrunkowymi napędzany jest dodatkowo brakiem pojedynczego produktu, który byłby idealny dla każdego rodzaju rany, na wszystkich jej etapach leczenia [Turner 1997]. Ze względu na znamienne różnice poszczególnych faz procesu leczenia rany, w tym przede wszystkim różnice w ilości wydobywającego się z niej wysięku, a także różnice w stanie zdrowia poszczególnych pacjentów, nie jest możliwe zaprojektowanie idealnego opatrunku medycznego. Wykorzystanie polimerów naturalnych, w tym także kolagenu i chitozanu, pozwala na

otrzymywanie materiałów o właściwościach zbliżonych do matrycy pozakomórkowej – miękkiej, mocnej i elastycznej sieci zbudowanej z białek, zapewniającej stabilność mechaniczną i integralność strukturalną tkanek i narządów ciała. Przewagą tego rodzaju materiałów jest dodatkowo ich biokompatybilność, brak toksyczności i niska skłonność do wywoływania odczynów alergicznych [Amidi i in. 2010, Friess 1998]. Często odgrywają one także bardzo specyficzną rolę w procesie odbudowywania tkanek skóry m.in. stanowiąc miejsce adhezji komórek [Wang i in. 2009]. Taka charakterystyka i dodatkowo stosunkowo niska cena, czyni polimery naturalne materiałami atrakcyjnymi w projektowaniu nowoczesnych materiałów opatrunkowych [Mogošanu i in. 2014, Sionkowska 2011].

## 2.2. Polimery naturalne (chitozan, kolagen, żelatyna) w konstrukcji materiałów medycznych o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu ran skórnych.

### 2.2.1. Chitozan – informacje podstawowe.

Chitozan jest polimerem naturalnym, zbudowanym z podjednostek  $\beta(1\rightarrow4)$ -D-glukozaminy i N-acetyl-D-glukozaminy, ułożonych losowo lub blokowo w strukturze łańcucha polimeru. Uzyskiwany jest z chityny, stanowiącej budulec szkieletu skorupiaków i owadów, a także występującej w ścianie komórkowej grzybów [Tolaimate i in. 2000, Zhang i in. 2000], na drodze procesu N-deacetylacji. Proces ten polega na rozszczepieniu grupy amidowej znajdującej się na węglu C2 N-acetylo-D-glukozaminy, w wyniku czego zostaje wygenerowana wolna grupa aminowa. Obecność szerefu wolnych grup aminowych chitozanowi rozpuszczonemu w środowisku kwaśnym unikatowy wśród biopolimerów, polikationowy charakter (**Rysunek 1**).



**Rysunek 1.** Schemat procesu otrzymywania chitozanu (Panel B) z chityny (Panel A).



Hasło „chitozan” obejmuje grupę polimerów o różnej masie cząsteczkowej, różnym stopniu deacetylacji, zdefiniowanym, jako procent pierwszorzędowych grup aminowych w strukturze szkieletu polimeru, a także o różnej dystrybucji obu podjednostek w obrębie pojedynczego łańcucha, na co wpływają warunki prowadzenia procesu N-deacetylacji. Większość właściwości chitozanu, w tym biodegradowalność, funkcje biologiczne, właściwości reologiczne jego roztworów i w konsekwencji możliwe zastosowania są zależne od tych dwóch parametrów [Huang i in. 2005]. Stopień deacetylacji komercyjnie dostępnych preparatów chitozanu zawiera się pomiędzy 70 a 95%, a ich masa cząsteczkowa pomiędzy 10 a 1000 kDa [Muzzarelli 2009]. Określenie „polimer naturalny” jest w przypadku chitozanu uzasadnione faktem, że polimer ten jest składnikiem ściany komórkowej niektórych grzybów strzępkowych, np. *Mucor rouxii*.

Ze względu na swoje wszechstronne właściwości, chitozan został doceniony nie tylko w zastosowaniach inżynierii tkankowej, lecz także na polu badań systemów dostarczania leków, produkcji suplementów diety, kosmetyków, przeciwdrobnoustrojowych płukanek do ust, w uprawie roślin i procesach ochrony środowiska m.in. w procesach oczyszczania ścieków [Mucha 2010]. Liczne badania dowiodły o jego biodegradowalności, biokompatybilności, braku właściwości antygenowych, braku toksyczności i biofunkcjonalności [Khor i in. 2003, Muzzarelli 2009]. Ponadto obecność dwóch grup funkcyjnych: hydroksylowych i aminowych, daje możliwość wielu różnych modyfikacji chemicznych i enzymatycznych, co jest często wykorzystywane w projektowaniu i konstruowaniu systemów do immobilizacji i uwalniania związków terapeutycznych, a także do uzyskiwania rozpuszczalnych w wodzie pochodnych chitozanu [Uragami i in. 2010, Liu i in. 2011]. Raporty dotyczące analizy rynku chitozanu prognozują, że światowe zapotrzebowanie na ten polimer w 2015 roku wyniesie ponad 21,4 tysiące ton [BHBIIC Ltd. 2014]. Daje mu to drugie miejsce, zaraz po celulozie, w grupie masowo wytwarzanych polimerów naturalnych.

Pomimo tak wszechstronnych zastosowań, aplikacje związane z wykorzystaniem chitozanu nadal jednak podlegają pewnym ograniczeniom. Ze względu na stabilną i sztywną strukturę krystaliczną, chitozan jest polimerem nierozpuszczalnym w wodzie, a także w roztworach przy pH powyżej 7 oraz w typowych rozpuszczalnikach organicznych. Rozpuszcza się on natomiast w wodnych roztworach kwasów takich jak: kwas octowy, cytrynowy, mrówkowy, solny, mlekowy, z których roztwory kwasu octowego są najczęściej wykorzystywane, przy czym niezbędne jest obniżenie pH roztworu poniżej wartości 6,2 [Leffler i in. 2000]. Przy zastosowaniu takich roztworów otrzymywane są różnego typu biomateriały, w tym: membrany, gąbki, włókna, mikrosfery oraz hydrożele. Zawartość kwasu w tak przygotowanych materiałach uniemożliwia ich bezpośrednie wykorzystanie w zastosowaniach medycznych bądź kosmetycznych (ze względu na drażniące działanie kwasów - spadek biokompatybilności) i zmusza wytwórcę do prowadzenia dodatkowych

procesów mających na celu jego usunięcie. Zwykle dzieje się to poprzez wypłukiwanie za pomocą wodnych bądź etanolowych roztworów, a następnie powtórne suszenie [Nandagiri i in. 2011, Yan i in. 2010]. Aby pominąć ten etap, prowadzonych jest wiele badań mających na celu wytworzenie rozpuszczalnych w wodzie cząsteczek chitozanu, a wśród nich różnego typu chemiczne bądź enzymatyczne modyfikacje oraz fragmentowanie łańcucha [Czechowska-Biskup i in. 2005, Heraa i in. 2001, Chung i in. 2005, Baran i in. 2015, Wang i in. 2011, Chang i in. 2007]. Nieco inne rozwiązanie zaproponował Struszczyk opracowując technologię otrzymywania chitozanu mikrokryształicznego [Struszczyk 1987]. Polega ona na agregacji makrocząsteczek z wodnych roztworów kwasów organicznych przez procesy zobojętniania, koagulacji i wytrącania polimeru mikrokryształicznego, połączonego z usuwaniem produktów ubocznych. Prace wdrożeniowe wykonane m.in. przez Instytut Biopolimerów i Włókien Chemicznych doprowadziły do jego wykorzystania w takich zastosowaniach jak: produkcja materiałów opatrunkowych, impregnacja tkanin i włókien wiskozowych, a także produkcja nawozów płynnych [Mucha 2010].

### **2.2.2. Kolagen – informacje podstawowe.**

Kolagen jest jednym z głównych składników tkanek kręgowców i bezkręgowców, w tym m.in. skóry, ścięgien, chrząstek, kości i błon łącznotkankowych, przy czym szacuje się, że w przypadku organizmów ssaczych stanowi on 25-30% suchej masy ciała [Alberts i in. 2002, Sadowska i in. 1999]. Cechą charakterystyczną cząsteczek kolagenu jest ich struktura, stanowiąca potrójną prawoskrętną helisę, utworzoną przez trzy lewoskrętne łańcuchy polipeptydowe  $\alpha$ . Do 2010 roku zidentyfikowano 29 typów tego białka, różniących się przede wszystkim konformacją łańcuchów  $\alpha$  i ich wzajemną kombinacją w potrójnej helisie [Parenteau-Bareil i in. 2010]. Strukturę pierwszorzędową kolagenu tworzy 19-21 reszt aminokwasowych, ułożonych w blokowo powtarzających się fragmentach –Gly-X-Y–. Obecność glicyny na co trzecim miejscu polipeptydowego łańcucha jest niezbędna do utrzymania prawidłowej jego konformacji. Kolejną cechą charakterystyczną dla tej grupy białek jest obecność w ich strukturze znacznej ilości hydroksyproliny i hydroksylizyny – aminokwasów rzadko i w nieznacznych ilościach występujących w innych białkach. Wykazano, że zawartość zwłaszcza hydroksyproliny zależna jest od rodzaju tkanki, gatunku i pochodzenia (temperatury przeżyciowej) zwierzęcia, z którego dokonywano izolacji preparatu. M.in. preparat wyizolowany z mięśni bydłowych zawierał od 6,6 do 11,1% hydroksyproliny [Sadowska 1992], natomiast preparat ze skór zimnolubnego dorsza od 4,1 do 8,0% [Sikorski i in. 1984, Yamaguchi i in. 1976]. Zawartość hydroksyproliny w kolagenie wpływa na jego właściwości funkcjonalne, wykorzystywane w konstrukcji różnego rodzaju produktów, m.in. na stabilność cieplną wyizolowanego preparatu, jego rozpuszczalność, czy właściwości przeciwutleniające. Służy także do jego identyfikacji.

Dojrzały kolagen, znajdujący się w tkankach organizmów żywych, jest białkiem nierozpuszczalnym w wodzie, rozcieńczonych kwasach i roztworach buforowych. Dopiero zniszczenie wiązań sieciujących, poprzez rozdrobnienie tkanki i traktowanie alkaliami lub obróbka enzymatyczna sprawia, że możliwa jest ekstrakcja docelowego preparatu białkowego [Sadowska i in. 2005, Skierka i in. 2004]. Z kolei wyizolowany preparat kolagenu jest białkiem rozpuszczalnym w rozcieńczonych roztworach kwasów (m.in. w roztworach kwasu octowego i mlekowego), natomiast nie rozpuszcza się w wodzie, o ile zostaną zapewnione warunki nienaruszające jego natywnej struktury. Poddanie roztworu kolagenu długotrwałemu ogrzewaniu powyżej temperatury denaturacji, sprawia, że dochodzi do rozpadu wiązań wodorowych i oddziaływań hydrofobowych, stabilizujących jego strukturę. W wyniku tego procesu następuje przejście z helikalnej struktury do tzw. kłęбка statystycznego i utrata części pierwotnych właściwości biologicznych. Yunoki i wspólnie wykazali, że temperatura denaturacji kolagenu wyizolowanego z ryb w większości przypadków nie przekracza 30°C [Yunoki i in. 2003]. Natomiast Reich zaobserwował, że możliwa jest samorzutna częściowa renaturacja (powrót do pierwotnej struktury), jeśli tylko warunki i czas ekspozycji nie są zbyt ekstremalne [Reich 1970].

Pomimo identyfikacji wielu typów białek kolagenowych, jedynie kilka z nich wykorzystywanych jest do konstrukcji biomateriałów mających zastosowanie w inżynierii tkankowej. Wśród nich znajdują się zdolne do tworzenia włókien: typ I, II, III, V i IX. Pozostałe są białkami niefibrylarnymi, wykazującymi znaczne różnice w strukturze, umiejscowieniu w tkankach oraz pełnionych funkcjach w organizmach żywych. Złotym standardem w większości publikowanych materiałów stało się wykorzystanie kolagenu typu I. Jest to białko o mocnych i grubych włóknach, o dużej stabilności cieplnej i odpowiednich do tego zastosowania właściwościach mechanicznych: cechujące się dużą rozciągliwością i wytrzymałością. Ponadto występuje ono w dużych ilościach w skórze, ścięgnach, kościach i mięśniach, co stanowi o jego atrakcyjności z punktu widzenia źródła pozyskiwania. Wykazano m.in., że kolagen typu I jest głównym składnikiem skóry, kości i płetw ryb, czyli składników będących dotychczas odpadami przemysłu rybnego [Nagai i in. 2000]. Opracowanie wydajnych technologii pozyskiwania kolagenu z tego źródła, przyczyniło się do obserwowanego w ostatnich latach, gwałtownego rozwoju produkcji preparatów kosmetycznych oferujących różnego rodzaju kuracje kolagenowe [Sadowska i in. 2003].

### **2.2.3. Żelatyna – informacje podstawowe.**

Żelatyna jest produktem częściowej hydrolizy kolagenu, przez co nie różni się od niego składem aminokwasowym. Nadal charakterystycznymi cechami pozostaje blokowo powtarzający się układ aminokwasów –Gly-X-Y– oraz stosunkowo duża zawartość hydroksyproliny i hydroksylizyny. W trakcie procesów otrzymywania żelatyny, w wyniku ekspozycji na wysoką temperaturę i ekstremalny odczyn kwasowo-zasadowy środowiska,

dochodzi do bezpowrotnej denaturacji trzeciorzędowej struktury kolagenu i fragmentacji jego łańcucha. W efekcie uzyskiwany jest preparat o strukturze kłębaka statystycznego, będącego mieszaniną łańcuchów o różnej masie cząsteczkowej i konformacji. W przypadku żelatyny rybiej obserwowane są głównie struktury  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , gdzie dwie ostatnie konformacje określają odpowiednio dwa i trzy związane ze sobą łańcuchy  $\alpha$  [Karim i in. 2009]. Ze względu na dwa typy procesu hydrolizy kolagenu wyróżnia się też dwa typy żelatyny, charakteryzujące się różnymi punktami izoelektrycznymi [Djagny i in. 2001, Young i in. 2005]. Żelatynę typu A otrzymuje się w procesie kwaśnej hydrolizy, zaś typu B w warunkach hydrolizy alkalicznej. Proces denaturacji w środowisku alkalicznym polega na hydrolizie wiązań amidowych w łańcuchach bocznych reszt asparaginowych i glutaminowych, w wyniku czego uzyskuje się produkt z większą gęstością grup karboksylowych, a co za tym idzie o większym ładunku ujemnym i niższym punkcie izoelektrycznym. Kwaśna obróbka kolagenu jedynie nieznacznie wpływa na jego właściwości elektrostatyczne (ze względu na dużo mniejszą wrażliwość wiązań amidowych) i w konsekwencji uzyskiwana jest żelatyna o punkcie izoelektrycznym zbliżonym do kolagenu. Obie metody doczekały się wielu modyfikacji, dzięki czemu na rynku dostępne są produkty o różnym punkcie izoelektrycznym. Najczęściej jednak żelatyna typu A cechuje się punktem izoelektrycznym w pobliżu wartości 5, a typu B w pobliżu wartości 9.

Usunięcie silnych oddziaływań stabilizujących strukturę kolagenu powoduje, że żelatyna jest preparatem białkowym rozpuszczalnym w wodzie. W przeciwieństwie do kolagenu, na skutek żelowania roztworów żelatynowych, możliwe jest otrzymanie stabilnych struktur w postaci stałej (o trójwymiarowej strukturze), bez wykorzystania związków sieciujących. Cecha ta jest powszechnie wykorzystywana w przemyśle spożywczym przy produkcji różnego rodzaju deserów i galaret, ze względu na zdolność uzyskiwanych żeli do szybkiego rozptywania się w ustach oraz na stosunkowo niskie stężenia wymagane do uzyskania produktu w postaci stałej [Gómez-Guillén i in. 2011].

Do dnia dzisiejszego głównymi źródłami pozyskiwania żelatyny są skóry wieprzowe, skóry bydlęce oraz ich kości. Z roku na rok obserwuje się jednak rosnące zapotrzebowanie na żelatynę ze źródeł alternatywnych. W 2007 roku żelatyna uzyskiwana z produktów ubocznych przemysłu rybnego stanowiła około 1,5% produkcji światowej, a liczne analizy rynku wskazują na znaczny wzrost w jego udziale w kolejnych latach. Rosnące zainteresowanie nie tylko podyktowane jest zagrożeniem ze strony zakażeń białkami prionowymi, ale także wzrastającym zapotrzebowaniem szybko rozwijających się państw o strukturze religijnej opartej na judaizmie lub islamie, w których produkcja i spożycie żelatyny pochodzenia wieprzowego jest zabronione, a żelatyny wołowej dozwolona tylko w przypadku, jeśli cały proces produkcyjny prowadzony jest zgodnie z religijnymi wymaganiami. Wśród powodów dotychczasowego mniejszego zainteresowania żelatynami pochodzenia rybiego były mniejsza stabilność i gorsze właściwości reologiczne

uzyskiwanych z nich żeli w stosunku do tych otrzymywanych z żelatyny ze zwierząt lądowych. Ostatnie badania wskazują jednak, że wykorzystanie żelatyny wyizolowanej z ryb bytujących w akwenach ciepłych wód tropikalnych i sub-tropikalnych, może prowadzić do uzyskania żeli o właściwościach reologicznych wymaganych przez przemysł [Gilsenan i in. 2000, Rawdkuen i in. 2010, Karim i in. 2009].

#### **2.2.4. Rola chitozanu, kolagenu i żelatyny w procesie regeneracji ran skórnych.**

Polimery naturalne, w tym chitozan, kolagen i żelatyna, jako składniki materiałów opatrunkowych, cenione są przede wszystkim za doskonałą biokompatybilność, bardzo niską antygenowość, biodegradowalność oraz podobieństwo wytwarzanych z nich biomateriałów do matrycy pozakomórkowej. Rola każdego z tych polimerów w procesie regeneracji uszkodzonej skóry jest złożoną funkcją wielu oddziaływań, wśród których wyróżnić można m.in. stymulowanie proliferacji komórek i procesu angiogenezy, aktywację makrofagów i neutrofilów w celu zainicjowania procesu gojenia, inhibicję metaloproteinaz, regulowanie środowiska oksydo-redukcyjnego, stymulowanie syntezy kolagenu, ograniczenie procesu formowania blizn, czy zapewnienie czystości mikrobiologicznej [Mogoşanua i in. 2014, Glowacki i in. 2007]. Niemniej jednak, pomimo wielu zebranych informacji, nadal nie jest jednoznaczne w jaki sposób chitozan, kolagen i żelatyna przyczyniają się do często znacznego przyspieszenia procesu gojenia się ran.

W celu wyjaśnienia podstawowego efektu działania chitozanu na układy biologiczne zbadano skutki aplikacji roztworu chitozanu na świeżą ranę. Zaobserwowano, że natychmiast po podaniu następuje aktywacja wielu elementów układu odpornościowego. Wykazano, że po kontakcie z naczyniami krwionośnymi, chitozan przyspiesza koagulację krwi oraz podnosi ilość uwalnianych cytokin z trombocytów. Efekty te stymulują łańcuch procesów biologicznych występujących w fazie zapalnej procesu gojenia się rany, co ostatecznie prowadzi do fagocytozy leukocytarnej wywołanej przez aktywność komórek śródbłoka naczyniowego, migrację granulocytów i znakowanie drobnoustrojów za pomocą opsoniny w przypadku infekcji. Ponadto na skutek kontaktu leukocytów z chitozaniem komórki te uwalniają fizjologicznie aktywne substancje, które dodatkowo intensyfikują swoją aktywność, a także aktywność monocytów, makrofagów, komórek śródbłoka naczyniowego i fibroblastów. Kaskada tych reakcji sprzyja tworzeniu tkanki ziarninowej oraz stymuluje proces angiogenezy. Makrofagi przekształcają się w komórki olbrzymie degradujące duże ilości kolagenu, co zapobiega przerastaniu blizn. W tym samym czasie następuje angiogeneza pobudzana przez różnego rodzaju cytokiny, co podnosi skuteczność leczenia ran [Uragami 2010].

W środowisku rany chitozan ulega biodegradacji za pomocą niektórych enzymów np. lizozymu, dzięki czemu powstaje oligosacharyd chitozanu (oligomer) oraz D-glukozamina. Oligomer silnie przyciąga granulocyty i makrofagi, natomiast D-glukozamina jest

składnikiem proteoglikanu i glikozaminoglikanów, substancji wykorzystywanych jako materiał w syntezie matrycy zewnątrzkomórkowej w miejscu zranienia, a także wykorzystywana jest w syntezie kwasu hialuronowego, który dodatkowo wzmacnia ruchliwość komórek, ich adhezję i proliferację, a także odgrywa ważną rolę w procesie morfogenezy [Minami i in. 2010]. Badania prowadzone w warunkach *in vitro* wykazały, że aktywacja makrofagów w wyniku kontaktu z cząsteczkami chitozanu może prowadzić do zwiększonej produkcji interleukiny 1 (IL-1), a także czynnika nekrozy nowotworów (TNF- $\alpha$ ), co ma znaczenie w procesach zapobiegania nowotworzeniu [Shibata i in. 1997].

Badania prowadzone przez kilka grup badawczych wykazały zdolność chitozanu, zwłaszcza jego frakcji o niższych masach cząsteczkowych, do inhibicji metaloproteinaz, enzymów zdolnych do degradacji składników matrycy zewnątrzkomórkowej, w tym kolagenów, lamininy i fibrynonektyny [Chen i in. 1992]. Metaloproteinazy są białkami, które ulegają stałej ekspresji, niemniej jednak w przypadku nieuszkodzonej skóry, ich produkcja odbywa się na niskim, niezagrażającym autohydrolizie poziomie. Wzrost ich stężenia, często gwałtowny, towarzyszy większości procesom związanych z przebudową tkanek, w tym procesom gojenia się ran, zapaleniom stawów, czy zmianom nowotworowym, w sposób istotny utrudniając procesy regeneracyjne. Przypuszcza się, że inhibicja aktywności tych enzymów przez cząsteczki chitozanu może zachodzić na skutek współdziałania dwóch mechanizmów: zahamowania procesów związanych z ich ekspresją na poziomie transkrypcyjnym i/lub poprzez ograniczenie dostępu do jonów cynku, które uznaje się za kofaktory metaloproteinaz [Kim i in. 2006, Gorzelanny i in. 2007].

Badania przeprowadzone przez Cuy i współpr. wykazały, że wprowadzenie do matrycy chitozanowej kolagenu może prowadzić do zwiększonej adhezji komórek i szybkości ich namnażania, w stosunku do matrycy chitozanowej otrzymanej bez jego dodatku [Cuy i in. 2003]. Podobne wyniki uzyskano w grupie Chen'a, która zaobserwowała zwiększoną adhezję fibroblastów na powierzchni symetrycznych membran chitozanowo-kolagenowych [Chen i in. 2009]. Zwiększona adhezja komórek na powierzchni materiałów kolagenowych jest konsekwencją strukturalnych i funkcjonalnych właściwości kolagenu, a zwłaszcza jego hydrofilowej natury uwarunkowanej dużą zawartością aminokwasów dikarboksyłowych. Nie bez znaczenia jest także fakt występowania glikoproteinowych receptorów na powierzchni komórek, wykazujących specyficzne powinowactwo do określonych regionów łańcucha kolagenowego [Kleinman i in. 1981]. Receptory te podzielono na cztery grupy różniące się budową i rozpoznawalną sekwencją, aczkolwiek tymi najczęściej rozpoznawalnymi motywami są sekwencje GPO (Gly-Pro-Hyp) i RGD (Arg-Gly-Asp) [Parenteau-Bareil i in. 2010].

Wysoka biokompatybilność kolagenu, a także promocja procesu gojenia się ran związana jest z tym, że białko to stanowi ponad 70% masy wszystkich komponentów skóry (poza wodą), w której pełni przede wszystkim funkcje związane z zapewnieniem jej

odpowiednich właściwości mechanicznych. Dane literaturowe wskazują co prawda na możliwą immunogenność (zdolność do wywoływania odpowiedzi immunologicznej) cząsteczek kolagenu bądź żelatyny [Steffen i in. 1968], aczkolwiek w przypadku kolagenu typu I, najczęściej wykorzystywanego do konstrukcji materiałów opatrunkowych, odpowiedź humoralna obserwowana jest jedynie u niewielkiego procenta populacji, a ponadto jest łatwo wykrywalna na drodze testów serologicznych [Eaglstein i in. 1999, Badyłak i in. 2008].

Na skutek aktywności metaloproteinaz obecnych w podwyższonym stężeniu w środowisku gojącej się rany, kolagen i żelatyna, a zwłaszcza żelatyna, mogą ulegać, enzymatycznej hydrolizie do oligopeptydów, a nawet do pojedynczych aminokwasów. Aminokwasy mogą być wykorzystywane jako substraty w syntezie nowej tkanki [Lai i in. 2012], a oligomery mogą dodatkowo stymulować chemotaktyczne ruchy fibroblastów, przyspieszając tym samym procesy remodelowania [Postlethwaite i in. 1978].

W celu zwiększenia szybkości procesu gojenia się rany, materiały na bazie chitozanu, kolagenu, a także żelatyny, często wykorzystuje się jako nośniki dla innych aktywatorów tego procesu, takich jak czynniki wzrostu, składniki matrycy zewnątrzkomórkowej, związki przeciwutleniające, inhibitory metaloproteinaz, komórki macierzyste oraz czynniki przeciwdrobnoustrojowe [Obara i in. 2003, Holmes i in. 2013].

#### **2.2.4.1. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe chitozanu, kolagenu i żelatyny.**

Skóra jest integralną częścią nieswoistego systemu odpornościowego, tworzącą pierwszą linię obrony przed egzogennymi infekcjami bakteryjnymi i tym samym, pomimo różnorodnych mechanizmów obronnych, stanowi siedlisko dla wielu gatunków mikroorganizmów. Wyniki projektu prowadzonego przez Amerykański Narodowy Instytut Zdrowia („The Human Microbiome Project”), którego celem była identyfikacja i charakterystyka mikroorganizmów należących do mikrobiomu człowieka, wskazały, że większość z nich należy do mikroorganizmów VBNC – komórek cechujących się brakiem zdolności do wzrostu na podłożach mikrobiologicznych mimo wykazywania aktywności fizjologicznej i metabolicznej [Percival i in. 2012]. Z kolei ilość bakterii zdolnych do wzrostu na podłożach mikrobiologicznych, bytujących na zdrowej i nienaruszonej skórze zawiera się poniżej  $10^5$  CFU/g bądź poniżej  $2 \times 10^6$  CFU/cm<sup>2</sup> [Edwards i in. 2004]. W wyniku przerwania jej ciągłości, odsłonięta tkanka stanowi bardziej dogodne środowisko dla wzrostu zarówno mikroorganizmów należących do mikrobiomu skóry, jak i egzogennych patogenów. Na ogół przyjmuje się, że w przypadku otwartej rany, przekroczenie wskazanych wyżej zakresów świadczy o jej zakażeniu bądź wysokim prawdopodobieństwie rozwoju zakażenia [Bowler 2003]. Wśród najczęściej występujących objawów wskazujących na zakażenie rany znajdują się: pojawienie się stanu zapalnego (zaczerwienienie i/lub wydzielanie ciepła, zwłaszcza na brzegach rany), odczuwanie zwiększonego bólu i tkliwości (szczególnie w okolicach rany), nadmierny wysięk, a także nieprzyjemny zapach [Gardner i in. 2001]. Zakażenia

spowodowane kolonizacją mikroorganizmów patogennych, należą do głównych czynników wydłużających proces leczenia ran, w tym także mogą prowadzić do zgonu pacjenta. Szacuje się, że na każdy milion przypadków pacjentów cierpiących z powodu ran skórnych, przypada przynajmniej 10 000 zgonów spowodowanych zakażeniami mikrobiologicznymi [Fiedotow i in. 2006]. Jedną z grup mikroorganizmów, które należą do tych najczęściej wywołujących infekcje ran skórnych są bakterie z gatunku *Staphylococcus aureus*, w tym także te, należące do grupy MRSA. W badaniach przeprowadzonych przez Gilliland'a wykazano m.in., że aż 94% trudno gojących się owrzodzeń kończyn dolnych było skolonizowanych tymi bakteriami [Gilliland 1988]. Wśród pozostałych mikroorganizmów wysoce patogennych wyróżnia się często *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter spp.*, a także *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus lugdunensis*. Pojawienie się zakażenia wskazuje na niepowodzenie endogennych mechanizmów obronnych i wymusza konieczność stosowania terapii przeciwdrobnoustrojowych, a wśród nich wykorzystanie materiałów opatrunkowych zawierających związki o tej aktywności. Do tych najczęściej wykorzystywanych należą związki srebra, jodu, preparaty miodu Manuka, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, związki o działaniu antyseptycznym, a także różnego rodzaju antybiotyki (**Wprowadzenie 2.3.2**). Pomimo wysokiej skuteczności wiele z nich jest przyczyną obaw związanych z ich efektami ubocznymi, wysoką toksycznością bądź ze stosunkowo dużą podatnością na generowanie mechanizmów oporności wśród mikroorganizmów wystawionych na ich długotrwałe działanie. Z tych powodów wiele uwagi poświęca się opracowywaniu terapii wykorzystujących związki naturalne o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, których zadaniem byłoby przynajmniej niedopuszczanie do rozwoju zakażenia.

Wśród komercyjnie dostępnych, produkowanych w skali wielkotonażowej polimerów naturalnych, chitozan jest jedynym polimerem wykazującym aktywność przeciwdrobnoustrojową. Jego spektrum aktywności obejmuje grzyby, drożdżaki, algi, niektóre wirusy oraz bakterie, przy czym większą aktywność stwierdzono wobec bakterii Gram(+) niż wobec Gram(-). Pomimo szerokiego spektrum aktywności, nie wpływa on negatywnie na wzrost komórek uszkodzonej tkanki, w przypadku konstrukcji materiałów wytworzonych na bazie chitozanu wykorzystywanych w medycynie, a także nie wpływa negatywnie na wzrost roślin, wobec których zastosowano chitozan jako środek przeciwwgrzybiczy. Wysoka biokompatybilność chitozanu idąca w parze z właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi, choć wyraźnie niższymi w stosunku do popularnie wykorzystywanych chemoterapeutyków, czy środków ochrony roślin, a także innymi jego zaletami, sprawiła, że chitozan cieszy się wzrastającym zainteresowaniem jako surowiec o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych wykorzystywany na potrzeby przemysłu spożywczego, rolnej uprawy roślin oraz konstrukcji wyrobów medycznych i tekstylnych, na



co wskazuje wyraźnie rosnąca liczba doniesień literaturowych opublikowanych w ostatnich dwóch dekadach [Kong i in. 2010, Rabea i in. 2003, Costa i in. 2012].

Mechanizm przeciwdrobnoustrojowego działania chitozanu nie został dotąd poznany, choć obserwuje się znaczny wzrost ilości doniesień literaturowych poświęconych tej tematyce. Zdjęcia komórek wyeksponowanych na działanie chitozanu uzyskane za pomocą mikroskopii elektronowej wskazują, że głównym celem molekularnym chitozanu jest powierzchnia komórki [No i in. 2012, Jeon i in. 2001, Helander i in. 2001]. Powszechnie uznano, że polikationowa natura chitozanu zapewniona przez obecność sprotonowanych grup aminowych glukozaminy, może być odpowiedzialna za oddziaływanie z obdarzoną ujemnym ładunkiem powierzchnią komórkową. Takie oddziaływanie może powodować lokalne zmiany w jej strukturze, prowadząc do wycieku substancji wewnątrzkomórkowych [Je i in. 2006, Zakrzewska i in. 2005]. Do argumentów wspierających zaproponowany mechanizm należą: a) utrata aktywności przeciwdrobnoustrojowej chitozanu w środowisku o pH powyżej 7,0 [Tsai i in. 1999, Park i in. 2004]; b) proporcjonalna zależność pomiędzy stopniem deacetylacji chitozanu, a aktywnością przeciwdrobnoustrojową [Tsai i in. 1999, Hussain i in. 2012]; c) utrata aktywności grzybostatycznej po N-acetylacji oligomerów chitozanu [Okamoto i in. 2003]; d) zwiększona oporność na chitozan mutantów *Salmonella typhimurium* ze znacznie zmniejszoną gęstością ładunku ujemnego na powierzchni zewnętrznej komórki [Je i in. 2006]. Ogólny mechanizm działania jest zatem zbliżony do mechanizmu działania innych kationowych czynników przeciwdrobnoustrojowych, takich jak jony srebra czy peptydy anty-drobnoustrojowe. Przewiduje się jednak, że w przypadku aktywności bakteriostatycznej nie decydują o niej niespecyficzne oddziaływania z ujemnie naładowanymi fosfolipidami błony komórkowej, lecz bardziej specyficzne oddziaływania elektrostatyczne z ujemnie naładowanymi fragmentami kwasu teichojowego [Helander i in. 2001]. Hipotezę tą ma potwierdzać dużo niższa aktywność chitozanu wobec bakterii Gram(-) oraz symulacje zachowania liposomów w kontakcie z makrocząsteczkami chitozanu. W symulacjach tych nie zaobserwowano wycieku zamkniętego we wnętrzu liposomów małowcząsteczkowego markera pod wpływem działania chitozanu, co wyklucza możliwość tworzenia kanałów oraz kompleksów poracyjnych błony komórkowej komórek patogenów, a potwierdza możliwość oddziaływania z innymi strukturami naładowanymi ujemnie, tworzącymi błonę komórkową [Raafat i in. 2008].

Skuteczność chitozanu jako środka przeciwdrobnoustrojowego, wykazano m.in. w czasie 28-dniowego testu w szeregu formułacji farmaceutycznych. Stwierdzono wówczas synergistyczne oddziaływania chitozanu z powszechnie wykorzystywanymi środkami konserwującymi, takimi jak: alkohol fenyloetylowy czy kwas benzoowy [Drury i in. 2003]. Te same badania wskazują także, iż aktywność chitozanu przejawia się bardziej bakteriostatycznym niż bakteriobójczym działaniem. Istnieją liczne doniesienia literaturowe poświęcone badaniom aktywności przeciwdrobnoustrojowej chitozanu i jego pochodnych, w

zależności od jego pochodzenia i właściwości fizyko-chemicznych. Ze względu na ogromną liczbę zmiennych parametrów oraz brak zestandaryzowanych protokołów, bardzo trudne, a czasem niemożliwe jest porównanie uzyskanych wyników. Badaniu wpływu masy cząsteczkowej chitozanu na jego aktywność przeciwdrobnoustrojową poświęcono szereg publikacji. Część z nich wykazuje prawidłowość, zgodnie z którą im mniejszy stopień polimeryzacji chitozanu, czyli im mniejsza jest jego masa cząsteczkowa, tym większa jest jego aktywność przeciwdrobnoustrojowa [Savard i in. 2002, Shigemasa i in. 1995]. Inne publikacje dokumentują wyższą aktywność materiałów wykonanych z chitozanu o wyższym stopniu deacetylacji w porównaniu do tych, wytworzonych z chitozanu o niższym stopniu deacetylacji [Liu i in. 2001, Tsai i in. 1999]. Pozostałe badania skupiały się nad wpływem rodzaju kwasu użytego do rozpuszczenia chitozanu oraz pH, temperaturą i siłą jonową środowiska, w jakim przeprowadzany jest test przeciwdrobnoustrojowy [Savard i in. 2002, Jumaa i in. 2002, Bhatia i in. 2003]. Ze względu na budowę chemiczną chitozanu, jego aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest wyższa w środowisku o niższym pH i spada w miarę zbliżania się do wartości pKa (6,3 – 6,5). Interesujące wyniki uzyskano badając aktywność chitozanu w roztworach o różnym stężeniu metali dwuwartościowych. Ich obecność powodowała znaczący spadek aktywności biologicznej chitozanu, co uzasadniono zmniejszeniem ilości aktywnych grup aminowych, z których część zaangażowana została w tworzenie kompleksów koordynacyjnych z jonami metali [Jumaa i in. 2002, Raafat i in. 2008]. Z kolei Chung i współpracownicy wykazali, że zdolność chitozanu do selektywnego wiązania jonów metali może hamować produkcję toksyn wydzielanych przez komórki bakteryjne, a także hamować ich wzrost [Chung i in. 2003].

W literaturze dostępny jest także szereg doniesień na temat alternatywnych mechanizmów przeciwdrobnoustrojowej aktywności chitozanu. Wśród nich znajdują się m.in. oddziaływanie z DNA i RNA, prowadzące do zahamowania transkrypcji oraz translacji [Rabea i in. 2003, Liu i in. 2001, Tarsi i in. 1997], a także blokowanie przepływu składników odżywczych do wnętrza komórki, poprzez tworzenie nieprzepuszczalnej otoczki chitozanowej na jej powierzchni [Sudarshan i in. 1992, Tokura i in. 1997]. Część przedstawionego wyżej materiału dotyczącego zagadnień związanych z aktywnością przeciwdrobnoustrojową chitozanu stała się podstawą publikacji przeglądowej poświęconej metodom aktywacji przeciwdrobnoustrojowej materiałów medycznych [Gorczyca i in. 2011].

W przeciwieństwie do opisanego wyżej chitozanu znanych jest znacznie mniej prac poświęconych badaniu przeciwdrobnoustrojowej aktywności preparatów żelatyny i kolagenu, przy czym zdecydowana większość z nich dotyczy ich hydrolizatów bądź peptydów o zdefiniowanej budowie pierwszorzędowej. M.in. Gómez-Guillén i współpracownicy dokonali charakterystyki aktywności hydrolizatów białkowych wyizolowanych ze skóry tuńczyka i kalmara o masie cząsteczkowej w zakresie 1-10 kDa oraz poniżej 1 kDa względem osiemnastu szczepów bakteryjnych, wykazując aktywność zależną zarówno od masy

cząsteczkowej, jak i ich składu aminokwasowego [Gómez-Guillén i in. 2010]. Wyniki uzyskane na drodze testu dyfuzyjno-krążkowego, w którym na celulozowe krążki o średnicy 0,5 cm наносono 40 µl roztworu peptydów z danej frakcji (2 mg/ml, w/v) wykazały, że wśród szczepów najbardziej wrażliwych względem wszystkich badanych preparatów znajdowały się bakterie z gatunków: *L. acidophilus*, *B. lactis*, *S. putrefaciens* i *P. phosphoreum* (średnica stref zahamowania wzrostu powyżej 0,5 cm). W przypadku bakterii z grupy najczęściej odpowiadającej za zakażenia ran skórnych (*S. aureus* i *E. coli*) jedynie frakcje o masie cząsteczkowej poniżej 1 kDa wykazały aktywność, wywołując strefę zahamowania wzrostu o średnicy w zakresie 0,6 - 0,75 cm. Mechanizm leżący u podstaw aktywności tych hydrolizatów nie został wskazany, jednakże autorzy przypuszczają, że jest on tożsamy z mechanizmami innych peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, dla których głównym celem molekularnym jest błona komórkowa mikroorganizmów [Hancock i in. 2002]. W swoich rozważaniach uznali oni, że stosunkowo wysoka aktywność badanych hydrolizatów względem poszczególnych szczepów może być uwarunkowana dużą zawartością hydrofobowych aminokwasów, które ułatwiają przedostanie się peptydów o niższej masie cząsteczkowej do wnętrza komórki [Wieprecht i in. 1997].

Lima i współpr. wykazali, że prowadząc proces hydrolizy z wykorzystaniem metod enzymatycznych można uzyskać preparaty białkowe o stosunkowo wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej w sposób powtarzalny. Uzyskane przez nich hydrolizaty białkowe o masie cząsteczkowej poniżej 2 kDa kolagenu bydlęcego, przy wykorzystaniu kolagenazy wyizolowanej z *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622, cechowały się wartościami MIC względem komórek *S. aureus* i *E. coli* na poziomie odpowiednio 0,55 i 0,625 mg/ml [Lima i in. 2015]. Natomiast Ramadass i współpr. w wyniku połączenia kolagenu bydlęcego, jego hydrolizatu uzyskanego na drodze hydrolizy enzymatycznej za pomocą trypsyny oraz chitozanu opracowali kompozytowy biomateriał przeznaczony do regeneracji ubytków skórnych, o aktywności przeciwdrobnoustrojowej względem komórek *S. aureus* i *E. coli* (średnica stref zahamowania wzrostu na poziomie 1,0 cm) [Ramadass i in. 2014]. Autorzy uznali, że zaobserwowana aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest wyłącznie wynikiem obecności hydrolizatu kolagenowego, ze względu na brak aktywności materiałów otrzymanych bez jego dodatku.

#### **2.2.4.2. Właściwości przeciwutleniające chitozanu, kolagenu i żelatyny.**

Stres oksydacyjny to jeden z czynników wpływających na wydłużenie tempa procesu regeneracji rany. Stan ten wynika z braku równowagi pomiędzy działaniem reaktywnych form tlenu i mechanizmów obrony antyoksydacyjnej organizmu. Może być powodowany nadmierną aktywnością wolnych rodników, a także może być związany z obecnością pozakomórkowych kationów poliwalentnych [Wiseman i in. 2006, Waddington i in. 2000]. Rola wolnych rodników i wpływ substancji przeciwutleniających jest jednym z najbardziej

aktualnych tematów w wyznaczaniu nowych strategii leczenia ran trudno gojących się [Fitzmaurice i in. 2011]. Dotychczasowe przekonania na temat konieczności maksymalnego ograniczania aktywności wolnych rodników w środowisku gojącej się rany zostały zastąpione nowymi wskazaniami, według których dąży się do zapewnienia równowagi pomiędzy siłami utleniającymi, a siłami przeciwutleniającymi [Roy i in. 2006, Sen 2003, Soneja i in. 2005].

Reaktywne formy tlenu (*ROS – reactive oxygen species*) to rodzaj wolnych rodników, które w swojej strukturze zawierają atom tlenu z niesparowanym elektronem. Są one normalnie produkowane w wielu reakcjach chemicznych związanych z metabolizmem komórkowym, a także jako odpowiedź organizmu na zakażenia bakteryjne. Szacuje się, że 2-5% przyjętego przez organizm tlenu dziennie jest przekształcanych w reaktywne formy tlenu [Soneja i in. 2005]. Badania wykazały, że mogą one powodować utlenianie białek i lipidów, uszkodzenia DNA, niszczenie składników macierzy pozakomórkowej, takich jak kolagen, proteoglikany, hialuroniany, a także indukcję metaloproteinaz [Waddington i in. 2000]. Z kolei inne badania donoszą, że całkowite zahamowanie aktywności reaktywnych form tlenu wpływa niekorzystnie na proces leczenia rany [Roy i in. 2006, Sen 2003], bowiem są one mediatorami wielu komórkowych szlaków sygnałowych, a także fazy zapalenia procesu regeneracji rany. M. in. Marumo i współpr. zasugerowali, że wyciszenie genów odpowiedzialnych za ekspresję płytkowego czynnika wzrostu (PDGF, odpowiedzialnego za produkcję nadtlenu wodoru, a także indukcję innych czynników stanu zapalnego, takich jak NF- $\kappa$ B i białka chemotaktycznego dla monocytów MCP-1) u myszy, spowodowało zmniejszoną liczbę monocytów w obrębie uszkodzonej tkanki, zmniejszenie ilości produkowanego nadtlenu wodoru i w konsekwencji opóźnienie w procesach angiogenezy – procesu tworzenia nowych naczyń włosowatych [Marumo i in. 1997]. Jednocześnie wykazano, że traktowanie uszkodzonej skóry takich myszy nadtlakiem wodoru w niskich stężeniach doprowadziło do zwiększenia stężenia czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF i przyspieszyło proces leczenia. Zaobserwowana pozytywna korelacja pomiędzy poziomem ekspresji VEGF, a stężeniem reaktywnych form tlenu została potwierdzona także w badaniach przeprowadzonych przez Sen'a i współpr. [Sen i in. 2002].

Organizmy żywe posiadają szereg mechanizmów obronnych, które są odpowiedzialne za zachowanie równowagi oksydacyjnej odbudowującej się tkanki skórnej. Poziom reaktywnych form tlenu jest kontrolowany na różnych poziomach poprzez: działanie dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazyglutationowej oraz peroksyredoksyny [Schäfer i in. 2008]. Mechanizmy te wspomagane są często terapiami wykorzystującymi różnego rodzaju niskocząsteczkowe związki o właściwościach przeciwutleniających, takich jak: glutation, witamina E, witamina C, a także różnego rodzaju pochodne fenolu. Ochronne działanie tych związków polega na tym, że same ulegają utlenieniu pod wpływem reaktywnych form tlenu, przekształcając je w mniej aktywne i przez to mniej szkodliwe formy [Maxwell 1997]. Rolę w regulacji równowagi oksydacyjnej odgrywają także

poliwalentne jony metali, zwłaszcza jony żelaza (III) i żelaza (II). Jony te działają, jako katalizatory w reakcji Fentona, podczas której następuje konwersja nadtlenu wodoru do rodnika hydroksylowego, będącego reaktywną formą tlenu o szczególnie szkodliwym działaniu [Sharma i in. 1990].

Polimery pochodzenia naturalnego, w tym zwłaszcza kolagen, żelatyna i chitozan to grupa związków wielkocząsteczkowych, która w stosunku do większości popularnie wykorzystywanych niskocząsteczkowych przeciwutleniaczy, wykazuje dużo niższą aktywność, zachowując jednak dużo większą stabilność [Puoci i in. 2008, Li i in. 2007]. Wysoka stabilność zapewnia jednak długotrwałą aktywność, co sprawia, że są one chętnie wykorzystywane jako stabilizatory produktów spożywczych. Nieliczne doniesienia literaturowe wskazują także, że charakterystyczna aktywność przeciwutleniająca wykazywana początkowo jedynie dla roztworów tych polimerów jest zachowana także dla różnego typu biomateriałów wytworzonych przy ich użyciu, w tym także dla materiałów projektowanych jako potencjalne materiały opatrunkowe.

Znane są doniesienia literaturowe na temat właściwości przeciwutleniających hydrolizatów otrzymywanych z białek roślinnych, takich jak otręby ryżowe, słonecznik, liście lucerny [Revilla i in. 2009, Megías i in. 2008, Xie i in. 2008]; kazeiny [Suetsuna i in. 2000]; białka i żółtka jaja [Sakanaka i in. 2006]; w tym również żelatyn pochodzenia zwierzęcego [Kim i in. 2001]. Wiele uwagi poświęcono także właściwościom przeciwutleniającym żelatyn rybich i ich hydrolizatów [Thiansilakul i in. 2007, Samaranayaka i in. 2008, Jun i in. 2004]. Dokładny mechanizm leżący u podstaw ich aktywności nie został w pełni poznany. Wiele z powyższych badań wykazuje, że mogą działać poprzez inhibicję utleniania lipidów, neutralizację wolnych rodników i chelatowanie jonów metali przejściowych. Różnice we właściwościach przeciwutleniających peptydów izolowanych z różnych źródeł, wynikają głównie z ich składu aminokwasowego i struktury wyższorzędowej. Wiele spośród opisanych peptydów o najwyższych właściwościach przeciwutleniających posiadało na N-końcach hydrofobowe aminokwasy: walinę albo izoleucynę, a także prolinę, histydynę, tryptofan, tyrozynę i metioninę w swojej sekwencji aminokwasowej [Dávalos i in. 2004]. Kim i współpracownicy zasugerowali, że wyższe aktywności przeciwutleniające peptydów zawierających więcej hydrofobowych aminokwasów mogą być związane z ich wyższą rozpuszczalnością w tłuszczach [Kim i in. 2001]. Inne badania wskazują, że o wyższej zdolności do neutralizacji wolnych rodników przez preparaty białkowe może przesądzać wyższa zawartość aminokwasów o charakterze elektronodonorowym [Giménez i in. 2009]. Natomiast Rajapakse i współpracownicy zasugerowali, że za wyższe właściwości przeciwutleniające żelatyn wyizolowanych ze skór rybich w stosunku do żelatyn wieprzowych odpowiada wyższa zawartość glicyny i prolina [Rajapakse i in. 2005]. Duża zawartość takich aminokwasów jak histydyna, prolina, hydroksyprolina może natomiast wskazywać na wyróżniającą zdolność danego preparatu do chelatowania jonów metali przejściowych [Saiga i in. 2003]. Poza

relacjami pomiędzy budową pierwszorzędową, a aktywnością danego preparatu białkowego, badano także wpływ jego struktury drugorzędowej na przykładzie hydrolizatów  $\alpha$  i  $\beta$  lacalbuminy wołowej [Hernández-Ledesma i in. 2005]. Badania przeprowadzone przez dwie niezależne grupy badawcze wskazały, że o właściwościach przeciwutleniających hydrolizatów białkowych, mogą decydować także warunki prowadzenia procesu hydrolizy, a w przypadku hydrolizy enzymatycznej o poziomie właściwości przeciwutleniających uzyskiwanych peptydów może decydować aktywność wykorzystywanej proteazy [Alemán i in. 2011, Qian i in. 2008]. Obie te grupy uzyskały hydrolizaty o wyższej aktywności przeciwutleniającej przy użyciu alkalazy w stosunku do innych wykorzystanych enzymów: kolagenazy, pepsyny, tripsyny, chymotrypsyny, papainy i neutrazy.

Znane są także wyniki badań ukazujące zależność pomiędzy masą cząsteczkową peptydu, a jego aktywnością przeciwutleniającą. W badaniach tych wykazano rosnącą aktywność przeciwutleniającą wraz ze zmniejszającą się masą cząsteczkową różnych frakcji hydrolizatów wyizolowanych ze skóry kałamarnicy [Gómez-Guillén i in. 2010]. Podobne wyniki uzyskała grupa Yang'a, która wykazała o 20% wyższą aktywność w stosunku do neutralizowania wolnych rodników frakcji składającej się z peptydów o masie do 700 kDa w stosunku do preparatu niefrakcjonowanego, wyizolowanych ze skór ryby okoniowatej *Rachycentron canadum* [Yang i in. 2008].

Z kolei Mendis i współpracownicy wskazali, że hydrolizaty białkowe uzyskane na drodze hydrolizy enzymatycznej skór ryby Hoki (*Johnius belengerii*), poza zdolnością do neutralizacji wolnych rodników i inhibicji utleniania lipidów, zdolne są do stymulowania ekspresji enzymów regulujących równowagę oksydo-redukcyjną w ludzkich komórkach raka wątroby: dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej oraz katalazy [Mendis i in. 2005].

Właściwości przeciwutleniające chitozanu należą do równie dobrze znanych jak w przypadku opisanych wyżej hydrolizatów preparatów białkowych, aczkolwiek na ten temat dostępnych jest znacznie mniej doniesień literaturowych. Wśród zaproponowanych mechanizmów leżących u podstaw tej aktywności znajdują się przede wszystkim: zdolność do neutralizacji reaktywnych form tlenu oraz zdolność do chelatowania jonów metali przejściowych [Xie i in. 2001, Lin i in. 2009, Rajalakshmi i in. 2013]. Są to mechanizmy dużo mniej skomplikowane niż te występujące w preparatach białkowych ze względu na ograniczoną różnorodność możliwych centrów aktywności, którymi w tym przypadku są grupy hydroksylowe i wolne grupy aminowe. Małą różnorodność tych oddziaływań kompensuje jednak stosunkowo duża ilość powtarzających się grup funkcyjnych.

Podobnie do obserwacji poczynionej w trakcie badania preparatów białkowych, tak i w tym przypadku zaobserwowano wzrost aktywności w stosunku do neutralizacji wolnych rodników wraz ze spadkiem masy cząsteczkowej badanego preparatu [Chien i in. 2007, Yin

i in. 2002]. Ponadto badania aktywności przeciwutleniającej chitozanów o różnej masie cząsteczkowej w soku jabłkowym wykonane przez Chien'-a i współprac. wskazały na porównywalną zdolność do neutralizacji wolnych rodników wykazywaną przez chitozan o niskiej masie cząsteczkowej (12 kDa) z roztworami kwasu askorbinowego [Chien i in. 2007]. Z kolei Mau i współprac. skorelowali wzrost właściwości przeciwutleniających chitozanów wyizolowanych ze ściany komórkowej grzybów shiitake ze wzrostem stopnia deacetylacji tego preparatu [Yen i in. 2007]. Ta sama grupa wykazała także bardzo duże zdolności chitozanu do chelatowania jonów żelaza (II), na poziomie porównywalnym z EDTA i kilkunastokrotnie wyższym w stosunku do kwasu cytrynowego. Czynniki wpływające na właściwości chelatujące chitozanu nie są do końca wyjaśnione. Znane są doniesienia literaturowe sugerujące, że dwuwartościowe jony metali chelatowane są poprzez oddziaływanie z grupą hydroksylową na atomie węgla C6 oraz z grupą aminową na atomie C2 glukozaminy [Inoue i in. 1988]. Inne badania donoszą o zależności związanej ze stopniem deacetylacji chitozanu, wskazując na niemal całkowitą redukcję zdolności do chelatowania dwuwartościowych jonów metali całkowicie zacylowanych chitozanów [Qin 1993]. Jony metali przejściowych poza wskazanym wcześniej negatywnym wpływem w procesie gojenia rany, mogą także inicjować utlenianie lipidów i rozpocząć kaskadę reakcji rodnikowych, która prowadzi do pogorszenia walorów smakowych i zapachowych różnych produktów spożywczych, dlatego też w obu tych zastosowaniach dąży się do utrzymania ich stężenia na możliwie minimalnych poziomach.

Aktywność ochronną chitozanu wykazano w badaniach *in vitro* i *in vivo* na przykładzie zmniejszonego tempa utleniania roztworów surowiczej albuminy ludzkiej wyekspozowanych na działanie rodników hydroksylowych [Anraku i in. 2008, Anraku i in. 2009]. Santhosh wykazał, że podawanie chitozanu szczurom, które były leczone izoniazydem lub ryfampicyną zapobiegało hepatotoksycznej oksydacji lipidów wątrobowych [Santhosh i in. 2006]. Natomiast Yoon odnotował, że dożylnie podanie roztworu chitozanu szczurom, zahamowało uszkodzenia oksydacyjne nerek indukowane poprzez podawanie glicerolu [Yoon i in. 2008].

### **2.2.5. Przegląd materiałów na bazie chitozanu, kolagenu i żelatyny o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu ran skórnych, a także metod ich otrzymywania.**

Ze względu na szereg przedstawionych wyżej właściwości, chitozan, kolagen i żelatyna należą do grupy polimerów naturalnych najczęściej wykorzystywanych w projektowaniu i konstrukcji nowoczesnych biomateriałów o potencjalnym zastosowaniu w terapiach przyspieszających proces regeneracji uszkodzonej skóry. Lee i współpr. w swojej pracy przeglądowej poświęconej biomedycznym zastosowaniom kolagenu zebrali zalety i wady związane z opisywaną aplikacją [Lee i in. 2001]. Wśród zalet wymieniono m.in. otrzymywanie ze źródeł odnawialnych, dużą dostępność surowca i dobrze opisane procesy jego otrzymywania; brak antygenowości, biodegradowalność, a także bioresorbowalność; brak toksyczności i wysoką biokompatybilność, oddziaływanie synergistyczne z innymi bioaktywnymi molekułami, zdolność do przyspieszania procesu krzepnięcia krwi, łatwość formułowania w materiały o różnej postaci, łatwość wprowadzania modyfikacji, dzięki obecności wielu grup funkcyjnych, a także wysoką kompatybilność z syntetycznymi polimerami. Wymienione wady obejmowały takie aspekty jak: stosunkowo wysoką cenę surowca, niejednorodność właściwości w zależności od źródła pozyskiwania, znaczną hydrofilowość materiału odpowiadającą za zjawisko gwałtownego uwalniania inkorporowanych w materiałach z niego wytworzonych związków aktywnych, utrudnienia związane z przetwarzaniem kolagenu, a zwłaszcza konieczność zapewnienia niskich temperatur w celu zminimalizowania utraty jego trzeciorzędowej struktury, a także zagrożenie ze strony zakażeń prionami wywołującymi gąbczastą encefalopatię bydłą w przypadku wykorzystywania tkanek bydła jako źródła jego pozyskiwania. W opinii autora niniejszej rozprawy większość z wymienionych zalet i wad dotyczy także dwóch pozostałych opisywanych surowców, z taką tylko różnicą, że chitozan i żelatyna są surowcami tańszymi w pozyskiwaniu, a także niewymagającymi utrzymywania niskich temperatur w procesach ich przetwarzania.

W dotychczasowej literaturze znajduje się szereg doniesień na temat różnorodnych formułacji obejmujących: proszki, hydrożele, membrany, włókna, nano- i mikrocząsteczki, rusztowania, a także materiały gąbczaste, dla każdego z tych biopolimerów osobno, a także materiałów kompozytowych, stanowiących wzajemne ich połączenia bądź połączenia z innymi naturalnymi i syntetycznymi makrocząsteczkami. Mając na uwadze dużą różnorodność tych formułacji, a także dostępność obszernych prac przeglądowych je zestawiających, najważniejsze z nich zostały przedstawione w sposób tabelaryczny (**Tabela 1**).



**Tabela 1.** Przegląd materiałów wytworzonych z chitozanu, kolagenu i żelatyny mających zastosowanie w leczeniu ran.

Rodzaj formułacji (typ materiału)	Wykorzystane związki dodatkowe (związki sieciujące // związki nadające bądź intensyfikujące właściwości biofunkcyjne)	Najważniejsze informacje o materiale i przeprowadzonych badaniach.	Źródło
<b>CHITOZAN</b>			
gąbka (liofilizacja)	wodorofosforan sodu	Materiał sieciowany poprzez kąpiel w roztworze wodorofosforanu sodu. Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty NIH3T3.	[Yang i in. 2010]
gąbka (liofilizacja)	paracetamol	Porównanie profilu uwalniania paracetamolu z gąbki chitozanowej, alginianowej i chitozanowo-alginianowej.	[Lai i in. 2003]
gąbka (liofilizacja)	amikacyna, wankomycyna	Badania <i>in vitro</i> – <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> .	[Noel i in. 2010]
gąbka (liofilizacja)	aldehyd glutarowy // cardosin A	Gąbka chitozanowa z czynnikiem przeciwwłóknieniowym, peptydem Cardosin A.	[Pereira i in. 2005]
gąbka (liofilizacja)	sulfodiazyna srebra	Materiał uzyskany na drodze suszenia sublimacyjnego, chitozanowego żelu wytrąconego z roztworu kwasu octowego za pomocą roztworu NaOH-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . Badania <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> – szczury.	[Mi i in. 2002]
gąbka (liofilizacja)	brak	Metoda wytwarzania materiałów gąbczastych o hierarchicznej strukturze porów, z wykorzystaniem zamrożonych kropelek wody.	[Ko i in. 2010]
gąbka (liofilizacja)	insulina	Metoda wytwarzania dwuwarstwowych materiałów z inkorporowaną insuliną.	[Portero i in. 2007]
gąbka (liofilizacja)	aldehyd glutarowy, trifosforan sodu // doksycyklina	Badania <i>in vitro</i> – <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> .	[Phaechamud i in. 2008]
gąbka (liofilizacja)	brak	Metoda wytwarzania gąbki chitozanowej z chitozanu mikrokryształicznego. Badania <i>in vivo</i> – szczury.	[Huang i in. 2015]
gąbka (liofilizacja)	DTBP (dimethyl 3, 3'-dithio- propionimidate dihydrochloride)	Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty ludzkie Detroit 551.	[Adekogbe i in. 2005]
gąbka (scCO <sub>2</sub> )	aldehyd glutarowy	Opis nowej metody otrzymywania materiałów gąbczastych, z wykorzystaniem ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym. Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty ludzkie.	[Chengdong i in. 2011]
gąbka (scCO <sub>2</sub> )	aldehyd glutarowy, genipina	Opis nowej metody otrzymywania materiałów gąbczastych, z wykorzystaniem ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym. Wpływ stężenia czynnika sieciującego na właściwości uzyskiwanych materiałów. Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty ludzkie.	[Ji i in. 2011]
gąbka (kriogeniczne drukowanie 3D, liofilizacja)	brak	Metoda pozwalająca na uzyskiwanie materiałów o wysoce programowalnej strukturze, dzięki wykorzystaniu druku 3D z jednoczesnym wymrażaniem nanoszonych pojedynczych warstw chitozanu.	[Lee i in. 2011]
membrana hydrożelowa	HBACS // gentamycyna	Wykorzystanie heksametyleno-1,6-bis amino tiosiarczanu disodu (HBACS), jako czynnika sieciującego.	[Campos i in. 2009]
membrana hydrożelowa	formaldehyd	Badanie wpływu sieciowania formaldehydem na właściwości hydrożelowych membran chitozanowych.	[Singh i in. 2006]
membrana hydrożelowa	aldehyd glutarowy // peptyd GRGDGY	Materiał z immobilizowanym za pomocą aldehydu glutarowego peptydem intensyfikującym migrację komórek w miejsce zranienia.	[Kirsebom i in. 2007]
membrana hydrożelowa	kwas 3-fosfoglicerynowy	Metoda wytwarzania termowrażliwych membran hydrożelowych z wykorzystaniem kwasu 3-fosfoglicerynowego, jako induktora procesu żelowania. Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty mysie.	[Zhao i in. 2009]

Rodzaj formulacji (typ materiału)	Wykorzystane związki dodatkowe (związki sieciujące // związki nadające bądź intensyfikujące właściwości biofunkcyjne)	Najważniejsze informacje o materiale i przeprowadzonych badaniach.	Źródło
<b>CHITOZAN cd.</b>			
membrana hydrożelowa + gąbka (liofilizacja)	brak	Asymetryczny materiał opatrunkowy o dużej chłonności. Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty NIH3T3, badania <i>in vivo</i> – szczury.	[Mi i in. 2001]
materiał włóknisty (elektroprzędzenie)	nanocząsteczki Ag	Badania <i>in vitro</i> – <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> (MRSA).	[Lee i in. 2014]
materiał włóknisty (elektroprzędzenie)	genipina, epichlorohydryna, HDACS	Wpływ różnych związków sieciujących na właściwości materiałów włóknistych uzyskanych metodą elektroprzędzenia.	[Austero i in. 2012]
Hydrożel	brak	Badanie wpływu masy cząsteczkowej i stopnia deacetylacji hydrożeli chitozanowych na proces regeneracji rany, badania <i>in vivo</i> – szczury.	[Minagawa i in. 2007]
Hydrożel	brak	Metoda wytwarzania hydrożelu chitozanowego w kwasie glikolowym, badania <i>in vivo</i> – szczury.	[Tucci i in. 2001]
cienki film	nanocząsteczki Ag	Metoda wytwarzania przezroczystych cienkich filmów z roztworu N-dodecylowej pochodnej chitozanu. Badania <i>in vitro</i> – <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> .	[Pinto i in. 2012]
Mikrosfery	genipina // klarytromycyna, tramadol, heparyna	Profil uwalniania związków aktywnych w zależności od ich budowy i masy cząsteczkowej. Wpływ stężenia genipiny na profile uwalniania.	[Harris i in. 2010]
Mikrosfery	genipina // albumina wołowa	Sieciowanie immersyjne. Wpływ stężenia roztworu genipiny i czasu sieciowania na profil uwalniania albuminy wołowej.	[Yuan i in. 2007]
nanocząsteczki (sonikacja)	trifosforan sodu // kationy metali: Ag <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup>	Sieciowanie za pomocą trifosforanu sodu. Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej <i>in vitro</i> – <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> .	[Du i in. 2009]
<b>KOLAGEN</b>			
gąbka (liofilizacja)	tansglutaminaza	Materiał gąbczasty uzyskiwany na drodze sieciowania enzymatycznego. Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty ludzkie.	[Chen i in. 2005]
gąbka (liofilizacja)	brak	Porównanie materiałów gąbczastych uzyskanych z kolagenu i jego hydrolizatu. Gąbka z hydrolizatu kolagenu wykazywała aktywność przeciwdrobnoustrojową. Badania <i>in vitro</i> - <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> .	[Ramadass i in. 2015]
gąbka (liofilizacja)	EDC	Materiał gąbczasty uzyskany z kolagenu wyizolowanego z meduzy.	[Song i in. 2006]
gąbka (liofilizacja)	EDC	Materiał uzyskany na drodze sieciowania immersyjnego w roztworze EDC/NHS i ponownie poddany liofilizacji. Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty ludzkie.	[Ma i in. 2004]
gąbka (liofilizacja)	aldehyd glutarowy // neurotensyna	Materiał gąbczasty sieciowany immersyjnie z inkorporowanym neuropeptydem, który wykazuje działanie jako modulator stanu zapalnego podczas procesu gojenia się rany. Badania przebiegu procesu regeneracji rany <i>in vivo</i> – myszy.	[Liane i in. 2014]
gąbka (suszenie w podwyższonej temperaturze)	brak	Materiał uzyskany poprzez wysuszenie pulpy kolagenowej. Kolagen rybi.	[Sankar i in. 2008]

Rodzaj formulacji (typ materiału)	Wykorzystane związki dodatkowe (związki sieciujące // związki nadające bądź intensyfikujące właściwości biofunkcyjne)	Najważniejsze informacje o materiale i przeprowadzonych badaniach.	Źródło
<b>KOLAGEN c.d.</b>			
gąbka (kriogeniczne drukowanie 3D, liofilizacja)	brak	Metoda pozwalająca na uzyskiwanie materiałów o wysoce programowalnej strukturze, dzięki wykorzystaniu druku 3D z jednoczesnym wymrażaniem nanoszonych pojedynczych warstw kolagenu.	[Kim i in. 2009]
membrana hydrożelowa	ekstrakt z fasoli <i>Macrotyloma uniflorum</i>	Membrana o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Kolagen rybii. Badania <i>in vitro</i> - <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. vulgaris</i> .	[Muthukumar i in. 2012]
membrana hydrożelowa	kwercetyna	Materiał o zwiększonych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.	[Gomathi i in. 2003]
membrana hydrożelowa + gąbka (liofilizacja)	DNA łososia	Materiał uzyskany poprzez zmieszanie kolagenu łososia z jego DNA, w celu przyspieszenia procesu gojenia się ran.	[Shen i in. 2008]
materiał włóknisty (elektroprzędzenie)	komórki: fibroblasty i keranocyty ludzkie	Materiał do zastosowań jako substytut skóry z inkorporowanymi komórkami.	[Kempf i in. 2011]
materiał włóknisty (elektroprzędzenie)	wankomycyna, gentamycyna, lidokaina	Wielowarstwowy materiał, z warstwą zawierającą związki przeciwdrobnoustrojowe. Naprzemienne ułożenie warstw z i bez związków aktywnych przyczyniło się do spowolnienia tempa uwalniania leku. Badania <i>in vivo</i> – szczury, rany zakażone <i>E. coli</i> i <i>S. aureus</i> .	[Chen i in. 2012]
gąbka (liofilizacja) + włókna (elektroprzędzenie)	brak	Materiały otrzymane z kolagenu rybiego dla celów medycyny regeneracyjnej. Badania przebiegu procesu regeneracji rany <i>in vivo</i> – szczury.	[Zhou i in. 2015]
Hydrożel	aldehyd glutarowy // minocyklina	Hydrożel o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych do zastosowań w leczeniu zakażeń ran skórnych. Badanie profilu uwalniania minocykliny w zależności od stężenia kolagenu i czynnika sieciującego.	[Ghicai in. 2011]
Hydrożel	brak	Metoda otrzymywania stabilnych żeli kolagenowych bez dodatku czynników sieciujących, na drodze neutralizacji podczas procesu dializy.	[Skopinska-Wisniewska i in. 2014]
<b>ŻELATYNA</b>			
gąbka (liofilizacja)	dehydratacja termiczna	Porównanie materiałów gąbczastych uzyskanych z kolagenu i żelatyny, sieciowanych na drodze dehydratacji termicznej. Badania <i>in vitro</i> - fibroblasty tkanki łącznej L929.	[Ratanavaraporn i in. 2006]
gąbka (liofilizacja)	wankomycyna	Materiał uzyskany na drodze naprskiwania pojedynczych warstw żelatynowych z wankomycyną na wcześniej przygotowaną gąbkę żelatynową. Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej <i>in vitro</i> – <i>S. aureus</i> .	[Shukla i in. 2012]
gąbka (liofilizacja)	aldehyd glutarowy	Materiał wykorzystywany jako substytut skóry. Porównanie z Integra scaffold. Żelatyna rybna.	[Shevchenko i in. 2014]
membrana hydrożelowa	transglutaminaza // witronektyna, fibronektyna, peptydy z sekwencją RGD	Metoda wytwarzania hydrożelowych membran z unieruchomionymi białkami i peptydami stymulującymi adhezję fibroblastów.	[Ito i in. 2003]

Rodzaj formulacji (typ materiału)	Wykorzystane związki dodatkowe (związki sieciujące // związki nadające bądź intensyfikujące właściwości biofunkcyjne)	Najważniejsze informacje o materiale i przeprowadzonych badaniach.	Źródło
<b>ŻELATYNA c.d.</b>			
membrana hydrożelowa	genipina	Badanie kinetyki degradacji matrycy w zależności od stężenia czynnika sieciującego.	[Yao i in. 2004]
membrana hydrożelowa	brak	Materiał otrzymany poprzez naniesienie cienkiej warstwy żelatynowej na materiał celulozowy.	[Huang i in. 2010]
membrana hydrożelowa	genipina, EDC	Porównanie właściwości membran hydrożelowych sieciowanych genipiną i karboimidami.	[Liang i in. 2003]
materiał włóknisty (elektroprzędzenie)	genipina	Sieciowanie w atmosferze par genipiny.	[Su i in. 2011]
materiał włóknisty (elektroprzędzenie)	aldehyd glutarowy	Metoda wytwarzania włóknistych materiałów z włókien będących kopolimerem chitozanu, żelatyny i alkoholu poliwinylowego. Sieciowanie parami aldehydu glutarowego.	[Tsai i in. 2014]
materiał włóknisty (elektroprzędzenie)	genipina	Metoda otrzymywania materiałów dla zastosowań medycyny regeneracyjnej. Sieciowanie kodyspersyjne.	[Panzavoltai in. 2011]
materiał włóknisty (elektroprzędzenie)	aldehyd glutarowy // nanocząsteczki Ag	Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej <i>in vitro</i> – <i>S. aureus</i> .	[Rujitanaraj i in. 2008]
<b>CHITOZAN – ŻELATYNA</b>			
gąbka (liofilizacja)	aldehyd glutarowy // prednizolon	Wpływ rodzaju kwasu użytego jako rozpuszczalnika na fizykochemiczne właściwości uzyskiwanych materiałów oraz profil uwalniania związku aktywnego.	[Leffler i in. 2000]
gąbka (liofilizacja)	aldehyd glutarowy	Badania przeciwdrobnoustrojowe <i>in vitro</i> – <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus</i> , porównanie z terapią cefalosporyną i penicyliną. Badania <i>in vivo</i> – królik.	[Deng i in. 2007]
gąbka (liofilizacja)	EDC	Wykorzystanie materiałów chitozanol-żelatynowych z dodatkiem kwasu hialuronowego, jako sztucznej skóry. Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty ludzkie.	[Liu i in. 2007]
gąbka (liofilizacja)	aldehyd glutarowy // cyprofloksacyna	Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej <i>in vitro</i> – <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> . Badania <i>in vivo</i> – królik.	[Han i in. 2014]
gąbka (liofilizacja)	genipina	Badanie wpływu stężenia chitozanu i żelatyny na właściwości materiałów gąbczastych przeznaczonych do zastosowań medycyny regeneracyjnej, a także wpływu stężenia czynnika sieciującego i metody sieciowania (metoda kodyspersyjna i immersyjna).	[Sarema i in. 2013]
gąbka (liofilizacja) + mikrosfery	FGF – czynnik wzrostu fibroblastów	Materiał gąbczasty z inkorporowanymi mikrosferami zawierającymi czynnik wzrostu fibroblastów.	[Liu i in. 2007]
membrana hydrożelowa	promieniowanie $\gamma$ // nanocząsteczki Ag	Membrana sieciowania promieniowaniem $\gamma$ . Wykorzystano rozpuszczalny w wodzie karboksymetylochitozan. Badania <i>in vitro</i> – <i>E. coli</i> .	[Zhou i in. 2012]
membrana hydrożelowa	miód	Badania przeciwdrobnoustrojowe <i>in vitro</i> – <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> . Badania <i>in vivo</i> – króliki, myszy. Synergistyczne oddziaływanie chitozanu i miodu na aktywność przeciwdrobnoustrojową.	[Wang i in. 2012]

Rodzaj formulacji (typ materiału)	Wykorzystane związki dodatkowe (związki sieciujące // związki nadające bądź intensyfikujące właściwości biofunkcyjne)	Najważniejsze informacje o materiale i przeprowadzonych badaniach.	Źródło
<b>CHITOZAN – KOLAGEN</b>			
membrana hydrożelowa	transglutaminaza, tyrozynaza	Wykorzystanie enzymatycznych metod sieciowania w otrzymywaniu membran chitozanowo-żelatynowych.	[Chen i in. 2003]
membrana hydrożelowa	promieniowanie $\gamma$	Membrana uzyskiwana z wodnych roztworów żelatyny i karboksymetylochitozanu sieciowana promieniowaniem $\gamma$ . Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty NIH3T3.	[Yang i in. 2010]
membrana hydrożelowa	genipina	Badanie wpływu stężenia genipiny oraz stosunku stężenia chitozanu do żelatyny na właściwości uzyskiwanych membran hydrożelowych.	[Chiano i in. 2007]
włókna (elektroprzędzenie)	nanocząsteczki Ag	Wykorzystanie chitozanu mikrokrystalicznego.	[Zhuang i in. 2010]
gąbka (liofilizacja)	EDC, sieciowanie poprzez dehydratację termiczną	Badanie stopnia porostania materiałów chitozanowo-kolagenowych przez komórki fibroblastów – <i>in vitro</i> .	[Ding i in. 2008]
gąbka (liofilizacja)	lizostafyna	Materiał przeznaczony do leczenia ran oparzeniowych zainfekowanych komórkami <i>S. aureus</i> . Profil uwalniania lizostafiny. Badania <i>in vivo</i> – myszy.	[Cui i in. 2011]
gąbka (liofilizacja)	aldehyd glutarowy	Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty ludzkie.	[Ma i in. 2003]
gąbka (liofilizacja)	aldehyd glutarowy	Sieciowanie immersyjne, poprzez zanurzenie otrzymanego materiału chitozanowo-kolagenowego w roztworze aldehydu glutarowego. Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty ludzkie.	[Liu i in. 2012]
gąbka (liofilizacja)	dehydratacja termiczna	Materiał sieciowany poprzez dehydratację termiczną. Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty tkanki łącznej L929.	[Tangsadthakun i in. 2006]
gąbka (liofilizacja)	EDC, NHS	Materiał gąbczasty z dodatkiem kwasu hialuronowego. Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty mysie.	[Lin i in. 2009]
gąbka (liofilizacja)	dehydratacja termiczna	Wpływ masy cząsteczkowej chitozanu na właściwości gąbek chitozanowo-kolagenowych sieciowanych metodą dehydratacji termicznej. Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty tkanki łącznej L929.	[Tangsadthakun i in. 2007]
gąbka (liofilizacja)	FGF – czynnik wzrostu fibroblastów	Badania <i>in vivo</i> – szczury, model rany uzyskanej w wyniku powikłań cukrzycowych.	[Wang i in. 2008]
gąbka (liofilizacja)	TGF- $\beta$ 1 - transformujący czynnik wzrostu- $\beta$ 1	Materiał gąbczasty do leczenia ran błony śluzowej jamy ustnej.	[Zhang i in. 2006]
gąbka (liofilizacja) + mikrosfery	genipina	Asymetryczna membrana chitozanowa z inkorporowanymi mikrosferami z kolagenu. Badania <i>in vivo</i> – szczury. Badania <i>in vitro</i> – fibroblasty szczurze.	[Chen i in. 2009]
gąbka (liofilizacja) + mikrosfery	aldehyd glutarowy // kwas galusowy, cyprofloksacyna	Gąbka kolagenowa (kolagen bydłczy) z mikrosferami chitozanowymi zawierającymi związki aktywne. Badania <i>in vitro</i> – limfocyty i erytrocyty z krwi ludzkiej, <i>E. coli</i> .	[Wary i in. 2014]
włókna (elektroprzędzenie)	brak	Badanie wewnątrzcząsteczkowych interakcji pomiędzy chitozaniem i kolagenem we włóknach chitozanowo-kolagenowych.	[Chen i in. 2008]

Bez względu na rodzaj formułacji, pierwszym etapem na drodze procesu otrzymywania biomateriałów na bazie chitozanu, kolagenu i żelatyny jest przeprowadzenie ich preparatów do roztworu, a następnie w zależności od docelowej postaci, wybór odpowiedniej metodologii postępowania. Jak przedstawiono we wcześniejszych rozdziałach niniejszej rozprawy, chitozan naturalny – niemodyfikowany chemicznie, a także kolagen, są polimerami nierozpuszczalnymi w wodzie. W celu przeprowadzenia ich preparatów do roztworu wykorzystuje się wodne roztwory kwasów, z czego ze względu na stosunkowo niską toksyczność względem pozostałych rozpuszczalników o tym charakterze, rozcieńczone roztwory kwasu octowego i mlekowego są najczęściej wykorzystywane. Takie postępowanie wymusza zwykle przeprowadzanie dodatkowych etapów mających na celu usunięcie kwasów z materiału docelowego w celu zapewnienia wyższej jego biokompatybilności. Odbywa się to zwykle na drodze wypłukiwania, bądź zubożniania i powtórnego suszenia otrzymanych materiałów. Pod tym względem żelatyna jest surowcem mniej uciążliwym technologicznie, ze względu na łatwość jej rozpuszczania w wodzie.

Spośród wielu opisanych metod otrzymywania biomateriałów, te prowadzące do wytworzenia membran hydrożelowych i materiałów o strukturze gąbki, są najczęściej wykorzystywane do produkcji chitozanowych, kolagenowych, czy żelatynowych materiałów opatrunkowych. Membrany hydrożelowe mają postać trójwymiarowej sieci łańcuchów polimerowych połączonych ze sobą w wybranych punktach, której przestrzeń pomiędzy cząsteczkami wypełnia woda, a zawartość fazy stałej zwykle nie przekracza 10%. Są to materiały zdolne do pochłaniania znacznych ilości wody, podczas gdy same są w niej z reguły nierozpuszczalne bądź ich rozpuszczalność jest programowalna poprzez wykorzystanie różnego rodzaju związków sieciujących. Duże zainteresowanie tymi materiałami, jako materiałami opatrunkowymi wynika przede wszystkim z dużej zawartości wody, co czyni je wysoko kompatybilnymi z większością tkanek. Ponadto są one zwykle miękkie i elastyczne, co minimalizuje uszkodzenia otaczającej tkanki podczas aplikacji i zmian materiału opatrunkowego w trakcie i po zabiegu u pacjenta [Dash i in. 2011]. Wyróżnia się trzy podstawowe metody otrzymywania membran hydrożelowych z wykorzystaniem wskazanych polimerów naturalnych: asocjację fizyczną, asocjację poprzez koordynację z jonami metali oraz otrzymywanie z wykorzystaniem metod sieciowania. Proces tworzenia fizycznych hydrożeli jest oparty na odwracalnych oddziaływaniach, które mogą wystąpić pomiędzy łańcuchami polimerów. Oddziaływania te mają charakter niekowalencyjny, taki jak oddziaływania elektrostatyczne, oddziaływania hydrofobowe i wiązania wodorowe [Boucard i in. 2005]. Intensywność tych interakcji może być uzależniona od wielu parametrów, w tym przede wszystkim od stężenia i rodzaju użytego biopolimeru, pH i temperatury, co czyni tak uzyskane hydrożele niezbyt stabilnymi, a także pozwala na uzyskanie tzw. hydrożeli odwracalnych, których postać jest uzależniona od warunków ekspozycji. Ilość i intensywność oddziaływań w tak otrzymanych materiałach determinuje także ich właściwości mechaniczne

związane z profilem tekstury, w tym twardość i elastyczność. Polikationowa natura chitozanu sprawia, że większość interakcji z negatywnie naładowanymi cząsteczkami prowadzi do utworzenia żeli stabilizowanych silnymi wiązaniami jonowymi i to zarówno z niskocząsteczkowymi związkami, takimi jak sole kwasu fosforowego, siarkowego i cytrynowego [Shu i in. 2002, Shen i in. 2008], jak również z innymi polimerami o wypadkowym ładunku ujemnym, w tym z białkami (kolagenami, żelatynami, keratyniną, albuminą czy fibroiną) [Yin i in. 1999, Mao i in. 2004], polisacharydami (kwasem hialuronowym, kwasem alginianowym, pektyną, heparyną, siarczanem dekstranu, chondroityną) [Il'ina i in. 2005, Boddohi i in. 2009], a także z karboksymetylocelulozą i glikozaaminoglikanami [Denuziere i in. 1998]. Znane są także hydrożele uzyskane na drodze fizycznej asocjacji chitozanu z syntetycznymi polimerami np. z poli(kwasem akrylowym) [Gorczyca i in. 2010]. Druga wymieniona metoda otrzymywania hydrożeli polega na wykorzystaniu koordynacyjno-kowalencyjnych wiązań z atomami metali ołowiu (II), platyny (II) i molibdenu (VI). Niemniej jednak z powodu wyższej toksyczności nie są one rekomendowane do zastosowań biomedycznych [Brack i in. 1997, Dambies i in. 2001].

Jednym z ograniczeń wykorzystania polimerów naturalnych, w tym także chitozanu, kolagenu i żelatyny w konstrukcji materiałów opatrunkowych, w tym zarówno membran hydrożelowych, jak i materiałów gąbczastych, jest niewielka stabilność (zwłaszcza duża rozpuszczalność) i nieregularność struktury materiałów wytworzonych jedynie wskutek asocjacji fizycznych. Problem ten rozwiązuje kowalencyjne sieciowanie różnymi czynnikami sieciującymi. Pozwala to w większości przypadków na uzyskanie materiałów o powtarzalnych i w miarę programowalnych właściwościach. Jednakże rozwiązanie to związane jest z reguły z wprowadzeniem chemicznych modyfikacji w łańcuchach sieciowanych polimerów, co zwykle prowadzi do zmiany ich początkowych właściwości, zwłaszcza, jeśli w reakcję są zaangażowane bezpośrednio ich grupy funkcyjne. Ponadto wprowadzanie do układu związków sieciujących i/lub katalizatorów tych reakcji prowadzi często do zmniejszania biokompatybilności otrzymywanych materiałów.

Znany jest szereg metod kowalencyjnego sieciowania materiałów otrzymanych z chitozanu, kolagenu i żelatyny. Najczęściej stosowaną metodą jest sieciowanie przy użyciu małych cząsteczek sieciujących (dialdehydów, w tym aldehydu glutarowego [Ma i in. 2003, Bigi i in. 2001], aldehydu mrówkowego [Sinkh i in. 2006], aldehydu szczawiowego [Patel 1996]; karbodiimidów – (EDC/NHS) [Adhiraja i in. 2009, Kozłowska i in. 2015]; eteru diglicydylowego glikolu etylenowego (EDGE) [Mi i in. 1999], kwasu taninowego [Sionkowska i in. 2014] oraz genipiny [Muzzarelli i in. 2009]), dodawanych bezpośrednio do dyspersji polimerów bądź poprzez sieciowanie immersyjne materiałów zaraz po ich otrzymaniu. Czynnikiem limitującym wykorzystanie małych cząsteczek sieciujących jest ich dość znaczna toksyczność, dlatego też konieczne jest wypłukiwanie materiałów uzyskanych przy ich użyciu, w celu usunięcia nieprzereagowanych cząsteczek [Zeiger i in. 2005]. Inną

metodą sieciowania są reakcje typu polimer-polimer, w których grupy funkcyjne jednego bądź obu polimerów zostały wcześniej odpowiednio zaktywowane np. poprzez wprowadzenie grupy karbonylowej, jak miało to miejsce w przypadku hydrożeli otrzymanych z chitozanu i chemicznie zmodyfikowanego kwasu hialuronowego posiadającego wolne grupy karbonylowe, dzięki czemu możliwe było sieciowanie poprzez utworzenie zasad Schiffa [Tan i in. 2009]. W dostępnej literaturze znajdują się także przykłady wykorzystania sieciowania typu polimer-polimer na drodze reakcji addycji Michaela [Metters i in. 2005]. Główną zaletą tego typu sieciowania jest całkowite wyeliminowanie toksycznych związków sieciujących. Natomiast wadą limitującą wykorzystanie tego typu reakcji niemalże do minimum jest wieloetapowy i długotrwały proces przygotowania, związany z aktywacją jednego bądź obu polimerów. Chemiczna modyfikacja polimeru wymagana jest także przy wykorzystaniu związków fotowrażliwych. Znane są przykłady otrzymywania hydrożeli chitozanowych poprzez wcześniejsze wprowadzenie do jego łańcucha grup azydkowych bądź akrylanowych i naświetlanie dyspersji promieniowaniem UV [Ono i in. 2000, Ishihara i in. 2003, Yoo i in. 2007]. Polimery posiadające grupy wrażliwe na promieniowanie UV są obiecującymi materiałami w tworzeniu hydrożeli *in situ*. Ograniczeniem w tym przypadku mogą być lokalne wzrosty temperatury, spowodowane długotrwałą ekspozycją na działanie promieniowania UV, co może prowadzić do uszkodzenia komórek i tkanek [Lukaszczyk i in. 2005]. Znaczną rolę w konstruowaniu nowych materiałów z chitozanu, kolagenu i żelatyny odgrywa także wykorzystanie katalizatorów enzymatycznych w procesach sieciowania. Do najczęściej wykorzystywanych enzymów należą transglutaminaza oraz tyrozynaza [Kumar i in. 2000, Sheu i in. 2005, Norziah i in. 2009,]. M.in. znane są przykłady otrzymywania żelatynowo-chitozanowych folii spożywczych sieciowanych za pomocą transglutaminazy [Kołodziejaska i in. 2006]. Enzym ten katalizuje reakcję tworzenia wiązań sieciujących pomiędzy grupą karboksamidową reszty glutaminy a pierwszorzędowymi grupami aminowymi różnych związków, w tym białek i chitozanu. Wykorzystanie enzymów jako katalizatorów reakcji sieciowania wymaga jednak precyzyjnego kontrolowania warunków prowadzenia reakcji, zwłaszcza pH, temperatury i siły jonowej, które uzależnione są od aktywności danego enzymu, a także często nie pozwala w pełni kontrolować właściwości otrzymanych materiałów. Ze względu na wiele czynników limitujących wykorzystanie wyżej wyszczególnionych metod sieciowania chemicznego, stale poszukuje się nowych alternatywnych metod. Małe cząsteczki sieciujące dodawane bezpośrednio do dyspersji polimerowych są jednak w dalszym ciągu najbardziej pożądanymi czynnikami sieciującymi, ze względu na największą kontrolę właściwości otrzymywanych biomateriałów.

W przeciwieństwie do metod wytwarzania membran hydrożelowych, wytworzenie struktur gąbczastych wymaga wykorzystania dodatkowej infrastruktury, za pośrednictwem której następuje usunięcie wykorzystanego rozpuszczalnika. Najbardziej powszechne metody wytwarzania takich struktur obejmują procesy suszenia sublimacyjnego wcześniej

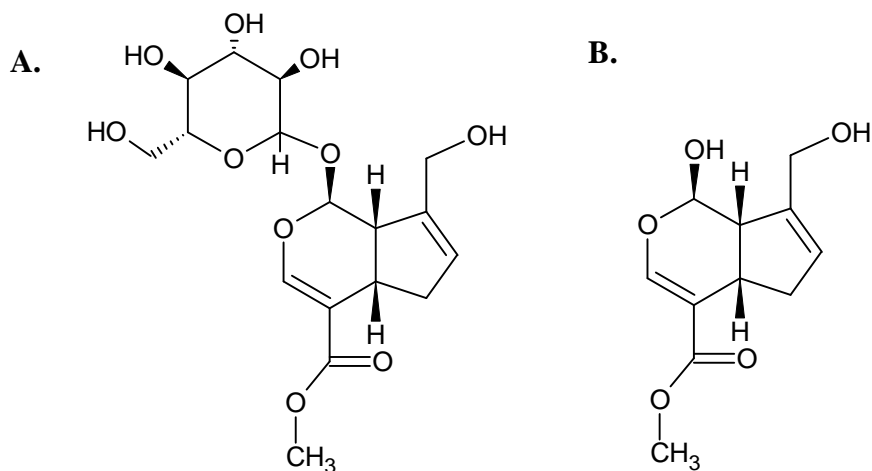


zamrożonych roztworów tych biopolimerów bądź techniki elektroprzędzenia [Jayakumar i in. 2011, Zahedi i in, 2010]. Są to stosunkowo proste, niedrogie i wydajne metody wytwarzania. W metodzie suszenia sublimacyjnego rozpuszczalnik usuwany jest z wcześniej wymrożonego roztworu polimerów, w obniżonej temperaturze i pod zmniejszonym ciśnieniem, co dodatkowo umożliwia suszenie produktów termolabilnych, podczas gdy techniki elektroprzędzenia polegają na otrzymywaniu nanowłókien ze stopionych polimerów lub z ich roztworów za pomocą pola elektrycznego. Metody te prowadzą do uzyskania materiałów gąbczastych bądź włóknistych, o wysokoporowatej strukturze, dzięki czemu takie materiały zdolne są do wiązania znacznie większych ilości cieczy (często w ilości przekraczającej dwudziestokrotność wagi takich materiałów). Jest to wysoce pożądana właściwość materiałów wykorzystywanych jako materiały opatrunkowe, zwłaszcza w terapiach leczenia ran wysoko sączących się. Przy jej wykorzystaniu otrzymano m.in. gąbki chitozanowe [Seol i in. 2004], gąbki z wcześniej przygotowanego hydrożelu chitozanowego w obecności fosforanu wapnia [Lee i in. 2000], gąbki chitozanowo-kolagenowe wykorzystane w regeneracji ubytku kostnego [Arpornmaeklong i in. 2008], a także gąbki chitozanowo-kolagenowe z inkorporowaną lizostafyną, jako materiałem opatrunkowym wykorzystanym w leczeniu infekcji szczepami gronkowca złocistego [Cui i in. 2011].

Nieco inną metodę otrzymywania wysoko porowatych struktur gąbczastych na bazie chitozanu, a także innych biopolimerów, zaproponowała Dehghani i współpracownicy, wykorzystując do tego celu ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym ( $scCO_2$ ) [Ji i in. 2011, Chengdong i in. 2011, Annabi i in. 2009, Annabi i in. 2009a, Annabi i in. 2010]. Materiały z wykorzystaniem tej technologii otrzymywane są na drodze spieniania wcześniej przygotowanych dyspersji polimerowych w lub bez obecności czynnika sieciującego, po uprzednim nasyceniu dyspersji  $scCO_2$ . Spienienie następuje na drodze kontrolowanej dekompresji reaktora, w jakim przeprowadzany jest proces, co skutkuje gwałtownym uwolnieniem rozpuszczonego w dyspersji polimerów ditlenku węgla w postaci gazowej. W wyniku tego procesu tworzą się liczne pęcherzyki gazu, które na skutek rozszczelnienia układu wydostają się z dyspersji polimeru pozostawiając suchą porowatą strukturę [Goel i in. 1994].

#### **2.2.5.1. Wykorzystanie genipiny w procesach wytwarzania materiałów na bazie chitozanu, kolagenu i żelatyny.**

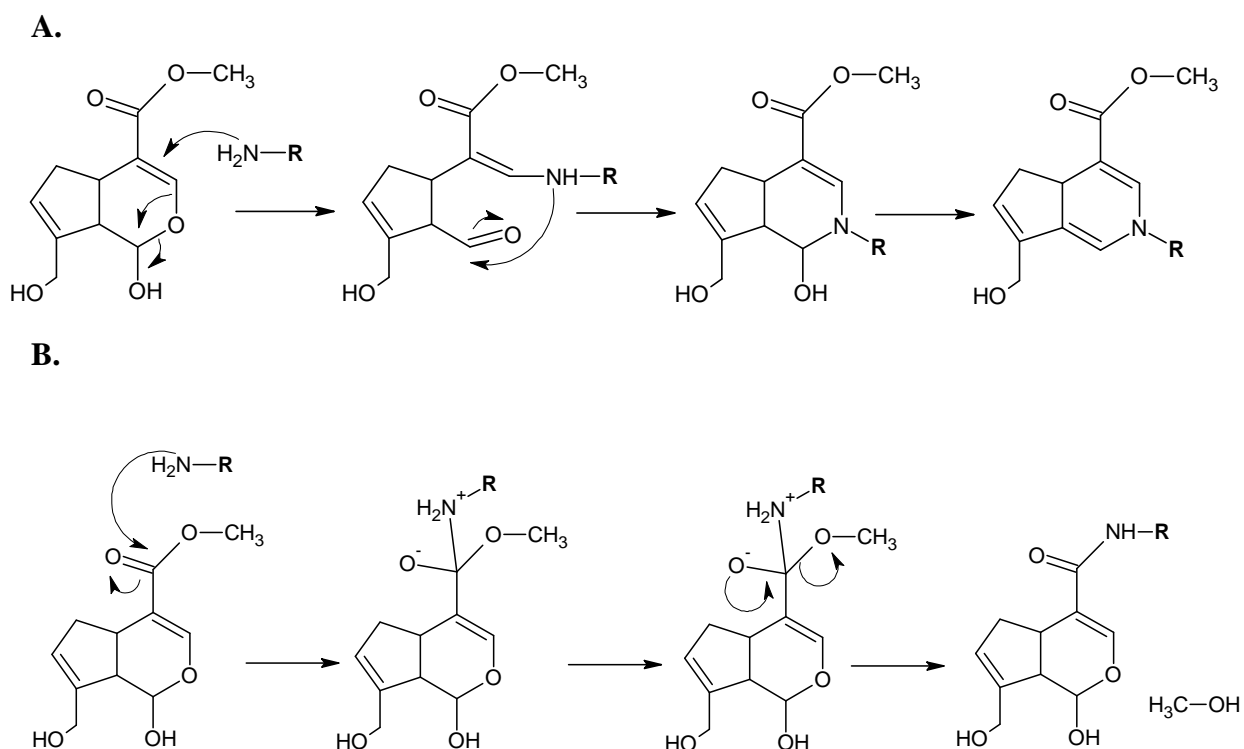
W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono wykorzystaniu należącej do tzw. małych cząsteczek sieciujących, genipinie. W przeciwieństwie do pozostałych, powszechnie wykorzystywanych związków ze swojej klasy, jest to związek pochodzenia naturalnego, otrzymywany w procesie enzymatycznej hydrolizy genipozydu. Oba te związki są dobrze znane w kulturze chińskiej i są ekstrahowane m.in. z owoców *Gardenia jasminoides*, w których stężenie genipiny waha się w granicach od 3 do 6% [Cao i in. 2001]. Wzory strukturalne obu związków przedstawia **Rysunek 2**.



**Rysunek 2.** Wzory strukturalne genipiny (**Panel B**) i genipozydu (**Panel A**).

Ze względu na naturalne pochodzenie genipiny, materiały sieciowane przy jej wykorzystaniu wykazują bardzo małą cytotoksyczność, mniejszą od tych sieciowanych aldehydem glutarowym, a także innymi syntetycznymi związkami sieciującymi [Mi i in. 2001, Mi i in. 2002]. Doniesienia literaturowe wskazują nawet na 10000-krotnie mniejszą cytotoksyczność genipiny w stosunku do aldehydu glutarowego, względem mysich komórek fibroblastów NIH3T3, a dawkę  $LD_{50}$  przy doustnym podaniu myszom wyznaczono na poziomie 382 mg/kg masy ciała [Jin i in. 2004]. Taka charakterystyka jest odpowiedzialna za obserwowane duże zainteresowanie wykorzystaniem genipiny w procesach otrzymywania materiałów do celów medycznych [Muzzarelli 2009].

Mechanizm reakcji sieciowania polimerów naturalnych, zawierających wolne grupy aminowe, za pomocą genipiny został dokładnie zbadany i zrozumiany [Butler i in. 2003]. Wykazano, że do powstania pełnego połączenia pomiędzy dwiema resztami aminowymi sieciowanych polimerów prowadzą dwie oddzielne reakcje chemiczne. Pierwsza i zarazem najszybsza z nich, to reakcja, podczas której następuje atak pierwszorzędowej grupy aminowej chitozanu, bądź zasadowych reszt aminokwasowych obecnych w białkach na atom węgla C3 genipiny, co skutkuje utworzeniem heterocyklicznego związku (**Rysunek 3, Panel A**). Druga, wolniejsza, to reakcja substytucji nukleofilowej, podczas której następuje atak wolnej grupy aminowej chitozanu bądź białek, na atom węgla grupy karbonylowej genipiny, z utworzeniem trwałego wiązania amidowego i uwolnieniem cząsteczki metanolu (**Rysunek 3, Panel B**).



**Rysunek 3.** Mechanizm reakcji sieciowania polimerów zawierających wolną grupę aminową.

Reakcja z utworzeniem heterocyklicznego związku (**Panel A**), reakcja substytucji nukleofilowej z utworzeniem wiązania amidowego (**Panel B**).

Początkowo uważano, że do efektywnego przebiegu wskazanych reakcji niezbędna jest kataliza kwasowa, o czym wnioskowano na podstawie zmniejszonej szybkości reakcji prowadzonej w wodzie deuterowanej. Dalsze badania prowadzone przez inną grupę wykazały, że mechanizm sieciowania przy użyciu genipiny jest zależny od pH środowiska, w jakim prowadzona jest reakcja sieciowania [Mi i in. 2005]. W kwaśnym i neutralnym środowisku reakcja biegnie zgodnie z opisanym mechanizmem - genipina działa jak dialdehydy, z tą tylko różnicą, że jej produkty kondensacji są znacznie bardziej stabilne w porównaniu do połączeń uzyskiwanych na drodze reakcji z aldehydem glutarowym. W środowisku zasadowym reakcja otwarcia heterocyklicznego pierścienia genipiny następuje w wyniku nukleofilowego ataku jonów hydroksylowych rozpuszczalnika, jakim jest woda, a nie jak w poprzednio opisanym ataku grupy aminowej sieciowanych polimerów. W wyniku nukleofilowego ataku jonu hydroksylowego powstaje produkt pośredni z grupą aldehydową, z którą reagują grupy aminowe sieciowanych polimerów z utworzeniem zasady Schiffa.

Opisanej reakcji sieciowania towarzyszy powstawanie niebieskiego barwnika, o rosnącej intensywności, w zależności od użytego stężenia genipiny. Wykazano, że reakcje odpowiedzialne za to zabarwienie przebiegają równocześnie z reakcjami sieciującymi

i związane są z indukowaną tlenem polimeryzacją rodnikową genipiny [Park i in. 2002], w związku z czym, materiały otrzymywane na drodze chemicznego sieciowania genipiną, zawsze będą charakteryzowały się niebieskawym zabarwieniem.

### **2.3. Metody aktywacji przeciwdrobnoustrojowej materiałów medycznych o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu ran skórnych.**

Dotychczasowe badania poświęcone projektowaniu nowoczesnych materiałów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej obejmują przede wszystkim wykorzystanie różnego rodzaju związków o tym charakterze. Trwały kontakt czynnika aktywnego z uszkodzoną tkanką, konieczny do zahamowania infekcji i zachowania czystości mikrobiologicznej rany, zapewniany jest przez unieruchomienie czynnika na powierzchni matrycy materiału bądź poprzez zapewnienie kontrolowanego profilu uwalniania z jego wnętrza. Ze względu na wykorzystanie dużo wyższych stężeń precyzyjnie dostarczanych bezpośrednio w miejsce zranienia, miejscowe stosowanie czynników przeciwdrobnoustrojowych stanowi ogromną przewagę w stosunku do zastosowań systemowych. Ma to szczególne znaczenie przy kształtowaniu się mechanizmów oporności drobnoustrojów wystawionych na długotrwałe działanie użytego czynnika przeciwdrobnoustrojowego. Duża różnorodność i sukces dostępnych na rynku chemoterapeutyków nie budzi jednak dużego entuzjazmu ze względu na pojawianie się coraz to nowszych drobnoustrojów opornych na niemal każdy z nich.

Alternatywnym sposobem aktywacji przeciwdrobnoustrojowej różnego rodzaju materiałów jest wykorzystanie do ich produkcji takich surowców, które same wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową. Ten typ aktywacji budzi jednak dużo mniejsze zainteresowanie ze względu na bardzo ograniczony zakres wyboru takich surowców. W praktyce wykorzystuje się jedynie chitozan, którego aktywność przeciwdrobnoustrojową opisano we wcześniejszej części niniejszej rozprawy doktorskiej (**Wprowadzenie 2.2.4.1**).

Tymczasowe podawanie czynnika przeciwdrobnoustrojowego, dostarczanie go w ściśle określonym czasie bądź w stałych dawkach przez pewien okres czasu jest pożądaną cechą materiałów wykorzystywanych w różnego typu praktykach medycznych. Dokonany przegląd literatury sugeruje, że głównymi typami opatrunków medycznych, wykorzystywanych do tego celu, są różnego rodzaju polimerowe gąbki oraz hydrożele [Jones i in. 2005, Stojadinovic i in. 2008, Stashak i in. 2004]. Wiedza na temat mechanizmów kontroli uwalniania inkorporowanego we wnętrzu matrycy związku jest więc niezbędna przy projektowaniu odpowiedniego systemu. Generalnie uwalnianie związku z matrycy biodegradowalnego materiału jest kontrolowane przez procesy dyfuzyjne i/lub przez kinetykę degradacji samej matrycy. W praktyce oba te mechanizmy odgrywają istotną rolę. Ten, który będzie dominował zależy od właściwości inkorporowanej cząsteczki, nośnika i innych fizykochemicznych właściwości. Uwalnianie małych cząsteczek kontrolowane jest przede wszystkim na drodze procesów dyfuzyjnych. Natomiast profil uwalniania makrocząsteczek,

takich jak peptydy i białka jest bardziej złożony i zależny w większości przypadków od szybkości degradacji matrycy [Makoto i in. 1998].

### **2.3.1. Mechanizm uwalniania czynnika aktywnego z polimerowej matrycy.**

W systemach, w których profil uwalniania inkorporowanego związku zależny jest od procesów dyfuzyjnych, nośnik (polimerowa matryca) zachowuje zwykle integralność swojej struktury przez cały okres stosowania. W takich systemach szybkość dyfuzji kontrolowana jest poprzez następujące czynniki: rozpuszczalność związku w otaczającym środowisku (zarówno w wodzie, jak i w roztworze polimeru tworzącego matrycę), gradientu stężenia dostarczanego związku, ilości zawartego związku w matrycy, morfologii matrycy (porowatości, powierzchni właściwej, kształtu), hydrofilowości/hydrofobowości matrycy, oddziaływań chemicznych pomiędzy inkorporowanym związkiem a matrycą, właściwości użytego polimeru tworzącego matrycę oraz zewnętrznych czynników środowiskowych (pH, siła jonowa, aktywność termiczna i/lub enzymatyczna) [Li i in. 2006]. Szybkość dyfuzji z biodegradowalnych matryc o dużych rozmiarach może być bardzo wolna, natomiast z systemów, w których matrycę stanowi koloidalna zawiesina polimeru o bardzo dużej powierzchni właściwej, bardzo szybka, ze względu na znacznie krótszą drogę dyfuzji.

Różnice w profilu uwalniania danego związku można uzyskać poprzez kontrolę powierzchni właściwej matrycy, wykorzystując w jednym materiale frakcje o różnej morfologii. Tego typu mechanizm spowalniania uwalniania związku aktywnego wykorzystano m.in. w konstrukcji porowatych materiałów chitozanowych, do wnętrza których wprowadzono chitozanowe mikrosfery z jednym z czynników wzrostu [Kim i in. 2003], a także przy wytwarzaniu materiałów kolagenowych z inkorporowanymi chitozanowymi mikrosferami zawierającymi kwas galusowy na potrzeby leczenia trudno gojących się ran [Wary i in. 2014]. Drugim niezwykle ważnym czynnikiem wpływającym na tempo uwalniania inkorporowanego związku jest zdolność i siła jego oddziaływania z polimerową matrycą. Ma to szczególne znaczenie zwłaszcza w przypadku oddziaływań jonowych dla matryc zbudowanych z polimerów o licznych wolnych grupach karboksylowych. W przypadku związków o charakterze kwasowym bądź neutralnym może dojść do sytuacji, w której w wyniku słabych oddziaływań jonowych z wolnymi grupami karboksylowymi będzie miało miejsce wytrącanie związku w postaci kryształków we wnętrzu matrycy [Makoto i in. 1998]. Możliwość sterowania szybkością procesów dyfuzyjnych za pomocą różnic w masie cząsteczkowej polimerów użytych do otrzymywania matrycy nośnej oferuje także bardzo atrakcyjną opcję przy projektowaniu systemu ze zmodyfikowanym profilem uwalniania. Zwykle obserwuje się prawidłowość, w której zastosowanie polimeru o wyższej masie cząsteczkowej prowadzi do uzyskania materiału o większej porowatości i nieco gorszych parametrach wytrzymałościowych. Uwalnianie z takich systemów jest

zazwyczaj gwałtowne, co oznacza, że większość zawartego w nich związku uwalnia się już w pierwszych godzinach stosowania [Li i in. 2006].

Procesy degradacji matrycy zbudowanej z polimerów naturalnych, a więc w większości matryc biodegradowalnych, można podzielić na dwie główne grupy: procesy związane z jej rozpuszczaniem (erozją) oraz degradacją na skutek działania czynników zewnętrznych, głównie biodegradacji. Erozja oznacza utratę masy bądź wyjściowej struktury danego materiału na skutek oddziaływań fizycznych, głównie związanych z procesami rozpuszczania. Natomiast biodegradacja odnosi się do chemicznego rozrywania wiązań, przez to skracania długości łańcuchów polimerowych, spowodowanego reakcjami hydrolitycznymi bądź enzymatycznymi. Polimery biodegradowalne zwykle podatne są na trzy typy degradacji. Typ pierwszy to degradacja związana z rozpadem głównego łańcucha polimeru. Rozpad wiązań pomiędzy monomerami prowadzi do utraty ciągłości łańcucha. Tą grupę stanowi większość polimerów liniowych. Jeśli na bazie rozpuszczalnego w wodzie polimeru utworzono materiał w niej nierozpuszczalny, np. na drodze chemicznego bądź enzymatycznego sieciowania, jego degradacja może nastąpić na skutek rozerwania tych wiązań. Tego typu degradacja stanowi typ drugi. Typ trzeci obejmuje degradację łańcuchów bocznych, jeśli takowe występują. Poza wyszczególnionymi trzema typami degradacji, możliwa jest każda kombinacja dwóch typów dając w konsekwencji mieszany mechanizm degradacji. W każdym bądź razie degradacja materiałów na bazie polimerów naturalnych może być kontrolowana poprzez modyfikację następujących czynników: budowy chemicznej i składu matrycy, masy cząsteczkowej użytego polimeru, jego stężenia; hydrofobowości/hydrofilowości, właściwości morfologicznych matrycy (kształt, wielkość i porowatość), obecności substancji pomocniczych; zewnętrznych czynników środowiskowych (np. pH, siła jonowa), metody otrzymywania matrycy, jak również warunków procesu sterylizacji [Li i in. 2006].

### **2.3.2. Charakterystyka wybranych grup czynników przeciwdrobnoustrojowych wykorzystywanych w konstrukcji materiałów opatrunkowych.**

#### **2.3.2.1. Antybiotyki.**

Od momentu wprowadzenia penicyliny w latach czterdziestych ubiegłego wieku, antybiotyki są najchętniej i najczęściej wykorzystywaną grupą związków, wśród czynników przeciwdrobnoustrojowych w leczeniu zainfekowanych ran skórnych. W przeciwieństwie do czynników antyseptycznych posiadają z reguły bardzo specyficzne cele molekularne, a efekt terapeutyczny widoczny jest po dłuższym okresie stosowania. Pomimo dużej różnorodności mechanizmów działania (**Tabela 2**), żadna z ponad piętnastu aktualnie dostępnych klas antybiotyków nie oparła się mechanizmom kształtującym oporność wśród wystawionych na ich działanie drobnoustrojów [Vogelsang 1951]. Problem kształtowania oporności nie jest niczym nowym. Pierwsze penicylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* wyizolowano już

krótko po wprowadzeniu tego antybiotyku do praktyki medycznej [Levy 2002]. Kolejne przykłady oporności pojawiały się wraz ze wzrostem częstości stosowania antybiotyków. Gwałtowne i niekontrolowane dalsze ich wykorzystywanie doprowadziło w końcu do rozpowszechnienia występowania wielolekoopornych szczepów bakteryjnych [Kaye 2000, Larson 1995] i w konsekwencji do obecnej sytuacji, w której wielu ekspertów z obawą spogląda w przyszłość w poszukiwaniu alternatywnych metod leczenia.

**Tabela 2.** Główne typy powszechnie stosowanych antybiotyków i ich mechanizmy działania.

<b>Mechanizm działania</b>	<b>Grupy antybiotyków</b>
Inhibicja syntezy ściany komórkowej.	penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, deptyomycyny, monobaktamy, glikopeptydy
Inhibicja syntezy białek.	tetracykliny, aminoglikozydy, oksazolidony, streptograminy, ketoidony, linkozamidy, makroidy
Inhibicja syntezy DNA.	chinolony
Inhibicja syntezy RNA.	rifampicyny
Inhibicja kwasu foliowego.	sulfonamidy, trimetoprym
Redukcja grup nitrowych, prowadząca do generowania reaktywnych form tlenu.	metronidazol

Choć w praktyce chętniej wykorzystywano różnego rodzaju płukanki roztworami antybiotyków, znane są także materiały przystosowane do kontrolowanego ich dostarczenia bezpośrednio do miejsca zranienia. Niektóre z doniesień literaturowych obejmują fibrynowe dyski o gąbczastej strukturze, impregnowane tetracykliną [Kumar i in. 2004], systemy na bazie kwasu polihydroksymasłowego z ofloksacyną [Sawada i in. 1994], kompozytowe materiały chitozanowo – poliuretanowe nasączone minocykliną [Aoyagi i in. 2007], gąbki chitozanowe, jako nośniki amikacyny i wankomycyny [Noel i in. 2010], wielowarstwowe gąbki żelatynowe jako nośniki wankomycyny [Shukla i in.2012], a także kolagenowe materiały gąbczaste oraz hydrożele na bazie karboksymetylochitozanu z inkorporowaną gentamycyną przeznaczone do opatrywania zainfekowanych ran skórnych [Lipsky i in. 2012, Wu i in. 2014].

### **2.3.2.2. Związki srebra.**

Właściwości antyseptyczne srebra znane są od kilku tysięcy lat. Niemniej jednak dopiero konsekwencje zbyt gwałtownego, nieracjonalnego rozwoju antybiotykoterapii, pozwoliły na nowo dostrzec jego potencjał, jako środka bakteriobójczego. Aktualnie na rynku

wyrobów medycznych dostępna jest cała gama materiałów opatrunkowych, zawierających srebro, jako czynnik przeciwdrobnoustrojowy. Wśród nich wyróżnić można gazy, bandaże, hydrożele, opatrunki poliuretanowe, czy hydrokoloidowe, a więc materiały przeznaczone do opatrywania rany znajdującej się na wszystkich etapach procesu jej gojenia. Na skutek kontaktu z wydobywającym się z rany wysiękiem, wymienione powyżej materiały uwalniają jony srebra bezpośrednio do jej wnętrza. Niezależnie od metody połączenia srebra z materiałem opatrunkowym (pokrycie formą czysto metaliczną, wykorzystanie specyficznych soli, czy wprowadzenie nanocząstek) uwalnianym czynnikiem antydrobnoustrojowym są kationy srebra [Percival i in. 2005]. Kationy te uważane są za bardzo efektywny czynnik przeciwdrobnoustrojowy o szerokim spektrum działania, w stosunku do dotychczasowo używanych związków [Russell i in. 1994, Lansdown i in. 1997]. W odróżnieniu od antybiotyków, posiadających zazwyczaj bardzo specyficzne cele molekularne, jony srebra wykazują zróżnicowany, złożony mechanizm działania [Rai i in. 2009, Lansdown i in. 2002]. Spośród wielu udokumentowanych celów molekularnych, najważniejszym jest jednak błona komórkowa komórki patogenicznej [Percival i in. 2005]. Interakcje jonów srebra z powierzchnią komórki, powodują gwałtowny wyciek jonów, a także składników odżywczych z wnętrza komórki, w wyniku czego dochodzi do zaburzenia siły protonomotorycznej i ostatecznie do śmierci komórki [Rosenkranz i in. 1972, Goddard i in. 1989, Dibrov i in. 2002]. Wśród pozostałych celów molekularnych jonów srebra znajdują się m.in. nukleofilowe grupy aminokwasów wchodzących w skład białek i peptydów kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania komórki, w tym biorących udział w procesie replikacji DNA oraz stanowiących elementy łańcucha oddechowego [Percival i in. 2005,]. Wszystkie te cechy, a także stosunkowo niska toksyczność preparatów zawierających srebro spowodowała, że obecnie dostępna jest szeroka gama materiałów je zawierających, a w tym materiały zawierające siarczan srebra (np. Mepilex Ag), fosforan srebrowo-sodowo-wodoro-cyrkonowy (np. Melgisorb Ag), srebro w formie metalicznej (np. Medisorb Silver Pad). Tak duża popularność stosowania może budzić jednak wątpliwości, dotyczące możliwości wykształcenia oporności przez drobnoustroje wystawione na ciągłe jego działanie. Wieloletnie badania pozwoliły wyszczególnić różne możliwe mechanizmy tej oporności [Deshpande i in. 1994, Gupta i in. 1999, Silver 2003]. Niemniej jednak, do tej pory częstotliwość jej występowania była niewielka, rzec można sporadyczna [Silver i in. 2006, Loh i in. 2009]. Niepokojące jest jednak to, że materiały zawierające srebro są już dostępne nie tylko na rynku farmaceutycznym. Stały się one powszechne w codziennym wykorzystaniu, w produktach takich jak: szczoteczki do zębów, dezodoranty, wody toaletowe, środki ochrony sanitarnej, tkaniny, czy nawet wewnętrzne powłoki pralek automatycznych. Niewłaściwym może okazać się ogólne przeświadczenie, że skoro mikroorganizmy były i są wystawione na działanie srebra od ponad kilku milionów lat i, jak do tej pory, nie wykształciły ogólnego mechanizmu oporności, to już tego nie zrobią.



W dotychczasowej literaturze naukowej znanych jest wiele prób wykorzystania związków srebra do aktywacji materiałów zbudowanych z kolagenu, chitozanu i żelatyny. Kwon i współpr. z wykorzystaniem technik elektroprzędzenia otrzymali włóknisty materiał chitozanowy zawierający nanocząsteczki srebra [Lee i in. 2014]. Technika ta została także wykorzystana do przygotowania włókien żelatynowych i chitozanowo-żelatynowych z inkorporowanymi nanocząsteczkami srebra pod kierownictwem Park'a i Cheng'a [Jeong i in. 2014, Zhuang i in. 2010]. Z kolei Li i współpr. impregnowali cząsteczkami AgNO<sub>3</sub> gąbkę chitozanową otrzymaną techniką suszenia sublimacyjnego, wykazując jej przydatność w leczeniu infekcji ran skórnych względem szczepów *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* [Li i in. 2011], a Suh i współpr. otrzymali impregnowaną sulfodiazyną srebra membranę kolagenową z naniesioną warstwą lamininy, glikoproteiny stanowiącej główny składnik błony komórkowej, pełniącej ważną rolę w oddziaływaniach komórek nabłonka i śródbłonka [Lee i in. 2002].

### **2.3.2.3. Jod.**

Jodyna, a także inne preparaty zawierające jod, znane są w zastosowaniach medycznych od ponad wieku. Jodopowidon jest obecnie najczęściej stosowanym preparatem jodu. Jest to rozpuszczalny w wodzie kompleks jodu z poliwinylpirolidonem (PVP), o stężeniu jodu od 9,0% do 12,0%. Posiada właściwości bakteriobójcze o szerokim spektrum działania (głównie przeciw gronkowcom, paciorkowcom, jak również prątkom) oraz właściwości przeciwprzotniakowe, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe. Tak szerokie spektrum aktywności możliwe jest dzięki niespecyficznym oddziaływaniom z wieloma niezbędnymi do życia składnikami cytoplazmatycznymi komórki patogennej [Kaye 2000, Larson 1995]. Jodopowidon jest składnikiem wielu dostępnych opatrunków medycznych przeznaczonych do leczenia trudno gojących się infekcji skórnych. Jednym z przykładów stosowanych w praktyce medycznej są opatrunki z serii Inadine® (Johnson & Johnson Ltd.). Są to materiały na bazie glikolu polietylenowego impregnowane 10% jodopowidonem. Kontakt z wysiękiem z rany powoduje uwolnienie czynnika aktywnego z polimerowej matrycy bezpośrednio do środowiska rany, zapewniając długotrwały efekt terapeutyczny. O wysokim potencjale preparatów jodu, stanowi także brak doniesień na temat ogólnych mechanizmów oporności wykształconych przez patogeny wystawione na ich działanie [Khan i in. 2006]. Obserwowane są natomiast pojedyncze przypadki oporności mikroorganizmów wytwarzających biofilm na powierzchniach różnych materiałów medycznych. Uważa się jednak, że nie są one wynikiem wykształcenia specyficznych mechanizmów oporności, lecz trudności w pokonaniu bariery z glikokaliksu produkowanego na zewnątrz komórek tworzących biofilm [Brown i in. 1995]. Kontrowersje związane ze stosowaniem preparatów jodu jako czynników antyseptycznych, związane są z dość często pojawiającym się odczynem alergicznym, miejscowymi podrażnieniami skóry oraz toksycznością [Spann i in. 2003].

Ponadto dość dobrze udokumentowane jest wchłanianie jodu przez skórę i błony śluzowe, dlatego też powinno unikać się stosowania preparatów go zawierających u noworodków, kobiet w ciąży, a także przez osoby posiadające zaburzenia pracy tarczycy [Khan i in. 2006]. Pomimo dość dużej efektywności jodu już przy niewielkich stężeniach, konieczne jest zapewnianie znacznie większego stężenia tego czynnika w wyjściowym materiale, ze względu na ograniczoną biodostępność uwalnianego jodu. Udowodniono, że nawet 80% wolnego jodu neutralizowane jest przez białka osocza krwi [Abdullah i in. 1981]. Nie jest więc pewne, czy korzyści wynikające z przeciwbakteryjnych właściwości jodu przewyższają negatywne konsekwencje jego stosowania. Niemniej jednak nawet najświeższe doniesienia literaturowe dokumentują zalety związane z wykorzystaniem jodu [Vermeulen i in. 2010], dlatego też jest on nadal używany jako czynnik pierwszego wyboru w leczeniu infekcji skórnych.

Tak jak w przypadku dwóch omówionych wyżej grup czynników przeciwdrobnoustrojowych, tak i w przypadku preparatów jodu, są one wykorzystywane do aktywacji przeciwdrobnoustrojowej biomateriałów otrzymywanych z chitozanu, kolagenu i żelatyny. Doniesienia literaturowe w tym zakresie są jednak znacznie rzadsze i obejmują np. konstrukcję gąbczastych materiałów kolagenowych przeznaczonych do regeneracji ubytków kostnych, otrzymanych na drodze impregnacji wcześniej przygotowanej, w procesie suszenia sublimacyjnego, gąbki kolagenowej [Jiang i in. 2013], przygotowanie membran chitozanowo-żelatynowych z dodatkiem emulsji chitozanowej z kompleksem jodu i poliwinylpirolidonu (PVP) [Sai i in. 2015], a także próby wytworzenia kompozytowych włókien chitozanu z poli(alkoholem winylowym) z domieszką kompleksu jodu i poliwinylpirolidonu, techniką elektroprzędzenia [Aytimur i in. 2013].

#### **2.3.2.4. Miód Manuka.**

Miód Manuka i jego preparaty należą do najmłodszej grupy czynników przeciwdrobnoustrojowych wykorzystywanych w leczeniu trudno gojących się ran. W porównaniu z innymi czynnikami antyinfekcyjnymi, charakteryzują się one bardzo szerokim spektrum działania, przy jednoczesnym braku przypadków wykształconej oporności [Moghazy i in. 2010]. Antybakteryjne działanie miodu jest wynikiem połączenia działania nadtlenku wodoru, który powstaje pod wpływem zawartej w miodzie oksydazy glukozy oraz metyloglioksalu [Molan 1992, Tonks i in. 2007]. Na bazie zawartości metyloglioksalu w danym preparacie miodu opracowano parametr UMF (Unikalny Czynnik Manuka), który określa jego aktywność, a przez to także i przydatność w zastosowaniach medycznych. Miód o aktywności 1 UMF odznacza się aktywnością antyseptyczną porównywalną z 1% roztworem fenolu. W praktyce wykorzystuje się jednak te, które charakteryzują się wartością tego parametru powyżej 10 jednostek. Ponadto dodatkową zaletą wykorzystania miodów jest bardzo duża zawartość naturalnych związków przeciwutleniających [Ferreirra i in. 2009,

Gheldof i in. 2002]. Czynniki te biorą udział m.in. w neutralizowaniu wolnych rodników, które, jak wykazano, spowalniają proces leczenia rany [Martin 1996, Gomathi i in. 2003]. Na rynku wyrobów medycznych dostępne są już materiały opatrunkowe zawierające miody Manuka. Rekomendowane są one nie tylko do leczenia ran trudno gojących się w wyniku infekcji różnymi drobnoustrojami wykazującymi oporność na pozostałe znane czynniki, lecz także w przypadku ran standardowych. Liderem na wschodnio-europejskim rynku materiałów opatrunkowych z miodem Manuka jako czynnikiem antyinfekcyjnym jest firma Kikgel (Polska), która wprowadziła serię produktów z rodziny Activion Monuka. Jednym z nich jest alginianowy opatrunek hydrożelowy nasączony miodem Manuka (UMF 12-14), który w kontakcie z wilgocią przyjmuje formę miękkiego żelu, co stwarza wilgotne środowisko i ułatwia uwalnianie się miodu w miejscu zranienia. Pomimo stosunkowo krótkiej historii funkcjonowania tego typu materiałów, dostępna jest już całkiem znaczna liczba prac wskazująca na bardzo duży potencjał miodu i opatrunków go zawierających w leczeniu trudno gojących się ran [Visavadia i in. 2008, Lusby i in. 2002, Natarajan i in. 2001, Cooper i in. 2001, Kędzia i in. 2014, Yusof i in. 2007]. M.in. Visavadia przedstawia dwa przypadki pacjentów z ranami zainfekowanymi szczepami MRSA, które w wyniku terapii opatrunkami z miodem Manuka zagoiły się bez widocznych komplikacji [Visavadia i in. 2008]. Jak dotąd nie stwierdzono przeciwwskazań w zastosowaniu preparatów miodu. Niemniej jednak niepokojąca wydaje się być dostępność źródła pozyskiwania tego czynnika przeciwdrobnoustrojowego [Mamatas 2007]. Utrata źródła pozyskiwania miodu mogłaby skutecznie wyeliminować tego typu produkty z rynku wyrobów medycznych. Konieczne jest więc dysponowanie co najmniej kilkoma efektywnymi czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi, by nie dopuścić do utraty skutecznych narzędzi w walce z wielolekoopornymi drobnoustrojami.


O rosnącym zainteresowaniu wykorzystaniem miodów w konstrukcji materiałów chitozanowo-białkowych świadczą także liczne prace badawcze poświęcone tej tematyce, opublikowane zwłaszcza w okresie ostatnich kilku lat. Opracowano m.in. hydrożelową membranę chitozanowo-żelatynową z dodatkiem miodu z kwiatu słonecznika (przy stężeniu chitozanu, żelatyny i miodu odpowiednio na poziomie 0,5:20,0:20,0%, w/w), przeznaczoną do leczenia zainfekowanych ran oparzeniowych [Wang i in. 2012]. Autorzy tej pracy wykazali wyraźne synergistyczne działanie chitozanu i miodu, uzyskując znacznie wyższą aktywność otrzymanych membran względem szczepów *S. aureus* i *E. coli*, w stosunku do aktywności obu tych surowców oznaczanej oddzielnie. Z kolei Sasikala i współpr. do aktywacji cienkich filmów chitozanowych wykorzystali miód Manuka, uzyskując także materiały o dużej aktywności względem szczepów *S. aureus* i *E. coli* [Sasikala i in. 2013].


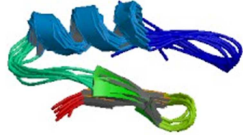
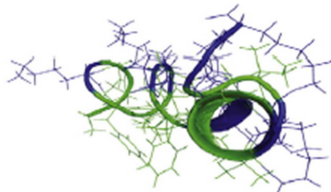
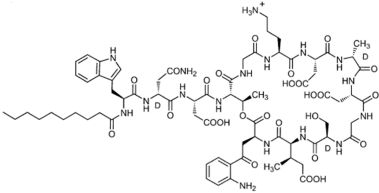
### 2.3.2.5. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe.

We współczesnej medycynie coraz częściej spotyka się zastosowania biologicznie aktywnych makromolekuł, będące integralną częścią materiałów opatrunkowych wykorzystywanych w leczeniu trudno gojących się ran m.in. owrzodzeń i ran pooparzeniowych. Znane są zastosowania peptydów i białek zaklasyfikowanych jako hormony, czynniki wzrostu, immunomodulatory, neuroprzekazniki, substraty bądź inhibitory enzymów oraz peptydy przeciwdrobnoustrojowe [Malafaya i in. 2007]. Pomimo ogromnego sukcesu tych ostatnich w przemyśle spożywczym jako naturalne konserwanty żywności bądź składniki bioaktywnych opakowań (nizyna) [Cotter 2005], występują tylko nieliczne doniesienia ich wykorzystania jako składniki bioaktywnych materiałów w leczeniu infekcji ran skórnych [Hancock i in. 2006, Tylingo i in. 2008, Szweida i in. 2014].

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs – Antimicrobial Peptides) występują u wszystkich żyjących gatunków (włączając bakterie), stanowiąc ważny składnik odporności wrodzonej gospodarza [Boman 1995, Yeaman i in. 2003, Guaní-Guerra i in. 2010] bądź leżą u podstaw antagonistycznego oddziaływania mikroorganizmów (bakteriocyny) [Gwiazdowska i in. 2005]. Setki różnych opisanych do dziś AMPs zostało sklasyfikowanych pod względem strukturalnym do czterech głównych klas:  $\beta$ -katek,  $\alpha$ -helis, pętli i peptydów złożonych, przy czym dwie pierwsze są grupami najczęściej spotykanymi w naturze. Poniżej przedstawiono listę najciekawszych i jednocześnie dobrze przebadanych peptydów przeciwdrobnoustrojowych, zarówno tych o dużym potencjale aplikacyjnym, jak i tych już znajdujących się w trakcie badań klinicznych (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Zestawienie informacji na temat najciekawszych peptydów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej (MW – masa cząsteczkowa, LA – liczba aminokwasów, NC – wypadkowy ładunek przy pH 7,0; w nawiasach podano źródło izolacji).

Struktura (RCSB Protein Data Bank)	Podstawowe informacje	Status badań klinicznych
	<b>Nizyna A</b> ( <i>Lactococcus lactis</i> ) Aktywność: Gram <sup>+</sup> MW: 3,5 kD; NC: +5 Źródła: [Gwiazdowska i in. 1994]	<i>Biosynexus</i> , U.S.A. <a href="http://www.biosynexus.com">www.biosynexus.com</a> Czynnik przeciwinfekcyjny ran skórnych (zastosowanie miejscowe) Badania przedkliniczne.
		<i>ImmuCell</i> , U.S.A. <a href="http://www.immucell.com">www.immucell.com</a> Wipe Out® chusteczki o działaniu profilaktycznym przeciw mastitis Dostępne na rynku.
		E234 dodatek do żywności (substancja konserwująca) Dostępna na rynku.

Struktura (RCSB Protein Data Bank)	Podstawowe informacje	Status badań klinicznych
Struktura przestrzenna nieustalona	<p><b>Lizostafyna</b> (<i>Staphylococcus simulans</i>) Aktywność: Gram+ MW: 26,9 kD; NC: +11 Źródła: [Szweda i in. 2005]</p>	<p>Biosynexus, U.S.A. <a href="http://www.biosynexus.com">www.biosynexus.com</a> Czynnik przeciwnieinfekcyjny ran skórnych (zastosowanie miejscowe) Badania przedkliniczne (<i>in vivo</i>)</p>
	<p><b>Laktoferyna B</b> (<i>Homo sapiens, Bos taurus</i>) MW: 86 kD; LA: 691 NC: +8,7 Dodatkowe znaczenie: - udział w transporcie jonów żelaza - aktywność przeciwutleniająca</p> <p><b>Laktoferycyna B</b> (<i>Homo sapiens, Bos taurus</i>) MW: 3,13; LA: 25 kD ; NC: +7,9 Aktywność: Gram+, Gram-, grzyby, wirusy, pasożyty, kom. nowotworowe Źródła: [Jameson i in. 1998, Brock 2002, Farnaud i in. 2003]</p>	<p>Pet King Brands, U.S.A. <a href="http://www.petkingbrands.com">www.petkingbrands.com</a> Składnik produktów leczniczych weterynaryjnych o działaniu przeciwnieinfekcyjnym do zastosowań miejscowych. Dostępny na rynku.</p> <p>AM-Pharma, Holandia <a href="http://www.am-pharma.com">www.am-pharma.com</a> Human lactoferricin (czynnik przeciw infekcyjny ran skórnych) Badania przedkliniczne (<i>in vivo</i>).</p> <p>PATER Laboratorium, Polska <a href="http://www.pater-lab.com">www.pater-lab.com</a> VIVO-DENTAL żel nawilżający, przeciwbakteryjny do jamy ustnej.</p>
	<p><b>Plectasin</b> (<i>Pseudoplectania nigrella</i>) Typ: defensyna Aktywność: Gram+, MW: 4,4 kD; LA: 40; NC: +1 ÷ +3 Źródła: [Mygind i in. 2005]</p>	<p>Novozymes, Dania <a href="http://www.novozymes.com">www.novozymes.com</a> Czynnik przeciwnieinfekcyjny (zastosowanie miejscowe) Badania przedkliniczne (<i>in vivo</i>)</p>
	<p><b>Pexiganan (MSI-78)</b> (syntetyczny) Typ: analog meganiny 2 Aktywność: Gram+, Gram- MW: 2,48 kD; LA: 22; NC: +10 Źródła: [Shanmugam i in. 2005, Gottler i in. 2009]</p>	<p>Geniera Corporation, Wielka Brytania <a href="http://www.geniera.com">www.geniera.com</a></p>
	<p><b>Daptomicin</b> (<i>Streptomyces roseosporus</i>) Typ: antybiotyk lipopeptydowy Aktywność: Gram+, MW: 1,64 kD; LA: 14; NC: -3 Źródła: [Micklefield i in. 2004, Nguyen i in. 2006]</p>	<p>Cubist Pharmaceuticals, U.S.A. <a href="http://www.cubicin.com">www.cubicin.com</a> CUBICIN – roztwór do infuzji (różnego typu infekcje skórne; bakteriemia) Dostępny na rynku.</p>

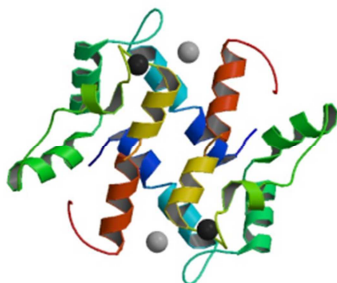
---

**Struktura**  
(RCSB Protein Data Bank)

**Podstawowe informacje**

**Status badań klinicznych**

---



**Psoriazyna (S100A7)**

(*Homo sapiens*)

Aktywność: Gram-, Gram+,  
kom. nowotworowe

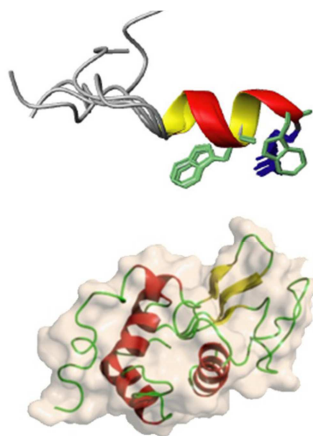
MW: 11,07 kD; LA: 100; NC:

Dodatkowe znaczenie:

- główny składnik naturalnej  
ochrony skóry  
- właściwości chemotaktyczne dla  
komórek T i neutrofilii

Źródła: [Regenhard i in. 2009, Schroder i  
in. 2006]

Uniwersytet Christiana-  
Albrechta w Kilonii, Niemcy  
[www.uni-kiel.de/SFB617](http://www.uni-kiel.de/SFB617)  
Badania przedkliniczne dla  
peptydów z rodziny S100 (in  
vitro, *in vivo*)



**Lizozym**

(*Gallus domesticus*)

Aktywność: Gram+, Gram-, wirusy

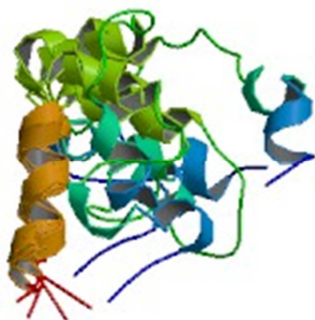
MW: 14,4 kD; LA: 130; NC: +6,1

Źródła: [Szymański i in. 2007,  
Dembczyński i in. 2009]

Neova Technologies Inc, Kanada  
[www.neovatech.com](http://www.neovatech.com)  
Inovapure (lizozym) – w formie  
proszku, granulatu i roztworu  
wodnego do różnych  
zastosowań. Dost. na rynku.

PATER Laboratorium, Polska  
[www.pater-lab.com](http://www.pater-lab.com)  
VIVO-DENTAL żel  
nawilżający, przeciwbakteryjny  
do jamy ustnej.  
Dostępny na rynku

E 1105  
(substancja konserwująca)



**Dermicydyna 1 (DCD-1)**

(*Homo sapiens*)

Typ: Defensyna

Aktywność: Gram-, Gram+, grzyby

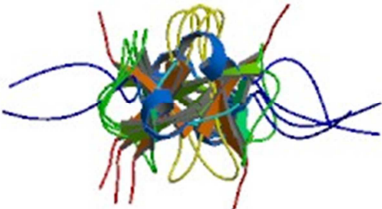
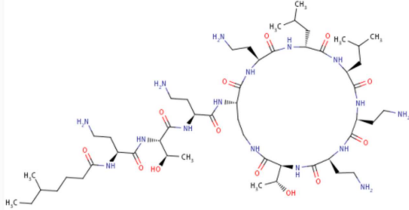
MW: 4,83 kD; LA: 47; NC: -5

Dodatkowe znaczenie:

- główny składnik przeciwbakteryjny  
w pocie ludzkim

Źródła: [Schittek i in. 2001, Rieg i in.  
2006]

Uniwersytet Eberharda Karola  
w Tybindze, Niemcy  
[www.uni-tuebingen.de](http://www.uni-tuebingen.de)  
Badania przedkliniczne  
(in vitro, *in vivo*).

Struktura (RCSB Protein Data Bank)	Podstawowe informacje	Status badań klinicznych
	<p><b>Human <math>\beta</math>-defensin 3 (hBD-3)</b> (<i>Homo sapiens</i>) Typ: Defensyna Aktywność: Gram+, Gram-, grzyby MW: 5,17 kD; LA 45; NC: +11 Dodatkowe znaczenie: - główny składnik naturalnej ochrony skóry - właściwości chemotaktyczne dla komórek T, monocytów i komórek dendrytycznych Źródła: [Harder i in. 2001, Bohling i in. 2006, Sassa i in. 2008, Spielmann i in. 2007]</p>	<p>Harvard Medical School, U.S.A. <a href="http://hms.harvard.edu">hms.harvard.edu</a>  Uniwersytet w Hokkaido, Japonia <a href="http://www.hokudai.ac.jp">www.hokudai.ac.jp</a> Badania nad wykorzystaniem hBD-3 w terapii infekcji ran skórnych.</p>
	<p><b>Kolistyna (Polimyksyna E)</b> (<i>Bacillus colistinus</i>) Typ: antybiotyk lipopeptydowy Aktywność: Gram-, MW: 1,16 kD; LA: 12; NC: +5 Źródła: [Lewis i in. 2004, Nasnas i in. 2009]</p>	<p>Polfa Tarchomin S.A., Polska COLISTIN TZF – antybiotyk (zastosowanie miejscowe, domięśniowe, doustne, dożylnie). Dostępny na rynku (produkt leczniczy generyczny).</p>
Struktura przestrzenna nieustalona	<p><b>Omiganan (MBI 226)</b> (syntetyczny) Typ: analog Indolicidin Aktywność: Gram+, Gram-, grzyby MW: 1,78 kD; LA: 12; NC: +5 Źródła: [Sader i in. 2004, Rubinchik i in. 2009]</p>	<p>MIGENIX Inc., Kanada <a href="http://www.migenix.com">www.migenix.com</a> Omigard<sup>TM</sup> – 1% żel przeciwinfekcyjny (zastosowanie miejscowe). Badania kliniczne: Faza III.</p>
Struktura przestrzenna nieustalona	<p><b>Iseganan (IB-367)</b> (syntetyczny) Typ: analog protegryny-1 Aktywność: Gram+, Gram- MW: 1,90 kD; LA: 17; NC: +4,8 Źródła: [Giacometti i in. 2003, Landaa i in. 2009]</p>	<p>IntraBiotics Pharmaceuticals, U.S.A. <a href="http://www.intrabiotics.com">www.intrabiotics.com</a> Składnik płynu przeciw infekcyjnego (zapalenie błony śluzowej jamy ustnej). Badania kliniczne: Faza III.</p>
Struktura przestrzenna nieustalona	<p><b>P-113</b> (syntetyczny) Typ: analog histatyny Aktywność: grzyby; Gram+, Gram- MW: 1,56 kD; LA: 12; NC: +6,3 Źródła: [Rotshtein i in. 2001, Sajjan i in. 2001]</p>	<p>Demegen, U.S.A. <a href="http://www.demegen.com">www.demegen.com</a> Składnik płynu przeciwinfekcyjnego (zapalenie błony śluzowej jamy ustnej; kandydoza). Badania kliniczne: Faza II.</p>

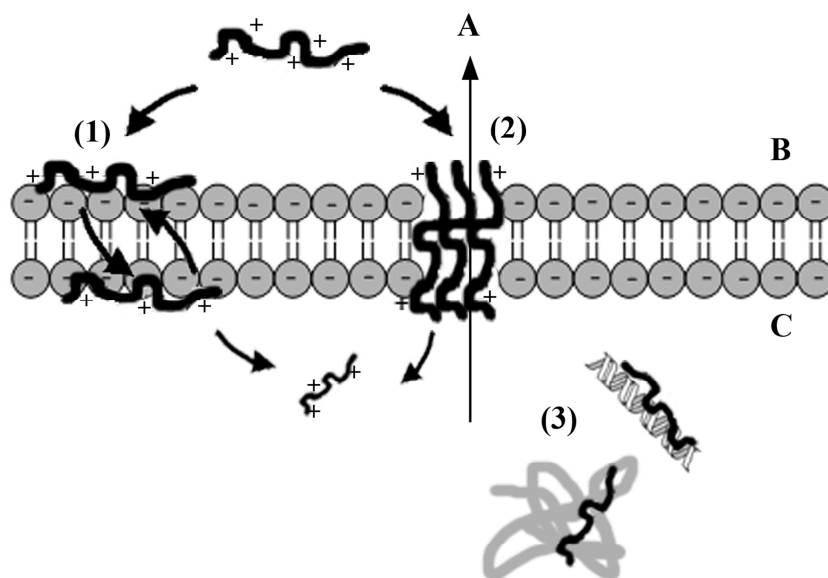
Cechą charakterystyczną AMPs, niezależnie od pochodzenia peptydu, jest ich kationowy charakter (zwykle od +2 do +5 w neutralnym pH) oraz niewielkie rozmiary (nieprzekraczające 100 reszt aminokwasowych). Stanowi to dużą zaletę w przypadku konstruowania matryc polimerowych przeznaczonych do ich uwalniania w miejscu infekcji,



gdzie profil uwalniania peptydu z wnętrza matrycy uzależniony jest głównie od procesów dyfuzyjnych. Poza bezpośrednią aktywnością przeciw bakteriom Gram (+) i Gram (-), peptydy te wykazują aktywność przeciwko grzybom [Mohammad i in. 1995], pierwotniakom [Aley i in. 1994] i wirusom [Murakami i in. 1991] z wartościami MIC (minimalne stężenie hamujące wzrost) na poziomie mikromolarnym i submikromolarnym.

Jak dotąd dokładny mechanizm działania wszystkich znanych AMPs nie został poznany. Niemniej jednak zaakceptowany został model, w którym podstawowym mechanizmem działania wielu z nich jest permabilizacja błony komórkowej komórki patogenicznej [Toke 2005]. Zaproponowany mechanizm jest wynikiem mało specyficznych oddziaływań i polega na odpowiednim łączeniu się AMPs z błoną komórkową, w wyniku czego następuje wypływ istotnych składników wewnątrzkomórkowych (**Rysunek 4**). Te niespecyficzne oddziaływania leżą u podstaw szerokiego spektrum aktywności wielu przedstawicieli należących do tej grupy związków. Do pierwszego kontaktu pomiędzy peptydem a komórką dochodzi w wyniku oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy dodatnio naładowaną, hydrofobową cząstką inhibitora a ujemnie naładowanymi fosfolipidami znajdującymi się w błonie komórkowej. Mechanizm ten polega na tworzeniu przejściowych kompleksów poracyjnych oraz kanałów jonowych w błonie komórkowej. Powstawanie porów, a co za tym idzie utrata ciągłości błony, powoduje bierny wypływ jonów fosforanowych i potasowych, a także aminokwasów i ATP. Dochodzi do zaburzenia siły protonomotorycznej lub co najmniej jednej z jej składowych (gradient pH, potencjał membranowy). Niska zawartość w komórce ATP oraz niedobór jonów i kofaktorów hamuje syntezę makromolekuł, do których należą: DNA, RNA, polisacharydy i białka. Niemożliwym staje się transport aktywny składników odżywczych, w konsekwencji czego komórki nie mogą się rozwijać i umierają [Netz i in. 2002]. W zależności od budowy struktury pierwszorzędowej danego peptydu wyróżnia się modyfikacje bezpośredniego oddziaływania z błoną komórkową komórki patogenicznej.





**Rysunek 4.** Mechanizm działania kationowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (A — wypływ jonów, ATP i składników odżywczych; B — środowisko zewnętrzne; C — przestrzeń wewnątrzkomórkowa) [Gorczyca i in. 2011].

Zdecydowana większość z opisanych w literaturze peptydów należących do grupy AMPs działa według opisanego wyżej mechanizmu. Spośród pozostałych wyodrębnione zostały także i te, które zdolne są do inaktywacji komórek patogennych poprzez interakcje z różnymi celami wewnątrzkomórkowymi np. poprzez inhibicje produkcji strategicznych enzymów dla prawidłowego funkcjonowania komórki, poprzez chelatowanie jonów cynku i żelaza bądź bezpośrednio na drodze inhibicji kompetytywnej, czy też poprzez wiązanie z DNA, RNA gospodarza, a także indukcję apoptozy [Carlsson i in. 1991, Moll i in. 1996, Héchar d i in. 2002]. Powszechnie jest też występowanie mieszanych mechanizmów działania na drodze jednoczesnej destabilizacji wielu różnych funkcji komórki patogennej.

Jednym z ograniczeń powszechnego wykorzystywania peptydów przeciwdrobnoustrojowych w konstrukcji biomateriałów jest ich stosunkowo niska stabilność, przez co roztwory je zawierające szybko tracą swoją wyjściową aktywność, a także duża wrażliwość na działanie różnych inhibitorów zewnętrznych. Badania *in vivo* (aplikacja w postaci płynu zawierającego peptyd bezpośrednio na zranioną tkankę) wykazały szybką utratę aktywności użytego peptydu na skutek działania proteaz obecnych w środowisku rany i niewielkich zmian pH. Ponadto wykazano, że stały kontakt z peptydem, bądź zbyt duże jego stężenie w miejscu zranienia może wywołać przewlekłe zapalenie i w konsekwencji uniemożliwić/spowolnić proces gojenia rany. Zjawisko to zaobserwowano w eksperymentalnym leczeniu łuszczycy, z wykorzystaniem endogennego peptydu

przeciwdrobnoustrojowego o szerokim spektrum aktywności LL-37 [Ong i in. 2002]. Zaobserwowana prawidłowość nie jest jednak czynnikiem limitującym zastosowanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych, ze względu na specyficzną efektywność stosunkowo niskich dawek wielu z nich. Dalsze wykorzystanie AMPs w leczeniu zainfekowanych ran musi być więc związane z zastosowaniem odpowiedniej metody aplikacji, aby uchronić aktywną biologicznie makromolekulę przed degradacją enzymatyczną i zapewnić kontrolowany profil jej uwalniania w dawkach minimalnych potrzebnych do zahamowania infekcji.

Dodatkową zaletą wykorzystania peptydów przeciwdrobnoustrojowych jest w wielu przypadkach brak aminokwasów niebiałkowych w ich sekwencjach aminokwasowych, co stwarza możliwości ich otrzymywania z wykorzystaniem technologii rekombinowanego DNA w heterologicznych układach ekspresyjnych o dużej wydajności.

#### **2.3.2.6.1. Lizostafyna.**

Lizostafyna jest zewnątrzkomórkową, cynkową metaloproteinazą wytwarzaną przez bakterie *Staphylococcus simulans biovar staphylolyticus*. Masa cząsteczkowa tego monomerycznego białka wynosi 26,9 kDa [Szweda i in. 2005]. Lizostafyna należy do białek o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, przy czym główne jej działanie polega na niszczeniu peptydoglikanu ściany komórkowej u niemal wszystkich znanych mikroorganizmów z rodzaju *Staphylococcus*. Lizostafyna wykazuje aktywność enzymatyczną endopeptydazy glicylo-glicylowej, endo- $\beta$ -N-acetylo glukozamidazy oraz N-acetylo-muramylo-L-alanino amidazy, przy czym optimum tej aktywności występuje w temperaturze 40°C i przy pH 7,5 [Browder i in. 1965, Iversen i in. 1973]. Jako endopeptydaza glicylo-glicylowa, lizostafyna lizuje komórki *Staphylococcus* poprzez hydrolizę wiązań peptydowych w mostkach poliglicynowych. Mostki te sieciują łańcuchy glikopeptydowe występujące w peptydoglikanie ścian komórkowych w/w bakterii. Wysoki stopień usieciowania ściany komórkowej bakterii z rodzaju *Staphylococcus aureus* nadaje jej nieporównywalnie większą wytrzymałość mechaniczną w stosunku do innych gatunków z tego rodzaju, a tym samym sprawia też, że są one dużo bardziej wrażliwe na działanie lizostafiny. Peptydoglikan innych gronkowców zawiera większe ilości seryny niż glicyny, co powoduje, że są one mniej podatne na jej działanie. Ta wyjątkowa właściwość ściany komórkowej *S. aureus* sprawia, że lizostafyna może być wykorzystywana jako środek terapeutyczny w leczeniu antybiotykoopornych infekcji wywołanych przez drobnoustroje *S. aureus*. Ponadto, lizostafyna umożliwia lizę zarówno komórek dzielących się jak i niedzielących, podczas gdy większość antybiotyków do zachowania swojej aktywności wymaga różnicujących się komórek [Zygmunt i in. 1972].

Jak dotąd przeprowadzono liczne badania, których celem było sprawdzenie możliwości wykorzystania tego enzymu jako czynnika chemoterapeutycznego przeciw infekcjom wywołanym przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. W trakcie tych badań

stwierdzono, że lizostafyna mogłaby być bardzo skutecznym lekiem przeciwgronkowcowym. Prace nad jej zastosowaniem rozpoczęto już w latach 70-tych XX wieku, kiedy przeprowadzono pierwsze badania wykorzystujące lizostafynę w leczeniu infekcji wywołanych przez drobnoustroje *Staphylococcus aureus*. W kolejnych latach wykazano aktywność lizostafiny w stosunku do szczepów MRSA [Huber i in. 1989]. Huan i wsp. zaproponowali możliwość jej wykorzystania w leczeniu zakażeń, wywołanych przez szczepy MRSA, u pacjentów z oparzeniami skóry [Huan i in. 1994]. Poza tym stwierdzono synergistyczne oddziaływanie pomiędzy rekombinowaną lizostafyną, a niektórymi antybiotykami tj. wankomycyną, gentamycyną, tetracykliną czy erytromycyną, co zwiększyło skuteczność zwalczania szczepów MRSA [Polak i in. 1993]. Badania wykonane przez Kokai-Kun i współpr. wykazały, że lizostafyna jest także doskonałym środkiem leczniczym w usuwaniu gronkowca złocistego z krwi oraz narządów wewnętrznych zainfekowanych myszy [Kokai-Kun i in. 2007]. Ostatnie doniesienia wskazują także na możliwość jej wykorzystania w konstrukcji chitozanowo-kolagenowych materiałów gąbczastych o potencjalnym zastosowaniu jako materiały opatrunkowe [Cui i in. 2011]. Autorzy tej pracy wykazali, że inkorporowana na etapie wytwarzania matrycy lizostafyna, nie traci swojej aktywności podczas procesu suszenia sublimacyjnego, a otrzymane za jego wykorzystaniem materiały gąbczaste zdolne są do uwalniania większości początkowo wprowadzonej jej ilości. Ponadto badania cytotoksyczności przeprowadzone metodą *in vitro* względem ludzkich embrionalnych komórek płuc (HLF), wykazały znakomitą biokompatybilność wytworzonych biomateriałów, na co wskazywał ponad dwukrotny wzrost tych komórek w obecności badanego biomateriału w stosunku do próby kontrolnej, a przeprowadzone badania *in vivo*, z wykorzystaniem modelu zainfekowanej komórkami gronkowca złocistego rany króliczej, wskazały na znacznie szybsze tempo zmniejszania się powierzchni rany w porównaniu z materiałem chitozanowo-kolagenowym niezawierającym lizostafiny.

### 3. CEL PRACY

Celem badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej była konstrukcja i charakterystyka materiału zbudowanego z chitozanu, kolagenu i żelatyny o strukturze i właściwościach wymaganych od nowoczesnego materiału opatrunkowego, stanowiącego jednocześnie dogodną matrycę do inkorporacji związków biologicznie czynnych, zwłaszcza lizostafiny - dzięki czemu materiały te byłyby skutecznym środkiem w walce z zakażeniami ran skórnych wywołanymi kolonizacją szczepów *Staphylococcus aureus*.

W szczególności zakładano:

- skonstruowanie materiału o strukturze gąbki z chitozanu, kolagenu i żelatyny w oparciu o postawioną hipotezę, która zakładała, że możliwe jest rozpuszczenie chitozanu w wodzie uprzednio nasyconej gazowym ditlenkiem węgla. Zakładano, że wskazana metoda wyeliminuje czaso- i energochłonny proces końcowego płukania materiału uzyskiwanego w procesie liofilizacji, w celu usunięcia resztkowej zawartości kwasów organicznych, standardowo wykorzystywanych do przygotowywania roztworów chitozanu. Ponadto zakładano, że wykorzystanie tej metody umożliwiłoby dodawanie peptydów/białek już na etapie formułowania materiałów z niego wytworzonych, bez obawy o ich częściową utratę na skutek wymywania oraz bez obawy o utratę ich aktywności na skutek działania niskiego pH.
- określenie wybranych właściwości fizykochemicznych w/w materiałów, a także wpływu stężenia genipiny, użytej jako czynnika sieciującego na wartość oznaczanych parametrów.
- określenie przydatności otrzymanych materiałów, jako matrycy do inkorporacji lizostafiny poprzez wyznaczenie profilu jej uwalniania oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej względem wzorcowego szczepu *S. aureus* (ATCC 29213) w zależności od stężenia lizostafiny i stężenia czynnika sieciującego.
- określenie aktywności wybranych materiałów chitozanowo-białkowych aktywowanych lizostafiną wobec szerokiego zestawu szczepów *S. aureus* pochodzących z różnych populacji.
- porównanie wybranych właściwości fizykochemicznych oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych materiałów chitozanowo-białkowych aktywowanych lizostafiną względem komórek *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* i *P. aeruginosa* z komercyjnie dostępnymi materiałami opatrunkowymi.
- określenie wpływu rodzaju preparatu biopolimerowego (chitozanu, żelatyny bądź kolagenu) na wybrane właściwości wytworzonych z nich materiałów gąbczastych przy wykorzystaniu standardowych procedur przetwarzania

chitozanu, mając na celu obiektywne wykazanie relacji pomiędzy tymi czynnikami.

- próbę zwiększenia skali wytwarzania lizostafiny, poprzez optymalizację jej ekspresji w bioreaktorze o objętości roboczej 5l, w wydajnym układzie ekspresyjnym *E. coli* TOP10F'/pBAD2lys, przygotowanym i wcześniej opisanym przez pracowników Katedry Technologii Leków i Biochemii, Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, w celu pozyskania wydajnego, szybkiego i taniego źródła jej otrzymywania.

## 4. MATERIAŁY I METODY

### 4.1. Materiały podstawowe i aparatura.

#### 4.1.1. Odczynniki i surowce stosowane podczas badań laboratoryjnych.

Tabela 4. Wykaz odczynników i surowców wykorzystywanych podczas badań laboratoryjnych.

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
1. Żelatyna z łosia atlantyckiego ( <i>Salmo salar</i> )	Surowce przygotowane przez dr. Roberta Tylingo (Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska).
2. Kolagen z łosia atlantyckiego ( <i>Salmo salar</i> )	
3. Żelatyna z suma afrykańskiego ( <i>Clarias gariepinus</i> )	
4. Kolagen z suma afrykańskiego ( <i>Clarias gariepinus</i> )	
5. Chitozan (MW 160,08±18,33 kDa, DA 83,6±3,0 %)	Beckmann-Kenko GmbH
6. Chitozan MMW	Sigma-Aldrich
7. Aldehyd glutarowy	Sigma-Aldrich
8. Genipina	Challenge Bioproducts
9. Kwas octowy, lodowaty	POCH S.A.
10. Etanol	POCH S.A.
11. Metanol	POCH S.A.
12. Izopropanol	Sigma-Aldrich
13. Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Sigma-Aldrich
14. Lizozym (70000 U/mg)	Sigma-Aldrich
15. Lizostafyna (728 U/mg)	(Suplement)
16. Surowica bydlęca (FBS)	Sigma-Aldrich
17. Bufor fosforanowy w tabletkach (pH 7,4)	Sigma-Aldrich
18. DPPH	Sigma-Aldrich
19. ABTS	Sigma-Aldrich
20. Nadsiarczan potasu	Sigma-Aldrich
21. Ferrozyna	Sigma-Aldrich
22. Ninhydryna	Sigma-Aldrich
23. NaCl	POCH S.A.
24. CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
25. FeCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
26. NaOH	POCH S.A.
27. Chloramfenikol	Sigma-Aldrich
28. Penicylina	Sigma-Aldrich
29. Streptomycyna	Sigma-Aldrich
30. Agaroza	Emapol
31. MTT	Sigma-Aldrich
32. Odczynnik Bradford	Fermentas
33. Woda demineralizowana Mili-Q	Mili-Q
34. CO <sub>2</sub> (gaz).	Linde Gaz Polska Sp. z o.o.

#### 4.1.2. Aparatura stosowana podczas badań laboratoryjnych.

Tabela 5. Wykaz aparatury wykorzystywanej podczas badań laboratoryjnych.

	Nazwa	Producent
1.	Liofilizator CHRIST Alpha 1-4 LD Plus,	CHRIST*
2.	Mieszadło mechaniczne	IKA RW20*
3.	Mieszadło mechaniczne specjalnej konstrukcji BMX 10s (z wydrążonym wałem mieszadła)	BIOMIX
4.	Waga elektroniczna, dokładność 0,001g	RADWAG
5.	Urządzenie do otrzymywania wody wysokiej czystości Mili-Q	Milipore
6.	Skaningowy mikroskop elektronowy	Philips-FEI XL 30 ESEM (Katedra Inżynierii Materiałowej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Gdańska)
7.	Mikroskop optyczny TELAVAL 3	Carl Zeiss
8.	Homogenizator Silent Crusher	Heidolph*
9.	PH-metr (CP-315M)	Elmetron
10.	Elektroda Blueline 25 pH	Schott
11.	Cieplarka laboratoryjna	NuAire
12.	Inkubator powietrzny z wytrząsaniem Unitron	Infors
13.	Wiskozymetr Brookfield'a – model DV-III+	Brookfield*
14.	Maszyna wytrzymałościowa Instron model 5543	Instron, KCTBŻ*
15.	Czytnik mikroplatek Hercules	Bio-Rad
16.	Spektrofotometr Victor	Perkin Elmer Instruments
17.	Sterylizator SP 32 E	Wadem
18.	Vortex WL-1	DHN

\*aparatura stanowiąca wyposażenie Katedry Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska.

#### 4.1.3. Podłoża bakteryjne stosowane podczas badań laboratoryjnych.

Tabela 6. Wykaz podłoży bakteryjnych wykorzystywanych w badaniach laboratoryjnych. Ilości składników na 1000 ml wody destylowanej. Pożywki po przygotowaniu sterylizowano w autoklawie w 120°C, przy ciśnieniu 1,5 atm. przez 30 minut. Dodatki dodawano do sterylnych pożywek przed przygotowaniem podłoża.

	Nazwa podłoża	Składniki
1.	LB	10,0 g NaCl, 5,0 g ekstrakt drożdżowy, 10,0 g pepton K
2.	LA	10,0 g NaCl, 5,0 g ekstrakt drożdżowy, 10,0 g pepton K, 15 g agar
3.	Pseudomonas Agar Cetrimide	Podłoże gotowe na płytkach jednokomorowych 90 mm (Emapol)
4.	Podłoże hodowlane Baird-Parker	10,0 g hydrolizat kazeiny, 5,0 g ekstrakt mięsny, 1,0 g ekstrakt drożdżowy, 12,0 g glicyna, 10,0 g pirogronian sodu, 5,0 g chlorek litu, 20,0 g agar (Emapol)
5.	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich

#### 4.1.4. Komórki i szczepy bakteryjne stosowane podczas badań laboratoryjnych.

Tabela 7. Wykaz komórek i szczepów bakteryjnych stosowanych podczas badań laboratoryjnych.

Nazwa	Pochodzenie	Oznaczenia linii komórkowych i szczepów bakteryjnych	
Linia komórkowa 1. mysich embrionalnych fibroblastów NIH-3T3	ATCC	NIH-3T3	
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	ATCC 29213	
3. <i>Staphylococcus aureus</i>	Kolekcja Katedry Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska (84 szczepy pochodzenia bydłęcego).	gruczoł mlekowy bydła chorego na mastitis	7-19; 21-22; 24-47; 49-74; 81-84; 86; 95; 102; 104-109; 110-113; 116; 190; 120; 123-126; 128
		rany pooperacyjne	6SZ; 8SZ; 10SZ; 16SZ; 19SZ; 30SZ; 35SZ; K8
	Kolekcja Oddziału Mikrobiologii Klinicznej Szpitala w Vaxjo, Szwecja (SZ, 32 szczepy).	rany u pacjentów chorych na cukrzycę	26SZ; 49SZ; 54SZ; 56SZ; 59SZ; 61SZ; 79SZ
		rany u pacjentów z niewydolnością naczyniową	21SZ; 25SZ; 29SZ; 39SZ; 41SZ; 55SZ; 7SZ
		odleżyny	18SZ; 68SZ; K6
	Kolekcja Zakładu Bakteriologii Szpitala Wojewódzkiego w Koszalinie (K, 27 szczepów)	owrzodzenia	K1; K11; K2041
		rany innego typu	17SZ; 22SZ; 40SZ; 52SZ; 60SZ; 70SZ; 77SZ; K13; K16; K17; K3; K9
	wymazy z jamy ustnej	K10; K12; K14; K18; K2; K5	
	szczepy MRSA	59SZ; 7SZ; K2015; K2041; K2102; K2136	
4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kolekcja Katedry Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska	<i>S. epidermidis</i>	
5. <i>Escherichia coli</i>	Kolekcja Katedry Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska	<i>E. coli</i>	
6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kolekcja Katedry Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska	<i>P. aeruginosa</i>	



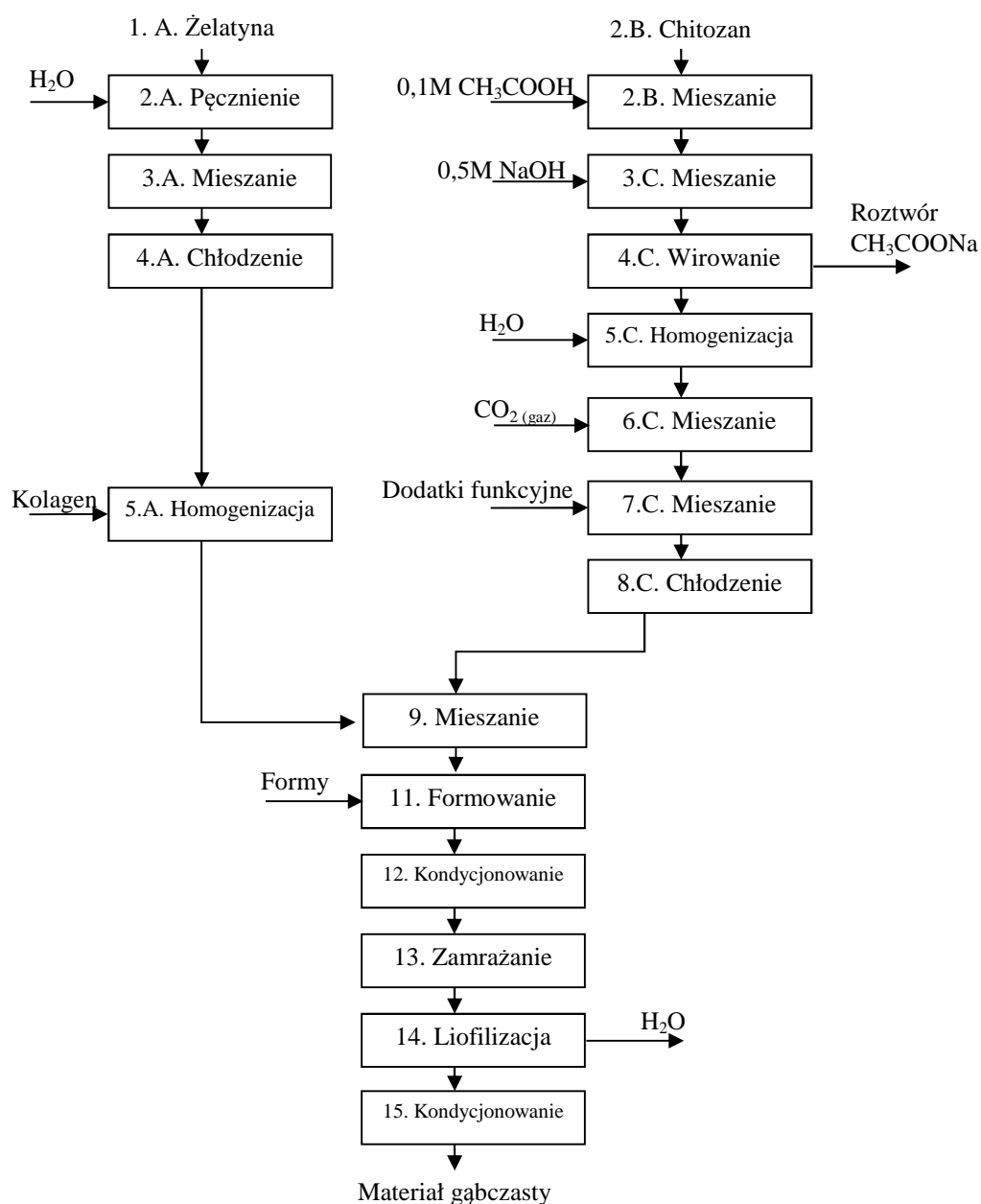
## **4.2. Metody stosowane podczas badań laboratoryjnych.**

### **4.2.1. Otrzymywanie biopolimerowych materiałów gąbczastych, z wykorzystaniem standardowych metod przetwarzania chitozanu.**

Materiały gąbczaste o różnym składzie biopolimerowym otrzymywano według standardowo wykorzystywanej procedury z dyspersji chitozanu, kolagenu i żelatyny (wyizolowanych ze skór łososia atlantyckiego (*Salmo salar*) i suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*). Chitozan oraz kolagen rozpuszczano w 0,5 M roztworze kwasu octowego, zaś żelatynę w wodzie demineralizowanej, z wykorzystaniem mieszadła mechanicznego (prędkość obrotowa dostosowana została do lepkości uzyskanej dyspersji), w temperaturze dopasowanej do użytego biopolimeru. W przypadku materiałów złożonych z dwóch polimerów przygotowywano osobno dyspersje każdego z nich, a następnie łączono obie mieszaniny. Po rozpuszczeniu preparaty umieszczano w cylindrycznych formach o średnicy 25 mm i wysokości 20 mm, zamrażano w -20°C (24 h) i poddawano suszeniu sublimacyjnemu (CHRIST Alpha 1-4 LD Plus) do momentu wysuszenia (0,96 atm; temperatura próbki -21°C, temperatura kondensatora -84°C). Uzyskane struktury gąbczaste przechowywano w szczelnie zamkniętych pojemnikach w temperaturze około 4°C do czasu ich charakterystyki. W celu ograniczenia rozpuszczalności otrzymanych struktur do każdej z przygotowywanych dyspersji dodawano roztworu aldehydu glutarowego w ilości 1%, w/w względem całkowitej masy biopolimerów w dyspersji.

### **4.2.2. Otrzymywanie i charakterystyka materiałów chitozanowo-białkowych, z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie.**

Metoda otrzymywania chitozanowo-białkowych materiałów gąbczastych została szczegółowo przedstawiona na schemacie poniżej (**Rysunek 5**). Każdy z trzech surowców był preparowany oddzielnie. 1,2 g żelatyny z łososia atlantyckiego (*Salmo salar*) zawieszano w 20 ml wody destylowanej i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 2 h do spęcznienia (2.A.), po czym podgrzewano do temperatury ok. 60°C w celu jej rozpuszczenia (3.A.). Otrzymany roztwór żelatyny schładzano do temperatury 12°C i dodawano do niego 0,6 g kolagenu z łososia atlantyckiego (*Salmo salar*), po czym całość poddawano homogenizacji do momentu uzyskania jednorodnego roztworu polimerów białkowych (4.A.). 1,5 g chitozanu rozpuszczano w 100 ml 0,1 M roztworu kwasu octowego (2.B.), po czym dodawano stopniowo 0,5 M roztworu wodorotlenku sodu, przy ciągłym mieszaniu i kontroli pH, do momentu osiągnięcia pH 7,5 (3.B.). Osad odseparowywano poprzez wirowanie (10000 rpm, 30 min), a następnie trzykrotnie przemywano wodą destylowaną i ponownie odwirowywano (4.C.). Uzyskany osad zawieszano w wodzie demineralizowanej w ilości niezbędnej do uzyskania całkowitej masy 81,5 g, po czym mieszaninę poddawano homogenizacji w celu uzyskania jednorodnego roztworu koloidalnego (5.C.).



**Rysunek 5.** Schemat otrzymywania gąbczastych materiałów chitozanowo-białkowych z wykorzystaniem technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie.

Następnie tak otrzymany roztwór nasycono gazowym ditlenkiem węgla przez okres 3 h, w temperaturze pokojowej z wykorzystaniem mieszadła mechanicznego z końcówką wyposażoną w odpowiedni spiek ceramiczny (6.C.). Stopień rozpuszczenia chitozanu w wodzie kontrolowano poprzez pomiar lepkości nasyconego roztworu za pomocą viskozymetru Brookfield'a – model DV-III+. Do otrzymanego w ten sposób roztworu chitozanu, kontrolując, by temperatura nie przekroczyła 12°C, dodawano etanolowego

roztworu genipiny tak, by jej stężenie względem suchej masy polimerów wynosiło 0,5% w/w i mieszano przez 10 min. (7.C.). Następnie dodawano 20 ml wcześniej przygotowanego roztworu polimerów białkowych i kontynuowano mieszanie przez kolejne 10 min. (9.). Otrzymaną dyspersję polimerów wprowadzano do form o wymiarach 12,0 x 12,0 x 0,4 cm (10.) i kondycjonowano przez 24 h w temperaturze 12°C (11.). Otrzymany żel chitozanowo-białkowy zamrażano w temperaturze -20°C przez okres 24 h (12.), po czym poddawano suszeniu sublimacyjnemu (13.) (liofilizator CHRIST Alpha 1-4 LD Plus, 0,96 atm; temperatura próbki -30°C, temperatura kondensatora -80°C). W wyniku procesu suszenia uzyskiwano suche materiały w postaci gąbek, które przed dalszą analizą kondycjonowano w temperaturze pokojowej przy wilgotności powietrza 90% przez 3 h (14.). Otrzymane materiały przechowywano w szczelnie zamkniętych pojemnikach do czasu ich charakterystyki. Zgodnie z opisaną procedurą przygotowano materiały sieciowane genipiną w stężeniach 0,5; 1,0 i 2,0% w/w, względem suchej masy użytych biopolimerów, a także materiały bez dodatku czynnika sieciującego.

#### 4.2.3. Otrzymywanie materiałów chitozanowo-białkowych aktywowanych lizostafyną.

Materiały chitozanowo-białkowe aktywowane lizostafyną były otrzymywane w sposób analogiczny do przedstawionego w punkcie **Materiały i Metody 4.2.2**, z tą tylko różnicą, że do wodnego roztworu chitozanu, uzyskiwanego na etapie **6.C.**, **Rysunek 5**, poza wodnym roztworem genipiny, dodawano roztworu lizostafiny, o aktywności 740 U/ml, w objętościach odpowiednich do uzyskania zadanej jej aktywności w końcowym materiale. W ten sposób przygotowano siedem rodzajów materiałów chitozanowo-białkowych o różnych stężeniach genipiny i lizostafiny (**Tabela 8**). W opisanym procesie wykorzystano roztwory lizostafiny otrzymane zgodnie z metodologią przedstawioną w punkcie **Materiały i Metody 9.3.1.**, dla hodowli prowadzonej w optymalnych warunkach (**Tabela 28**, „Glicerol 3g/l/h”).

**Tabela 8.** Skład materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie przy różnych stężeniach genipiny i lizostafiny.

Nr próby	Stężenie biopolimerów w dyspersji [%, w/w]	Stężenie genipiny [w/w, względem masy polimerów]	Ilość jednostek lizostafiny na ml dyspersji chitozanowo-białkowej [U/ml]
1.	1,25% chitozan 1,0% żelatyna 0,5% kolagen	0,5	0,0
2.	bez zmian	0,5	10,0
3.	bez zmian	0,5	20,0
4.	bez zmian	0,5	30,0
5.	bez zmian	0,0	10,0
6.	bez zmian	1,0	10,0
7.	bez zmian	2,0	10,0

#### 4.2.4. Charakterystyka biopolimerowych materiałów gąbczastych.

##### 4.2.4.1. Dokumentacja morfologii.

Morfologię otrzymanych struktur scharakteryzowano w oparciu o ocenę wizualną, a także na podstawie zdjęć uzyskanych z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), przy użyciu środowiskowego, skaningowego mikroskopu elektronowego, Philips-FEI XL 30 ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope), wyposażonego w wolframowe działko elektronowe, w atmosferze pary wodnej (Tr) i napięciu w zakresie 12-15 kV. Dodatkowo dla materiałów otrzymanych z wykorzystaniem nowej metody, wyznaczono porowatość [Yang i in. 2010], zgodnie ze wzorem:

$$\text{Wzór (1): } P(\%) = \frac{V_c}{V_m} = \frac{(W_{24}-W_0) \times \rho}{V_m} \times 100\% ,$$

gdzie  $V_m$  to objętość badanej próby materiału [ $\text{cm}^3$ ],  $V_c$  to objętość jej porów [ $\text{cm}^3$ ],  $W_0$  i  $W_{24}$  stanowią masę [g] badanej próby materiału odpowiednio przed i po 24h inkubacji w etanolu ( $25^\circ\text{C}$ ), a  $\rho$  odpowiada gęstości etanolu ( $0,808 \text{ g/cm}^3$ ). Za pomocą narzędzi przetwarzania obrazu pakietu graficznego Photoshop CS5 wyznaczono także powierzchnię przekroju porów dla wszystkich otrzymanych materiałów.

##### 4.2.4.2. Określanie chłonności / rozpuszczalności.

Zdolność otrzymanych biomateriałów do wiązania cieczy oceniono z wykorzystaniem wody demineralizowanej, według polskiej normy PN-EN 13726-1:2005. W tym celu uprzednio zważone próby materiałów ( $W_1$ ) zanurzano w badanej cieczy (50 ml) i inkubowano w temperaturze  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  przez 24h. Następnie próby wyjmowano, usuwano powierzchniowo związaną wodę poprzez delikatne osuszanie bibułą i ważono ( $W_2$ ). W celu oznaczenia rozpuszczalności próby zamrażano w  $-20^\circ\text{C}$  (24h), liofilizowano i powtórnie ważono ( $W_3$ ). Wodochłonność i rozpuszczalność [%] obliczano na podstawie wzorów:

$$\text{Wzór (2): } \text{Wodochłonność} = \frac{W_2 - W_3}{W_2} ,$$

$$\text{Wzór (3): } \text{Rozpuszczalność} = \left[ 1 - \frac{W_1 - W_3}{W_1} \right] \times 100\% ,$$

gdzie:  $W_1$  – masa próby przed badaniem [g];  $W_2$  – masa próby po inkubacji w wodzie [g]  
 $W_3$  – masa próby po liofilizacji [g].

Podczas wyznaczania wodochłonności uwzględniano rozpuszczalność prób. Dla wybranych materiałów wyznaczano chłonność względem roztworu o składzie jonowym zbliżonym do wysięku z rany według polskiej normy PN-EN 13726-1:2005 (Ciecz A), uzyskanym poprzez dodanie 0,368 g  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  i 8,0298 g NaCl do 991,6022 g wody demineralizowanej. Każdorazowo po przeprowadzeniu doświadczenia mierzono pH medium. Wynik podawano

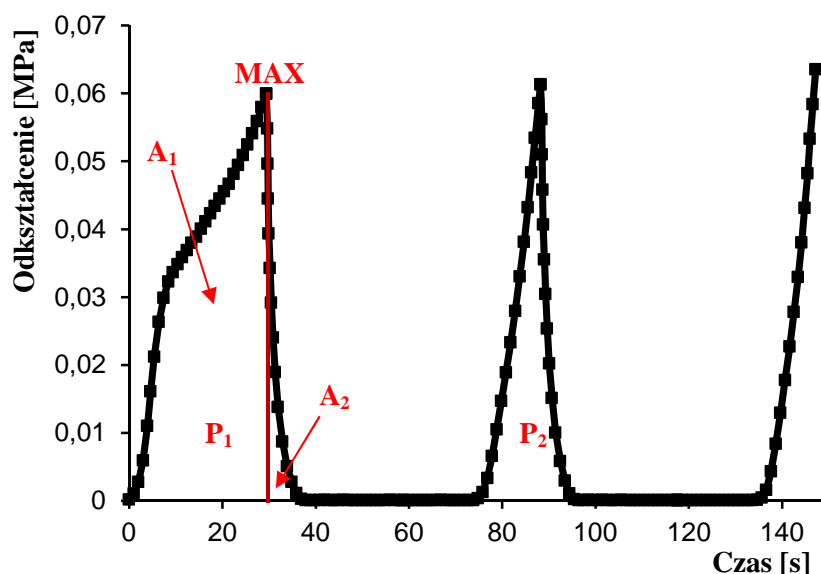
jako wartość średnią uzyskaną z trzech niezależnych pomiarów dla każdej z trzech prób materiału.

#### **4.2.4.3. Wyznaczanie stopnia usieciowania.**

Stopień usieciowania materiałów otrzymanych z wykorzystaniem 0,5%, 1,0% i 2,0% genipiny oznaczano przy wykorzystaniu metody opartej o reakcję z odczynnikiem ninhydrynowym [Yuan i in. 2007]. 2,5 mg badanego materiału zawieszano w 1 ml odczynnika ninhydrynowego (2% w-v) i ogrzewano przez 20 minut w temperaturze 100°C. Następnie roztwór schładzano do temperatury pokojowej, rozcieńczano 50% (v/v) izopropanolem i mierzono absorpcję przy długości fali 570 nm (UV-VIS Lambda Bio 20). Jako kontrolę wykorzystano materiał otrzymany bez dodatku czynnika sieciującego. Oznaczenia dla każdej z prób wykonano trzykrotnie.

#### **4.2.4.4. Określanie parametrów profilu tekstury.**

Mechaniczne właściwości struktur gąbczastych badano z wykorzystaniem uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej Instron model 5543, sterowanej komputerowo za pomocą programu „Merlin” (Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska), zgodnie z powszechnie stosowaną metodologią [Hoyer i in. 2012, Bi i in. 2011]. Cylindryczne formy poddawano dwukrotnemu ścisaniu do 50% odkształcenia. Siłę powstającą w trakcie ścisania mierzono przy szybkości przesuwu głowicy 0,5 mm/s. W oparciu o uzyskane wyniki wyznaczono wartości parametrów profilu tekstury (**Rysunek 6**): twardość (maksimum pierwszego piku - MAX) oraz elastyczność - szybkość odzyskiwania kształtu po ścisaniu (stosunek powierzchni od startu pierwszego piku do jego maksimum oraz powierzchni od maksimum pierwszego piku do jego końca – A1/A2). Każda z podanych wartości przedstawia średnią wartość uzyskaną z pięciu pomiarów. Wybrane materiały, po wcześniejszej preinkubacji w wodzie destylowanej (24h), poddano dodatkowo testom wytrzymałościowym, polegającym na cyklicznym ścisaniu w zdefiniowanych wyżej warunkach testu (25 cykli).



**Rysunek 6.** Sposób wyznaczania parametrów profilu tekstury materiałów chitozanowo-białkowych.

#### 4.2.4.5. Badanie transmisji par wilgoci.

Przepuszczalność par wilgoci WVTR (Water Vapor Transmission Rate) przez biopolimerowe materiały gąbczaste była oznaczana zgodnie z metodą ASTM E96-90, na drodze monitorowania ubytku masy wody, jaka wyparowywała z naczynia pomiarowego, zakrytego badanym materiałem. Naczynia pomiarowe wypełniano wodą w ilości 20 g, po czym na ich wylocie umieszczano próby badanych materiałów o średnicy i grubości odpowiednio 2,5 i 0,5 cm. Zważone naczynia pomiarowe umieszczano w eksykatorze wypełnionym nasyconym roztworem chlorku litu, co zapewniało poziom wilgotności wewnątrz eksykatora ok 20% i inkubowano w temperaturze 25<sup>0</sup>C. Wartości WVTR wyznaczano w zdefiniowanych odstępach czasowych, zgodnie ze wzorem:

$$\text{Wzór (4): } WVTR = \frac{m}{A \times \Delta t};$$

gdzie: m to masa [g] ubytku wody w określonym czasie,  $\Delta t$  - czas [h], A - powierzchnia materiału, przez którą przenikała para wodna [m<sup>2</sup>]. Dla każdego z otrzymanych materiałów doświadczenie przeprowadzano trzykrotnie.

#### 4.2.4.6. Badanie degradacji enzymatycznej pod wpływem lizozymu.

Zważone uprzednio próby biomateriałów ( $W_0$ ), umieszczano w 20 ml buforu fosforanowego (0,01 M, pH 7,4) zawierającego lizozym o całkowitej aktywności 4000 U/ml i inkubowano w temperaturze 37±1<sup>0</sup>C w ciągu 7 dni. W celu zachowania aktywności enzymu, medium wymieniano na nowe co 24 godziny. Każdego dnia wyjmowano po jednej próbce

danego materiału, zamrażano, liofilizowano i ważono ( $W_t$ ), w celu oznaczenia ubytku masy. Równocześnie przeprowadzono doświadczenie w roztworze niezawierającym lizozymu, by wyeliminować wpływ rozpuszczalności struktur w buforze fosforanowym. Stopień degradacji enzymatycznej matrycy wyznaczano odejmując ubytek masy gąbki inkubowanej w medium niezawierającym lizozymu od ubytku masy dla gąbki inkubowanej w medium z enzymem, według **Wzoru nr 5**. Do medium dodawano chloramfenikolu (34  $\mu\text{g/ml}$ ), aby uniknąć zakażenia bakteryjnego. Każdy eksperyment powtarzano trzy razy.

$$\text{Wzór (5): } \textit{Degradacja enzymatyczna} = \left[ \left( \frac{W_0 - W_t}{W_0} \right)_{\textit{lizozym}} - \left( \frac{W_0 - W_t}{W_0} \right)_{\textit{kontrola}} \right] \times 100\%,$$

#### 4.2.4.7. Oznaczanie zdolności do neutralizacji rodników – test DPPH.

Zdolność otrzymanych materiałów do neutralizacji wolnych rodników tlenowych została scharakteryzowana w oparciu o standardowy test DPPH [Cullen i in. 2002]. W tym celu próbki o różnej masie materiałów testowych zawieszano w 5 ml metanolowego roztworu DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) o stężeniu odpowiadającym wartości absorpcji (540 nm) równej  $1,00 \pm 0,01$ , a następnie inkubowano w ciemności w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przy ciągłym delikatnym wytrząsaniu. Mierzono wartość absorpcji przy 540 nm co godzinę, w ciągu sześciu godzin. Stopień neutralizacji (SN) rodników DPPH wyznaczano korzystając ze wzoru:

$$\text{Wzór (6): } SN_{DPPH} = \left[ 1 - \frac{A_{\textit{próba badana}}}{A_{\textit{kontrola}}} \right] \times 100\%.$$

W oparciu o równanie regresji liniowej wyznaczano wartość  $EC_{50}$ , jako masę próby materiału potrzebną do neutralizacji 50% rodnika zawartego w 1 ml roztworu DPPH po 2 godzinach inkubacji. Kontrolę stanowił roztwór rodnika DPPH. Każdy eksperyment powtarzano trzy razy.

#### 4.2.4.8. Oznaczanie zdolności do neutralizacji kationo-rodników ABTS.

Zdolność otrzymanych materiałów do neutralizacji kationo-rodników ABTS badano według zmodyfikowanej metodologii zaproponowanej przez Re [Re i in. 1999]. W tym celu próbki o różnej masie materiałów testowych zawieszano w 5 ml przygotowanego uprzednio roztworu ABTS, rozcieńczonego metanolem do wartości absorpcji (734 nm) równej  $1,00 \pm 0,01$ , a następnie inkubowano w ciemności w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , przy ciągłym delikatnym wytrząsaniu. Roztwór ABTS przygotowywano poprzez rozpuszczenie 3,48 g soli ABTS i 0,66 g nadsiarczanu potasu w buforze fosforanowym (0,01 M, pH 7,4), a następnie inkubowano w ciemności, przez 15h w temperaturze pokojowej. Mierzono wartość absorpcji

przy 734 nm co godzinę, w ciągu sześciu godzin. Stopień neutralizacji (SN) kationo-rodnika ABTS wyznaczano korzystając ze wzoru:

$$\text{Wzór (7): } SN_{ABTS} = \left[ 1 - \frac{A_{\text{próba badana}}}{A_{\text{kontrola}}} \right] \times 100\%.$$

W oparciu o równanie regresji liniowej wyznaczano wartość  $EC_{50}$  jako masę próby materiału potrzebną do neutralizacji 50% kationo-rodnika zawartego w 1 ml roztworu ABTS po 2 godzinach inkubacji. Kontrolę stanowił roztwór kationo-rodnika ABTS. Każdy eksperyment powtarzano trzy razy.

#### 4.2.4.9. Oznaczanie zdolności do chelatowania jonów $Fe^{2+}$ .

Zdolność do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$  przez materiały chitozanowo-białkowe została wyznaczona w oparciu o metodę opisaną przez Yen'a i współpr. [Yen i in. 2008]. W tym celu próbki o różnej masie materiałów testowych zawieszano w 4 ml roztworu stanowiącego kompleks ferrozyny z jonami żelaza (II), a następnie inkubowano w ciemności przez 60 minut, w temperaturze  $37^{\circ}C$ , przy ciągłym delikatnym wytrząsaniu. Roztwór ferrozyny z jonami żelaza (II) otrzymywano poprzez zmieszanie 3,7 ml metanolu, 0,1 ml 2 mM metanolewego roztworu  $FeCl_2$  i 0,2 ml 5 mM wodnego roztworu ferrozyny, po czym rozcieńczano go metanolem do wartości absorpcji (540 nm) równej  $1,00 \pm 0,01$ . Stopień chelatowania (SC) jonów  $Fe^{2+}$  wyznaczano korzystając ze wzoru:

$$\text{Wzór (8): } SC_{Fe^{2+}} = \left[ 1 - \frac{A_{\text{próba badana}}}{A_{\text{kontrola}}} \right] \times 100\%.$$

W oparciu o równanie regresji liniowej wyznaczano wartość  $EC_{50}$  jako masę próby materiału potrzebną do chelatowania 50% kationów  $Fe^{2+}$  zawartych w 1 ml ich roztworu po 60 minutach inkubacji. Kontrolę stanowił roztwór kompleksu jonów  $Fe^{2+}$  z ferrozyną. Każdy eksperyment powtarzano trzy razy.

#### 4.2.4.10. Określanie cytotoksyczności względem komórek NIH-3T3.

Cytotoksyczność otrzymanych materiałów chitozanowo-białkowych oceniano z wykorzystaniem testu MTT. Wszystkie badane materiały przed rozpoczęciem testu były poddawane sterylizacji poprzez 30 minutową inkubację w 75% etanolu, a następnie pięciokrotnemu płukaniu jałową wodą destylowaną, w celu usunięcia etanolu (czas trwania jednego cyklu płukania - 5 min). Próby badanych materiałów o średnicy i grubości odpowiednio 0,5 i 0,2 cm, umieszczano w 12-studzienkowej płytce, po czym dodawano pożywkę hodowlaną (2 ml) i komórki NIH-3T3 w gęstości  $2 \times 10^4$  komórek na studzienkę. Po 72h inkubacji ( $37^{\circ}C$ , atmosfera 5%  $CO_2$ ) określano żywotność komórek oraz dokonywano oceny ich morfologii. Zdjęcia komórek kontrolnych, materiału badanego i komórek w obecności materiału były wykonywane z wykorzystaniem mikroskopu optycznego



TELAVAL 3 Carl Zeiss, Jena, Germany (powiększenie x125). Żywotność komórek była wyznaczana z wykorzystaniem testu MTT. W tym celu do każdego układu dodawano 200  $\mu$ l roztworu MTT (4 mg/ml) i inkubowano przez 4 godziny (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Następnie usuwano medium hodowlane z roztworem MTT, a kryształy formazanu zawieszano w 2 ml dimetylosulfotlenku (DMSO), po czym płytkę wytrząsano przez 30 min. W dalszej kolejności 200  $\mu$ l roztworu z każdej studzienki przenoszono do 96-studzienkowej płytki w celu dokonania pomiaru wartości absorpcji przy długości fali 540 nm (czytnik mikropłytek Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Wynik przedstawiano w postaci wartości średniej z trzech oddzielnych doświadczeń. Doświadczenie wykonywano wykorzystując jedną kontrolę pozytywną, jaką stanowiła hodowla komórkowa bez obecności badanego materiału oraz dwie kontrole negatywne: 1) pożywka hodowlana bez obecności materiału i komórek, 2) pożywka hodowlana z badanym materiałem.

Komórki NIH-3T3 (linia komórkowa mysich embrionalnych fibroblastów) zostały zakupione z kolekcji ATCC (American Type Culture Collection). Komórki (wolne od zakażenia mykoplazmą) utrzymywano w hodowli jednowarstwowej w 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> z wykorzystaniem podłoża High Glucose Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) wzbogaconego 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS), zawierającego 100 U/ml penicyliny i 100  $\mu$ g/ml streptomycyny (Sigma-Aldrich, St. Louise, CA, USA). W tych warunkach czas podwojenia komórek wynosił 24 h.

#### **4.2.4.11. Ocena uwalniania lizostafiny z materiałów chitozanowo-białkowych.**

Ocenę uwalniania lizostafiny z materiałów chitozanowo-białkowych przeprowadzono z wykorzystaniem metody dyfuzyjnej, w celu identyfikacji jej uwalniania w sposób jakościowy oraz z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej do wyznaczenia ilościowego profilu jej uwalniania. Metoda dyfuzyjna polegała na umieszczeniu krążków badanych materiałów o średnicy i wysokości odpowiednio 1,0 i 0,3 cm, w centrum szalki Petriego ( $\varnothing$  12 cm), na której uprzednio wylano 2,0% podłoża agarozowe, a następnie zwilżaniu ich buforem fosforanowym (0,01M, pH 7,4) i inkubacji w temperaturze 37°C w czasie 18 h. Następnie na płytce nanoszono 10 ml roztworu Bradford i inkubowano przez 30 min. Niebieska strefa wokół badanej próby, widoczna po usunięciu odczynnika, wskazywała na dyfuzję białka z badanego materiału. Kontrolę stanowiła próba materiału niezawierającego lizostafiny (**Tabela 8, próba nr 1**).

Oznaczenie profilu uwalniania lizostafiny zawartej w materiałach chitozanowo-białkowych, prowadzono z wykorzystaniem metody pośredniej, poprzez pomiar aktywności roztworu do którego następowało jej uwalnianie. W tym celu próby materiałów o średnicy i wysokości odpowiednio 1,0 i 0,3 cm zanurzano w 1,5 ml buforu fosforanowego (0,01 M, pH 7,4) i inkubowano w temperaturze 37°C przy ciągłym wytrząsaniu (spektrofotometr Victor z komorą inkubacyjną, Perkin Elmer Instruments, USA). Następnie, w dziesięciominutowych

odstępach, pobierano po 150,0  $\mu$ l roztworu, uzupełniając układ tą samą objętością buforu fosforanowego. Doświadczenie prowadzono z wykorzystaniem polistyrenowych, dwunastostudzienkowych płytek titracyjnych (BD Falcon). Ilość uwolnionej lizostafiny w jednostkach jej aktywności wyznaczano za pomocą metody spektrofotometrycznej (**Materiały i Metody 4.2.4.14**). Oznaczenia dla każdego z badanych układów wykonywano w trzech powtórzeniach.

#### **4.2.4.12. Oznaczanie aktywności materiałów chitozanowo-białkowych względem komórek szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).**

Bakteriolityczną aktywność materiałów chitozanowo-białkowych aktywowanych lizostafyną badano z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krażkowej (metoda Kirba-Bauera) oraz z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej, względem komórek szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Metoda dyfuzyjna polegała na umieszczeniu krążków badanych materiałów o średnicy i wysokości odpowiednio 1,0 i 0,3 cm, w centrum szalki Petriego ( $\varnothing$  12 cm), na której uprzednio wylano selektywne podłoże hodowlane Baid-Parker i dokonano posiewu powierzchniowego komórek *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), a następnie zwilżaniu ich buforem fosforanowym (0,01 M, pH 7,4) i inkubacji w temperaturze 37°C w czasie 24 h. Następnie płytki hodowlane fotografowano i mierzono rozmiary stref zahamowania wzrostu z wykorzystaniem narzędzi do analizy obrazu programu Adobe Photoshop CS5. Oznaczenia dla każdego z badanych materiałów wykonano w trzech powtórzeniach. Kontrolę stanowiła próba materiału niezawierająca lizostafiny.

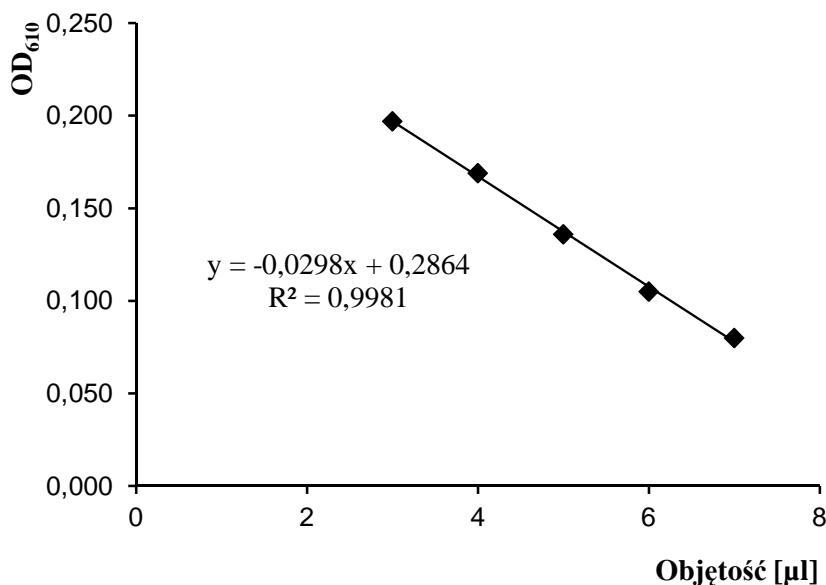
Ocenę aktywności materiałów chitozanowo-białkowych z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej prowadzono według zmodyfikowanej procedury pomiaru aktywności lizostafiny (**Materiały i Metody 4.2.4.14**). W tym celu do 3 ml preinkubowanej w temperaturze 37°C (10 min) zawiesiny bakteryjnej komórek *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, uzyskanych z hodowli nocnej, podłoże LB, 37°C) rozcieńczonej za pomocą 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,4) do gęstości optycznej  $OD_{595}=0,50 \pm 0,01$ , wprowadzano próbę materiału stanowiącą połowę krążka o średnicy i wysokości odpowiednio 0,4 i 0,3 cm i mierzono wartość  $OD_{595}$  w 5-cio minutowych odstępach czasu. Pomiar prowadzono w polistyrenowych, dwunastostudzienkowych płytkach titracyjnych, w temperaturze 37°C i ciągłym wytrząsaniu (spektrofotometr Victor z komorą inkubacyjną, Perkin Elmer Instruments, USA) do momentu, gdy wartość  $OD_{595}$  spadała do zera. Na czas oznaczania gęstości optycznej, badane próby wyjmowano ze studzienek płytki titracyjnej. Oznaczenia dla każdego z badanych materiałów wykonywano w trzech powtórzeniach.

#### **4.2.4.13. Oznaczenie aktywności materiałów chitozanowo-białkowych względem komórek szczepów *Staphylococcus aureus* pochodzących z różnych populacji.**

Aktywność materiałów chitozanowo-białkowych względem szczepów gronkowca złocistego pochodzących z różnych populacji mierzono z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej (**Materiały i Metody 4.2.4.12**). Do badania wykorzystano materiał sieciowany 0,5% genipiną, zawierający 10 U/ml lizostafiny (**Tabela 8, Próba nr 2**). Mierzono czas po jakim gęstość optyczna  $OD_{595}$  spadała do zera. W badaniu wykorzystano 143 szczepy (**Tabela 7**): 84 pochodzenia bydłęcego, wyizolowane z gruczołu mlekowego zwierząt chorych na *mastitis* (kolekcja Katedry Technologii Leków i Biochemii, Wydziału Chemicznego, Politechniki Gdańskiej); 32 wyizolowane z zakażonych ran ludzkich (kolekcja Department of Clinical Microbiology, Central Hospital, Vaxjo, Szwecja [Sjolund i in. 2008]), otrzymane od doktora Jakuba Kwiecińskiego; 27 wyizolowanych także z zakażonych ran ludzkich (kolekcja Zakładu Bakteriologii Szpitala Wojewódzkiego w Koszalinie), uzyskane dzięki uprzejmości prof. Julianny Kurlenda. Sześć badanych szczepów należało do grupy MRSA. Oznaczenia względem każdego badanego szczepu wykonywano w trzech powtórzeniach.

#### **4.2.4.14. Oznaczenie aktywności specyficznej lizostafiny.**

Aktywność specyficzną lizostafiny oznaczano z wykorzystaniem metodologii zaproponowanej przez Marova i Kovara [Marova i in. 1993]. W tym celu do 6 ml preinkubowanej w temperaturze 37°C (10 min) zawiesiny komórek *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (uzyskanych z hodowli nocnej), rozcieńczonej za pomocą 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,4) do gęstości optycznej  $OD_{610} = 0,25$ , dodawano roztwory lizostafiny w różnych objętościach, po czym ponownie inkubowano w 37°C przez 10 minut. Po inkubacji próbki przenoszono do lodu w celu zahamowania reakcji enzymatycznej i niezwłocznie dokonywano pomiaru absorpcji przy długości fali 610 nm. Próbę odniesienia stanowił bufor PBS. Jednostka aktywności litycznej [U] lizostafiny definiowana jest jako ilość enzymu powodująca spadek absorpcji od  $OD_{610}=0,25$  do  $OD_{610}=0,125$  w 6 ml zawiesiny gronkowca, w czasie 10 minut w temperaturze 37°C. Dla każdego z otrzymanych preparatów aktywność wyznaczana była w trzech powtórzeniach, w oparciu o równanie regresji liniowej dla funkcji wartości OD względem objętości badanej próby. Przykładowa zależność została przedstawiona na rysunku poniżej (**Rysunek 7**).



**Rysunek 7.** Przykładowa zależność  $[OD_{610}] = f(V)$  wykorzystywana do wyznaczania aktywności specyficznej lizostafiny.

#### 4.2.4.15. Porównanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie z wybranymi dostępnymi na rynku materiałami opatrunkowymi.

Aktywność przeciwdrobnoustrojową porównywanych materiałów oznaczano względem czterech mikroorganizmów (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*), z wykorzystaniem metody dyfuzyjnej na podłożu stałym, poprzez pomiar wielkości stref zahamowania wzrostu oraz metody ilościowej, określając spadek ilości komórek mikroorganizmów w czasie, w trakcie dynamicznego kontaktu zawiesiny drobnoustrojów z materiałem opatrunkowym metodą seryjnych rozcieńczeń. Metodę dyfuzyjną na podłożu stałym przeprowadzano zgodnie z metodologią opisaną w punkcie **Materiały i Metody 4.2.4.12**, przy czym wykorzystywano następujące podłoża hodowlane: 1) *Pseudomonas* Agar Certimide (*P. aeruginosa*); 2) podłoże LA (*E. coli*); 3) Baird Parker (*S. aureus*, *S. epidermidis*).

Spadek liczby komórek bakteryjnych w czasie badano w trakcie dynamicznego kontaktu zawiesiny drobnoustrojów z próbą materiału w wybranych odstępach czasu. W tym celu każdorazowo przygotowywano zawiesiny bakteryjne o gęstości optycznej  $OD_{595} = 0,132$  (0,5 w skali McFarlanda). Następnie 10 ml tak przygotowanych zawiesin bakteryjnych umieszczano w probówkach polipropylenowych o objętości 50 ml, po czym zawieszano w nich próby materiałów o wymiarach 10 x 10 mm, a następnie całość umieszczano w inkubatorze powietrznym ze wstrząsaniem, w temperaturze 37 °C. Po upływie 4 i 24 h

pobierano próby, w których określano liczbę drobnoustrojów metodą seryjnych rozcieńczeń. Rozcieńczenia wykonywano w roztworze soli fizjologicznej (0.9% roztwór NaCl). Na selektywne podłoża przenoszono po 0,1 ml odpowiednich rozcieńczeń (od 0 do  $10^{-7}$ ) i dokładnie rozprowadzano głaszczką. Wykonywano po trzy oznaczenia z każdego rozcieńczenia. Następnie płytki inkubowano przez okres 24 h, w temp. 37 °C. Dla każdego materiału wykonywano trzy powtórzenia. Kontrolę stanowiła zawiesina bez dodatku materiału. Liczbę bakterii wyznaczano na podstawie wzoru:

$$\text{Wzór (9): } \log(CFU/ml) = \log(N \times R \times V),$$

gdzie: N- liczba kolonii na płytce, R- rozcieńczenie, z którego wykonano posiew, V- objętość posiewu (ml). Liczbę komórek oznaczano za pomocą narzędzi przetwarzania obrazu pakietu graficznego Photoshop CS5.

#### **4.2.4.16. Analiza podobieństwa biopolimerowych materiałów gąbczastych.**

Analizę podobieństwa wykonano w oparciu o metodę głównych składowych (PCA) z wykorzystaniem oprogramowania dostępnego w pakiecie Statistica 7.0.

## 5. WYNIKI I DYSKUSJA

### 5.1. Założenia projektu badawczego

W uprzemysłowionych społeczeństwach problem zdrowotny związany z występowaniem i leczeniem ran występuje u około 1-2% populacji przynajmniej jednokrotnie, a koszty związane z leczeniem ran pochłaniają 2-4% budżetu państw. Szacuje się, że problem ran przewlekłych dotyka w Polsce 500 tys. osób rocznie, z których większość nie wymaga hospitalizacji. To pół miliona osób, które miesiącami cierpią nie tylko z powodu bólu, ale także społecznej dysfunkcji. Niepokojącym jest jednak fakt, że spośród tej grupy, około 10 tys. umiera, najczęściej na skutek zakażeń wielolekoopornymi drobnoustrojami [Fiedotow i in. 2006]. W ostatnich dwóch dekadach obserwuje się bardzo niepokojące zjawisko szybkiego uodporniania się drobnoustrojów na powszechnie stosowane antybiotyki, m.in. pojawiły się wielolekooporne szczepy *Staphylococcus aureus*, wankomycynooporne szczepy *Enterococcus faecalis* i *Pseudomonas aeruginosa*, czy wielolekooporne szczepy *Candida albicans* [White i in. 2001]. Ze względu na szybkie uodpornianie się na leki, drobnoustroje te są także częstą przyczyną zakażeń szpitalnych. Jedną z grup mikroorganizmów, które najszybciej uodporniają się na stosowane związki terapeutyczne, są bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, czynnik etiologiczny wielu schorzeń człowieka i zwierząt, w tym przede wszystkim patogeny wywołujące infekcje skórne, a przy tym odpowiadające za większość zgonów pacjentów borykających się z zakażonymi ranami. Zdaniem wielu specjalistów sytuacja jest na tyle poważna, że w niezbyt odległej przyszłości stosowane obecnie leki mogą okazać się zupełnie nieprzydatne w terapiach chorób infekcyjnych. Pojawienie się szczepów opornych na wankomycynę, antybiotyk glikopeptydowy stanowiący do tej pory jedyny lek zawsze skuteczny, a także pierwsze doniesienia oporności na terapie wykorzystujące różne formy srebra [Percivala i in. 2005] oraz wysoki koszt stosowanych terapii fagowych, wymusza poszukiwania metod alternatywnych. Istnieje, więc pilna potrzeba poszukiwania nowych substancji, które mogłyby być stosowane jako leki przeciwdrobnoustrojowe. Obiecującą alternatywą do walki z patogennymi mikroorganizmami jest wykorzystanie rybosomalnie syntetyzowanych peptydów i białek o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Występują one u wszystkich żyjących gatunków jako ważny składnik odporności wrodzonej gospodarza [Yeaman i in. 2003] bądź leżą u podstaw antagonistycznego oddziaływania mikroorganizmów (bakteriocyny) [Gwiazdowska i in. 2005, Schroder i in. 2006]. Jedną z najbardziej obiecujących bakteriocyn jest lizostafyna - zewnątrzkomórkowa, cynkowa metaloproteinaza wytwarzana przez bakterie *Staphylococcus simulans biovar staphylolyticus*. Należy ona do białek o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, przy czym główne jej działanie polega na specyficznym niszczeniu peptydoglikanu ściany komórkowej u niemal wszystkich znanych mikroorganizmów z rodzaju *Staphylococcus*. Obecnie trwają badania kliniczne mające na celu dopuszczenie jej stosowania w terapiach skierowanych przeciwko zakażeniom gronkowcowym. Pomimo wielu korzyści i obiecujących

wyników, lizostafyna, a także inne peptydy/białka o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, nadal nie są powszechnie wykorzystywane w zastosowaniach typowo komercyjnych np. materiałach opatrunkowych. Wśród czynników odpowiadających za to ograniczenie znajdują się m.in. niewielka dostępność systemów przydatnych do ich inkorporacji, a także wysokie koszty produkcji. Systemy, o jakich mowa powyżej, nie tylko powinny zapewniać długotrwałe uwalnianie i utrzymanie stałego stężenia uwalnianej substancji w środowisku gojącej się rany, lecz także powinny chronić peptyd/białko przed przedwczesną utratą aktywności, a ponadto powinny zapewniać optymalne warunki dla procesu gojenia się rany. W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono projektowaniu i konstrukcji systemów o tych właściwościach, wykorzystując przy tym polimery naturalne. Ich wykorzystanie w konstrukcji nowoczesnych materiałów opatrunkowych stało się możliwe dzięki intensywnym badaniom, które potwierdziły ich biokompatybilność oraz umożliwiły opanowanie technologii ich masowego wytwarzania. Atrakcyjność polimerów naturalnych uwarunkowana jest przede wszystkim ich biokompatybilnością (dotyczy to także produktów ich degradacji), możliwością wielu modyfikacji, co umożliwia tworzenie kompozytów, czy też systemów do kontrolowanego dostarczania czynników aktywnych (dzięki obecności co najmniej jednej grupy funkcyjnej), dodatkową rolą w procesie odbudowy tkanek skóry m.in. stanowiąc dogodne miejsce do adhezji komórek, stosunkowo niską ceną, umożliwiającą ich wykorzystanie do produkcji wyrobów na masową skalę. Wśród wielu wykorzystywanych w konstrukcji materiałów opatrunkowych polimerów naturalnych, chitozan, kolagen i żelatyna są polimerami wykorzystywanymi najczęściej, a uzyskiwane na ich bazie biomateriały spełniają najważniejsze kryteria stawiane nowoczesnym zaawansowanym materiałom opatrunkowym [Jayakumar i in. 2011, Hoyer i in. 2012, Tucci i in. 2001, Sai i in. 2000, Muzzarelli 2009]. Wielokrotnie wykazywano, że biomateriały uzyskiwane na bazie tych polimerów posiadają właściwości zbliżone do matrycy pozakomórkowej – miękkiej, mocnej i elastycznej sieci zbudowanej z białek, zapewniającej stabilność mechaniczną i integralność strukturalną tkanek i narządów ciała, a także posiadają szereg dodatkowych właściwości funkcyjnych wpływających pozytywnie na proces regeneracji rany, co zostało szczegółowo opisane wyżej w części teoretycznej.

Chitozan jest polimerem nierozpuszczalnym w wodzie - rozpuszcza się w wodnych roztworach kwasów organicznych lub nieorganicznych, z których roztwory kwasu octowego są najczęściej wykorzystywane. Przy zastosowaniu takich roztworów otrzymywane są różnego typu biomateriały, w tym: membrany, gąbki, włókna, mikrosfery oraz hydrożele. Zawartość kwasu w tak przygotowanym materiale uniemożliwia jego bezpośrednie wykorzystanie w zastosowaniach medycznych (ze względu na drażniące działanie kwasów - spadek biokompatybilności) i zmusza wytwórcę do prowadzenia dodatkowych procesów mających na celu jego usunięcie. Zwykle dzieje się to poprzez wypłukiwanie za pomocą wodnych bądź etanolowych roztworów, a następnie powtórne suszenie. Takie postępowanie

jest procesem czaso- i kosztochłonnym, a ponadto uniemożliwia inkorporację związków aktywnych na etapie wytwarzania takich materiałów, bowiem wyflukiwanie powoduje pełne bądź częściowe usunięcie inkorporowanego związku aktywnego, a obecność kwasów może spowodować utratę aktywności takiego czynnika zwłaszcza, jeśli jest nim preparat białkowy. Aby pominąć ten etap, prowadzonych jest wiele badań mających na celu wytworzenie rozpuszczalnych w wodzie cząsteczek chitozanu, a wśród nich różnego typu chemiczne bądź enzymatyczne modyfikacje oraz fragmentowanie łańcucha. Oba podejścia prowadzą do otrzymania rozpuszczalnych cząsteczek chitozanu, niemniej jednak sposoby te również posiadają szereg ograniczeń i wad. Otrzymywanie rozpuszczalnych w wodzie pochodnych chitozanu związane jest z koniecznością wprowadzania dodatkowych, często wieloetapowych procesów, które niejednokrotnie wykorzystują szkodliwe dla zdrowia i środowiska rozpuszczalniki, co także zmusza wytwórcę do prowadzenia procesów związanych z usuwaniem ich pozostałości, a w konsekwencji otrzymywane są rozpuszczalne w wodzie pochodne chitozanu o zmniejszonej biokompatybilności, względem wyjściowego polimeru. Z kolei fragmentacja łańcuchów chitozanu prowadzi do otrzymania chitozanu o najmniejszych masach cząsteczkowych, a często wręcz do jego oligomerów, co znacznie ogranicza możliwe zastosowania takiego preparatu (**Wprowadzenie 2.2.1**). Rozwiązaniem tego problemu mogłoby być zatem zaproponowanie procesu pozwalającego na rozpuszczenie w wodzie, co nie tylko wyeliminowałoby proces usuwania resztowych kwasów organicznych, lecz także umożliwiłoby dodawanie peptydów/białek już na etapie formułowania materiałów z niego wytworzonych.

Mając na uwadze wszystkie wskazane powyżej potrzeby, a zwłaszcza potrzebę konstrukcji skutecznego materiału mogącego znaleźć zastosowanie w terapiach leczenia ran zakażonych szczepami gronkowca złocistego, postanowiłem, że swoją pracę poświęcę próbie opracowania materiału zbudowanego z chitozanu, kolagenu i żelatyny, który poza właściwościami wymaganymi od nowoczesnego materiału opatrunkowego byłby dogodną matrycą do inkorporacji lizostafyny. Wstępne założenia projektowe skupiłem wokół obserwacji powszechnie znanego procesu produkcyjnego, jakim jest przygotowywanie napojów gazowanych, co pozwoliło mi na sformułowanie hipotezy, która stwierdza, że możliwe jest rozpuszczenie chitozanu w wodzie uprzednio nasyconej gazowym ditlenkiem węgla i wykorzystanie tak przygotowanego roztworu do konstrukcji chitozanowo-białkowego materiału o strukturze gąbki. Zanim jednak doszło do sformułowania powyższej hipotezy swoje prace poświęciłem analizie wpływu rodzaju preparatu biopolimerowego (chitozanu, żelatyny i kolagenu) na wybrane właściwości wytworzonych z nich materiałów przy wykorzystaniu standardowych procedur przetwarzania chitozanu, mając na celu obiektywne wykazanie relacji pomiędzy tymi czynnikami. Podczas swojej pracy podjąłem także próbę zwiększenia skali wytwarzania lizostafyny, poprzez optymalizację jej ekspresji w bioreaktorze o objętości roboczej 5 l, w układzie ekspresyjnym przygotowanym



i wcześniej opisanym przez pracowników Katedry Technologii Leków i Biochemii, Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej, w celu pozyskania wydajnego, szybkiego i taniego źródła jej pozyskiwania (prace związane z tym wątkiem badań o charakterze optymalizacyjnym przedstawiłem w załączonym do rozprawy suplemencie).

## **5.2. Analiza wpływu rodzaju preparatu biopolimerowego (chitozanu, żelatyny i kolagenu) na wybrane właściwości wytworzonych z nich materiałów gąbczastych.**

Gąbczaste materiały chitozanowe, kolagenowe, żelatynowe, a także te zbudowane z mieszanin owych biopolimerów zostały wielokrotnie szczegółowo scharakteryzowane w dostępnej literaturze naukowej. Otrzymywane są one na ogół na drodze procesu suszenia sublimacyjnego wcześniej zamrożonych roztworów biopolimerów bądź z wykorzystaniem technik elektroprzędzenia, przy czym do przygotowywania roztworów kolagenu i chitozanu wykorzystywane są rozpuszczalniki o charakterze kwasowym (najczęściej roztwory kwasu octowego bądź mlekowego), natomiast biomateriały żelatynowe otrzymywane są wprost z roztworów wodnych (**Wprowadzenie 2.2.5**). Otrzymane struktury poddawane są wielu testom, których dobór uwarunkowany jest ich deklarowanym przeznaczeniem. Bez względu na wybrane zastosowanie są one w większości przypadków charakteryzowane pod kątem kilku podstawowych parametrów: morfologii, zdolności do wiązania cieczy, rozpuszczalności, parametrów profilu tekstury, czy podatności na biodegradację. Są to parametry istotne w konstrukcji biomateriałów wykorzystywanych jako materiały opatrunkowe. Ze względu na różnice we właściwościach użytych biopolimerów, wyniki oznaczeń dla materiałów otrzymywanych według tej samej metodologii, nie są jednak oczywiste. W przypadku omawianych biopolimerów wpływ mają takie ich parametry jak masa cząsteczkowa, stopień deacetylacji (chitozan), czy różnice w składzie aminokwasowym (kolagen i żelatyna), często uwarunkowane źródłem ich izolacji. Z tego powodu wykazanie wpływu rodzaju preparatu biopolimerowego (chitozanu, żelatyny i kolagenu) na wybrane właściwości biopolimerowych materiałów gąbczastych, otrzymanych i opisanych w różnych grupach badawczych jest bardzo trudne. Przewodni cel badań, których wyniki opisano w niniejszej rozprawie doktorskiej, czyli otrzymanie nowoczesnego biomateriału na bazie chitozanu, kolagenu i żelatyny, przeznaczonego do leczenia trudno gojących się ran skóry, zapewniającego jednocześnie dogodne środowisko do immobilizacji/inkorporacji peptydowych związków aktywnych, wymagał zapoznania się ze standardowymi technikami otrzymywania takich materiałów, dlatego też przy tej sposobności otrzymałem, scharakteryzowałem i następnie porównałem biomateriały na bazie chitozanu, kolagenu i żelatyny w jednorodnych warunkach i z wykorzystaniem tych samych surowców. Takie podejście dostarczyło jednoznacznych danych, na podstawie których możliwe stało się wykazanie wpływu rodzaju preparatu biopolimerowego na wybrane właściwości gąbczastych biomateriałów, otrzymanych przy ich wykorzystaniu. Przedstawione poniżej wyniki obejmują opis 9 układów biopolimerowych (**Tabela 9**) pod względem przywołanych wyżej

parametrów, a także zawierają charakterystykę ich właściwości przeciwutleniających jako, że zapewnienie odpowiedniego środowiska oksydo-redukcyjnego jest także jednym z istotnych wymagań stawianym nowoczesnym materiałom opatrunkowym.

**Tabela 9.** Skład oraz warunki otrzymywania biopolimerowych materiałów gąbczastych.

Nr próby	Oznaczenie	Biopolimer	Stężenie biopolimerów w dyspersji [%, w/w]	Rozpuszczalnik	Temperatura rozpuszczania [°C]
1	100% KOL ŁOSOŚ	kolagen (łosoś atlantycki)	2,0 %	0,5M CH <sub>3</sub> COOH	5°C
2	100% KOL SUM	kolagen (sum afrykański)	2,0 %	0,5M CH <sub>3</sub> COOH	10°C
3	100% ŻEL ŁOSOŚ	żelatyna (łosoś atlantycki)	2,0 %	H <sub>2</sub> O	60°C *
4	100% ŻEL SUM	żelatyna (sum afrykański)	2,0 %	H <sub>2</sub> O	60°C *
5	50% KOL ŁOSOŚ 50% CHITOZAN	chitozan; kolagen (łosoś atlantycki)	1,0 %; 1,0 %	0,5M CH <sub>3</sub> COOH	5°C
6	50% KOL SUM 50% CHITOZAN	chitozan; kolagen (sum afrykański)	1,0 %; 1,0 %	0,5M CH <sub>3</sub> COOH	10°C
7	50% ŻEL SUM 50% CHITOZAN	chitozan; żelatyna (sum afrykański)	1,0 %; 1,0 %	0,5M CH <sub>3</sub> COOH; H <sub>2</sub> O	Temperatura pokojowa
8	50% ŻEL ŁOSOŚ 50% CHITOZAN	chitozan; żelatyna (łosoś atlantycki)	1,0 %; 1,0 %	0,5M CH <sub>3</sub> COOH; H <sub>2</sub> O	Temperatura pokojowa
9	100% CHITOZAN	chitozan	2,0 %	0,5M CH <sub>3</sub> COOH	Temperatura pokojowa

\*żelatynę poddano wstępnemu spęcznieniu w temperaturze pokojowej (20min), a następnie ogrzewano w 60°C przez 1 minutę.

Wyniki przedstawione dla materiałów otrzymanych w 100% z żelatyn bądź w 100% z kolagenów dla zmiennych (morfologia, chłonność, rozpuszczalność, twardość oraz elastyczność) uzyskane zostały w ramach prac magisterskich przez Klaudię Kwiatkowską i Magdalenę Flisikowską [Kwiatkowska 2011, Flisikowska 2011] i stanowią integralną część zaplanowanego przeze mnie cyklu badawczego. Różnice we właściwościach biomateriałów otrzymanych na bazie preparatów białkowych (kolagenu i żelatyny wyizolowanych z różnych źródeł), często mogą wynikać z różnic w ich składzie aminokwasowym, dlatego też podczas interpretacji uzyskanych wyników odnoszę się do tych danych. W **Tabeli nr 10** przedstawiłem składy aminokwasowe dla preparatów wyizolowanych ze skór łososia atlantyckiego i suma afrykańskiego, uzyskane przez dr Tylingo.

**Tabela 10.** Skład aminokwasowy żelatyn wyizolowanych ze skór łososia atlantyckiego i suma afrykańskiego\*.

Reszta aminokwasowa	Liczba reszt aminokwasowych/ 1000 reszt aminokwasowych	
	Sum afrykański	Łosoś atlantycki
Hydroksyprolina	70	65
Kwas asparaginowy	47	56
Treonina	29	20
Seryna	33	51
Kwas glutaminowy	78	72
Glicyna	322	371
Alanina	110	102
Cysteina	0	0
Walina	22	14
Metionina	14	17
Izoleucyna	12	10
Leucyna	28	21
Tyrozyna	6	2
Fenylalanina	19	12
Lizyna	31	20
Histydyna	7	12
Arginina	49	56
Prolina	123	96
Hydroksylizyna	0	3
Tryptofan	0	0

\*wyniki uzyskane przez dr. inż. Roberta Tylingo

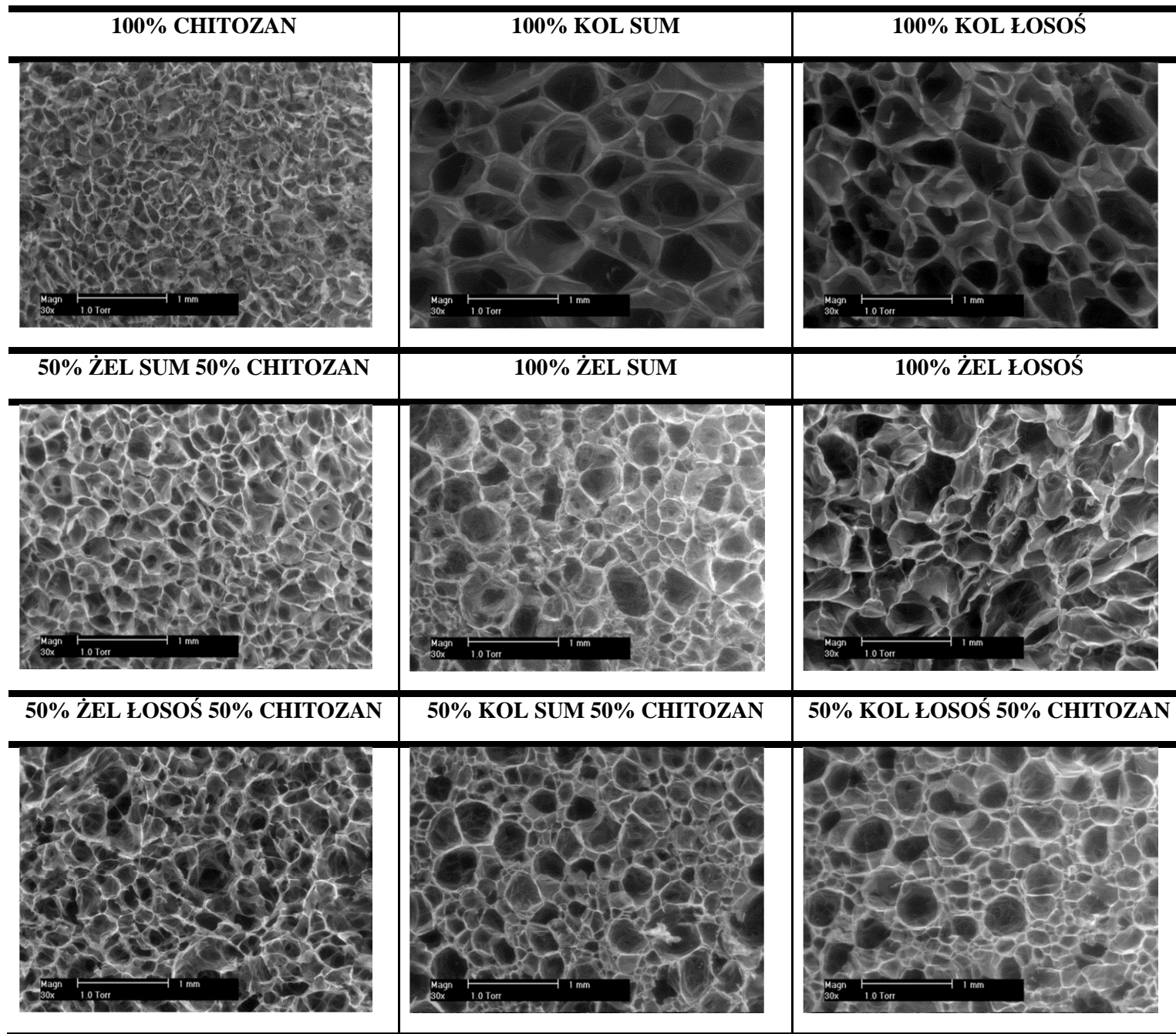
### 5.2.1. Analiza wybranych właściwości biopolimerowych materiałów gąbczastych otrzymanych z chitozanu, kolagenu i żelatyny.

Otrzymane przeze mnie materiały nie różniły się w sposób istotny wyglądem zewnętrznym. Wszystkie były białe i posiadały kształt cylindryczny, nadany przez użyte formy (**Rysunek 8**). Profil tekstury silnie zależał od rodzaju użytego biopolimeru. Wyraźnie twardsze materiały uzyskano dla gąbek zawierających w swoim składzie żelatynę. Wszystkie materiały były spójne i nie wykazywały tendencji do rozpadu podczas oceny wizualnej. Analiza mikrostruktury za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej wykazała, że wszystkie otrzymane przeze mnie materiały mają charakter wysokoporowaty (**Rysunek 9**). Materiały otrzymane w 100% z chitozanu cechowały się najmniejszymi porami, natomiast te zbudowane z kolagenów posiadały największe pory o w miarę regularnej strukturze.



**Rysunek 8.** Biopolimerowe materiały gąbczaste otrzymane z roztworów chitozanu, kolagenu z suma afrykańskiego, żelatyny z suma afrykańskiego, kolagenu z łososa atlantyckiego, żelatyny z łososa atlantyckiego, chitozanu i kolagenu z suma afrykańskiego, chitozanu i żelatyny z suma afrykańskiego, chitozanu i kolagenu z łososa atlantyckiego oraz chitozanu i żelatyny z łososa atlantyckiego.

Na morfologię materiałów otrzymywanych z wykorzystaniem suszenia sublimacyjnego ma wpływ wiele czynników. Poza wpływem związanym z budową chemiczną poszczególnych polimerów, wpływ mają m.in.: stężenie polimerów w dyspersji przed zamrożeniem, stopień usieciowania, rodzaj wykorzystanego czynnika sieciującego, a także warunki samego procesu otrzymywania, poczynając od profilu temperatury zamrażania, kończąc na parametrach procesu suszenia. W warunkach prowadzonego przeze mnie doświadczenia, zmienność wynikająca z tych czynników została zminimalizowana niemal do zera, ze względu na brak bądź niewielką zmienność w procesie otrzymywania wszystkich materiałów, a także jednakowe stężenie polimerów w dyspersji oraz jednakowe stężenie czynnika sieciującego. W związku z powyższym można założyć, że przedstawione różnice w morfologii związane są wyłącznie z budową chemiczną wykorzystanych biopolimerów.



**Rysunek 9.** Zdjęcia SEM wybranych biopolimerowych materiałów gąbczastych (oznaczenia materiałów zgodne z etykietami Tabela 8).

W celu porównania właściwości otrzymanych układów gąbczastych, wyznaczyłem i zestawilem ze sobą wartości dla dziewięciu parametrów: chłonność, rozpuszczalność, twardość, elastyczność, zdolność do wymiatania rodnika DPPH, zdolność do wymiatania kationo-rodnika ABTS, zdolność do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$  oraz wrażliwość na degradację enzymatyczną względem lizozymu po 1 oraz 5 dniach ekspozycji (**Materiały i Metody 4.2.4**). Analizę graficzną dla zmiennych cząstkowych przedstawiłem na wspólnym zestawieniu (**Rysunek 10**, str. 89, rysunek rozkładany). Dla zwiększenia czytelności wyników zmienne pogrupowano w cztery panele tematyczne.

W warunkach przeprowadzonego doświadczenia największą zdolnością do wiązania wody charakteryzowały się układy zawierające w swojej strukturze chitozan, najmniejszą zaś układy otrzymane wyłącznie z polimerów białkowych (**Rysunek 10, Panel A**), przy czym dodatek polimeru białkowego do dyspersji chitozanu spowodował spadek parametru chłonności w stosunku do materiałów otrzymanych jedynie z chitozanu średnio o 30%. W przypadku analizy rozpuszczalności otrzymanych biomateriałów te otrzymane w 100% z kolagenów, okazały się być najmniej rozpuszczalne, zaś te otrzymane z żelatyn najbardziej. Ubytek masy dla materiałów chitozanowych wynosił 11%, co stanowiło trzykrotnie mniejszą wartość w stosunku do obu materiałów żelatynowych, a dwukrotnie i ponad czterokrotnie wyższą wartość w stosunku do materiałów otrzymanych z kolagenu wyizolowanego odpowiednio z łososia atlantyckiego i suma afrykańskiego. Dla obu grup materiałów otrzymanych z żelatyn i kolagenów wyizolowanych z tych samych gatunków ryb różnica w rozpuszczalności wynosiła odpowiednio 28% dla preparatów wyizolowanych ze skór łososia atlantyckiego i 30% dla tych wyizolowanych z suma afrykańskiego. Jako, że oba białka nie różnią się pod względem składu aminokwasowego, wyraźne różnice w rozpuszczalności pomiędzy materiałami otrzymanymi z żelatyn i kolagenów wyizolowanych z tego samego źródła, leżą u podstaw ich przestrzennej budowy. Kolagen jest białkiem o charakterystycznej strukturze potrójnej helisy, stabilizowanej licznymi oddziaływaniami bliskiego zasięgu w tym także wiązaniami wodorowymi pomiędzy poszczególnymi grupami reszt aminokwasowych, dzięki czemu jest białkiem nierozpuszczalnym w wodzie w warunkach nienaruszających jego natywnej struktury (**Wprowadzenie 2.2.2**). Natomiast żelatyna jest produktem otrzymywanym w wyniku denaturacji kolagenu, czyli procesu, podczas którego następuje całkowite bądź częściowe zniszczenie oddziaływań stabilizujących strukturę białka. W trakcie denaturacji następuje także częściowa jego fragmentacja, w wyniku czego fragmenty zdenaturowanego białka występują w postaci kłęбка statystycznego, co powoduje, że jest ono rozpuszczalne w wodzie. Dodatek aldehydu glutarowego (czynnika sieciującego) do otrzymywanych przeze mnie biomateriałów ograniczył rozpuszczalność wszystkich struktur. Bez jego dodatku materiały żelatynowe uległyby całkowitemu rozpuszczeniu. Mając na uwadze rozpuszczanie maty, chłonność charakteryzowanych materiałów wyznaczyłem względem masy materiału skorygowanej o ubytek masy na skutek tego procesu (**Wzór 2**). Materiały chitozanowo-kolagenowe i chitozanowo-żelatynowe cechowały się pośrednimi wartościami obu mierzonych parametrów.

Dalsza analiza uzyskanych wyników wskazuje na wyraźne różnice zarówno pod względem chłonności, jak i rozpuszczalności materiałów otrzymanych z preparatów białkowych wyizolowanych z różnych ryb – dotyczy to także materiałów chitozanolobiałkowych. Materiały gąbczaste zawierające w sobie kolagen bądź żelatynę z łososia atlantyckiego cechowały się mniejszą chłonnością i wyższą rozpuszczalnością w stosunku do gąbek z kolagenu bądź żelatyny z sumy afrykańskiego. Widoczne różnice mogą wynikać m.in. z różnic w składzie aminokwasowym obu preparatów. Większa zawartość reszt lizyny w preparacie wyizolowanym z sumy afrykańskiego, 31/1000 reszt aminokwasowych w stosunku do 20/1000 reszt aminokwasowych dla preparatu z łososia atlantyckiego (**Tabela 10**), może być przyczyną tego, że materiały z niego otrzymane mogły ulec bardziej intensywnemu usieciowaniu aldehydem glutarowym. Wyższy poziom usieciowania może tłumaczyć mniejszą rozpuszczalność materiałów otrzymanych z preparatów z sumy afrykańskiego w stosunku do tych otrzymanych przy użyciu preparatów z łososia. W przypadku materiałów zawierających w swojej strukturze kolagen, dodatkowy wpływ na tempo procesu rozpuszczania mają procesy denaturacyjne, których intensywność zależy od warunków prowadzonego doświadczenia. Dynamika procesów denaturacji dla różnych preparatów kolagenu zależy od liczby oddziaływań stabilizujących jego helikalną strukturę, co jest uwarunkowane zawartością reszt hydroksyproliny. Wyższa jej zawartość w preparacie wyizolowanym z sumy afrykańskiego, 70/1000 reszt aminokwasowych w stosunku do 65/1000 reszt aminokwasowych dla preparatu z łososia atlantyckiego (**Tabela 10**), może być także powodem mniejszej rozpuszczalności materiałów otrzymanych z wykorzystaniem tego biopolimeru. Wyższa zawartość reszt o charakterze hydrofilowym (lizyna, hydroksylizyna, arginina, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, asparagina, seryna, treonina), 278/1000 reszt aminokwasowych w stosunku do 267/1000 reszt aminokwasowych dla preparatu z łososia atlantyckiego (**Tabela 10**), sprzyja wyższej chłonności dla materiałów zawierających polimery białkowe z tego źródła.

Właściwości mechaniczne materiałów gąbczastych zostały scharakteryzowane zgodnie z metodyką przedstawioną w punkcie **Materiały i Metody 4.2.4.4**. Na podstawie analizy parametrów profilu tekstury stwierdziłem, że materiały zawierające w swoim składzie żelatynę są twardsze od tych zawierających kolagen i jednocześnie wolniej odzyskują pierwotny kształt po ściśnięciu (są mniej elastyczne), bez względu na źródło izolacji polimeru białkowego. Obserwacja ta dotyczy zarówno materiałów zbudowanych wyłącznie z preparatów białkowych, jak i tych otrzymanych z ich połączenia z chitozaniem. Materiały otrzymane w 100% z chitozanu okazały się być twardsze od materiałów kolagenowych średnio o 30% i ponad dwukrotnie mniej elastyczne. Natomiast w stosunku do materiałów żelatynowych cechowały się mniejszymi wartościami obu mierzonych parametrów średnio o 40% i 30% (**Rysunek 10, Panel B**). Wyraźne różnice widoczne są także pomiędzy materiałami otrzymanymi z kolagenów wyizolowanych ze skór obu badanych gatunków ryb. Gąbki zbudowane z kolagenu wyizolowanego z sumy afrykańskiego cechowały się wyższą twardością i mniejszą elastycznością w porównaniu do gąbek zbudowanych z kolagenu

z łososia atlantyckiego (odpowiednio o 50% i 37%). Zależność tą zaobserwowałem także dla materiałów chitozanowo-kolagenowych. W tym przypadku różnice były jednak mniejsze (różnica w twardości 36%, różnica w elastyczności 25%). Wartość parametrów profilu tekstury jest wypadkową wielu czynników. Poza wpływem związanym z budową chemiczną poszczególnych polimerów, wpływ mają także stopień usieciowania oraz morfologia badanych preparatów (w szczególności struktura porów). Podczas ściskania materiałów porowatych znaczna część odkształcenia związana jest z odkształcaniem porów wypełnionych powietrzem, co decyduje o mniejszej wartości siły pierwszego pikę podczas testów mechanicznych, określającej twardość materiału. Widoczne na zdjęciach ze skaningowej mikroskopii elektronowej różnice w strukturze porów poszczególnych materiałów (**Rysunek 9**) mogą zatem tłumaczyć część uzyskanych przeze mnie wyników. Większa elastyczność i mniejsza twardość materiałów kolagenowych w stosunku do żelatynowych i chitozanowych może być tu najlepszym przykładem. Ponadto, podobnie jak w przypadku różnic w wartościach rozpuszczalności, różnice w parametrach profilu tekstury pomiędzy materiałami kolagenowymi i żelatynowymi mogą być tłumaczone różnicami w strukturze obu biopolimerów. Jak wspomniano wyżej, żelatyna występuje w postaci kłęбка statystycznego, co zapewnia lepszą dostępność wolnych grup aminowych reszt lizyny dla czynnika sieciującego, niż w przypadku regularnej struktury kolagenu, dlatego też materiały otrzymane z tych preparatów wykazują wyższą twardość. Elastyczność natomiast zależy od rodzaju i siły wiązań, jakie występują pomiędzy łańcuchami białek budującymi gąbkę. W kłębku statystycznym żelatyny występują wiązania kowalencyjne o sztywnym charakterze. W potrójnej helisie kolagenu dominują zaś oddziaływania elektrostatyczne, nadające białku elastyczność, co ma odzwierciedlenie w wyższych właściwościach parametru opisującego elastyczność tych materiałów. Różnice występujące pomiędzy materiałami otrzymanymi z białek wyizolowanych ze skór sumy afrykańskiego i łososia atlantyckiego mogą być także tłumaczone różnicami w ich składzie aminokwasowym. Wyższa zawartość reszt lizyny (mogąca wpływać na wyższy stopień usieciowania) oraz wyższa zawartość hydroksyproliny (wpływającej na siłę oddziaływań pomiędzy łańcuchami helisy kolagenu) w preparatach z sumy afrykańskiego (**Tabela 10**) może tłumaczyć dodatkowo wyższą twardość materiałów otrzymanych przy ich wykorzystaniu. Jako, że różnice pomiędzy materiałami zawierającymi w swoim składzie żelatyny wyizolowane z różnych źródeł są znacznie mniejsze od tych zaobserwowanych dla materiałów kolagenowych, przypuszczam, że różnice wynikające ze struktury danego białka mają dużo większy wpływ niż te wynikające z ich składów aminokwasowych. Denaturacja i fragmentacja kolagenu następująca podczas procesu wytwarzania żelatyny powoduje przyjęcie struktury kłęбка statystycznego, czyli jej uśrednienie, co może minimalizować wpływ tego czynnika na wartości parametrów profilu tekstury.

Do oceny właściwości przeciwutleniających otrzymanych przeze mnie układów biopolimerowych wykorzystałem trzy powszechnie stosowane testy: test DPPH, ABTS i zdolność do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$  (**Materiały i Metody 4.2.4.7-9**). Zdolność do



wymiatania wolnych rodników DPPH oparta jest o pomiar zmiany absorpcji roztworu rodnika DPPH o kolorze fioletowym. Zanik fioletowego zabarwienia informuje o poziomie neutralizacji zawartych w roztworze rodników DPPH. W przypadku testu z kationo-rodnikiem ABTS mechanizm jest identyczny, z tą tylko różnicą, że roztwór ten ma zabarwienie zielone. Zdolność do chelatowania jonów żelaza obserwuje się z kolei poprzez zanik różowej barwy roztworu, jaka jest wynikiem oddziaływań jonów  $\text{Fe}^{2+}$  z ferrozyną. Oddziaływanie to jest specyficzne względem jonów żelaza (II). Silniejsze oddziaływanie tych jonów np. z chitozaniem bądź białkiem powoduje niszczenie kompleksów żelazo-ferrozyna i zanik różowego zabarwienia. O ile reakcje rodnikowe postępują z czasem, tzn. obserwowany jest zanik zabarwienia w czasie, którego szybkość uzależniona od stężenia badanego materiału, o tyle zanik zabarwienia spowodowany silniejszymi właściwościami kompleksującymi badanych materiałów w przypadku jonów żelaza (II) szybko osiąga stan równowagi (po dwóch godzinach trwania doświadczenia nie zaobserwowano dalszej zmiany zabarwienia roztworów).

W celu porównania właściwości przeciwutleniających wszystkich otrzymanych przeze mnie biomateriałów, wykorzystałem wyznaczone wartości  $\text{EC}_{50}$  dla wszystkich mierzonych parametrów (**Rysunek 10, Panel C**). Parametr  $\text{EC}_{50}$  określa masę próby materiału, jaka powoduje neutralizację wolnego rodnika bądź chelatowanie jonów  $\text{Fe}^{2+}$  w 50%, w czasie 2 godzin od momentu rozpoczęcia testu. Wartości dla tego parametru wyznaczyłem na podstawie regresji liniowej wyników otrzymanych z zależności wartości stopnia wymiatania wolnych rodników (bądź stopnia chelatowania jonów  $\text{Fe}^{2+}$ ) uzyskanych dla różnych naważek badanych materiałów (**Wzór (6-8)**). Większa wartość  $\text{EC}_{50}$  wskazuje, że dany materiał wykazuje mniejsze zdolności do neutralizacji wolnych rodników, bądź chelatowania jonów żelaza. W warunkach prowadzonych doświadczeń wykazałem, że wszystkie otrzymane materiały posiadają zdolność do neutralizacji rodników DPPH, kationo-rodników ABTS, a także wykazują zdolność do chelatowania jonów  $\text{Fe}^{2+}$ . Materiały zawierające w swojej strukturze kolageny wyizolowane z obu gatunków ryb cechują się wyraźnie niższymi wartościami trzech mierzonych parametrów w stosunku do materiałów zawierających żelatynę. Materiały kolagenowe uzyskały średnio dwu-, cztero- i -trzykrotnie niższe wartości  $\text{EC}_{50}$  odpowiednio dla testów DPPH, ABTS i  $\text{Fe}^{2+}$  w stosunku do materiałów zbudowanych wyłącznie z żelatyny. Natomiast materiały otrzymane w 100% z chitozanu cechują się najwyższymi wartościami  $\text{EC}_{50}$  dla wszystkich badanych parametrów. Stwierdziłem, że materiały chitozanowe posiadają średnio ponad cztero- i dwukrotnie niższą zdolnością do wymiatania rodników DPPH oraz dziewięcio- i trzykrotnie niższą zdolność do chelatowania jonów żelaza (II) względem materiałów zbudowanych odpowiednio z kolagenów i żelatyn. Wyjątek stanowi porównanie z materiałami żelatynowymi dla zmiennej określającej zdolność do wymiatania kationo-rodników ABTS, w którym materiały te osiągnęły zbliżone wartości parametru  $\text{EC}_{50}$  do materiałów otrzymanych z żelatyny wyizolowanej z suma afrykańskiego. Natomiast wartości tego parametru względem pozostałych materiałów osiągnęły o 23% niższe wyniki w stosunku do materiałów otrzymanych z żelatyny z łososia atlantyckiego

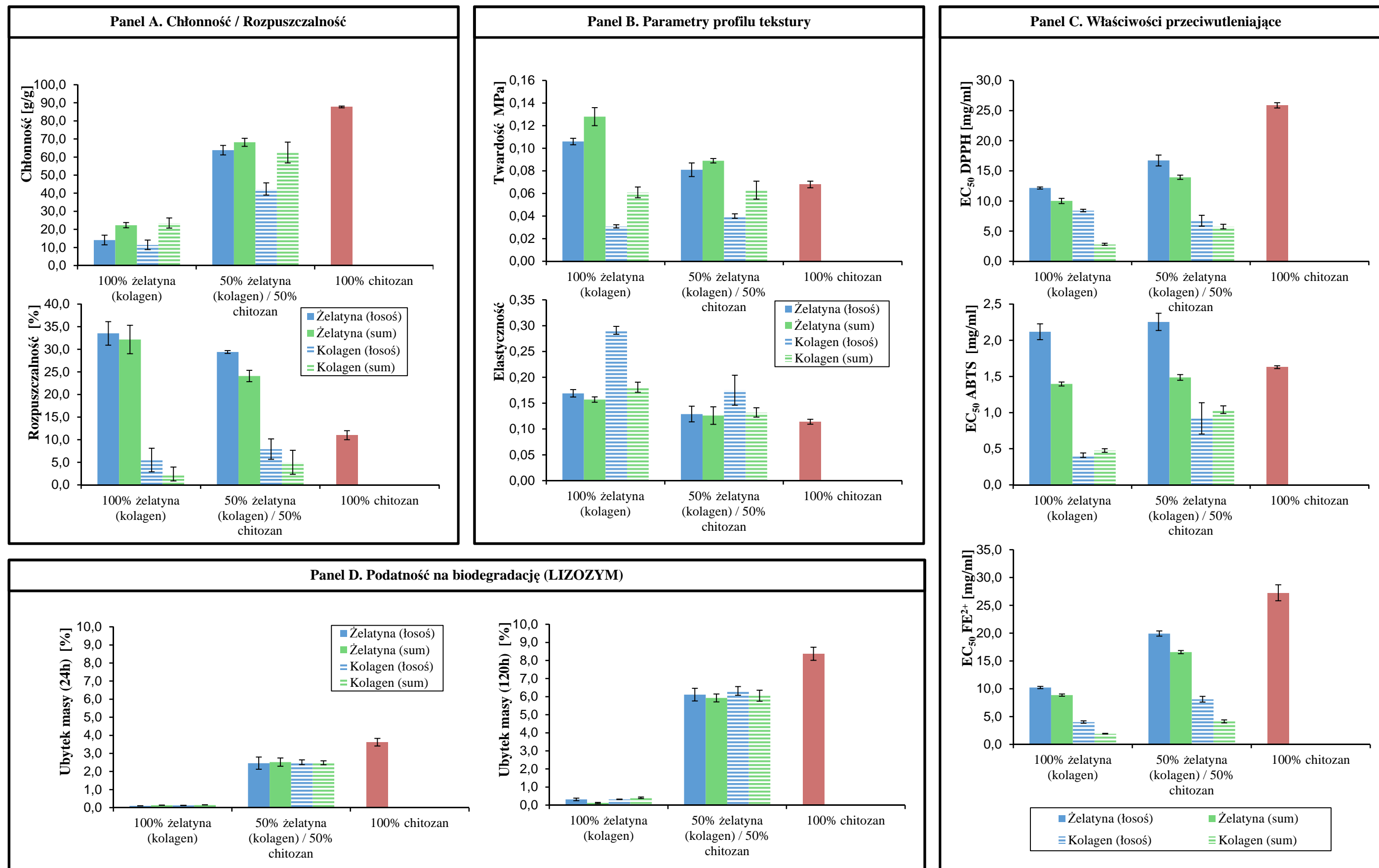
(wyższa zdolność do wymiatania kationo-rodników ABTS) oraz średnio o 70% wyższe w stosunku do obu preparatów kolagenowych (niższa zdolność do wymiatania kationo-rodników ABTS).

Mechanizmy leżące u podstaw aktywności przeciwutleniającej chitozanów, żelatyn i kolagenów, wyizolowanych z różnych źródeł wskazane zostały już wcześniej i opisane w części teoretycznej (**Wprowadzenie 2.2.4.2**). W dostępnej literaturze niewiele uwagi poświęcono badaniu właściwości przeciwutleniających biomateriałów gąbczastych wykonanych z wykorzystywanych surowców. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że materiały te w postaci stałej utrzymują właściwości przeciwutleniające charakterystyczne dla roztworów biopolimerów, z jakich zostały otrzymane. Jak wskazano w części teoretycznej na właściwości przeciwutleniające polimerów naturalnych, zwłaszcza białek, wpływa szereg czynników, takich jak: budowa chemiczna, struktura trzeciorzędowa oraz masa cząsteczkowa. Wyraźnie zaobserwowane różnice pomiędzy materiałami otrzymanymi z żelatyny i kolagenu wyizolowanych z tego samego źródła, nie są do końca wyjaśnione. Oba preparaty nie różnią się w sposób istotny pod względem składu chemicznego. Różnią się natomiast strukturą przestrzenną cząsteczek składowych biopolimerów, co może wpływać na poziom wyeksponowania grup funkcyjnych poszczególnych łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych, a przez to na częstość oddziaływań z cząsteczkami rodnika DPPH czy kationo-rodnika ABTS. Lepsze właściwości przeciwutleniające materiałów zawierających kolagen mogą wynikać także z różnic w procesach otrzymywania obu preparatów białkowych. Podczas otrzymywania kolagenu ma miejsce etap wybarwiania, podczas którego rozdrobnione skóry ryb poddawane są działaniu 3% roztworu nadtlenu wodoru przez okres 48 godzin. Podczas takiego procesu, może dojść do zmian w grupach funkcyjnych poszczególnych aminokwasów w wyniku ich utlenienia. Nowopowstałe grupy mogły cechować się większą zdolnością do wymiatania wolnych rodników, co w konsekwencji mogłoby tłumaczyć wyższą aktywność materiałów zbudowanych z kolagenu. Mechanizmy leżące u podstaw aktywności przeciwutleniającej chitozanu związane są z obecnością i aktywnością grup hydroksylowych i aminowych, które mogą neutralizować wolne rodniki poprzez przekazanie atomu wodoru do cząsteczki wolnego rodnika, np. reaktywnej formy tlenu. Przeprowadzone testy wykazały jednak, że właściwości przeciwutleniające gąbek chitozanowych są dużo słabsze od tych, jakie występują dla materiałów otrzymanych z kolagenów i żelatyn. Tak jak dla pozostałych badanych właściwości materiałów gąbczastych otrzymanych z preparatów białkowych, tak i w przypadku parametrów opisujących ich właściwości przeciwutleniające, zaobserwowałem wyraźne różnice w wartościach tych parametrów dla materiałów otrzymanych z białek wyizolowanych z różnych gatunków ryb. Różnice te są wyraźnie widoczne w przypadku materiałów otrzymywanych z różnych żelatyn. Wartości parametrów  $EC_{50}$  dla testów DPPH, ABTS i  $Fe^{2+}$  dla materiałów otrzymanych z żelatyny z sumy afrykańskiego są odpowiednio o 18%, 34% i 13% niższe, w stosunku do wartości wyznaczonych dla materiałów otrzymanych z żelatyny z łososia atlantyckiego. Aleman i in., porównując właściwości przeciwutleniające roztworów żelatyn

wyizolowanych z kalmara i soli, tłumaczy zaobserwowane różnice, innym składem aminokwasowym obu preparatów [Alemán i in. 2011]. W pracy tej sugerowano, że wyższa zawartość takich aminokwasów jak: walina, alanina, leucyna, izoleucyna, histydyna, metionina, prolina i hydroksyprolina, powinna sprzyjać zwiększeniu właściwości przeciwutleniających (zdolność do neutralizacji wolnych rodników). Wyższa zawartość wskazanych reszt aminokwasowych w preparacie pochodzącym z suma afrykańskiego, mogłaby zatem tłumaczyć wyższe właściwości przeciwutleniające otrzymanych przeze mnie biomateriałów zawierających białko z tego źródła (386/1000 reszt aminokwasowych w stosunku do 337/1000 reszt aminokwasowych dla preparatu z łososia atlantyckiego, **(Tabela 10)**). Z kolei badania przeprowadzone w grupie Saiga wskazują, że zdolność hydrolizatów białkowych do chelatowania jonów metali przejściowych wzrasta w raz ze wzrostem zawartości takich aminokwasów jak histydyna, prolina i hydroksyprolina [Saiga i in. 2003]. Wyższa zawartość tych reszt aminokwasowych w preparatach wyizolowanych ze skór suma afrykańskiego może zatem tłumaczyć wyższą zdolność do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$  otrzymanych z nich materiałów (200/1000 reszt aminokwasowych w stosunku do 173/1000 reszt aminokwasowych dla preparatu z łososia atlantyckiego, **Tabela 10**). Zdolność do chelatowania jonów żelaza (II) przez preparaty chitozanu nie została do końca wyjaśniona. Znane są doniesienia literaturowe sugerujące, że jony metali dwuwartościowych chelatowane są poprzez oddziaływania z grupą hydroksylową na atomie węgla C6 oraz z grupą aminową na atomie C2 podjednostek chitozanu. Inne badania donoszą o zależności związanej ze stopniem deacetylacji chitozanu, wskazując na niemal całkowitą redukcję zdolności do chelatowania dwuwartościowych jonów metali w przypadku całkowicie N-acetylowanych preparatów chitozanu (**Wprowadzenie 2.2.4.2**). Bez względu na mechanizm leżący u podstaw tych właściwości, są one znacznie słabsze w porównaniu z mechanizmami występującymi dla materiałów otrzymanych z polimerów białkowych.

Zbiór dziewięciu otrzymanych przeze mnie biopolimerowych materiałów gąbczastych został także poddany badaniom mającym na celu porównanie podatności na enzymatyczną degradację wynikającą z działania lizozymu (**Materiały i Metody 4.2.4.6**). Podatność taka ma znaczenie praktyczne, bowiem informacje o kinetyce procesu biodegradacji razem z informacjami na temat rozpuszczania danych materiałów, stanowią podstawę w projektowaniu systemów do kontrolowanego profilu uwalniania immobilizowanych bądź inkorporowanych w nich związków aktywnych. Lizozym jest jedynym enzymem obecnym w ludzkiej surowicy krwi, który jest zdolny do depolimeryzacji chitozanu [Oliveira i in. 2006, Vande i in. 2002]. Enzym ten w sposób wysoce specyficzny hydrolizuje wiązania glikozydowe m.in. łączące ze sobą podjednostki acetyloglukozaminy i glukozaminy budujące łańcuchy chitozanu. Brak tego typu wiązań w kolagenie i żelatynie sugeruje, że polimery te nie powinny ulegać hydrolizie pod wpływem jego działania. Niemniej jednak w dostępnej literaturze znajdują się prace, których autorzy przeprowadzając charakterystykę otrzymanych przeze siebie materiałów białkowych, wykazują ich podatność na biodegradację w oparciu o test hydrolitycznej aktywności lizozymu [Ratanavaraporn i in. 2006]. Ubytek masy dla

badanych przeze mnie materiałów odpowiednio po pierwszym i piątym dniu testu przedstawiłem na **Rysunku 10, Panel D**. W warunkach przeprowadzonego doświadczenia widoczny jest brak biodegradacji materiałów otrzymanych z polimerów białkowych zarówno po pierwszym jak i ostatnim dniu prowadzenia doświadczenia. Różnic nie obserwuje się także w przypadku materiałów chitozanowo-kolagenowych i chitozanowo-żelatynowych. Na tej podstawie mogę stwierdzić, że materiały kolagenowe i żelatynowe nie ulegają biodegradacji pod wpływem hydrolitycznego działania lizozymu. W związku z tym wydaje mi się, że wyniki przedstawione przez autorów cytowanej pracy nie wskazują na biodegradację uzyskanych przez nich materiałów przez lizozym, lecz mogą być związane z degradacją matrycy na skutek procesów związanych z ich rozpuszczaniem. W moich badaniach ubytek masy dla materiałów otrzymanych w 100% z chitozanu wzrósł z około 3,5% po 24 godzinnej ekspozycji na działanie lizozymu do ponad 8% po 120h. Wzrost ubytku masy zaobserwowano także w przypadku gąbek otrzymanych z dwóch kopolimerów chitozanu, z każdym z wybranych polimerów białkowych. Bez względu na rodzaj wykorzystanego białka, a także na źródło jego izolacji, ubytek masy wynosił odpowiednio 2 i 6%. Podatność matrycy na degradację enzymatyczną może mieć istotne znaczenie podczas projektowania systemów do kontrolowanego dostarczania związków aktywnych, bowiem jest to dodatkowy mechanizm obok procesów erozyjnych związanych z procesem rozpuszczania, jaki wpływa na kinetykę uwalniania inkorporowanego w niej związku aktywnego. W przypadku materiałów chitozanowo-żelatynowych ubytek masy spowodowany aktywnością lizozymu, w stosunku do ubytku masy utraconej na skutek procesów rozpuszczania, wydaje się być na tyle niewielki, by uznać ten mechanizm degradacji za nieistotny. Inaczej jest jednak w przypadku materiałów chitozanowo-kolagenowych, dla których erozja na skutek hydrolitycznej aktywności lizozymu stanowi około 40% ubytku masy związanego z procesami rozpuszczania. Nieuwzględnienie istotnego w tym przypadku parametru mogłoby być zatem przyczyną rozbieżności w projektowanych wynikach kinetyki uwalniania związków aktywnych.



**Rysunek 10.** Zestawienie poszczególnych wartości parametrów biopolimerowych materiałów gąbczastych otrzymanych z chitozanu, kolagenu i żelatyny: chłonność / rozpuszczalność (Panel A), parametry profilu tekstury: twardość i elastyczność (Panel B), właściwości przeciwutleniające (Panel C), podatność na biodegradację względem lizozymu (Panel D).

### 5.2.2. Analiza podobieństwa biopolimerowych materiałów gąbczastych otrzymanych z chitozanu, kolagenu i żelatyny - analiza głównych składowych (PCA).

W celu porównania wszystkich otrzymanych układów biopolimerowych wykorzystałem chemometryczną metodę analizy danych: analizę głównych składowych. Przedmiotem analizy była macierz danych zawierająca wartości dziewięciu zmiennych objaśniających określonych dla każdego z badanych obiektów (chłonność, rozpuszczalność, twardość, elastyczność, zdolność do wymiatania rodnika DPPH, zdolność do wymiatania kationo-rodnika ABTS, zdolność do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$ , wrażliwość na degradację enzymatyczną względem lizozymu po 1. dniu ekspozycji oraz wrażliwość na degradację enzymatyczną względem lizozymu po 5. dniu ekspozycji). Zmienne objaśniające poddałem standaryzacji, aby uzyskać jednakowy wpływ wszystkich zmiennych na wynik analizy porównawczej. Dla każdego parametru  $x_i$  obliczyłem średnią ogólną  $\mu_i$  oraz odchylenie standardowe średniej  $SD_i$ , po czym parametry poddałem normalizacji zgodnie ze wzorem:

$$\text{Wzór (10): } x_{ni} = \frac{x_i - \mu_i}{SD_i},$$

gdzie  $i$  jest numerem parametru, a  $n$  numerem kolumny. Wynikiem tej transformacji jest jednakowa dla wszystkich parametrów wartość średnia równa 0 i jednakowe odchylenie standardowe równe 1. Dopiero tak przygotowane dane poddałem dalszej analizie chemometrycznej. Wszystkie przedstawione poniżej analizy przeprowadziłem wykorzystując procedury zawarte w pakiecie statystycznym Statistica.

W Tabeli poniżej (**Tabela 11**) zestawiliem wartości własne kolejnych głównych składowych, będące jednocześnie ich wariancjami oraz procentowy udział głównych składowych w zmienności zbioru danych (% ogółu wyjaśnionej wariancji). Do zobrazowania relacji występujących pomiędzy analizowanymi obiektami, za istotne uznałem dwie pierwsze główne składowe. Wyboru dokonałem na podstawie kryterium maksymalnego zasobu zmienności (wartości własnych większych od 1 oraz maksymalnego skumulowanego procentu uwzględnionej zmienności).

**Tabela 11.** Tablica z wartościami i skumulowanymi wartościami własnymi głównych składowych oraz procentami i skumulowanymi procentami sumy wariancji dla analizowanych układów.

Numer głównej składowej (PC)	Wartość własna	% ogółu wariancji [%]	Skumulowana wartość własna	Skumulowany % wariancji [%]
PC 1	5,10	56,62	5,10	56,62
PC 2	2,72	30,18	7,81	86,80
PC 3	0,77	8,58	8,58	95,38
PC 4	0,21	2,37	8,80	97,75
PC 5	0,10	1,13	8,90	98,88
PC 6	0,09	0,96	8,99	99,84
PC 7	0,01	0,16	9,00	99,99
PC 8	0,00	0,00	9,00	100,00

Pierwsza główna składowa zawiera odpowiednio ponad 56% zmienności zawartej w danych, druga ponad 30%. Tak, więc dwie pierwsze składowe wyjaśniają ok. 87% informacji niesionej przez dziewięć zmiennych wejściowych opisujących analizowane obiekty. Ze względu na to, że uwzględniając jedynie dwie główne składowe tracimy około 13% informacji, uzasadnione byłoby zwiększenie liczby istotnych głównych składowych do trzech. Zawarta byłaby wówczas zdecydowana większość zmienności (ponad 95%). Mając jednak na uwadze, że z każdą kolejną główną składową rośnie prawdopodobieństwo uwzględnienia informacji związanej z niepewnością pomiarową, dalszą analizę przeprowadziłem uznając za istotne tylko te główne składowe, których wartości własne są większe od 1.

**Tabela 12.** Wartości współczynników głównych składowych (wartości ładunków czynnikowych) dla analizowanych układów biopolimerowych.

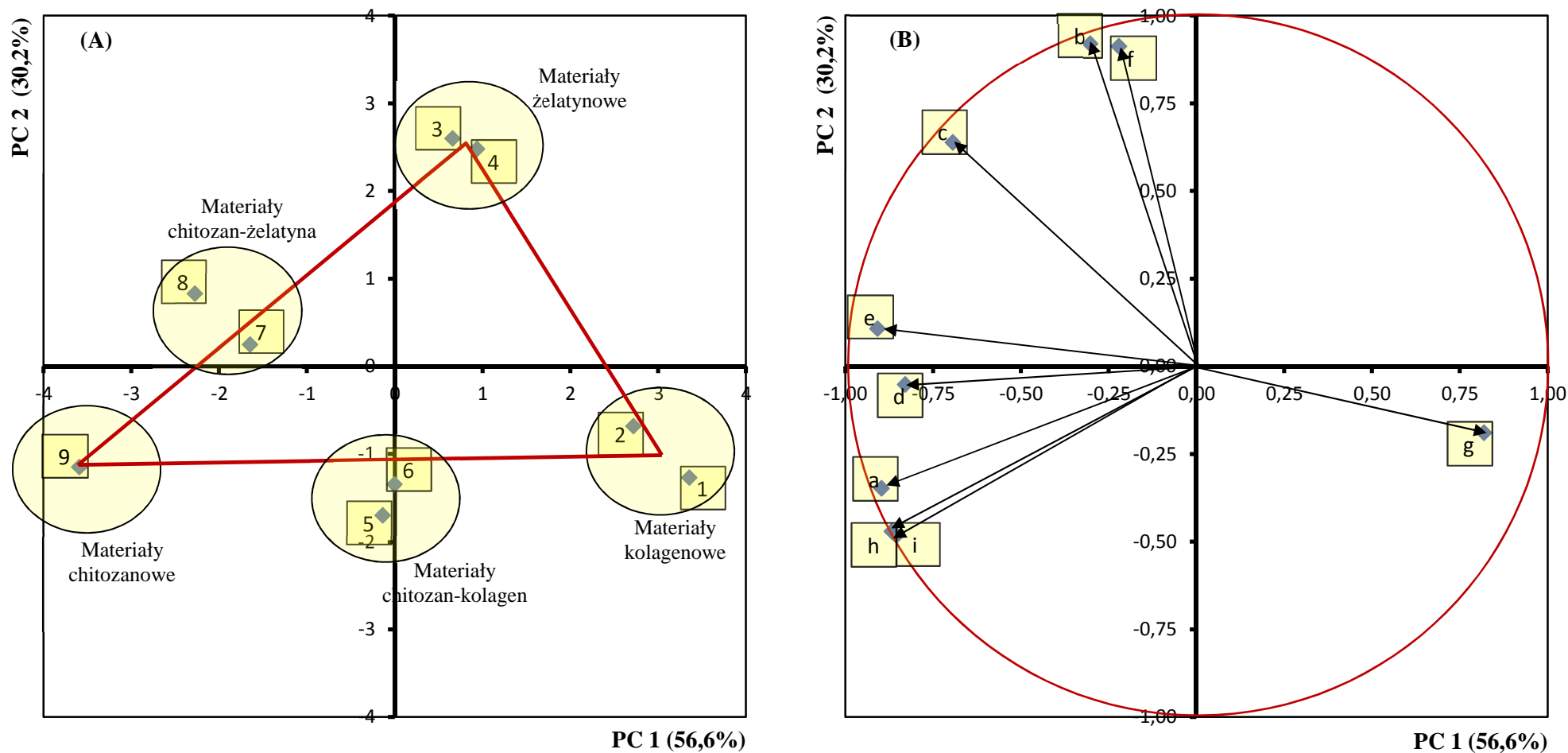
Nazwa zmiennej objaśniającej	PC1	PC2
Chłonność	<b>-0,897565</b>	-0,346841
Rozpuszczalność	-0,302508	<b>0,920771</b>
EC <sub>50</sub> ABTS	<b>-0,694237</b>	0,639893
EC <sub>50</sub> DPPH	<b>-0,830333</b>	-0,053066
EC <sub>50</sub> Fe <sup>2+</sup>	<b>-0,908885</b>	0,107980
Twardość	-0,220056	<b>0,912240</b>
Elastyczność	<b>0,818447</b>	-0,190150
Degradacja enzymatyczna - I dzień	<b>-0,867554</b>	-0,471434
Degradacja enzymatyczna - V dzień	<b>-0,854659</b>	-0,483144

W **Tabeli nr 12** zestawilem wartości tzw. ładunków czynnikowych, na podstawie których zaproponowałem interpretacje uznanych za istotne głównych składowych. Ładunki czynnikowe stanowią bowiem współczynniki korelacji liniowej pomiędzy zmiennymi wejściowymi i głównymi składowymi. Pogrubionym drukiem oznaczyłem ładunki o największych wartościach bezwzględnych. Na tej podstawie uznałem, że pierwsza główna składowa reprezentuje większość informacji z ogólnej zmienności zbioru za wyjątkiem informacji dotyczących twardości oraz rozpuszczalności analizowanych obiektów. Ponadto druga główna składowa opisuje przybliżoną ilość informacji na temat zdolności do wymiatania kationo-rodników ABTS (EC<sub>50</sub> ABTS) co pierwsza główna składowa. Rozmieszczenie wektorów kierunkowych testów w płaszczyźnie pierwszej i drugiej głównej składowej przedstawiono na **Rysunku nr 11, Panel B**. Analiza głównych składowych wykazała, że analizowane zmienne są ze sobą w różnym stopniu skorelowane. Najwyższe współczynniki korelacji ( $r \sim 0,99$ ) wykazują zmienne opisujące poziom biodegradacji po pierwszym i piątym dniu prowadzenia testu, a także pomiędzy zmienną opisującą zdolność do wiązania cieczy (chłonność), a obiema zmiennymi opisującymi poziom degradacji

enzymatycznej ( $r \sim 0,95$ ). Obie obserwacje można racjonalnie wytłumaczyć odnosząc się do metodyki prowadzenia testu. Wysoki poziom korelacji pomiędzy chłonnością a poziomem degradacji enzymatycznej jest związany z natężeniem ekspozycji badanej próby na lityczne działanie lizozymu. W prowadzonym teście jedynie zewnętrzna powierzchnia materiałów była w równym stopniu wystawiona na jego działanie. Różnice wynikały z poziomu lizozymu, jaki był w stanie wnikać do wnętrza gąbek, a to jest skorelowane z ich zdolnością do chłonięcia cieczy.

Do analizy przestrzeni związków wykorzystałem macierz współrzędnych obiektów w płaszczyźnie dwóch pierwszych głównych składowych. Dla zobrazowania relacji występujących w badanym zestawie otrzymanych materiałów gąbczastych, sporządziłem mapy liniowe, będące rzutami pełnej dziewięciowymiarowej przestrzeni obiektów na płaszczyznę dwóch pierwszych głównych składowych (**Rysunek 11, Panel A**). Przedstawiona mapa liniowa odtwarza łącznie 87% ogólnej zmienności zawartej w danych wejściowych. Analiza podobieństwa, za pomocą metody głównych składowych, materiałów otrzymanych na bazie chitozanu, kolagenów i żelatyny, a także materiałów otrzymanych w wyniku połączenia chitozanu z preparatami białkowymi, wykazała, że materiały otrzymane w 100% z kolagenów, żelatyn i chitozanu zostały wyraźnie oddzielone na przedstawionej płaszczyźnie głównych składowych, co wskazuje na istotne różnice pomiędzy badanymi materiałami. W celu wyeksponowania zależności pomiędzy otrzymanymi materiałami, środki obszarów charakterystycznych dla materiałów otrzymanych w 100% z danego biopolimeru, połączyłem prostymi tworząc trójkąt zależności. Czynność ta wykazała, że materiały otrzymane w wyniku połączenia wybranych dwóch biopolimerów, znajdują się w pobliżu wyznaczonych prostych łączących obszary biomateriałów wykonanych wyłącznie z jednego z tych biopolimerów. Obszar występowania materiałów chitozanowo-kolagenowych znajduje się na prostej łączącej obszary występowania materiałów chitozanowych i kolagenowych (podobnie jest dla materiałów chitozanowo-żelatynowych). Wynik powyższej analizy wskazuje, że łącząc dane dwa polimery możemy uzyskać materiał o właściwościach stanowiących wypadkową właściwości dla materiałów wykonanych z każdego z nich osobno.





**Rysunek 11.** Rozmieszczenie wektorów kierunkowych (B) dla zmiennych: chłonność (a), rozpuszczalność (b),  $EC_{50}$  ABTS (c),  $EC_{50}$  DPPH (d),  $EC_{50}$   $Fe^{2+}$  (e), twardość (f), elastyczność (g), degradacja enzymatyczna - I dzień (h), degradacja enzymatyczna - V dzień (i) oraz mapa liniowa obiektów (A) w przestrzeni pierwszej i drugiej głównej składowej dla materiałów otrzymanych z dyspersji: kolagenu z łososia atlantyckiego (1), kolagenu z sumy afrykańskiego (2), żelatyny z łososia atlantyckiego (3), żelatyny z sumy afrykańskiego (4), chitozanu i kolagenu z łososia atlantyckiego (5), chitozanu i kolagenu z sumy afrykańskiego (6), chitozanu i żelatyny z sumy afrykańskiego (7), chitozanu i żelatyny z łososia atlantyckiego (8), chitozanu (9).

### 5.3. Otrzymywanie i charakterystyka materiałów chitozanowo-białkowych z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie.

Materiały chitozanowo-białkowe zostały otrzymane zgodnie ze schematem przedstawionym w części eksperymentalnej (**Materiały i Metody 4.2.2**). Mając na uwadze wskazane wcześniej ograniczenia związane z przygotowywaniem materiałów zawierających chitozan z wykorzystaniem jego roztworów w kwasach organicznych, opracowałem nowy sposób wytwarzania materiałów chitozanowo-białkowych, który związany jest z techniką rozpuszczania chitozanu w wodzie bez jego wcześniejszej chemicznej derywatywacji bądź fragmentacji łańcucha. Proces rozpuszczania chitozanu w wodzie w nowej metodzie polega na nasyceniu wodnej zawiesiny tzw. chitozanu mikrokrystalicznego, gazowym ditlenkiem węgla [Gorczyca i in. 2013]. Ditlenek węgla to tlenek kwasowy, który w wodzie przekształca się w stosunkowo słaby i nietrwały kwas węglowy. Pozwala to jednak na spadek pH do takiego poziomu, by tak przygotowany chitozan mógł przejść do roztworu. Uzyskany w ten sposób roztwór chitozanu mieszałem następnie z dyspersją polimerów białkowych, dodawałem czynnika sieciującego, przelewałem do form, kondycjonowałem, zamrażałem i poddawałem procesowi suszenia sublimacyjnego w celu otrzymania materiału o strukturze gąbki [Gorczyca i in. 2014]. Do konstrukcji materiałów chitozanowo-białkowych wybrałem białka wyizolowane ze skór rybich (suma afrykańskiego), ze względu na: 1) brak zagrożenia ze strony zakażeń białkami prionowymi; 2) stosunkowo niewiele metod przetwarzania i wykorzystywania skór rybich w stosunku do skór wieprzowych, co czyni to źródło tanim w pozyskiwaniu; 3) stosunkowo łatwą dostępność do dużej ich ilości (roczny światowy połów samych tylko ryb łososiowatych oceniany jest na poziomie 4,5 mln ton; 4) pewne pożądane różnice we właściwościach chemicznych w stosunku do surowców otrzymywanych z innych źródeł np. wyższe właściwości przeciwutleniające (**Wyniki i Dyskusja 5.2.1**). Powodem, dla którego wykorzystałem jednocześnie żelatynę i kolagen, była chęć optymalizacji materiałowego kosztu wytwarzania projektowanych materiałów chitozanowo-białkowych, a także możliwość modyfikacji profilu uwalniania inkorporowanych w takich materiałach związków aktywnych, poprzez zmianę stosunku stężenia żelatyny i kolagenu. Żelatyna jest surowcem tańszym od kolagenu, a także jest rozpuszczalna w roztworach wodnych, co może wpłynąć na profil uwalniania inkorporowanych związków aktywnych. Stosunek zawartości chitozanu, kolagenu i żelatyny został zoptymalizowany, a materiały uzyskane w oparciu o optymalną kompozycję (1,25% w/w chitozan; 1% w/w żelatyna; 0,5% w/w kolagen) wybrałem do dalszej charakterystyki. Optymalizacja polegała na subiektywnej ocenie procesu żelowania, a także subiektywnej ocenie właściwości końcowego materiału gąbczastego uzyskanego po procesie liofilizacji. Poszukiwałem wówczas kompozycji, która zapewniałaby odpowiednią strukturę i wytrzymałość takiego materiału.

Zawartość chitozanu w dyspersji polimerów ograniczona była dodatkowo lepkością dyspersji chitozanu, otrzymanych w wyniku jego rozpuszczenia poprzez nasycanie gazowym ditlenkiem węgla. Wodne roztwory chitozanu o stężeniu powyżej 2% w/w charakteryzowały się tak dużą lepkością, że nie było możliwe ich dalsze mieszanie, nawet przy wykorzystaniu

mieszadła mechanicznego. Proces nasycania uznawałem za zakończony w momencie, gdy lepkość roztworu chitozanu nie ulegała dalszym zmianom. Dla opisanego w części eksperymentalnej przykładu roztworu chitozanu w wodzie (1,84%, w/w), stan równowagi względem wartości lepkości ustalał się po ok. 3h nasycania ditlenkiem węgla. Czas ten zmniejszył się do 2h, gdy nasycanie zintensyfikowałem poprzez dodawanie do dyspersji rozdrobnionych kawałków stałego CO<sub>2</sub>, czyli tzw. suchego lodu. Warto nadmienić, że zaproponowana metoda rozpuszczania z wykorzystaniem CO<sub>2</sub> jest skuteczna jedynie dla zawiesin chitozanu mikrokystalicznego otrzymywanego według metody zaproponowanej przez Struszczyka [Struszczyk, 1987], będącego strątem chitozanu z jego kwaśnego roztworu. Początkowe próby wykorzystania CO<sub>2</sub> do rozpuszczenia komercyjnego chitozanu w postaci proszku zawieszzonego w wodzie, nie przyniosły pożądanych rezultatów. Wysoka rozpuszczalność chitozanu w środowisku kwaśnym jest wynikiem tworzenia się soli pomiędzy naładowanymi dodatnio resztami aminowymi chitozanu, a obdarzonymi ładunkiem ujemnym grupami kwasowymi. Kwas węglowy, jaki tworzył się w warunkach prowadzonego doświadczenia na skutek saturacji wody ditlenkiem węgla, okazał się być zbyt słaby by rozluźnić silną sieć wiązań wodorowych w łańcuchu chitozanu i pomiędzy jego cząsteczkami, podczas gdy próbowałem rozpuścić chitozan bezpośrednio w postaci proszku. Można przypuszczać, że wstępne przygotowanie chitozanu poprzez przeprowadzenie go do postaci mikrokystalicznej, najprawdopodobniej ułatwiło oddziaływanie pomiędzy sprotonowanymi grupami aminowymi a anionami wodorowęglanowymi i umożliwiło jego rozpuszczenie w wodzie w zaproponowanych warunkach.

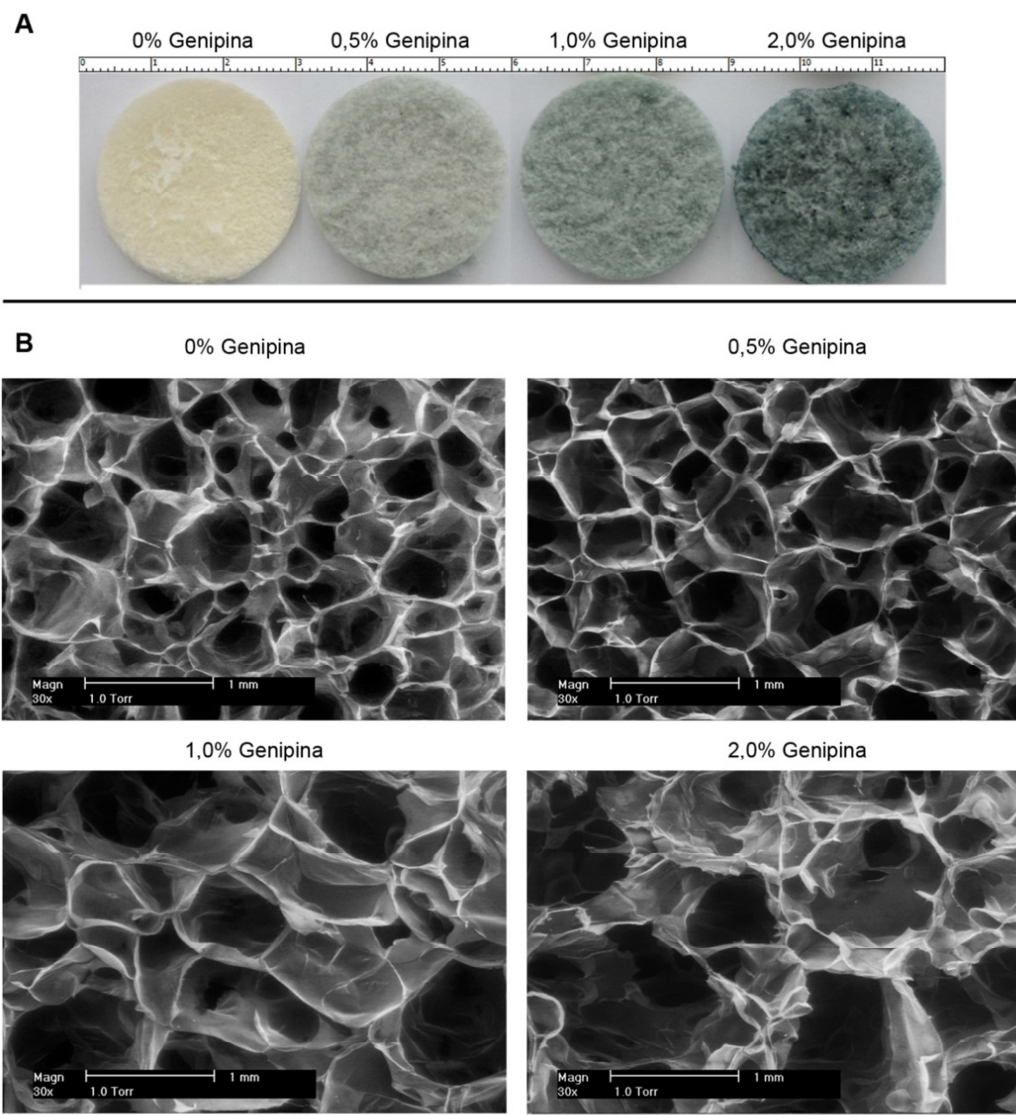
Na każdym z etapów, w jakim przetwarzałem kolagen, utrzymywałem temperaturę dyspersji poniżej 12°C, co miało zapobiec zniszczeniu jego trzeciorzędowej struktury. Temperaturę tą wybrałem biorąc pod uwagę temperaturę denaturacji dla wykorzystywanego preparatu, wyizolowanego ze skór suma afrykańskiego (15°C), wyznaczoną w oparciu o badania reologiczne i różnicową kalorymetrię skaningową w zespole dr. Inż. Roberta Tylingo. Proces inkubacji otrzymanych hydrożeli (**Rysunek 12, etap 12**) był etapem koniecznym, związanym z postępowaniem reakcji sieciowania pomiędzy cząsteczkami biopolimerów a genipiną. Wykorzystanie ditlenku węgla do rozpuszczenia chitozanu pozwoliło otrzymać materiały niezawierające resztkowych kwasów organicznych (kwasu octowego), co przede wszystkim pozwoliło pominąć etap wypłukiwania rozpuszczalnika z tak przygotowanych materiałów. Etap ten często prowadził do utraty trójwymiarowej struktury otrzymanych biomateriałów, a jego pominięcie skutkowało utratą ich biokompatybilności i zwiększoną rozpuszczalnością. Brak zawartości kwasów w otrzymanych w ten sposób materiałach potwierdził brak zmiany pH medium, w jakim dokonywałem charakterystyki chłonności i rozpuszczalności.

Ze względu na wyraźnie mniejszą cytotoksyczność materiałów otrzymywanych przy wykorzystaniu genipiny jako związku sieciującego, w porównaniu do powszechnie używanego aldehydu glutarowego [Muzzarelli 2009], postanowiłem, że wykorzystam ją w konstrukcji opracowywanych materiałów chitozanowo-białkowych opartych o nową technologię rozpuszczania chitozanu w wodzie.

### 5.3.1. Analiza wybranych właściwości gąbczastych materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie.

#### 5.3.1.1. Morfologia.

Otrzymany materiał nieusieciowany genipiną był biały, natomiast materiały otrzymane z zastosowaniem genipiny, jako czynnika sieciującego wykazywały szaroniebieskie zabarwienie, którego intensywność wzrastała ze wzrostem stężenia czynnika sieciującego (**Rysunek 12, Panel A**).



**Rysunek 12.** Materiały chitozanowo-białkowe otrzymane z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, sieciowane różnymi stężeniami genipiny (Panel A). Zdjęcia SEM w/w materiałów (Panel B).

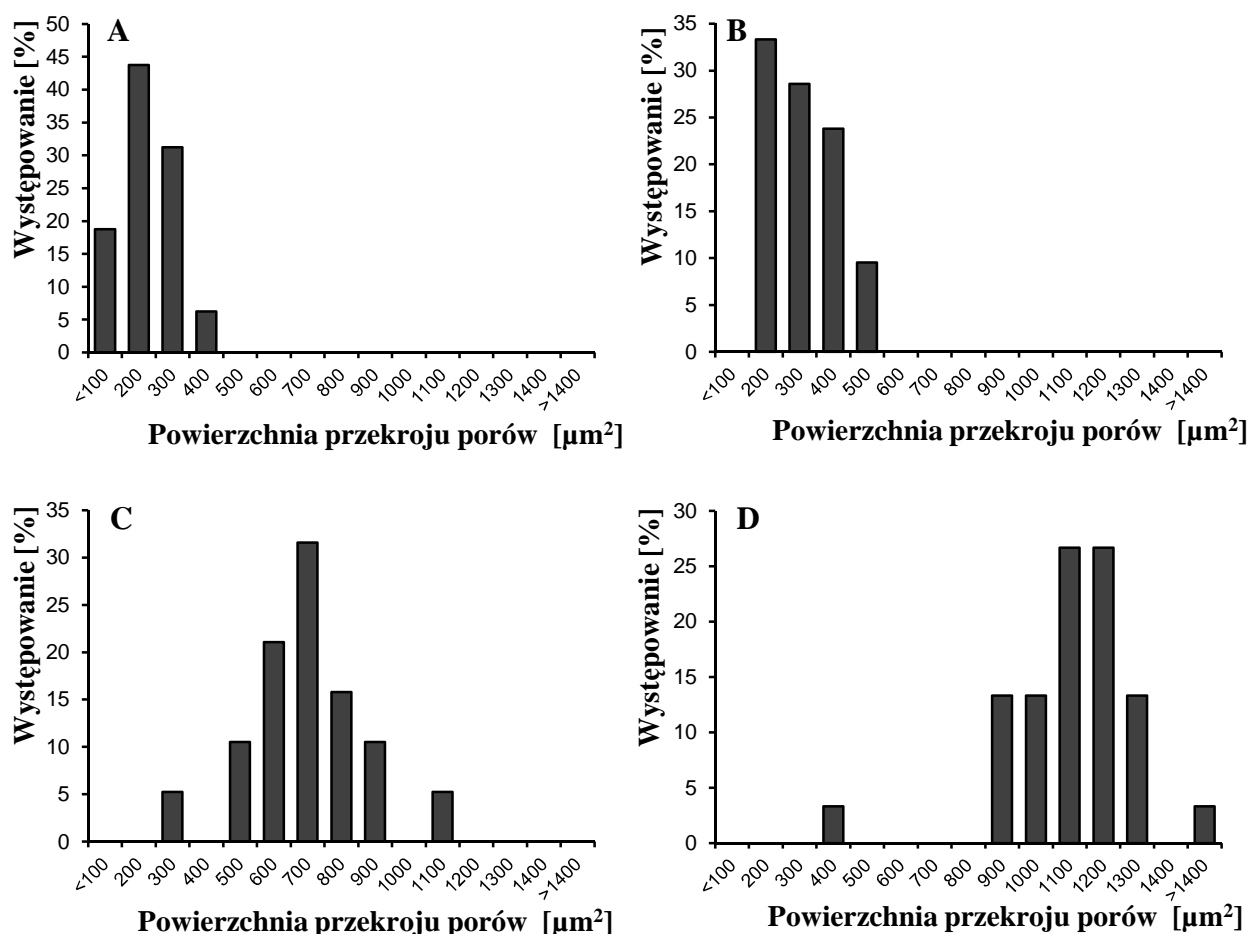
Zmiana koloru materiałów sieciowanych za pomocą tego czynnika sieciującego jest zjawiskiem naturalnym, wynikającym z wolnorodnikowej reakcji polimeryzacji cząsteczek genipiny, która przebiega równolegle do reakcji sieciowania, a jej intensywność uzależniona jest od wykorzystanego stężenia [Butler i in. 2003]. Wszystkie uzyskane materiały posiadały wysoce porowatą strukturę (**Rysunek 12, Panel B**), co jest wynikiem procesu suszenia sublimacyjnego. Zaobserwowałem, że wraz ze wzrastającym stężeniem czynnika sieciującego wyraźnie wzrastała powierzchnia przekroju porów oraz porowatość otrzymywanych materiałów (**Tabela 13, Materiały i Metody 4.2.4.1**). Materiały otrzymane bez wykorzystania czynnika sieciującego cechowały się ponad pięciokrotnie mniejszą powierzchnią przekroju porów w stosunku do tych, otrzymanych przy 2,0%-wym jego stężeniu (odpowiednio ok. 0,2 i 1,0 mm<sup>2</sup>).

**Tabela 13.** Powierzchnia przekroju porów oraz porowatość materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, sieciowanych różnymi stężeniami genipiny.

Stężenie genipiny [% , w/w]	Powierzchnia przekroju porów [μm <sup>2</sup> ]	Porowatość [%]
0,0	187,9 ± 101,0	25,75 ± 1,47
0,5	274,6 ± 123,8	33,13 ± 1,30
1,0	533,9 ± 259,8	39,95 ± 1,25
2,0	1066,4 ± 396,7	44,75 ± 1,50

Nie są to typowe obserwacje, jakich dokonuje się podczas sieciowania materiałów biopolimerowych. Na ogół wraz ze wzrostem stężenia czynnika sieciującego zmniejsza się wielkość porów sieciowanych materiałów [Chen i in. 2009, Yan i in. 2010]. Niemniej jednak uzyskane przeze mnie wyniki nie są wyjątkiem, gdyż podobne obserwacje poczynili Bi i wsp., podczas otrzymywania chitozanowo-kolagenowych materiałów gąbczastych z roztworów kwasu octowego [Bi i in. 2011], nie podając jednak wytłumaczenia obserwowanego zjawiska. Przypuszczam, że uzyskany wynik może być efektem reakcji sieciowania dalekiego zasięgu, co może następować gdy warunki przeprowadzanego doświadczenia faworyzują reakcje polimeryzacji cząsteczek genipiny [Mu i in. 2013]. W takim środowisku reakcje polimeryzacji czynnika sieciującego mogłyby być szybsze niż oddziaływania z grupami aminowymi cząsteczek polimerów, co w konsekwencji mogłoby prowadzić do reakcji sieciowania pomiędzy cząsteczkami biopolimerów, a cząsteczkami genipiny o bardziej przestrzennej budowie. Uzupełnieniem powyższej obserwacji jest przedstawiony poniżej rozkład wielkości porów (**Rysunek 13**), który także wskazuje na wzrastającą ilość większych porów w materiałach sieciowanych coraz wyższym stężeniem genipiny. Nieregularna struktura porów biomateriałów otrzymywanych w procesie liofilizacji jest głównie wynikiem sposobu przygotowania prób przed rozpoczęciem suszenia, w tym przede wszystkim temperaturowego profilu jej zamrażania. Podczas procesu liofilizacji dochodzi do sublimacji kryształów wody, w wyniku czego uzyskiwany jest materiał o strukturze porów odpowiadającej ich wielkości i kształtom [Hu i in. 2010]. Wszystkie

materiały przygotowywałem jednocześnie i w tych samych warunkach, dlatego też różnice w ich strukturze porów wynikają wyłącznie ze stężenia czynnika sieciującego.



**Rysunek 13.** Rozkład powierzchni przekroju porów materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, sieciowanych różnymi stężeniami genipiny: 0%, w/w Panel A; 0,5% w/w Panel B; 1,0% w/w Panel C; 2,0% w/w Panel D.

### 5.3.1.2. Stopień usieciowania.

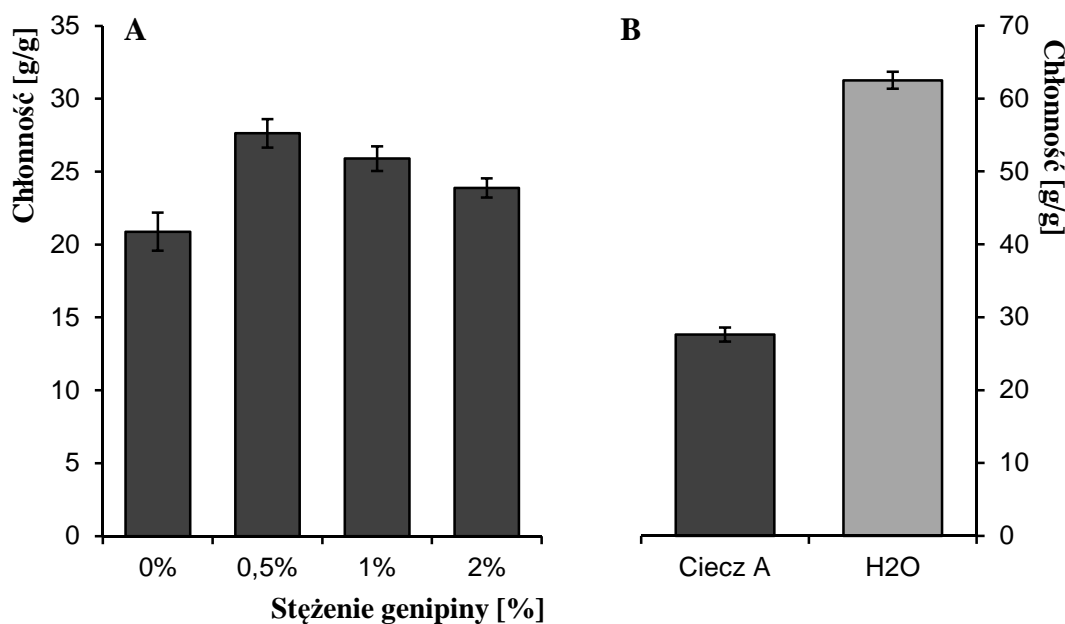
Przeprowadzone oznaczenia wykazały, że wraz z rosnącym stężeniem genipiny wykorzystanej przy otrzymywaniu materiałów chitozanowo-białkowych, rósł także stopień ich usieciowania (**Tabela 14, Materiały i Metody 4.2.4.3**). Zaobserwowana tendencja jest zgodna z oczekiwaniami, a także innymi wynikami uzyskiwanymi przy sieciowaniu materiałów zbudowanych z chitozanu i kolagenu [Yan i in. 2010]. Usieciowanie materiałów biopolimerowych jest procesem koniecznym do utrzymania ich właściwej struktury, właściwości funkcjonalnych, a także jest wykorzystywane przy modyfikowaniu profilu uwalniania związków aktywnych, jakie mogą być w nich inkorporowane. Wpływ sieciowania na wybrane właściwości materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych

z wykorzystaniem technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, przedstawiłem w punktach **Wyniki i Dyskusja 5.3.1)**

**Tabela 14.** Stopień usieciowania materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, sieciowanych różnymi stężeniami genipiny.

Stężenie genipiny [%, w/w]	Stopień usieciowania [%]
0,0	kontrola
0,5	7,29 ± 1,43
1,0	13,29 ± 1,94
2,0	27,64 ± 2,20

### 5.3.1.3. Chłonność / rozpuszczalność.



**Rysunek 14.** Chłonność materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, w zależności od użytego stężenia czynnika sieciującego (Panel A). Porównanie chłonności dla materiału sieciowanego 0,5% genipiną w wodzie i cieczy badawczej A (Panel B).

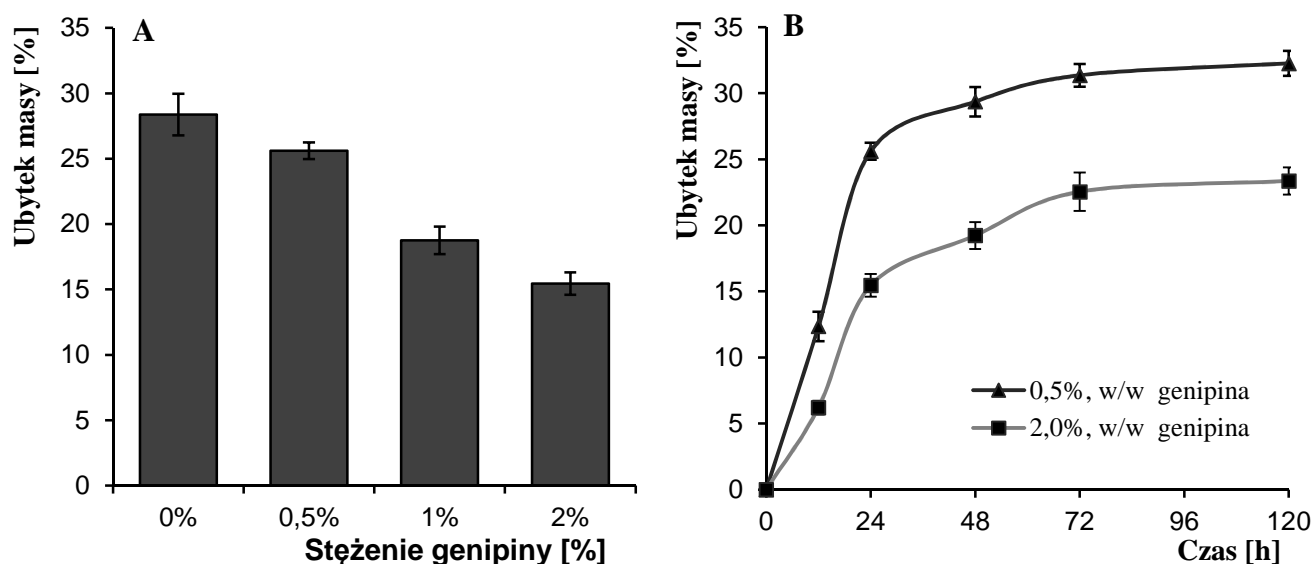
Chłonność oraz rozpuszczalność otrzymanych materiałów chitozanowo-białkowych wyznaczyłem zgodnie z metodologią przedstawioną w punkcie **Materiały i Metody 4.2.4.2.** Uzyskane wyniki wskazały na wyższą zdolność do wiązania cieczy przez materiały otrzymane z wykorzystaniem czynnika sieciującego, w stosunku do materiałów niesieciowanych (**Rysunek 14, Panel A**). Materiały bez jego dodatku w sposób istotny różniły się od pozostałych właściwościami mechanicznymi i nie były w stanie utrzymać swojej trójwymiarowej struktury zaraz po wyjęciu z badanego medium, co

najprawdopodobniej stanowiło przyczynę poczynionej obserwacji. Wszystkie sieciowane materiały były w stanie związać około 25 g Cieczy A, o składzie jonowym zbliżonym do wysięku z rany, na 1 gram swojej masy, przy czym zaobserwowałem spadek wartości tego parametru wraz ze wzrostem użytego stężenia genipiny. Jest to klasyczna sytuacja obserwowana podczas sieciowania materiałów biopolimerowych, gdzie na skutek wzrostu stopnia usieciowania maleje ilość wolnych grup hydrofilowych, zdolnych do oddziaływania z cząsteczkami wody. Na zdolność do wiązania cieczy, poza cechami samego badanego materiału, wpływ mają właściwości medium, w jakim przeprowadzane jest doświadczenie, a w przypadku biomateriałów zwłaszcza jego skład jonowy. Większość grup badawczych do charakterystyki chłonności materiałów, o deklarowanym zastosowaniu w regeneracji ubytków skórnych, wykorzystuje wodę bądź bufor fosforanowy [Lin i in. 2009, Yang i in. 2010]. Oba media nie zawierają jednak istotnych składników obecnych w wysięku z rany, jakie mogą wpływać na zdolność do wiązania cieczy badanych materiałów, zwłaszcza kationów poliwalentnych. Przeprowadzone przeze mnie porównanie chłonności gąbek chitozanowo-białkowych sieciowanych za pomocą genipiny w stężeniu 0,5%, w/w względem Cieczy A, a wodą destylowaną, wskazuje na ponad dwukrotne ograniczenie zdolności do wiązania cieczy gdy są w niej obecne kationy dwuwartościowe (**Rysunek 14, Panel B**). Ciecz A jest to bowiem medium o składzie jonowym zbliżonym do wysięku wydobywającego się z rany, przy czym zawiera ona jony wapnia w stężeniu 3,3 mM (PN-EN 13726-1: 2005). Mechanizm odpowiadający za ograniczenie chłonności biomateriałów w obecności kationów dwuwartościowych został poznany i związany jest z oddziaływaniami prowadzącymi do sieciowania jonowego [Sadeghi i in. 2010]. Przeprowadzone porównanie podkreśla znaczenie doboru właściwego medium badawczego dla wybranego zastosowania. Zdolność do wiązania cieczy jest bardzo ważnym parametrem służącym ocenie przydatności matryc wykorzystywanych w inżynierii tkankowej. Wykazano m.in., że dobra ich chłonność wspomaga proces regeneracji rany, poprzez utrzymanie wilgotnego środowiska rany [Jones i in. 2001]. Ponadto materiały o wyższych właściwościach sorpcyjnych mogą być zmieniane rzadziej, co może przyczynić się do obniżenia kosztów leczenia. Opisane w tym punkcie materiały chitozanowo-białkowe cechowały się porównywalną zdolnością do wiązania wody do materiałów otrzymanych i scharakteryzowanych w punkcie **Wyniki i Dyskusja 5.2.1, Rysunek 10**, choć otrzymałem je wówczas według standardowych procedur z wykorzystaniem aldehydu glutarowego jako czynnika sieciującego.

Zaawansowane materiały wykorzystywane w regeneracji ran skórnych poza zdolnością do utrzymywania wilgotnego środowiska i różnymi właściwościami funkcyjnymi, powinny sprawować także pierwotną funkcję okrywającą, a to z kolei wymaga od takich materiałów by zachowywały swoją strukturę i integralność w trakcie okresu ich wykorzystywania. Degradacja matryc biopolimerowych, zwłaszcza na skutek rozpuszczania, jest głównym procesem, jaki może doprowadzić do utraty ich wyjściowej struktury. Ubytek masy materiałów chitozanowo-białkowych sieciowanych różnymi stężeniami genipiny na skutek degradacji zachodzącej podczas dwudziestoczterogodzinnej inkubacji w Cieczy A,



przedstawiłem na **Rysunku 15, Panel A**. Zgodnie z oczekiwaniami wraz ze wzrostem użytego stężenia czynnika sieciującego otrzymywałem materiały o coraz mniejszej rozpuszczalności. Uzyskane wyniki są bezpośrednim skutkiem wzrastającego stopnia ich usieciowania (**Tabela 14**). W przeciwieństwie do materiałów niezawierających genipiny, dodatek czynnika sieciującego spowodował, że materiały te były w stanie utrzymać swoją trójwymiarową strukturę oraz integralność zaraz po wyjęciu z badanego medium. Dodatek genipiny na poziomie 2,0%, w/w względem suchej masy biopolimerów, ograniczył rozpuszczalność materiałów chitozanolowo-białkowych niemal o połowę, w stosunku do materiałów niesieciowanych (odpowiednio 15,5 i 28,4%). Profil rozpuszczania, wyznaczony w trakcie pięciodniowego testu wskazał natomiast, że zarówno materiały sieciowane 0,5 jak i 2,0%-wym stężeniem genipiny uzyskiwały maksymalną rozpuszczalność po około 72h godzinach (**Rysunek 15, Panel B**).



**Rysunek 15.** Rozpuszczalność materiałów chitozanolowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanolu w wodzie, w zależności od użytego stężenia czynnika sieciującego (Panel A). Profil rozpuszczania dla materiałów sieciowanych 0,5% i 2,0%-wym stężeniem genipiny (Panel B).

Chitozan i kolagen są polimerami, które nie rozpuszczają się w wodzie. W związku z tym ubytek masy otrzymywanych przez mnie materiałów chitozanolowo-białkowych spowodowany jest głównie rozpuszczaniem zawartej w nich żelatyny. Może na to wskazywać porównywalna wartość ubytku masy po osiągnięciu stanu równowagi materiałów sieciowanych 0,5% genipiną z ilością zawartej w tych materiałach żelatyny (32,3 i 36%, w/w). W warunkach prowadzonego doświadczenia mogło jednak dochodzić do denaturacji kolagenu, gdyż temperatura medium w jakim prowadziłem test, utrzymywana była na poziomie 37°C. Kolagen mógł więc częściowo tracić swoją trzeciorzędową strukturę i być w ten sposób bardziej podatny na rozpuszczanie. Dlatego też mechanizm rozpuszczania otrzymanych przez mnie materiałów chitozanolowo-białkowych, związany jest głównie z rozpuszczaniem zawartych w nich białek.

#### 5.3.1.4. Transmisja par wilgoci.

Zapewnienie właściwego, promującego proces regeneracji rany, wilgotnego środowiska wymaga od idealnego materiału opatrunkowego nie tylko dużej zdolności do wiązania wydobywającego się z niej wysięku, lecz także utrzymania odpowiedniej przepuszczalności par wilgoci. Normalne tempo utraty wody przez skórę jest równe około 200 g/m<sup>2</sup> dziennie i rośnie przy jej uszkodzeniu nawet do poziomu powyżej 5000 g/m<sup>2</sup> [Mi i in. 2001]. Przeprowadzone przeze mnie oznaczenie przepuszczalności dla pary wodnej materiałów chitozanowo-białkowych wykazało, że wszystkie otrzymane materiały są przepuszczalne względem par wilgoci i cechują się wartością tego parametru na poziomie 400 g/m<sup>2</sup> (Tabela 15, Materiały i Metody 4.2.4.5). Otrzymane materiały nie wpływają zatem na normalne tempo utraty wody przez skórę. Nie zaobserwowałem wpływu stopnia usieciowania na wartość mierzonego parametru.

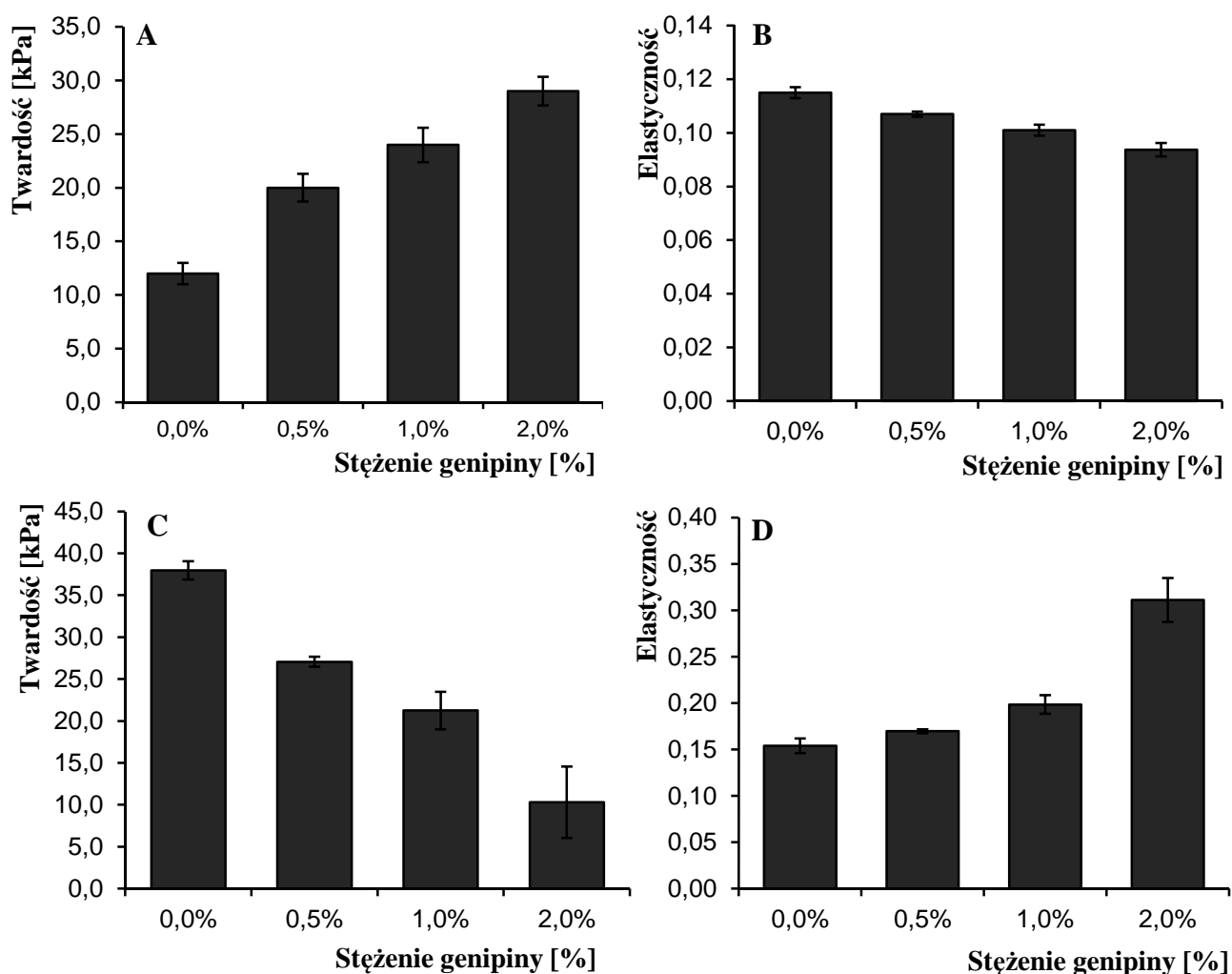
**Tabela 15.** Transmisja par wilgoci (WVTR) materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, sieciowanych różnymi stężeniami genipiny.

Stężenie genipiny [% , w/w]	WVTR [g/(h x m <sup>2</sup> )]
0,0	17,52 ± 0,54
0,5	17,83 ± 0,76
1,0	16,95 ± 0,55
2,0	17,02 ± 0,89

#### 5.3.1.5. Profil tekstury.

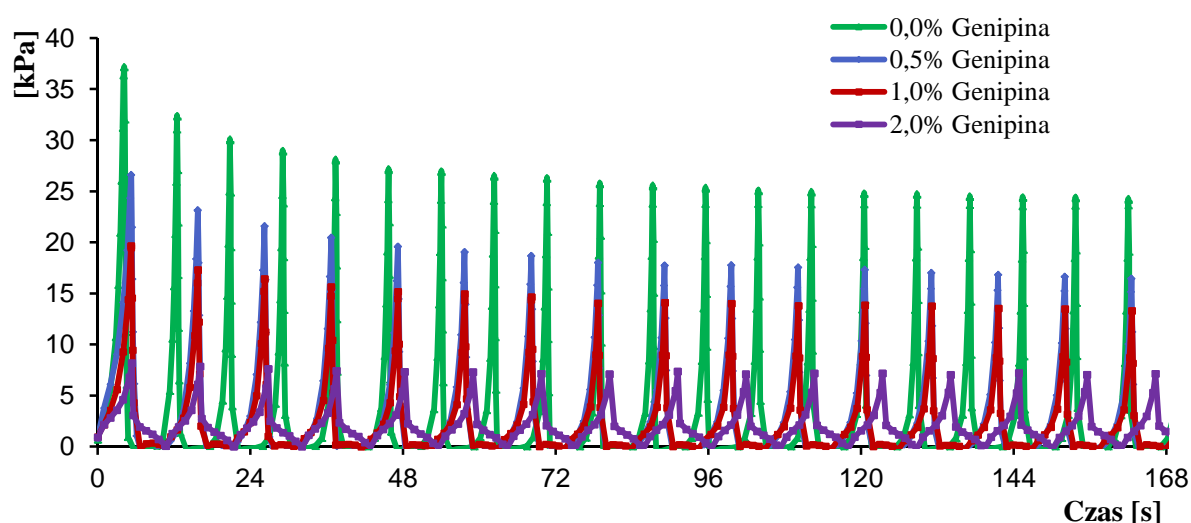
Właściwości mechaniczne materiałów gąbczastych scharakteryzowałem zgodnie z metodyką przedstawioną w części eksperymentalnej w oparciu o wartości dwóch parametrów profilu tekstury: twardości oraz elastyczności (Materiały i Metody 4.2.4.4). Wartość siły niezbędna do ściśnięcia otrzymanych materiałów chitozanowo-białkowych do połowy ich wysokości, opisująca zarazem parametr twardości, wzrastała wraz ze wzrostem użytego stężenia genipiny, odpowiednio z poziomu 12,11 kPa do 29,17 kPa dla materiałów niesieciowanych i sieciowanych 2,0% genipiną (Rysunek 16, Panel A). Jednocześnie obserwowałem spadek elastyczności badanych materiałów (Rysunek 16, Panel B). Wzrost twardości i spadek elastyczności powinien być tłumaczony rosnącą gęstością wiązań chemicznych pomiędzy grupami aminowymi wykorzystanych biopolimerów, na skutek bardziej intensywnych reakcji sieciowania. Uzyskany wynik kłóci się jednak z wynikami z oceny morfologii badanych materiałów, gdzie wykazałem, że wraz z rosnącym stężeniem genipiny rosła ich porowatość, a także wielkość porów (Rysunek 12). Podczas ściskania materiałów porowatych znaczna część odkształcenia związana jest z odkształcaniem porów wypełnionych powietrzem, co decyduje o mniejszej wartości siły niezbędnej do odkształcenia

materiałów o większej porowatości. Profil tekstury materiałów porowatych jest jednak wypadkową działania dwóch głównych czynników: porowatości, której wzrost wywołuje ujemny wpływ na wartość twardości oraz wpływającego pozytywnie stopnia usieciowania [Bi i in. 2011]. W przypadku otrzymanych przez ze mnie materiałów wpływ porowatości musiał być zatem słabszy niż wpływ stopnia usieciowania, co może tłumaczyć uzyskane wyniki. Z kolei pomiar parametrów profilu tekstury dla tych samych materiałów po inkubacji w cieczy badawczej A wskazał, że tym razem materiały niesieciowane wykazywały najwyższą twardość i jednocześnie najniższą elastyczność (**Rysunek 16, Panel C i D**). Odwrócenie zależności pomiędzy mierzonymi parametrami profilu tekstury, a stopniem usieciowania tych materiałów nastąpiło na skutek zmiany warunków kondycjonowania próbek. W nowych warunkach pory materiałów wypełnione zostały wodą, tworząc zwartą hydrokoloidową strukturę, w której to tym razem porowatość musiała wywierać dominujący wpływ na wartości parametrów profilu tekstury.



**Rysunek 16.** Wartości parametrów profilu tekstury materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, sieciowanych różnym stężeniem genipiny; twardość elastyczność dla próbek suchych (Panel A i B) i mokrych (Panel C i D).

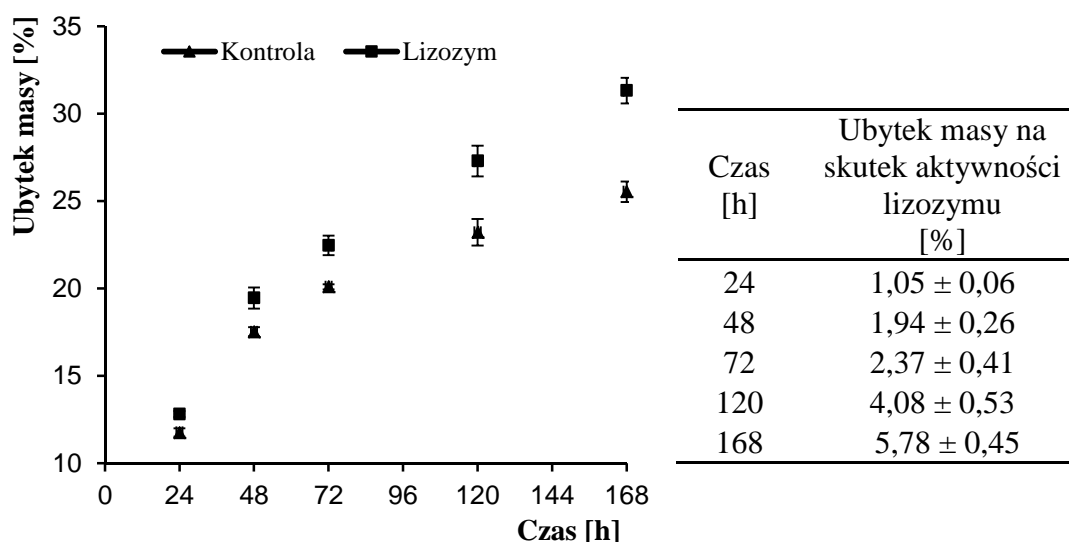
W celu określenia wytrzymałości otrzymanych materiałów w warunkach ich docelowego wykorzystywania, przeprowadziłem dodatkowo test, polegający na dwudziestopięciokrotnym ścisaniu materiałów, po preinkubacji w wodnym roztworze Cieczy A, do połowy ich wysokości (**Rysunek 17**). Wszystkie badane materiały utrzymywały na stałym poziomie wartość siły niezbędnej do ich odkształcania, przy niewielkim spadku obserwowanym po pierwszych kilku ściśnięciach. Materiały sieciowane zachowały też swoją przestrzenną strukturę, tracąc jedynie około 6% związanej początkowo cieczy A, podczas gdy ubytek masy dla materiałów niesieciowanych wyniósł około 40%. Ponieważ materiały niesieciowane utraciły także połowę swojej pierwotnej wysokości uznałem, że to właśnie materiały sieciowane genipiną cechują się odpowiednią wytrzymałością dla wybranego zastosowania.



**Rysunek 17.** Wynik testu wytrzymałościowego dla materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, sieciowanych różnym stężeniem genipiny (materiały po 24 h inkubacji w cieczy A).

### 5.3.1.6. Degradacja enzymatyczna – lizozym.

Do dalszej oceny właściwości materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie wybrałem materiał o subiektywnie najlepszych według mnie właściwościach chłonności, rozpuszczania i profilu tekstury względem wybranego zastosowania. Materiałem tym była gąbka chitozanowo-białkowa sieciowana za pomocą genipiny w stężeniu 0,5%, w/w względem suchej masy biopolimerów. Było to najniższe stężenie genipiny, przy jakim materiały utrzymywały swoją integralną strukturę, zarówno w czasie przechowywania jak i po związaniu maksymalnej ilości cieczy, zapewniając jednocześnie najwyższą chłonność i rozpuszczalność, a także najmniej intensywny odcień niebieskiego zabarwienia – co może być istotne dla końcowego użytkownika takiego materiału. Zmianę ubytku masy dla badanego materiału podczas testu trwającego pięć dni, zarówno w obecności lizozymu, jak i bez jego dodatku, przedstawiłem na **Rysunku 18**.



**Rysunek 18.** Wpływ aktywności hydrolitycznej lizozymu na ubytek masy materiałów chitozanowo-białkowych, otrzymanych z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, sieciowanych 0,5% (w/w) genipiną.

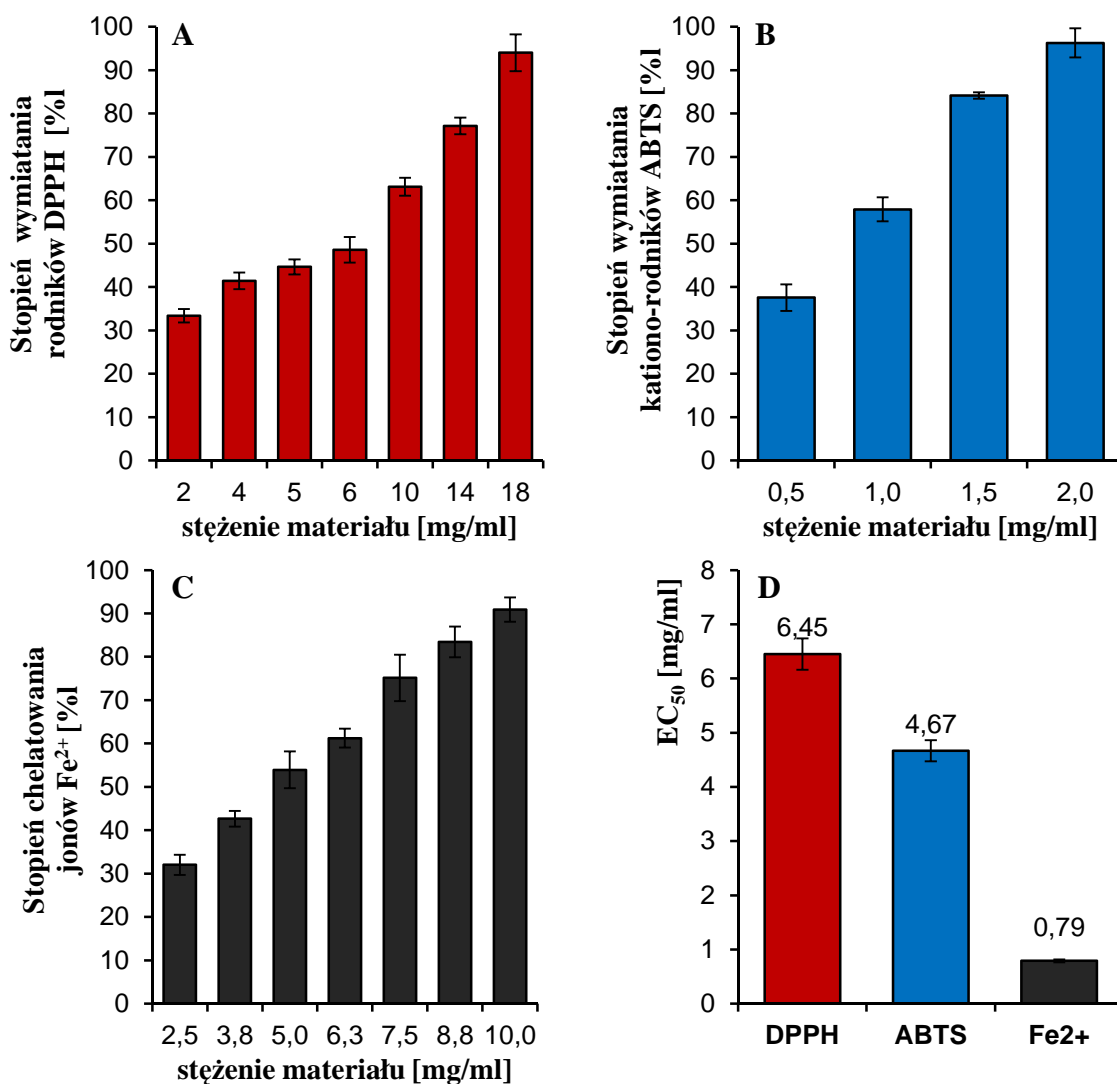
Wartości w tabeli przedstawiają natomiast wartość utraty masy spowodowaną wyłącznie aktywnością hydrolityczną wykorzystanego enzymu. Dobór właściwego stężenia lizozymu jest kluczowym elementem w ocenie zachowania matrycy w warunkach jej wykorzystania. Wielu autorów projektując tożsame doświadczenie, powołuje się na stężenie lizozymu znajdującego się w osoczu ludzkiej krwi, niemniej jednak żaden z nich nie odnosi się do jego aktywności specyficznej, a to ten właśnie parametr odpowiada za właściwą aktywność każdego z enzymów. W przeprowadzonym doświadczeniu wykorzystałem dane zawarte w pracy Hasmann'a, w której autor wyznaczył aktywność wielu preparatów lizozymu wyizolowanych z różnego rodzaju ran skórnych (średnio na poziomie 4000 jednostek/ml) [Hasmann i in. 2011], co powinno w lepszy sposób odzwierciedlać rzeczywiste warunki wykorzystywania materiałów. Z doświadczenia wynika, że obecność lizozymu w sposób istotny nie wpłynęła na utratę masy badanych materiałów w pierwszych dniach prowadzenia testu. Istotną różnicę zaobserwowałem natomiast po piątym i siódmym dniu, po których materiały utraciły odpowiednio ok. 4 i 6% swojej masy na skutek hydrolitycznej aktywności lizozymu. Większa wrażliwość na działanie enzymatyczne może być uwarunkowana większą rozpuszczalnością materiału, w wyniku której enzym łatwiej dyfundował do jego wnętrza. Uzyskane wyniki są porównywalne z poziomem biodegradacji materiałów chitozanowo-białkowych, jakie otrzymałem według standardowej procedury w celu określenia wpływu rodzaju użytego biopolimeru na wybrane właściwości materiałów chitozanowo-białkowych (**Rysunek 10, Panel C**).

Wydłużenie czasu ekspozycji na działanie lizozymu mogłoby spowodować dalszy ubytek masy, co wykazali wcześniej Tangsadthakun i in. porównując właściwości porowatych materiałów chitozanowo-kolagenowych otrzymanych według standardowych procedur, sieciowanych za pomocą procesu dehydratacji termicznej [Tangsadthakun i in. 2006]. Otrzymane wówczas, w wyniku połączenia 0,5% roztworu kolagenu (typ I, skora

wieprzowa) i 0,5% roztworu chitozanu, materiały chitozanowo-kolagenowe utraciły około 20% swojej masy na skutek dwudziestosiedmiodniowej inkubacji w buforze fosforanowym zawierającym lizozym w stężeniu 1,6 µg/ml.

### 5.3.1.7. Właściwości przeciwutleniające.

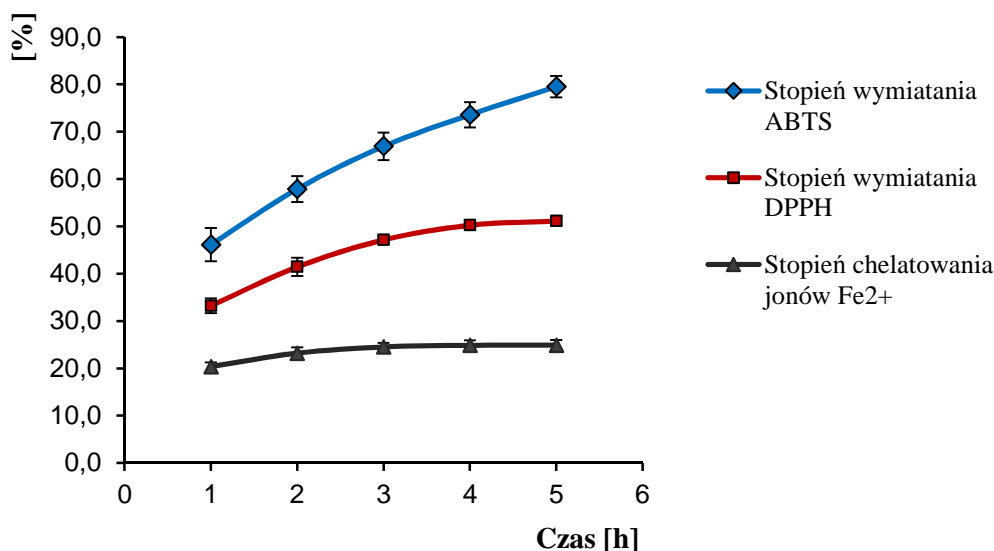
Do oceny przeciwutleniających właściwości materiałów chitozanowo-białkowych, otrzymanych z wykorzystaniem technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, wykorzystałem trzy powszechnie stosowane testy: test DPPH, ABTS i zdolność do chelatowania jonów  $\text{Fe}^{2+}$  (**Materiały i Metody 4.2.4.7-9**). Mechanizm wybranych testów przedstawiłem wcześniej, dokonując analizy wpływu rodzaju biopolimeru na aktywność przeciwutleniającą otrzymanych z nich materiałów chitozanowo-białkowych, przy czym materiały te otrzymałem wykorzystując wówczas standardową procedurę (**Wyniki i Dyskusja 5.2.1**). Ocenie poddałem materiały chitozanowo-białkowe usieciowane genipiną przy stężeniu 0,5%, w/w względem suchej masy biopolimerów. **Rysunek 19, Panele A1-A3**, przedstawiają zależność wartości mierzonych parametrów, odpowiednio dla stopnia wymiatania rodnika DPPH, stopnia wymiatania kationo-rodnika ABTS oraz stopnia chelatowania jonów  $\text{Fe}^{2+}$  od masy badanego materiału. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że wybrany materiał chitozanowo-białkowy może efektywnie neutralizować wolne rodniki DPPH, kationo-rodniki ABTS, jak również chelatować dwuwartościowe jony żelaza. We wszystkich trzech testach uzyskałem liniową odpowiedź mierzzonego parametru wobec stężenia materiału w badanym roztworze. Wyniki te wykorzystałem do wyznaczenia parametrów  $\text{EC}_{50}$  (**Rysunek 19, panel B**), określających masę próby materiału, jaka powoduje neutralizację wolnego rodnika, kationo-rodnika bądź chelatowanie jonów  $\text{Fe}^{2+}$  w 50% w czasie 2 godzin od momentu rozpoczęcia testów. Ten sposób reprezentacji wyników pozwala na bezpośrednie porównania pomiędzy różnymi materiałami. W rezultacie materiały otrzymane według nowej procedury cechowały się wartościami  $\text{EC}_{50}$  na poziomie 6,45 mg/ml, 0,79 mg/ml oraz 4,67 mg/ml odpowiednio dla zdolności do wymiatania rodnika DPPH oraz kationo-rodnika ABTS i stopnia chelatowania jonów  $\text{Fe}^{2+}$ . Wartości te są porównywalne z wynikami uzyskanymi dla materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych według standardowej procedury (**Rysunek 10, Panel C**). Mogę, więc stwierdzić, że zaproponowana nowa metoda otrzymywania materiałów chitozanowo-białkowych nie wpływa w sposób znaczący na ich właściwości przeciwutleniające. Dokonując charakterystyki omawianej cechy wykazałem także, że stopień wymiatania wolnych rodników DPPH, jak również kationo-rodników ABTS dla badanych materiałów (przy zadanej naważce) jest zależny od czasu prowadzenia doświadczenia (**Rysunek 20**), przy czym w przypadku testu DPPH wskazana zależność ma charakter logarytmiczny, a w przypadku testu ABTS zaobserwowałem zależność zbliżoną do liniowej. Tożsamą obserwację poczyniła Lisek, badając właściwości przeciwutleniające materiałów chitozanowo-białkowych o różnej zawartości użytych biopolimerów, w ramach wykonywanej pod moją opieką pracy magisterskiej [Lisek, 2013].



**Rysunek 19.** Ocena stopnia wymiatania wolnych rodników DPPH (Panel A), kationo-rodników ABTS (Panel B) oraz stopnia chelatowania jonów Fe<sup>2+</sup> (Panel A), dla materiałów chitozanowo-białkowych, otrzymanych z wykorzystaniem technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, sieciowanych genipiną w stężeniu 0,5% (w/w). Wartości EC<sub>50</sub> dla poszczególnych testów (Panel D).

Rola wolnych rodników i wpływ substancji przeciwutleniających na proces leczenia rany jest jednym z najbardziej aktualnych tematów w wyznaczaniu nowych strategii leczenia [Fitzmaurice i in. 2011]. Spośród wielu czynników wpływających na opóźnienia w procesie regeneracji ubytku skórno-te, związane z występowaniem i skutkami stresu oksydacyjnego okazały się mieć duże znaczenie. Z tego powodu uważa się, że nowoczesny materiał opatrunkowy poza funkcjami typowymi dla materiałów tradycyjnych, powinien zapewniać odpowiednią równowagę pomiędzy siłami utleniającymi a siłami przeciwutleniającymi. Wykazano bowiem, że zarówno nadmiar wolnych rodników, jak i ich całkowita neutralizacja prowadzi do zaburzenia prawidłowego przebiegu gojenia rany [Roy i in. 2006, Sen 2003]. Otrzymane przeze mnie materiały charakteryzują się zdolnością do neutralizacji rodników DPPH i kationo-rodników ABTS, na dużo niższym poziomie w stosunku do niskocząsteczkowych związków przeciwutleniających takich jak glutation, witamina E,

witamina C i flawonoidy, dla których wartości  $EC_{50}$  zawarte są na poziomie  $\mu\text{g/ml}$ . To czy materiały chitozanowo-białkowe otrzymane z wykorzystaniem zaproponowanej metodologii, będą w stanie zapewnić odpowiednie środowisko oksydo-redukcyjne dla właściwego procesu regeneracji ran, wymaga jednak przeprowadzenia dalszych testów, z wykorzystaniem badań na zwierzętach bądź przeprowadzenia stosownych oznaczeń na etapie badań klinicznych.

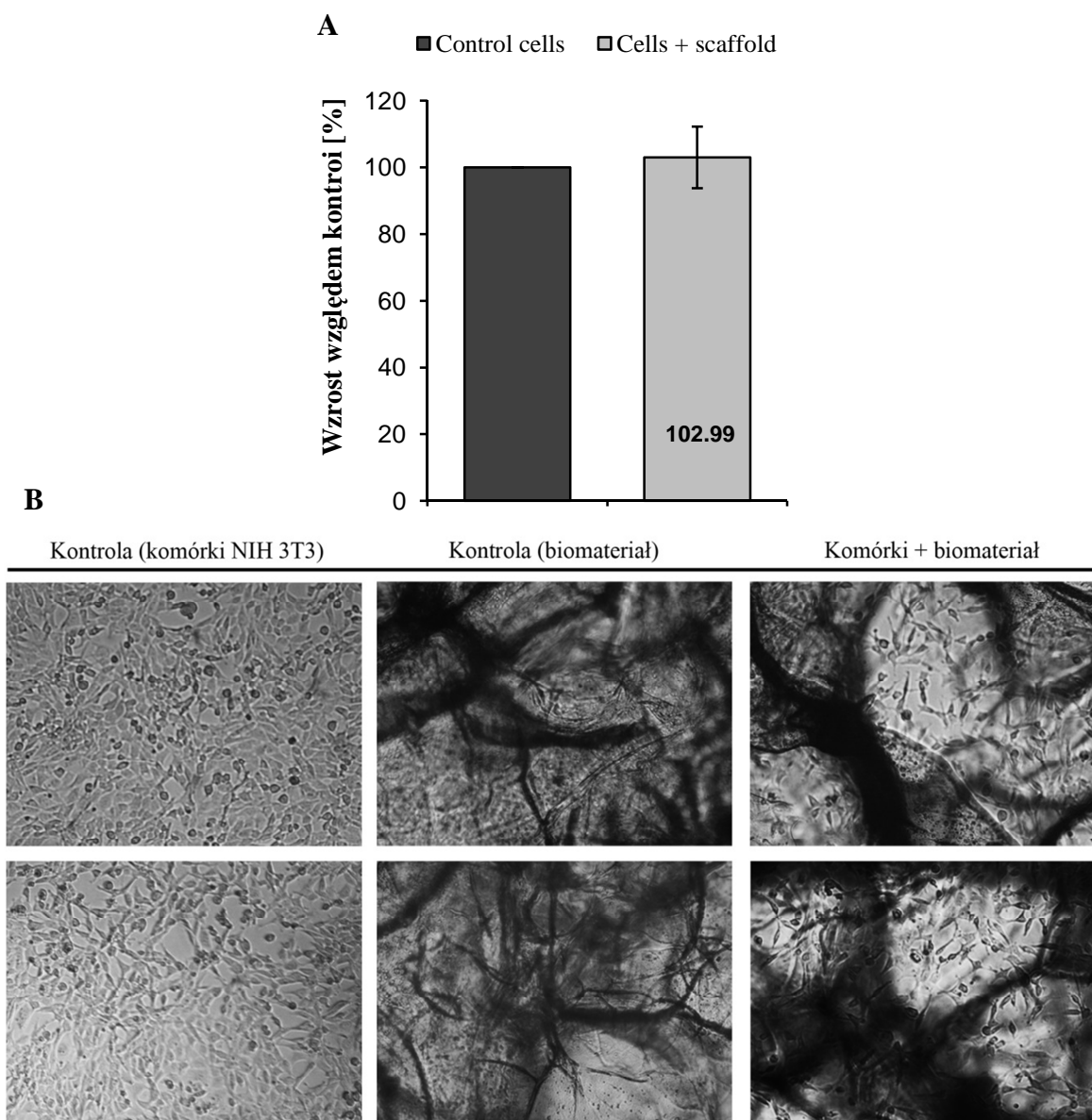


**Rysunek 20.** Zależność stopnia wymiatania wolnych rodników DPPH, kationo-rodników ABTS oraz stopnia chelatowania jonów  $\text{Fe}^{2+}$  od czasu prowadzenia doświadczenia, dla materiałów chitozanowo-białkowych, otrzymanych z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, sieciowanych genipiną w stężeniu 0,5% (w/w) (naważka 5 mg / 5 ml).

### 5.3.1.8. Cytotoksyczność względem komórek NIH-3T3.

Cytotoksyczny efekt związany z działaniem otrzymanych materiałów chitozanowo-białkowych określiłem względem mysich komórek fibroblastów (NIH-3T3) z wykorzystaniem testu MTT (**Materiały i Metody 4.2.4.10**). Jest to standardowa metoda *in vitro*, która opiera się na pomiarze aktywności mitochondrialnej żywych komórek [Pariente i in. 2001]. Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że obecność badanego materiału nie wpłynęła w sposób znaczący na żywotność komórek w czasie 72 godzin prowadzenia doświadczenia (**Rysunek 21, Panel A**). Na podstawie analizy mikroskopowej stwierdziłem, że materiał chitozanowo-białkowy nie wpłynął także na morfologię wzrastających komórek (**Rysunek 21, Panel B**), przy czym te wzrastały równomiernie zarówno w porach materiału, jak i w podłożu dookoła niego. Tym samym wykazałem, że zaproponowana metoda otrzymywania materiałów chitozanowo-białkowych, prowadzi do otrzymania materiałów o braku cytotoksyczności względem mysich komórek fibroblastów bez konieczności prowadzenia etapu ich płukania w celu usunięcia resztkowej zawartości kwasu octowego.





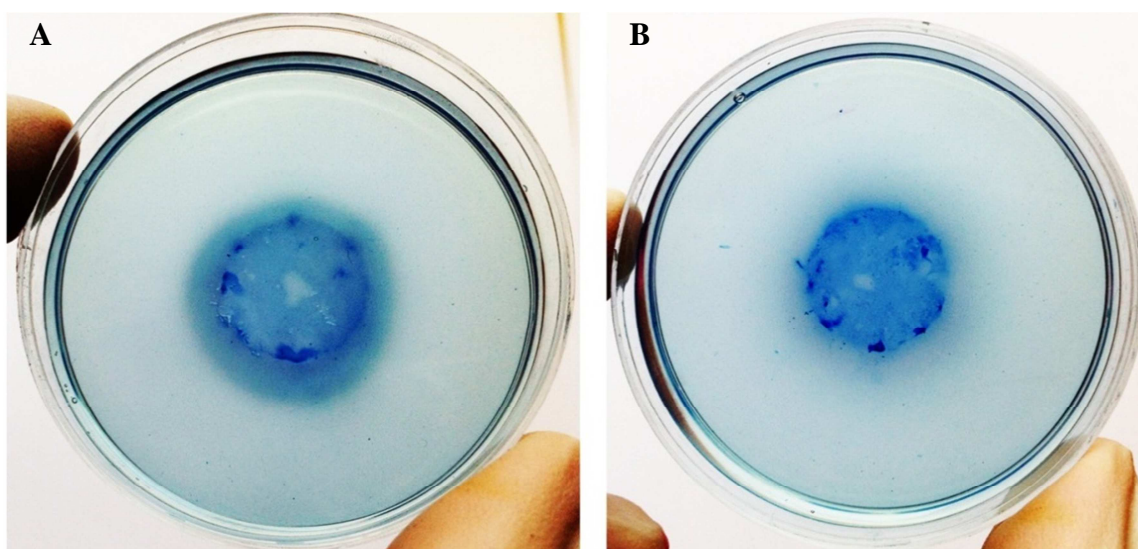
**Rysunek 21.** Wyniki testu MTT dla materiału chitozanowo-białkowego, otrzymanego z wykorzystaniem nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie, sieciowanych genipiną w stężeniu 0,5% (w/w) (Panel A). Zdjęcia mikroskopowe (powiększenie x150), komórek bez obecności materiału (kontrola komórki NIH3T3), materiału bez obecności komórek (kontrola biomateriał) oraz komórek wzrastających w obecności badanego materiału (komórki + biomateriał) (Panel B).

#### 5.4. Wykorzystanie materiałów chitozanowo-białkowych jako matrycy do inkorporacji lizostafiny.

W celu wykazania przydatności zaproponowanej metody rozpuszczania chitozanu, jak i samych materiałów chitozanowo-białkowych jako matrycy do inkorporacji lizostafiny, przygotowałem szereg układów o różnej jej zawartości i różnym stopniu usieciowania (**Materiały i Metody 4.2.3**). Lizostafina dodawana była do wodnego roztworu chitozanu, uzyskiwanego na etapie **6.C.**, **Rysunek 5**.

#### 5.4.1. Ocena uwalniania lizostafiny z materiałów chitozanowo-białkowych.

Oceny uwalniania lizostafiny z materiałów chitozanowo-białkowych dokonałem z wykorzystaniem metody dyfuzyjnej oraz metody spektrofotometrycznej (**Materiały i Metody 4.2.4.11**). Na **Rysunku 22** przedstawiłem wynik dla wybranego doświadczenia ukazującego dyfuzję enzymu z materiału sieciowanego 0,5% genipiną, zawierającego 10 U/ml lizostafiny (**Tabela 8, próba nr 2**) umieszczonego na 2%-wym podłożu agarozowym (**Panel A**). Wyraźna strefa o niebieskim zabarwieniu, będąca wynikiem barwienia podłoża po 24h inkubacji w 37<sup>o</sup>C roztworem Bradford, w odniesieniu do próby kontrolnej (materiału niezawierającego enzymu, **Panel B**) wskazuje, że w zaproponowanych warunkach doszło do dyfuzji lizostafiny z badanego materiału. Intensywne niebieskie zabarwienie w miejscu styku obu badanych materiałów chitozanowo-białkowych z podłożem agarozowym jest wynikiem dyfuzji białek będących elementami matrycy chitozanowo-białkowej (żelatyny i kolagenu). W warunkach prowadzonego doświadczenia, na skutek zwilżania materiałów buforem fosforanowym, dochodziło do częściowego rozpuszczania matrycy i w związku z tym dyfuzji białek o różnych masach cząsteczkowych. Niewielka strefa niebieskiego zabarwienia wokół materiału kontrolnego wskazuje, że w wyniku tego procesu do podłoża przedostawały się niewielkie ilości białek matrycy chitozanowo-białkowej o przypuszczalnie wyższej masie cząsteczkowej niż masa cząsteczkowa lizostafiny. Szczegółową charakterystykę uwalniania enzymu ze wszystkich otrzymanych materiałów z wykorzystaniem metody dyfuzyjnej przeprowadziłem badając ich aktywność względem szczepu *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

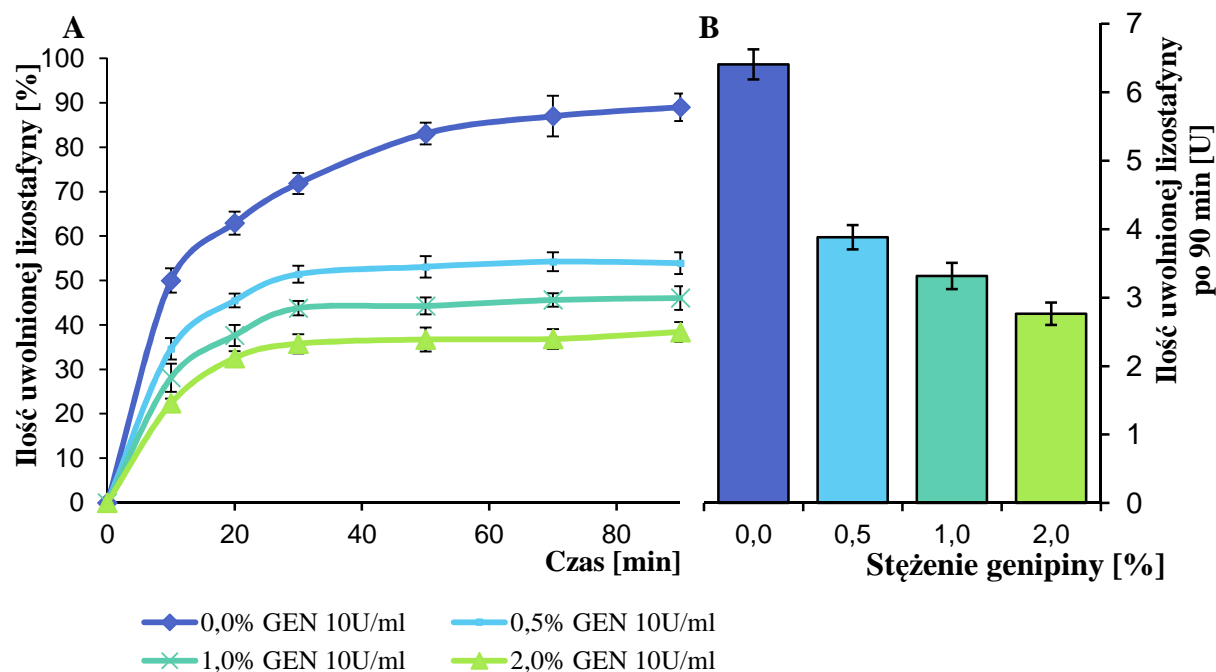


**Rysunek 22.** Dyfuzja lizostafiny z materiału chitozanowo-białkowego sieciowanego 0,5% w/w genipiną zawierającego lizostafinę w ilości 10 U/ml względem roztworu polimerów (**Panel A**). Kontrola – materiał niezawierający lizostafiny (**Panel B**).

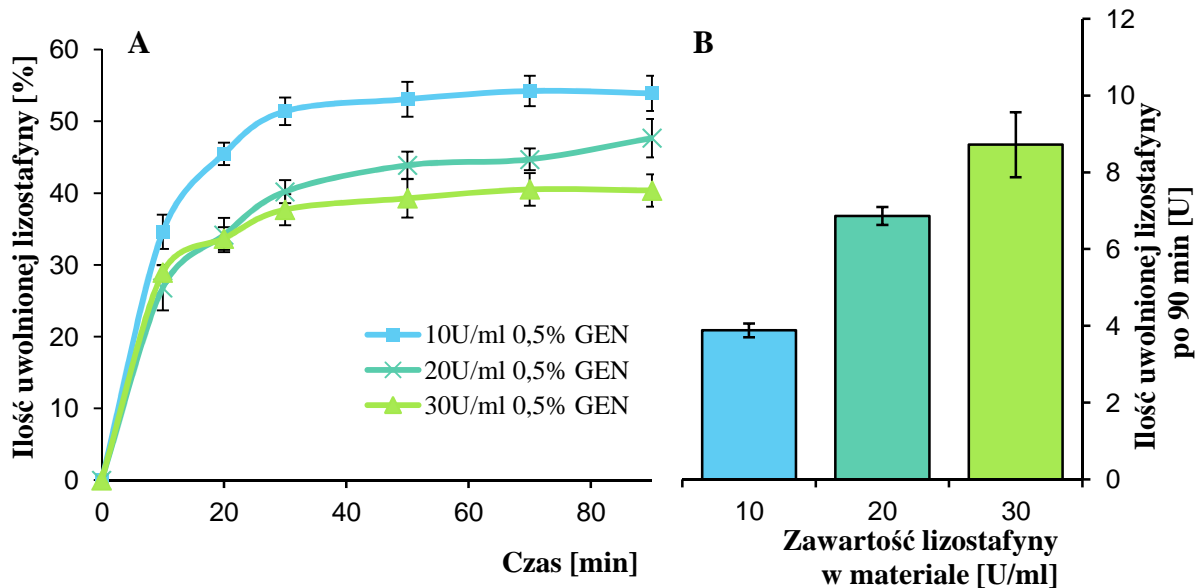
Do ilościowej oceny uwalniania lizostafiny z materiałów chitozanowo-białkowych wyznaczyłem profile jej uwalniania z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej (**Materiały i Metody 4.2.4.11**). Zaproponowana metoda jest metodą pośrednią polegającą na

miarze aktywności bakteriologicznej względem szczepu *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), pobieranych w równych odstępach czasu prób medium, do którego następowało uwalnianie lizostafiny. Mierzyłem tym samym ilość enzymu w jednostkach jego aktywności. W doświadczeniu nie mogłem wykorzystać bezpośrednich metod oznaczania stężenia białka, ze względu na obecność białek tła (kolagenu i żelatyny) uwalnianych równocześnie z badanych matryc na skutek ich rozpuszczania. Badanie przeprowadziłem dla materiałów o różnej zawartości enzymu i genipiny użytej przy ich sieciowaniu, dzieląc je na dwie grupy: 1) materiały otrzymane przy stałym stężeniu lizostafiny (10 U/ml) a różnym stężeniu genipiny (0,0%, 0,5%, 1,0% i 2,0%, w/w względem masy biopolimerów) (**Rysunek 23**); 2) materiały otrzymane przy stałym stężeniu genipiny (0,5%, w/w względem masy biopolimerów), a różnej zawartości lizostafiny (0, 10, 20 i 30 U/ml) (**Rysunek 23, Panel B**). Uzyskane wyniki wykazały, że zaproponowana metoda otrzymywania matryc chitozanolobiałkowych z inkorporowaną lizostafiną pozwala utrzymać aktywność biologiczną lizostafiny, przy czym w warunkach otrzymywania nie dochodziło do całkowitego jej unieruchomienia, a kinetyka jej uwalniania zależna była zarówno od stężenia użytej do sieciowania genipiny, jak również początkowego stężenia enzymu. W przypadku materiału niesieciowanego (**Tabela 8, próba nr 5**) uwolnieniu uległo prawie 90% zawartej w materiałach lizostafiny, w ciągu 90 minut od rozpoczęcia oznaczeń. Wzrost stężenia czynnika sieciującego spowodował wyraźne ograniczenie tego zjawiska do poziomów 50, 40 i 30% odpowiednio dla materiałów sieciowanych 0,5, 1,0 i 2,0% genipiną (**Rysunek 23; Tabela 8, próby nr 2,6,7**). Zaobserwowany wzrost retencji czynnika aktywnego, wraz ze wzrostem stężenia genipiny, jest wypadkowym wynikiem działania dwóch zjawisk: 1). rozpuszczania matrycy chitozanolobiałkowej oraz 2). stopnia unieruchomienia enzymu w strukturze materiału. Przeprowadzone wcześniej badania rozpuszczalności materiałów chitozanolobiałkowych wykazały, że wraz ze wzrostem stężenia genipiny rozpuszczalność badanych materiałów malała, a różnica w ubytku masy dla materiałów sieciowanych przy stężeniu genipiny równym 0,5 i 2,0% wynosiła ok. 10% po 24h inkubacji (**Wyniki i Dyskusja 5.3.1.3, Rysunek 15**). Większa rozpuszczalność matrycy powoduje, że zawarty czynnik aktywny w rozpuszczanym jej fragmencie przedostaje się do roztworu szybciej, niż by to wynikało wyłącznie z kinetyki procesów dyfuzyjnych. Drugi mechanizm retencji związany jest z możliwością trwałego unieruchomienia enzymu z matrycą za pośrednictwem cząsteczek genipiny, na skutek reakcji sieciujących. Lizostafyna zawiera w swojej strukturze 37 reszt lizyny (ok. 7,5% z całości) [Szweda i in. 2005], których wolne grupy aminowe mogą być dostępne w procesie ich wzajemnego sieciowania z grupami aminowymi polimerów budujących szkielet materiałów (chitozaniem, kolagenem i żelatyną). Wraz ze wzrostem stężenia czynnika sieciującego wzrastało zatem prawdopodobieństwo zwiększenia częstości zdarzeń prowadzących do utworzenia kowalencyjnych wiązań pomiędzy cząsteczkami lizostafiny a łańcuchami polimerów, co bezpośrednio prowadziło do zwiększenia stopnia jej unieruchomienia i zmniejszenia puli dostępnej do uwalniania. Zasugerowane mechanizmy związane z retencją lizostafiny mogą potwierdzać wysokie współczynniki korelacji liniowej

między ilością lizostafiny uwolnionej po 90 minutach prowadzonego doświadczenia a stopniem rozpuszczenia materiału chitozanowo-białkowego i stopniem usieciowania tych materiałów (odpowiednio 0,96 i 0,94) dla materiałów sieciowanych genipiną w zakresie 0,5-2,0%, w/w względem masy polimerów. Ocena profilu uwalniania enzymu z materiałów otrzymanych przy różnej jego zawartości wykazała, że wraz ze wzrostem zawartości lizostafiny uwalnianiu ulegał coraz mniejszy jej procent (**Rysunek 23, Panel A**). Przypuszczam, że większa zawartość lizostafiny w roztworze polimerów na etapie otrzymywania materiałów chitozanowo-białkowych sprzyja jej unieruchamianiu w wyniku reakcji z genipiną. Bez względu na stężenie użytej genipiny, a także początkową ilość lizostafiny, charakter uzyskanego profilu uwalniania wskazał, że większość niezwiązanej z matrycą lizostafiny została uwolniona w ciągu pierwszych 30 minut prowadzenia doświadczenia. W literaturze zjawisko to nazwane zostało efektem gwałtownego uwalniania (ang. „burst release”), jaki obserwowany jest w przypadku prób unieruchamiania różnych związków w biopolimerowych matrycach, także dla matryc chitozanowo-kolagenowych. W konstrukcji materiałów opatrunkowych o aktywności przeciwdrobnoustrojowej jest to efekt pożądany pod warunkiem, że materiał po uwolnieniu niezwiązanego czynnika aktywnego będzie nadal wykazywał działanie przeciwdrobnoustrojowe. Zadaniem pierwszej „gwałtownie uwolnionej” dawki jest unieczynnienie odpowiadających za zakażenie rany mikroorganizmów, natomiast pozostała aktywność materiałów ma chronić przed jej wtórnym zakażeniem.



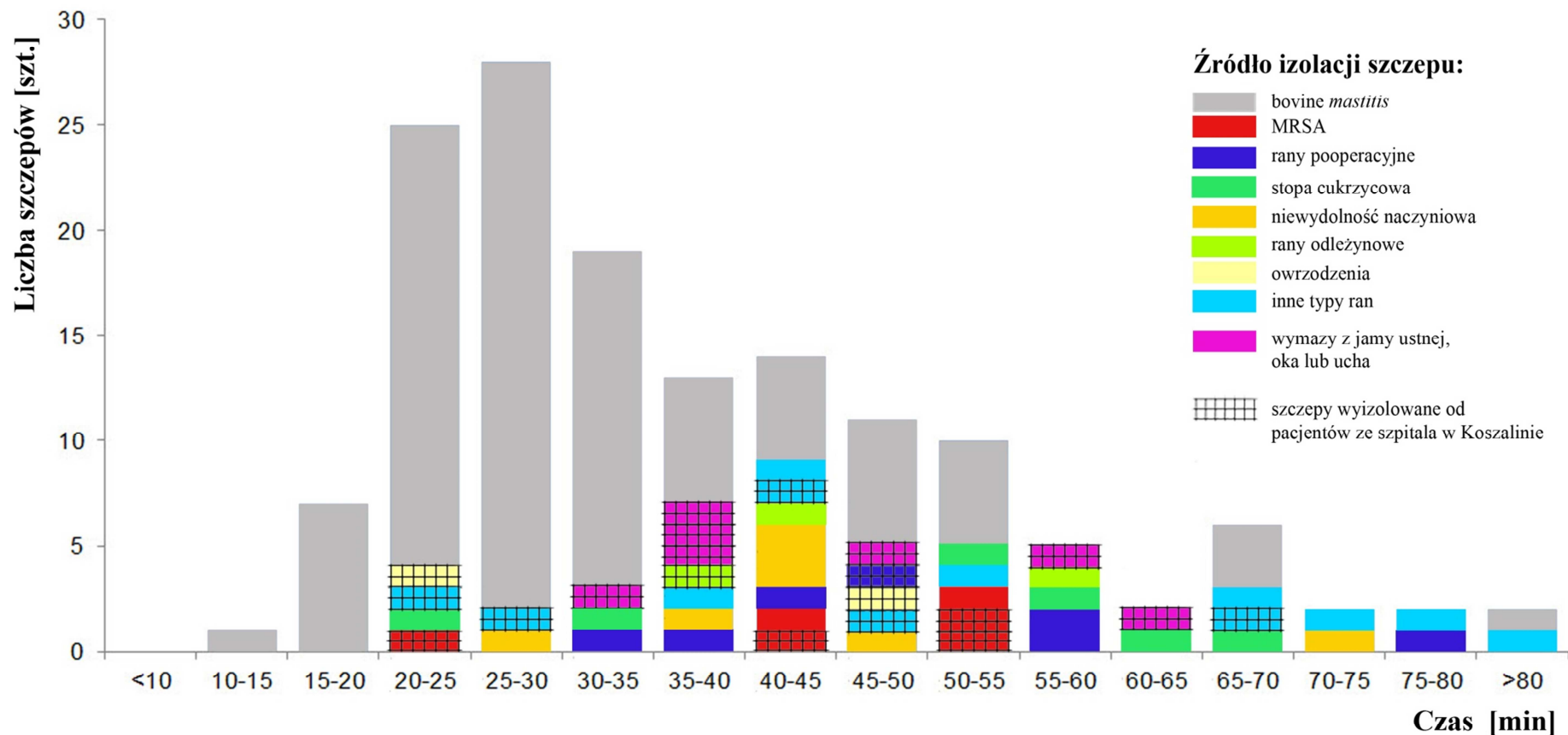
**Rysunek 23.** Profil uwalniania lizostafiny w czasie, z materiałów chitozanowo-białkowych sieciowanych różnym stężeniem genipiny, zawierających jednakową ilość lizostafiny (10 U/ml) (**Panel A**). Liczba jednostek lizostafiny uwolnionych z badanych materiałów po 90 minutach prowadzenia doświadczenia (**Panel B**).



**Rysunek 24.** Profil uwalniania lizostafiny w czasie, z materiałów chitozanowo-białkowych o różnej jej zawartości (sieciovanych genipiną w stężeniu 0,5% w/w) (**Panel A**). Liczba jednostek lizostafiny uwolnionych z badanych materiałów po 90 minutach prowadzenia doświadczenia (**Panel B**).

#### 5.4.2. Charakterystyka aktywności materiałów chitozanowo-białkowych względem komórek szczepów *Staphylococcus aureus* pochodzących z różnych populacji.

W celu oceny przydatności otrzymanych materiałów chitozanowo-białkowych w zwalczaniu zakażeń wywołanych przez różne szczepy *S. aureus*, oznaczyłem aktywność wybranego materiału (10U/ml lizostafiny względem dyspersji polimerów; 0,5% w/w – stężenie genipiny; **Tabela 8, próba nr 2**) w stosunku do 143 szczepów bakteryjnych, gdzie 59 wyizolowano z zakażonych ran ludzkich (w tym 6 MRSA), a 84 pochodziło z gruczołu mlekowego zwierząt chorych na *mastitis* (**Tabela 7**). Oznaczenia przeprowadziłem według procedury opisanej w punkcie **Materiały i Metody 4.2.4.13.**, przy czym parametrem wykorzystanym do porównywania aktywności bakteriolitycznej był czas, po jakim gęstość optyczna  $OD_{595}$  zawiesiny komórek *S. aureus* spadła do zera w wyniku jej dynamicznego kontaktu z materiałem chitozanowo-białkowym zawierającym lizostafinę. Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że badane materiały są aktywne względem wszystkich badanych szczepów, a czas po jakim gęstość optyczna ich zawiesin spadała do zera zawierał się w przedziale od 10 do 95 minut. Ciekawą obserwacją są różnice we wrażliwości na działanie zawartej w materiale lizostafiny pomiędzy szczepami wyizolowanymi z różnych źródeł. W warunkach przeprowadzonego doświadczenia szczepami, których komórki uległy całkowitej lizie, w najkrótszym czasie okazały się być te pochodzenia bydłowego. W przypadku 56 szczepów z tej populacji (60,2%) czas, w jakim nastąpił spadek gęstości optycznej z  $OD_{595} = 0,5$  do  $OD_{595} = 0,0$  był krótszy niż 30 minut, natomiast tylko dla 4 szczepów (4,3%) przekroczył 65 minut.



**Rysunek 25.** Porównanie aktywności materiału chitozanowo-białkowego względem 141 szczepów *S. aureus* pochodzących z różnych populacji (metoda spektrofotometryczna) otrzymanego przez dodanie 10U/ml lizostafiny (sieciovanie genipiną w stężeniu 0,5% w/w). Jako parametr klasyfikujący wykorzystano czas, po jakim gęstość optyczna wyjściowej zawiesiny drobnoustrojów spadnie do zera w wyniku dynamicznego kontaktu z badanym materiałem.

Redukcja gęstości optycznej dla szczepów wyizolowanych z ran ludzkich w czasie do 30 minut nastąpiła jedynie w przypadku 6 szczepów (11,5%). Komórki większości szczepów z tej populacji ulegały lizie w przedziale od 30 do 60 minut (42 szczepy). Natomiast tylko 11 wymagało do tego nieco dłuższego okresu inkubacji z badanym materiałem. W obrębie populacji komórek wyizolowanych z ran ludzkich pochodzących z różnych ośrodków, bardziej wrażliwymi szczepami okazały się być te pochodzące od pacjentów ze szpitala w Koszalinie. Tylko 11% z nich wymagało czasu dłuższego niż 55 minut do całkowitej redukcji gęstości optycznej zawiesiny komórkowej, podczas gdy dla szczepów otrzymanych ze szpitala w Vaxjo wskazaną wartość przekroczyło 37,5% z badanych szczepów. Ważną informacją uzyskaną w wyniku przeprowadzonego doświadczenia jest także brak oporności na działanie lizostafiny szczepów z grupy MRSA. Komórki tych szczepów nie wyróżniały się także na tle badanego zbioru czasem, po którym następowała całkowita ich liza na skutek kontaktu z badanym materiałem chitozanowo-białkowym: 22,7 min. dla szczepu K2041; 41,7 min. dla szczepu K2015 i ok 50 min. dla szczepów K2102, K2136 i 59SZ.

Przeprowadzone badanie ujawniło, że żaden z badanych szczepów *S. aureus*, w tym także z grupy MRSA, nie wykazał oporności względem inkorporowanej w materiale chitozanowo-białkowym lizostafiny. Oporność na bakteriolityczne działanie tego enzymu jest niezwykle rzadkim zjawiskiem, natomiast zróżnicowana wrażliwość, będąca wyrazem wykazanych różnic w kinetyce bakteriolizy jest już obserwacją powszechną, występującą także dla innych czynników przeciwdrobnoustrojowych [Szweda i in. 2014, Climo i in. 1998]. W przypadku lizostafiny różnice we wrażliwości szczepów wynikają z budowy ściany komórkowej poszczególnych szczepów, a w szczególności związane są z dostępem do wiązań peptydowych w mostkach poliglicynowych siecujących łańcuchy glikopeptydowe występujące w peptydoglikanie ścian komórkowych w/w bakterii, będące jednocześnie celem molekularnym dla lizostafiny [Zygmunt i in. 1972]. Uzyskane przeze mnie wyniki mogą być zatem jednym z kolejnych uzasadnień dla próby komercyjnego jej wykorzystania w terapiach przeciwgronkowcowych.



### 5.5. Porównanie wybranych właściwości materiałów chitozanowo-białkowych otrzymanych z wykorzystaniem technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie z wybranymi dostępnymi na rynku materiałami opatrunkowymi.

Ostatnie kilkanaście lat to okres gwałtownego rozwoju wszystkich dostępnych technologii. W tym czasie procesom transformacji ulegały także metody leczenia ran, a wraz z nimi technologie związane z wytwarzaniem materiałów opatrunkowych. Proste opatrunki bawełniane wykorzystywane początkowo do leczenia wszystkich typów ran na każdym ich etapie gojenia, stopniowo zostawały zastępowane bardziej zaawansowanymi materiałami, często o właściwościach dedykowanych nie tylko konkretnym urazom, lecz także właśnie poszczególnym etapom ich leczenia. Dzisiejszy rynek materiałów opatrunkowych to już ponad 2500 produktów wytwarzanych z różnych surowców i przy wykorzystaniu najbardziej aktualnej wiedzy z pogranicza wielu dyscyplin naukowych [Uzun i in. 2013]. Przy tak wielu możliwościach wyboru coraz trudniejszym staje się dobór tego właściwego. W literaturze naukowej dostępnych jest szereg publikacji poświęconych porównywaniu wybranych właściwości w warunkach *in vitro*, a także skuteczności materiałów opatrunkowych w badaniach *in vivo*, które pozwalają na ich kategoryzację. Ze względu na mnogość wykorzystywanych metodologii, bardzo trudne jest bezpośrednie obiektywne porównanie wybranych właściwości materiałów opisanych przez różne grupy badawcze. Dotyczy to szczególnie takich właściwości jak aktywność przeciwdrobnoustrojowa, czy badanie cytotoksyczności, gdzie zmiennych wpływających na jakość wyniku jest znacznie więcej niż w przypadku relatywnie prostych oznaczeń właściwości fizykochemicznych. W celu porównania właściwości opracowanego przeze mnie materiału chitozanowo-białkowego o potencjalnym zastosowaniu w terapiach leczenia ran, wybrałem grupę 15 materiałów opatrunkowych dostępnych na polskim rynku wyrobów medycznych. Opis wybranych materiałów przedstawiłem w **Tabeli nr 16**. W grupie tej znalazły się opatrunki zbudowane zarówno z polimerów naturalnych (kolagenu, karboksymetylocelulozy, soli kwasu alginowego, bawełny), jak i opatrunki syntetyczne (poliuretanowe i z poliwinylpirolidonu), materiały należące do grupy opatrunków hydrożelowych, hydrokolidowych, włóknistych, gąbczastych, a także opatrunki o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Wszystkie wybrane materiały porównałem pod kątem takich właściwości jak: chłonność, rozpuszczalność, wpływ na zmianę pH, cytotoksyczność względem mysich komórek fibroblastów (NIH-3T3), właściwości przeciwutleniające. Ponadto materiały o deklarowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej (Bactigras, Inadine, Matopad Silver Pad, Melgisorb Ag, Mepilex Ag, Algivon, Silvercell, Aquacel Ag) porównałem dodatkowo pod względem ich aktywności wobec komórek *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, wykorzystując do tego celu metodę dyfuzyjną oraz oznaczenie liczby drobnoustrojów po określonych czasach inkubacji materiałów z zawiesinami drobnoustrojów (**Materiały i Metody 4.2.4.15.**).



**Tabela 16.** Charakterystyka materiałów opatrunkowych wykorzystanych w porównaniu z właściwościami materiału chitozanowo-białkowego otrzymanego według nowej technologii rozpuszczania chitozanu w wodzie.

Nazwa materiału opatrunkowego	Producent	Podstawowe informacje
Bactigras	Smith & Nephew	Opatrunek z włókniny bawełnianej nasączony maścią parafinową z octanem chlorheksydyny w stężeniu 0,5% w/w.
Inadine	Johnson&Johnson	Opatrunek z dzianiny wiskozowej nasączony jodopowidonem (rozpuszczalnym w wodzie kompleksem jodu z poliwinylpirolidonem w stężeniu od 9 do 12%, w/w).
Matopat Silver Pad	TZMO S.A.	Opatrunek z włókniny bawełnianej pokryty siateczką z zaadsorbowanym srebrem metalicznym.
Melgisorb Ag	Molnlycke Health Care	Opatrunek włókninowy na bazie alginianu wapnia i karboksymetylocelulozy, o zawartości srebra 0,8 mg/cm <sup>2</sup> w postaci fosforanu srebrowo-sodowo-wodorowo-cykonowego (ulotka producenta).
Mepilex Ag	Molnlycke Health Care	Opatrunek z gąbki poliuretanowej z węglem aktywnym i siarczanem srebra o stężeniu 1,2 mg/cm <sup>2</sup> (ulotka producenta).
Algivon	Kikgel	Opatrunek z włókninowy na bazie alginianu wapnia, nasączony miodem Manuka (minimum UMF® 12+).
Silvercell	Johnson&Johnson	Opatrunek włókninowy zbudowany z włókien alginianu wapnia i karboksymetylocelulozy oraz włókien nylonu pokrytych srebrem metalicznym; zawartość jonów srebra 111mg/113cm <sup>2</sup> [Parsons i in. 2005].
Aquacel Ag	Convatec	Nietkany opatrunek hydrowłóknisty zbudowany z włókien karboksymetylocelulozy sodowej z dodatkiem 1,2% srebra koloidalnego (8,3mg/100cm <sup>2</sup> ) [Aramwit i in. 2010].
Aquacel	Convatec	Opatrunek hydrowłóknisty zbudowany z włókien karboksymetylocelulozy sodowej.
CS/KOL/LYZ	Politechnika Gdańska	Materiał gąbczasty zbudowany z chitozanu, kolagenu i żelatyny, zawierający lizostafinę. Opracowany w ramach pracy doktorskiej.
Hydrocoll	Paul Hartmann	Opatrunek hydrokoloidowy zbudowany z warstwy z karboksymetylocelulozy, warstwy adhezyjnej i warstwy z poliuretanu (zewnętrznej).
Granuflex	Convatec	Opatrunek hydrokoloidowy zbudowany z: karboksymetylocelulozy, pektyny i żelatyny.
Suprasorb C	Lohman & Rauscher	Opatrunek z gąbki kolagenowej, kolagen wołowy typ I.
Fabricoll Plus	Johnson&Johnson	Opatrunek z gąbki zbudowanej z kolagenu i alginianu wapnia.
Aquagel	Kikgel	Opatrunek hydrożelowy zbudowany z usieciowanej za pomocą strumienia elektronów dyspersji poliwinylpirolidonu, glikolu polietylenowego i agaru.
Kaltostat	Convatec	Opatrunek włókninowy zbudowany z włókien alginianu sodu i wapnia.

Uzyskane wyniki porównałem z tymi dla materiału chitozanowo-białkowego z inkorporowaną lizostafiną o składzie uznanym za optymalny (10U/ml lizostafiny względem dyspersji polimerów; 0,5% w/w – stężenie genipiny; **Tabela 8, próba nr 2**).

### 5.5.1. Porównanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych.

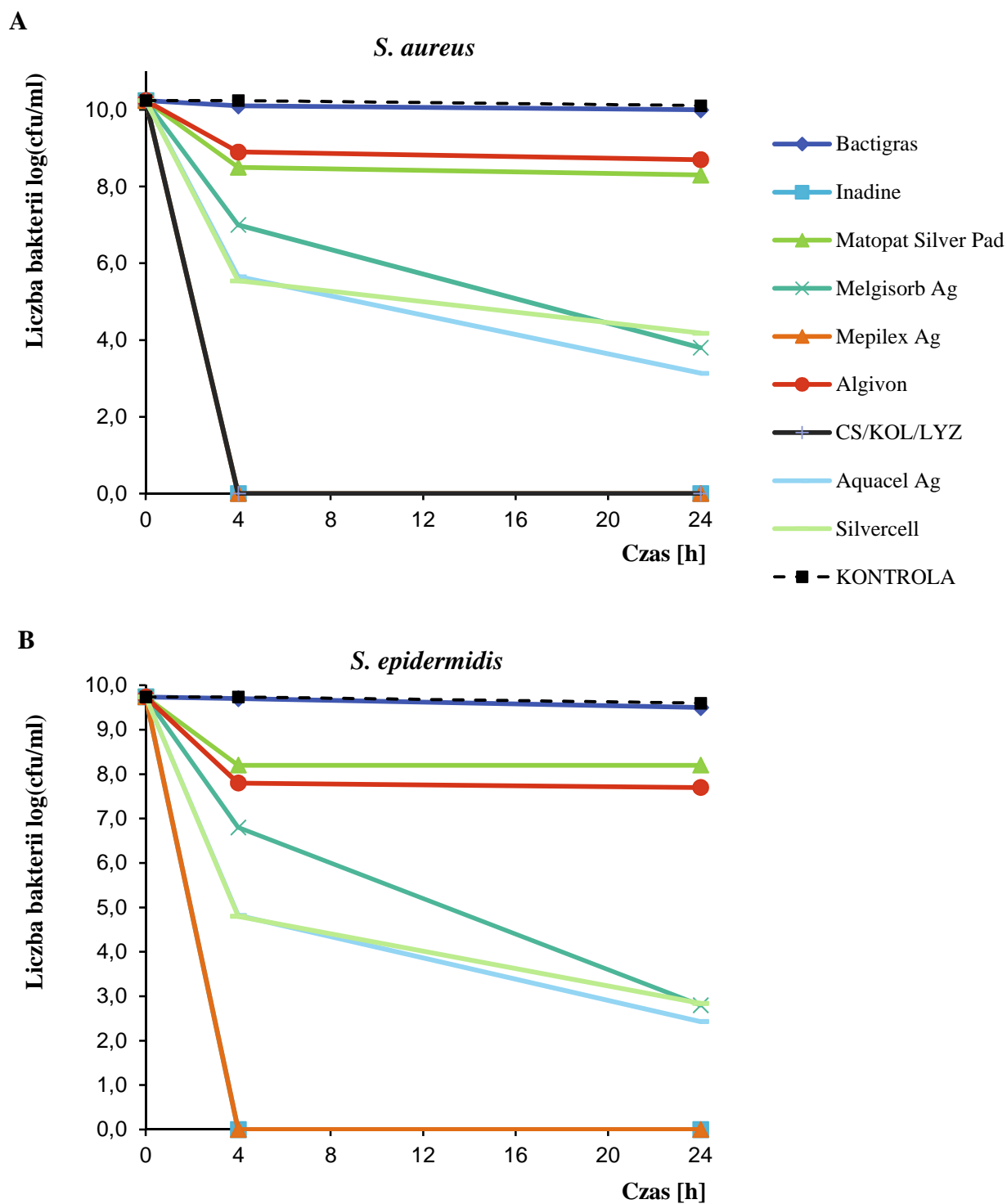
W ramach badania mającego na celu porównanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej siedmiu materiałów opatrunkowych o deklarowanej tej właściwości, a także materiału chitozanowo-białkowego z inkorporowaną lizostafiną

dokonałem oznaczenia wobec dwóch szczepów Gram (+): *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* oraz dwóch szczepów Gram (-): *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* należących do grupy drobnoustrojów najczęściej wywołujących zakażenia ran. Ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej przeprowadziłem z wykorzystaniem metody dyfuzyjnej, poprzez pomiar wielkości stref zahamowania wzrostu oraz oznaczenia liczby drobnoustrojów, jaka pozostała po bezpośrednim kontakcie zawiesiny komórek drobnoustrojów z badanymi materiałami po określonym czasie ekspozycji 4 i 24 godzin (**Materiały i Metody 4.2.4.15**). W obrębie wybranej grupy materiałów opatrunkowych znalazły się te, których aktywność uwarunkowana jest obecnością różnych związków aktywnych, w tym: chlorheksydyny (Bactigras); jodopowidonu (Inadine); miodu Manuka (Algivon) oraz związków srebra w czterech różnych postaciach: fosforanu srebrowo-sodowo-wodorowo-cyrkonowego (Melgisorb Ag), siarczanu srebra (Mepilex Ag), srebra koloidalnego (Aquacel Ag) oraz srebra metalicznego (Matopat Silver Pad, Silvercell). Ze względu na specyficzną aktywność lizostafiny, wykorzystanej w konstrukcji materiałów chitozanowo-białkowych, oznaczenia dla tego materiału przeprowadziłem wyłącznie względem komórek *S. aureus*.

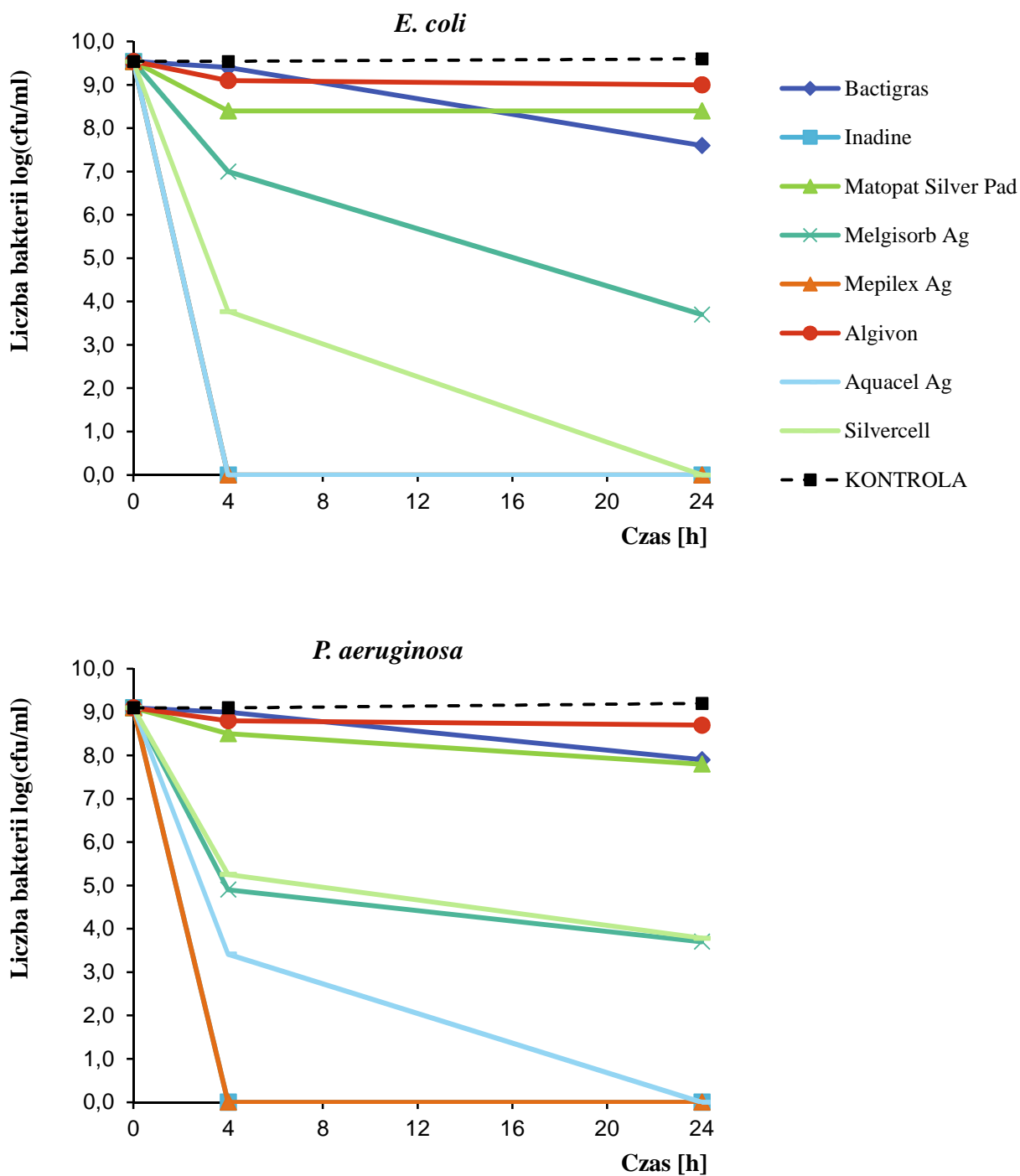
Ilość żywych komórek drobnoustrojów, jaka pozostała po cztero- i dwudziestoczterogodzinnej inkubacji z badanymi materiałami przedstawiłem na dwóch kolejnych **Rysunkach nr 26 i 27** w postaci logarytmu dziesiętnego z liczby bakterii, określonej metodą seryjnych rozcieńczeń,  $\log(\text{cfu/ml})$ . Materiały opatrunkowe Mepilex Ag i Inadine, a także opracowany przeze mnie materiał chitozanowo-białkowy zawierający lizostafinę okazały się być najbardziej aktywnymi wobec komórek wzorcowego szczepu *S. aureus*, redukując liczbę komórek bakteryjnych do poziomu poniżej progu oznaczalności, już po czterogodzinnym kontakcie z ich zawiesiną (**Rysunek 26, Panel A**). Opatrunki Mepilex Ag i Inadine były także jedynymi materiałami, które w tym samym czasie zredukowały do zera liczbę komórek *S. epidermidis* (**Rysunek 26, Panel B**). Opatrunki Melgisorb Ag, Aquacel Ag i Silvercell także wykazały wysoką aktywność wobec badanych szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis* redukując liczbę komórek o 4 do 5 rzędów logarytmicznych po czterogodzinnej inkubacji. Wydłużenie czasu ekspozycji zawiesiny drobnoustrojów na działanie tych materiałów o dalsze dwadzieścia godzin doprowadziło do spadku liczby żywych komórek o kolejne 1-2 rzędy, jednak nie spowodowało spadku ich liczby poniżej progu oznaczalności. W warunkach prowadzonego doświadczenia opatrunki Algivon i Matopat Silver Pad wykazały najniższą aktywność powodując spadek liczby drobnoustrojów jedynie o dwa rzędy logarytmiczne, przy czym Algivon okazał się być nieznacznie bardziej aktywny względem komórek *S. aureus* i nieznacznie mniej aktywny względem komórek *S. epidermidis*. Natomiast opatrunek Bactigras nie wykazał istotnej aktywności względem komórek obu gatunków bakterii Gram (+). Oznaczenia, jakie wykonałem względem komórek gatunków bakterii Gram (-) wykazały, że do grupy materiałów redukujących liczbę żywych komórek zarówno *E. coli*, jak i *P. aeruginosa* do poziomu poniżej progu oznaczalności po dwudziestoczterogodzinnej ekspozycji na ich działanie należą także materiały Mepilex Ag

i Inadine (**Rysunek 27, Panel A i B**). W przypadku testów wykonanych względem komórek *E. coli* grupę tą uzupełniły opatrunki Aquacel Ag i Silvercell, natomiast względem komórek *P. aeruginosa* - Aquacel Ag. Opatrunek Silvercell wykazał się nieco niższą aktywnością względem komórek *P. aeruginosa* redukując liczbę komórek w zawiesinie o 5,5 rzędu logarytmicznego. Pośrednią aktywnością względem obu bakterii Gram (-) wykazał się opatrunek Melgisorb Ag, powodując spadek liczby drobnoustrojów w obu przypadkach także o około 5 jednostek logarytmicznych. Opatrunki Algivon, Bactigras i Matopad Silver Pad, tak jak w przypadku testów wykonanych względem bakterii Gram (+), okazały się być najmniej aktywnymi materiałami, powodując redukcję liczby bakterii jedynie o dwa rzędy logarytmiczne.

Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że spośród wszystkich badanych materiałów jedynie opatrunki Mepilex Ag i Inadine wykazały najwyższą skuteczność względem wszystkich czterech wybranych szczepów bakteryjnych, redukując liczbę bakterii do poziomu poniżej progu oznaczalności. Opracowany przeze mnie materiał chitozanowo-białkowy aktywowany lizostafyną także spowodował całkowitą redukcję liczby komórek *S. aureus* w czasie pierwszych czterech godzin od momentu kontaktu z zawiesiną bakteryjną. Wynik ten był spodziewanym rezultatem ze względu na przeprowadzone wcześniej doświadczenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej z wykorzystaniem metody turbidometrycznej wobec 143 szczepów tego gatunku, gdzie całkowity spadek gęstości optycznej obserwowalem w czasie nieprzekraczającym 90 minut (**Wyniki i Dyskusja 5.4.2**). Obserwacje prowadzone podczas trwania eksperymentu także sugerowały, że do całkowitej redukcji liczby drobnoustrojów, przez materiał chitozanowo-białkowy, mogło dojść znacznie szybciej, na co wskazywała niemal całkowita redukcja gęstości optycznej zawiesiny już po pierwszych 30 minutach od nawiązania kontaktu. Wykorzystanie znacznie prostszej i szybszej metody turbidometrycznej do porównania wybranych materiałów opatrunkowych nie było możliwe ze względu na to, że zawarte w nich inne czynniki aktywne nie powodują spadku gęstości optycznej zawiesin badanych szczepów bakteryjnych. Zatem do określenia efektywności tych materiałów konieczne było zastosowanie metody seryjnych rozcieńczeń, w celu zliczenia komórek, jakie przeżyły kontakt z badanymi materiałami.



**Rysunek 26.** Porównanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych materiałów opatrunkowych względem komórek *S. aureus* (Panel A) i *S. epidermidis* (Panel B). Oznaczenie liczby żywych komórek drobnoustrojów, jaka pozostała po bezpośrednim kontakcie zawiesiny komórek drobnoustrojów z badanymi materiałami po określonym czasie 4 i 24 godzin.



**Rysunek 27.** Porównanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych materiałów opatrunkowych względem komórek *E. coli* (Panel A) i *P. aeruginosa* (Panel B). Oznaczenie liczby żywych komórek drobnoustrojów jaka pozostała po bezpośrednim kontakcie zawiesiny komórek drobnoustrojów z badanymi materiałami po określonym czasie 4 i 24 godzin.

Test pomiaru spadku liczby drobnoustrojów w czasie dostarczył ciekawych informacji na temat różnic w działaniu opatrunków srebrowych. Pomimo różnic w zawartości srebra w wybranych materiałach (**Tabela 16**), nie zaobserwowałem korelacji pomiędzy tym parametrem, a oznaczoną aktywnością przeciwdrobnoustrojową wobec badanych mikroorganizmów. Podobne wyniki zaobserwowano i opisano już wcześniej w wielu publikacjach [Uzun i in. 2013, Thomas i in. 2003]. W pracach tych zwrócono uwagę, że wszystkie dotychczas stosowane metody pomiaru zawartości srebra pozwalają jedynie na określenie całkowitej jego zawartości zarówno w jego aktywnej jonowej formie  $\text{Ag}^+$ , jak i tej nieaktywnej  $\text{Ag}^0$ . Natomiast aktywność danego materiału zawierającego srebro jest uwarunkowana od efektywności (ilości i szybkości) uwalniania srebra w formie jonowej, a to jest już zależne od budowy związków wykorzystanych do aktywacji materiałów, a także od budowy i charakteru samej matrycy opatrunku. Zawarty w materiale Melgisorb Ag fosforan srebrowo-sodowo-wodorowo-cyrkonowy jest trudniej rozpuszczalną solą niż siarczan srebra użyty w opatrunku Mepilex Ag, co przy zbliżonej zawartości srebra dla obu materiałów może stanowić jedną z przyczyn warunkujących zaobserwowane różnice w ich skuteczności. Matopat Silver Pad okazał się być najmniej skutecznym materiałem zawierającym srebro w warunkach prowadzonego doświadczenia względem wszystkich badanych szczepów bakteryjnych. Tak niska redukcja liczby bakterii może wynikać bezpośrednio z jego budowy. Jest on bowiem opatrunkiem dwuwarstwowym, zbudowanym z warstwy włókniny bawełnianej i siateczki pokrytej metalicznym srebrem. Ze względu na czysto metaliczną postać, kationy srebra prawdopodobnie uwalniane są w dużo mniejszej ilości niż z pozostałych materiałów, co może być przyczyną dużo słabszych rezultatów.

Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej z wykorzystaniem metody dyfuzyjnej potwierdziło, że wszystkie badane materiały były aktywne wobec wybranych szczepów, o czym świadczą zaobserwowane mniejsze bądź większe strefy zahamowania wzrostu (**Tabela 17**).

Największe wartości tego parametru w przypadku obu szczepów bakterii Gram (+) odnotowałem dla materiałów Mepilex Ag, Melgisorb Ag oraz opatrunku Algivon. Mepilex Ag i Melgisorb Ag pozostały także najbardziej aktywne względem obu szczepów Gram (-). Ciekawą obserwacją są różnice w aktywnościach niektórych materiałów oznaczone za pomocą obu metod. Opatrunek Inadine, który wcześniej należał do grupy opatrunków o najwyższej aktywności względem wszystkich badanych mikroorganizmów, w tym przypadku okazał się być jednym z materiałów powodujących najmniejsze strefy zahamowania wzrostu. Podobny wynik uzyskałem dla materiału chitozanowo-białkowego aktywowanego lizostafyną wobec komórek *S. aureus*. W badaniu za pomocą metody dyfuzyjnej materiał ten wywołał strefę inhibicji o najmniejszej średnicy. Natomiast opatrunek Algivon, który powodował spadek liczby drobnoustrojów podczas testu ilościowego jedynie o 1-2 jednostki logarytmiczne, okazał się należeć do najskuteczniejszych materiałów względem komórek bakterii Gram (+), gdy kryterium porównawczym była wielkość strefy

zahamowania wzrostu. Uzyskane wyniki mogą zatem wskazywać, że przy porównywaniu aktywności różnych materiałów istotny jest dobór metody jej oznaczania.

**Tabela 17.** Porównanie średniej wielkości stref zahamowania wzrostu dookoła wybranych materiałów o aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz materiału chitozanowo-białkowego aktywowanego lizostafyną.

	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	ZOI [mm]	odch.std. [mm]	ZOI [mm]	odch.std. [mm]	ZOI [mm]	odch.std. [mm]	ZOI [mm]	odch.std. [mm]
Bactigras	15,1	0,6	16,4	1,2	13,4	1,5	12,4	0,6
Inadine	16,1	0,5	14,6	1,3	15,3	0,5	16,9	1,2
Matopat Silver Pad	15,6	0,9	15,5	0,4	13,9	0,5	16,6	0,7
Melgisorb Ag	21,1	0,9	20,9	0,5	16,7	1,8	19,4	1,4
Mepilex Ag	20,9	1,6	20,4	1,0	20,3	0,5	18,2	0,5
Algivon	20,5	1,6	19,1	0,5	15,2	1,6	14,0	0,4
Aquacel Ag	16,7	1,0	16,2	1,0	17,1	0,6	17,2	0,4
Silvercell	16,1	0,5	16,0	0,7	17,7	1,2	17,8	0,6
CS/KOL/LYZ	14,4	0,3	nie oznaczono		nie oznaczono		nie oznaczono	

Brak korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi obiema wykorzystanymi metodami zaobserwował już wcześniej Gallant, porównując aktywność siedmiu opatrunków srebrnych względem 17 szczepów bakteryjnych Behm [Gallant-Behm i in. 2005]. W pracy tej szczegółowo zostały opisane wady i zalety obu wybranych testów aktywności oraz powody, dla których dokładna ocena skuteczności materiałów opatrunkowych, zawierających różne czynniki aktywne, a zwłaszcza różne formy srebra, nie powinna opierać się na pojedynczym teście dyfuzyjno-krażkowym. Brak korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi obiema metodami wynika także z różnic w budowie chemicznej samych związków aktywnych, a zwłaszcza ich masy cząsteczkowej czy charakteru jonowego. Ma to szczególne znaczenie dla zjawiska dyfuzji, jakie jest jednym z czynników wpływających na wielkość uzyskiwanych stref zahamowania wzrostu. Takie uzasadnienie może tłumaczyć dużo niższe wyniki dla opatrunku Inadine i materiału chitozanowo-białkowego zawierającego lizostafynę, porównując wyniki testu dyfuzyjnego i ilościowego. Oba zawarte w nich związki aktywne są polimerami o dużo wyższej masie cząsteczkowej w stosunku do pozostałych czynników aktywnych, co może powodować, że szybkość ich dyfuzji w podłożu stałym może być wolniejsza niż w przypadku pozostałych badanych czynników aktywnych. Z kolei wysoka aktywność opatrunku Algivon oznaczona za pomocą metody dyfuzyjnej na podłożu stałym i jednocześnie niska aktywność oznaczona na podstawie testu ilościowego, może wynikać z działania nieco odmiennych mechanizmów niż w przypadku pozostałych, zawartych w badanych materiałach, czynników aktywnych. Uważa się, że mechanizm związany z aktywnością przeciwdrobnoustrojową tego materiału związany jest z działaniem nadtlenku wodoru, jaki powstaje pod wpływem zawartej w miedzi oksydazy glukozy oraz

metyloglioksalu. Trzecim czynnikiem jaki mógł wywrzeć istotny wpływ na wielkość strefy zahamowania wzrostu, wywołanej przez ten materiał opatrunkowy, jest duża ilość cukru, jaka uwalniana jest do środowiska, w wyniku kontaktu z materiałem. Wysokie stężenie cukru może wywoływać szok osmotyczny, co dodatkowo (w sposób mechaniczny) redukuje znajdujące się w jego obrębie komórki drobnoustrojów, wpływając tym samym na wielkość strefy zahamowania wzrostu. Wniosek ten może potwierdzać zaobserwowana strefa przejaśnienia, ze zmniejszoną gęstością mikroorganizmów dookoła właściwej strefy zahamowania wzrostu, obecna dla wszystkich czterech badanych szczepów bakteryjnych. Wpływ działania tego mechanizmu, jak i aktywności nadtlenu wodoru, wydają się mieć istotne znaczenie jedynie podczas bezpośredniego kontaktu materiału z mikroorganizmami, co tłumaczyłoby różnice w wynikach uzyskanych za pomocą obu metod badania aktywności. Charakter podłoża płynnego, w jakim przeprowadzane było oznaczenie redukcji liczby komórek bakteryjnych w ich zawiesinie powodował, że stężenie cukru bardzo szybko rozkładało się na całą jej objętość, natomiast generowany nadtlenek wodoru mógł w takim środowisku bardzo szybko zostać inaktywowany zanim nastąpił kontakt z docelowymi komórkami.

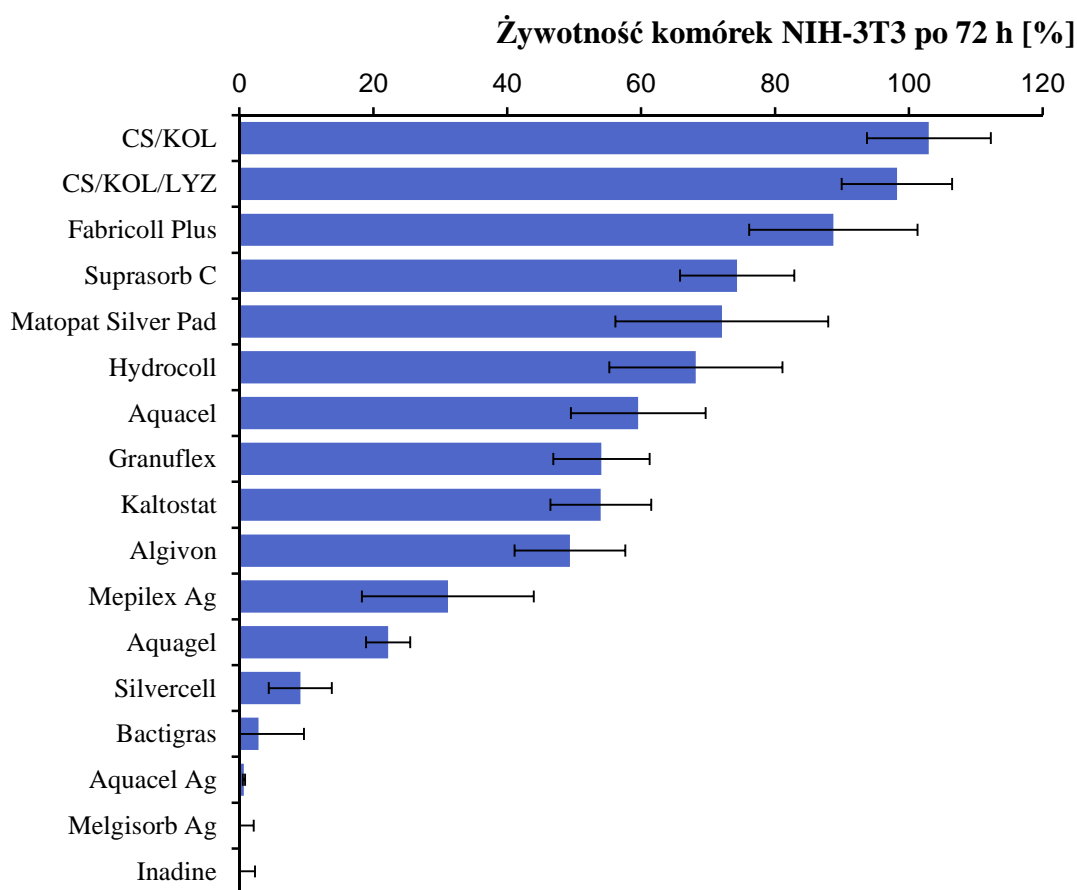
Porównując wielkości stref inhibicji wzrostu dla opatrunków srebrnych względem wszystkich badanych szczepów, tak jak w przypadku metody ilościowej, tak i tym razem nie zaobserwowałem korelacji pomiędzy tym parametrem a zawartością srebra w badanych materiałach. Niemniej jednak opatrunek Mepilex Ag, który zawierał największą ilość srebra przypadającą na jednostkę powierzchni należał do tych materiałów, które wywoływały największe strefy zahamowania wzrostu względem wszystkich badanych szczepów. Uzyskany przeze mnie wynik jest jednak sprzeczny z opublikowanymi wynikami przez Bradshaw'a, który wykorzystując podobną metodologię nie zaobserwował wokół tego materiału stref zahamowania wzrostu względem żadnego ze szczepów *E. coli*, *S. aureus* i *P. aeruginosa* [Bradshaw 2011], uzasadniając to brakiem możliwości zjonizowania zawartego w nim siarczanu srebra w warunkach prowadzonego doświadczenia. Mając jednak na uwadze wysoką aktywność opatrunku Mepilex Ag w przeprowadzonym przeze mnie teście ilościowym, a także innymi doniesieniami literaturowymi potwierdzającymi skuteczność tego materiału [Barrett 2009], mogę uznać, że uzyskane przeze mnie wyniki nie są przypadkowe.

### 5.5.2. Porównanie cytotoksyczności względem komórek NIH-3T3.

**Rysunek 28** przedstawia zestawienie wyników uzyskanych podczas badania cytotoksyczności szesnastu różnych materiałów opatrunkowych, w tym dla materiału chitozanowo-białkowego aktywowanego lizostafyną. Badanie zostało wykonane w oparciu o test MTT względem mysich komórek fibroblastów, NIH-3T3, po 72 godzinnej inkubacji z materiałami testowymi (**Materiały i Metody 4.2.4.10**). Uzyskane wyniki wskazują, że żaden z badanych materiałów opatrunkowych nie wpłynął korzystnie na poziom proliferacji fibroblastów, powodując w mniejszym bądź w większym stopniu redukcję żywotności komórek, w stosunku do próby kontrolnej. Jedynie materiały chitozanowo-białkowe,



otrzymane przez mnie na drodze opisanej w tej pracy metodologii, nieznacznie stymulowały wzrost fibroblastów, osiągając tym samym najlepszy wynik w grupie wybranych materiałów (wzrost komórek na poziomie  $103 \pm 9\%$  i  $98 \pm 8\%$  odpowiednio dla materiałów bez dodatku lizostafiny i materiałów ją zawierających). Wśród materiałów powodujących najmniejsze zahamowanie wzrostu komórek znalazły się materiały Fabricoll Plus, Suprasorb C, Matopat Silver Pad oraz Hydrocoll, dla których osiągnięto wzrost komórek w zakresie od około 90 do 70% względem próby kontrolnej. Natomiast opatrunki Inadine, Melgisorb Ag, Aquacel Ag oraz Bactigras doprowadziły niemalże do całkowitego zahamowania ich wzrostu.



**Rysunek 28.** Porównanie cytotoksyczności wybranych materiałów opatrunkowych z materiałem chitozanowo-białkowym aktywowanym lizostafyną, względem mysich komórek fibroblastów (NIH-3T3), test MTT.

Wysoka cytotoksyczność jaką wykazały materiały zawierające różne związki przeciwdrobnoustrojowe, nie jest wynikiem zaskakującym, bowiem była ona wskazywana już wcześniej przez różne grupy badawcze, z czego najwięcej uwagi poświęcono porównaniom opatrunków zawierających różne formy srebra [Kempf i in. 2011, Van Den Plas i in. 2008, Paddle-Ledinek i in. 2006]. Jak wykazałem w części poświęconej porównaniu aktywności przeciwdrobnoustrojowej, srebro jest niezwykle efektywnym czynnikiem bakteriobójczym o szerokim spektrum działania. Główny mechanizm jego aktywności polega na interakcji

z białkami błon komórkowych prowadzącej do zaburzenia jej ciągłości i wycieku jonów, a także składników odżywczych z wnętrza komórki. Ze względu na niespecyficzny charakter tej aktywności, srebro działa w ten sam sposób zarówno na komórki drobnoustrojów, jak i komórki ssacze [Lansdown 2010], co jest zapewne przyczyną zaobserwowanej wysokiej cytotoksyczności opatrunków je zawierających względem komórek fibroblastów. W postaci metalicznej jest ono jednak stosunkowo inertne, dlatego też opatrunek Matopat Silver Pad, który w swojej strukturze zawiera siateczkę pokrytą metalicznym srebrem, uzyskał jeden z najsłabszych wyników w porównaniu aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz okazał się materiałem o stosunkowo najniższej cytotoksyczności, utrzymując żywotność komórek fibroblastów na poziomie  $72 \pm 16\%$ . W sposób bezpośredni, cytotoksyczne działanie jonów srebra widoczne jest także w porównaniu wyników testu MTT dla dwóch hydrowłóknistych opatrunków zbudowanych z włókien karboksymetylocelulozy: Aquacel i Aquacel Ag, z których tylko jeden został impregnowany srebrem koloidalnym. Aktywność jonów srebra zawartych w opatrunku Aquacel Ag doprowadziła do niemalże całkowitej redukcji żywych komórek, w warunkach prowadzonego doświadczenia, podczas gdy materiał go niezawierający spowodował spadek liczby komórek jedynie o 40% w stosunku do kontroli. Tak jak w przypadku badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej, także podczas tego oznaczenia nie zaobserwowałem korelacji pomiędzy zawartością srebra a stopniem redukcji żywotności względem badanych komórek. Wysoka cytotoksyczność materiałów Bactigras i Inadine, które obok niektórych materiałów srebrowych całkowicie zahamowały wzrost fibroblastów, także była raportowana już wcześniej i wynika z niespecyficznych mechanizmów działania zawartych w nich związków: chlorheksydyny i jodopowidonu, a w przypadku tego ostatniego cytotoksyczny efekt związany jest także z jego silnym działaniem utleniającym [Kempf i in. 2011, Leaper i in. 2008]. Przeprowadzone porównanie jest także zgodne z doniesieniami wskazującymi na niższą cytotoksyczność opatrunków, których aktywność przeciwdrobnoustrojowa uwarunkowana jest obecnością miodu, w stosunku do opatrunków srebrowych [Toit i in. 2009]. Nie zmienia to jednak faktu, że w warunkach prowadzonego doświadczenia opatrunek Algivon spowodował niemal pięćdziesięcioprocentową redukcję żywotności fibroblastów. Najmniejszy uzyskany efekt cytotoksyczny, obok materiałów chitozanowo-białkowych dla opatrunków Fabricoll Plus oraz Suprasorb C, związany jest najprawdopodobniej z wykorzystaniem do ich konstrukcji kolagenu - surowca o dobrze udokumentowanej biokompatybilności, a nawet działaniu stymulującym proliferację wielu różnych komórek w warunkach *in vitro* i przyspieszenie procesu regeneracji rany w warunkach *in vivo*. Niemniej jednak zaobserwowany nieznaczny efekt cytotoksyczny względem komórek fibroblastów, może wynikać z obecności i działania zawartych w tych materiałach kwasów organicznych, najprawdopodobniej kwasu mlekowego, wykorzystywanego na etapie ich produkcji bądź izolacji kolagenu, jaki nie został dokładnie usunięty z wyrobu gotowego. Obecność związków o charakterze kwasowym uwalnianych z tych materiałów potwierdza obniżone pH medium, jakie wykorzystałem do oznaczeń maksymalnej chłonności dla obu materiałów (**Tabela 18**).

Wykazany przeze mnie negatywny wpływ na wzrost komórek fibroblastów wszystkich wybranych w porównaniu komercyjnie dostępnych materiałów opatrunkowych, nie podważa zasadności ich dotychczasowego wykorzystywania. Regeneracja uszkodzonej tkanki jest procesem składającym się z wielu etapów i faz, na które wpływ ma szereg kompleksowych czynników. Dobór właściwego materiału opatrunkowego wymaga często kompromisu pomiędzy niezbędnymi właściwościami, zależnymi od aktualnego stanu rany. Dotyczy to w szczególności sytuacji związanych z zakażeniami mikrobiologicznymi, w których priorytetem jest uzyskanie wolnego od patogenów środowiska gojenia rany, nawet kosztem chwilowego wprowadzenia dodatkowego czynnika hamującego procesy jej regeneracji. Pomimo, że wybrana przeze mnie metoda jest jedną z najprostszych opisanych w literaturze, a warunki, jakie zapewnia są bardzo odległe od właściwego środowiska gojącej się rany, przeprowadzone badanie dostarcza istotnych informacji na temat relacji pomiędzy różnymi materiałami o różnej konstrukcji i różnym przeznaczeniu. Razem z pozostałymi przedstawionymi w tym rozdziale wynikami dla porównywanych właściwości, a także licznymi badaniami klinicznymi przeprowadzonymi dla każdego z nich, może przyczynić się nie tylko do bardziej świadomego wyboru tego właściwego materiału opatrunkowego dokonywanego przez personel medyczny, ale także do konstrukcji kolejnych nowych materiałów, o właściwościach coraz bardziej odpowiadających idealnemu opatrunkowi medycznemu. Opracowany przeze mnie materiał chitozowo-białkowy z inkorporowaną lizostafyną okazał się być jedynym materiałem cechującym się jednocześnie bardzo dużą aktywnością przeciwko szczepom gronkowca złocistego i niemalże brakiem efektu cytotoksycznego względem badanych komórek fibroblastów. Brak cytotoksycznego działania lizostafiny wykazał także Hang, uzyskując prawie dwukrotnie wyższy poziom proliferacji embrionalnych fibroblastów płuca ludzkiego wzrastających w medium wystawionym na działanie otrzymanego w jego zespole materiału chitozowo-kolagenowego aktywowanego lizostafyną [Cui i in. 2011]. Zarówno ten, jak i uzyskany przeze mnie wynik sugeruje, że wykorzystanie czynników aktywnych, takich jak lizostafyna, o wysoce specyficznych mechanizmach aktywności, może doprowadzić do konstrukcji materiału opatrunkowego, który nie wprowadzałby do środowiska zakażonej rany dodatkowego czynnika negatywnie oddziałującego na proces jej regeneracji.

### **5.5.3. Porównanie wybranych właściwości fizykochemicznych.**

Wyniki oznaczeń czterech wybranych właściwości fizyko-chemicznych dla szesnastu porównywanych materiałów opatrunkowych przedstawiłem w **Tabeli nr 18**. Oznaczeniom zostały poddane następujące właściwości: chłonność, rozpuszczalność, wpływ na zmianę pH oraz właściwości przeciwutleniające mierzone jako zdolność do wymiatania wolnych rodników DPPH, kationo-rodników ABTS oraz zdolność do chelatowania jonów żelaza (II).

Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że spośród wszystkich badanych materiałów najwyższą zdolnością do wiązania cieczy charakteryzuje się otrzymany przeze mnie materiał chitozowo-białkowy, jaki w warunkach tego doświadczenia był w stanie

związać około 27 g cieczy A, o składzie jonowym zbliżonym do wysięku z rany, na każdy gram swojej masy. Opatrunki Aquacel, Aquacel Ag, Melgisorb Ag, Kaltostat, Silvercell oraz Fabricoll Plus uzyskały nieznacznie niższy wynik, wiążąc w ciągu 24 godzin ok. 20 g cieczy A na 1 g swoich mas. Wszystkie wymienione wyżej dostępne komercyjnie materiały zostały zaprojektowane jako opatrunki wysokochłonne, co uwarunkowane jest zarówno postacią ich matrycy (gąbka lub włókno), jak i budową chemiczną. Włókna każdego z nich zbudowane są bowiem z silnie hydrofilowych polimerów takich jak alginian sodu/wapnia (Silvercell, Fabricoll Plus, Kaltostat), karboksymetyloceluloza (Aquacel, Aquacel Ag, Silvercell) oraz kolagen (Fabricoll Plus). Dwa pozostałe opatrunki, także deklARowane przez ich producentów, jako materiały o dużych właściwościach absorpcyjnych względem wysięku z rany: Mepilex Ag oraz Matopat Silver Pad uzyskały najniższe wartości tego parametru, odpowiednio 12,9 i 8,9 g/g swojej masy. Stosunkowo niska chłonność opatrunku Algivon (ok. 3,0 g/g), pomimo tego, że jest on także zbudowany z włókien alginianu sodu/wapnia, spowodowana jest jego pierwotną impregnacją miodem Manuka, co znacznie obniżyło jego możliwości sorpcyjne wynikające z charakteru włókien alginianowych, na skutek częściowego ich nasycenia. Opatrunki hydrokoloidowe (Hydrocoll, Granuflex) oraz hydrożelowy Aquagel cechowały się dużo niższą zdolnością do wiązania cieczy, absorbując ją w ilości od ok. 1,5 do 3,0 gramów cieczy badawczej A na gram swojej masy. Natomiast opatrunki Bactigras i Inadine nie wykazały zdolności absorpcyjnych. Oba te materiały zbudowane są z cieniutkiej siateczki wiskozowej bądź bawełnianej i nie zostały opracowane z chęcią zapewniania im takiej właściwości. Suprasorb C był jedynym materiałem, który w warunkach prowadzonego doświadczenia uległ całkowitemu rozpuszczeniu, dlatego też nie było możliwe określenie jego zdolności sorpcyjnych. Pomimo tego, że na zdolność do absorbowania cieczy przez materiały opatrunkowe ma wpływ wiele parametrów, uzyskane przez mnie wyniki i relacje pomiędzy poszczególnymi materiałami są zgodne z tymi, dla których dostępne są dane prezentowane w dotychczasowej literaturze [Uzun i in. 2013, Parsons i in. 2005, Parikh i in. 2011].

Według wytycznych farmakopealnych opatrunki dzieli się na dwie grupy: opatrunki o wysokiej chłonności zdolne do pochłonięcia powyżej 6 g cieczy na 1 gram swojej masy (albo powyżej 12 g cieczy na 100 cm<sup>2</sup> swojej powierzchni) oraz opatrunki o niskiej chłonności absorbujące ciecz w ilości poniżej wskazanego kryterium. Zgodnie z tymi wytycznymi opracowany przeze mnie materiał chitozanowo-białkowy spełnia kryteria dla opatrunków wysokochłonnych, podobnie jak Aquacel, Aquacel Ag, Melgisorb Ag, Kaltostat, Silvercell, Fabricoll Plus, Mepilex Ag oraz Matopat Silver Pad. Wysoka chłonność materiałów opatrunkowych jest jedną z głównych cech, jaką powinien posiadać idealny materiał opatrunkowy, nie tylko ze względu na konieczność zapewnienia wilgotnego środowiska dla procesu regeneracji uszkodzonej tkanki skórnej. Jest ona wręcz pożądaną cechą w leczeniu wszystkich urazów, w których pojawia się wysięk i szczególnie istotna w przypadku ran zakażonych, bowiem stwarza on idealne warunki dla wzrostu mikroorganizmów.

**Tabela 18.** Porównanie wybranych właściwości fizykochemicznych piętnastu materiałów opatrunkowych oraz materiału chitozanowo-białkowego aktywowanego lizostafyną.

Nazwa materiału	Chłonność		Rozpuszczalność		pH		DPPH EC <sub>50</sub>		ABTS EC <sub>50</sub>		Fe <sup>2+</sup> EC <sub>50</sub>	
	[g/g]	odch.std.	%	odch.std.		odch.std.	[mg/ml]	odch.std.	[mg/ml]	odch.std.	[mg/ml]	odch.std.
CS/KOL/LYZ	27,62	0,98	25,60	0,64	6,19	0,10	6,45	0,29	0,79	0,03	4,67	0,20
Aquacel	21,97	0,35	24,51	1,87	5,11	0,10	b.a.		0,38	0,01	b.a.	
Aquacel Ag	21,86	0,91	29,40	1,82	5,18	0,16	b.a.		b.a.		b.a.	
Melgisorb Ag	20,66	0,35	24,88	2,6	5,61	0,15	b.a.		b.a.		b.a.	
Kaltostat	19,53	2,26	31,25	2,25	4,44	0,04	b.a.		b.a.		b.a.	
Silvercell	18,48	0,85	21,00	0,19	5,85	0,04	24,16	0,91	b.a.		b.a.	
Fabricoll Plus	17,91	2,71	31,64	1,97	4,74	0,19	b.a.		0,3	0,01	0,17	0,03
Mepilex Ag	12,89	0,11	7,94	0,98	5,78	0,01	9,24	0,54	0,54	0,05	25,77	0,57
Matopat Silver Pad	8,85	1,12	3,25	0,28	5,85	0,34	20,89	0,54	3,89	0,21	b.a.	
Algivon	3,14	0,98	**		5,52	0,09	7,20	0,51	1,29	0,09	b.a.	
Hydrocoll	2,82	0,82	**		6,15	0,17	66,93	6,87	15,42	2,06	b.a.	
Granuflex	1,58	0,01	**		4,34	0,06	16,69	0,58	5,37	0,39	b.a.	
Aquagel	1,45	0,07	**		5,81	0,10	426,48	18,42	141,01	6,09	41,71	7,21
Inadine	0,14	0,04	**		4,89	0,04	3,56	0,14	0,74	0,04	b.a.	
Bactigras	0,12	0,02	**		5,48	0,11	b.a.		34,94	6,05	b.a.	
Suprasorb C	*		100,00	0,00	5,40	0,10	8,88	0,44	0,42	0,02	26,42	2,50

\* wartość niemożliwa do wyznaczenia ze względu na 100% rozpuszczenie materiału,

\*\* wynik niemożliwy do oszacowania według przyjętej metodologii,

'b.a.', oznacza brak aktywności w warunkach prowadzonego doświadczenia.

Opatrunki o wysokiej chłonności i jednocześnie aktywności przeciwdrobnoustrojowej mogą zatem szybko odizolować zakażoną ciecz i dokonać jej inaktywacji już poza właściwym środowiskiem rany.

Badanie stopnia rozpuszczalności wybranych materiałów opatrunkowych wskazało, że wyższą rozpuszczalnością cechowały się wszystkie materiały wykonane z polimerów naturalnych, tracąc na skutek 24 godzinnej inkubacji w roztworze cieczy A od około 20 do 30% swojej wyjściowej masy. Degradacja materiałów na skutek procesów rozpuszczania w większym bądź mniejszym stopniu jest zjawiskiem naturalnie towarzyszącym wszystkim biomateriałom i nie budzi wątpliwości. Niemniej jednak ciekawość powinno wzbudzić całkowite rozpuszczenie materiału opatrunkowego Suprasorb C, dla którego producent deklaruje, że jest on materiałem wysokochłonnym, przy czym w zależności od ilości wydobywającego się z rany wysięku rekomenduje jego zmianę po 5-7 dniach od rozpoczęcia kuracji, a to sugeruje, że w tym czasie nie powinno dojść do zaistniałej obserwacji. Suprasorb C jest opatrunkiem zbudowanym w 100% z kolagenu bydlęcego produkowanym w procesie suszenia sublimacyjnego. Ze względu na niską rozpuszczalność kolagenu w wodnych roztworach o pH około 6,3 nie powinno dojść do całkowitego rozpuszczenia materiału z niego wykonanego. Spadek wartości pH roztworu zaraz po zakończeniu testu dla chłonności/rozpuszczalności do poziomu 5,4 wskazał, że z badanego materiału doszło do uwolnienia związków o charakterze kwasowym, najprawdopodobniej kwasu mlekowego bądź octowego, jaki został wykorzystany przez producenta w procesie formułacji materiału. Spadek pH do tego poziomu i stosunkowo długotrwała ekspozycja w warunkach maksymalnego wysycenia spowodowała, że po 24 godzinach inkubacji doszło do całkowitej dezintegracji tego materiału. Z kolei otrzymany przeze mnie materiał chitozanowo-białkowy utracił około ¼ swojej początkowej masy i tym samym nie różnił się pod tym względem od pozostałych opatrunków zbudowanych z polimerów naturalnych. Ze względu na trudność w wyznaczeniu parametru  $W_3$  **Wzór (3)**, wynikającą z wybranej metodologii i charakteru badanych materiałów, ubytku masy nie wyznaczyłem dla materiałów należących do grupy opatrunków hydrokoloidowych, hydrożelowego Aquagel oraz opatrunków Inadine i Bactigras.

Przeprowadzone oznaczenia pH roztworów, jakie pozostały po badaniu chłonności/rozpuszczalności wykazały, że jedynie dwa materiały nie wywołały istotnego wpływu na wartość mierzonego parametru: otrzymany w ramach niniejszej rozprawy materiał chitozanowo-białkowy oraz opatrunek Hydrocoll. Pozostałe czternaście można podzielić na trzy grupy: 1) materiały powodujące spadek pH o nie więcej niż 0,5 jednostki (Matopat Silver Pad, Silvercell, Aquagel, Mepilex Ag); 2) materiały powodujące spadek pH w zakresie 0,5 do 1,0 jednostki (Melgisorb Ag, Algivon, Bactigras, Suprasorb C) oraz 3) materiały powodujące spadek pH w zakresie od 1,0 do 2,0 jednostek (Aquacel, Aquacel Ag, Inadine, Fabricoll, Kaltostat i Granuflex), przy czym największy spadek pH zaobserwowałem dla materiałów Granuflex i Kaltostat, odpowiednio do poziomu równego 4,4. W praktyce medycznej panuje przekonanie, że odczyn środowiska rany odgrywa istotną rolę w procesie jej gojenia,

a odpowiednie nim sterowanie może pomóc w kontroli czystości mikrobiologicznej, gospodarce tlenowej, aktywności metaloproteinaz, procesu angiogenezy, a także w redukcji toksycznego wpływu produktów przemiany materii flory mikrobiologicznej kolonizującej jej powierzchnię [Basavraj i in. 2015]. Badania odczynu uszkodzonych tkanek skóry wykazały, że odczyn środowiska większości z nich zawiera się w okolicach  $\text{pH} = 7$ , natomiast ran trudno gojących wykazuje lekko zasadowy charakter w zakresie  $\text{pH}$  od 7,15 do 8,9 [Wilson i in. 1979, Tsukada i in. 1992, Shukla i in. 2007]. Obserwacje wskazują także, że wraz z postępem ich gojenia  $\text{pH}$  środowiska stopniowo spada, przesuwał się w stronę wartości kwaśnych, charakterystycznych dla zdrowej tkanki [Gethin 2007]. Inne z kolei donoszą o zmniejszonym tempie gojenia ran o stosunkowo wysokim odczynie, w stosunku do ran o odczynie kwaśnym. Wysokie  $\text{pH}$  sprzyja aktywności metaloproteinaz, które mogą być produkowane zarówno przez komórki gospodarza, jak i bakterie kolonizujące środowisko rany, redukując szybkość procesu gojenia, na skutek degradacji białek matrycy międzykomórkowej. Uważa się, że idealny materiał opatrunkowy nie powinien wpływać na równowagę kwasowo-zasadową skóry zdrowej, a każde odchylenie zarówno w stronę bardziej kwaśnego bądź bardziej zasadowego odczynu może powodować jej podrażnienia. Niemniej jednak w terapiach leczenia ran przewlekłych korzystna jest zdolność do redukcji odczynu  $\text{pH}$  i jego utrzymywania na poziomie neutralnym bądź lekko kwaśnym. Otrzymany przeze mnie materiał chitozanowo-białkowy nie spełnia tak sprecyzowanego kryterium idealnego opatrunku medycznego przeznaczonego w terapiach ran trudno gojących. Nie oznacza to jednak jego nieprzydatności we wskazanym zakresie, bowiem terapie leczenia ran przewlekłych często są terapiami kombinowanymi, gdzie poza doбором odpowiednich opatrunków uwzględnia się jej przemywanie rozcieńczonymi roztworami kwasów [Basavraj i in. 2015].

Ocenę właściwości przeciwutleniających wybranych materiałów przeprowadziłem na drodze analizy wartości parametrów  $\text{EC}_{50}$  względem roztworów wolnych rodników DPPH, kationo-rodników ABTS oraz jonów  $\text{Fe}^{2+}$ , każdorazowo wyznaczając masę dla danego materiału, która powodowała 50% redukcję absorbancji roztworu zawierającego wolne rodniki bądź jony żelaza w określonym czasie. Przeprowadzone porównanie wskazało, że część z wybranych materiałów nie wykazała aktywności w żadnym z trzech przeprowadzonych oznaczeń. Do grupy tej należą opatrunki Melgisorb Ag, Aquacel Ag oraz Kaltostat. Wśród materiałów o najwyższej zdolności do inaktywacji wolnych rodników DPPH znalazły się opatrunki Inadine, Algivon, Suprasorb, Mepilex Ag, a także otrzymany przeze mnie materiał chitozanowo-białkowy, dla których wartość parametru  $\text{EC}_{50}$  oznaczyłem na poziomie poniżej 10 mg/ml. Drugą grupę stanowiły trzy opatrunki o ponad dwukrotnie niższej aktywności: Granuflex, Matopat Silver Pad oraz Silvercell. Natomiast trzecią, najmniej aktywną grupę utworzyły Hydrocoll oraz Aquagel, dla których wartość wyznaczonego parametru była odpowiednio 10-cio i 66-cio krotnie wyższa (a aktywność w konsekwencji niższa) w stosunku do porównywanego materiału chitozanowo-białkowego. Trzy wymienione wyżej, a także Fabricoll Plus, Aquacel i Bactigras nie wykazały zdolności

do wymiatania wolnych rodników DPPH. Z kolei w grupie materiałów o najwyższej zdolności do wymiatania kationo-rodników ABTS obok tych samych materiałów, jakie najefektywniej wymiatają rodniki DPPH, znalazły się dodatkowo opatrunki Fabricoll Plus oraz Aquacel, których masa niezbędna do osiągnięcia wartości odpowiadającej parametrowi  $EC_{50}$  oznaczona została na poziomie nie wyższym niż 1,29 mg/ml. Opatrunki Hydrocoll, Aquagel i Bactigras także podczas tego oznaczenia cechowały się najwyższymi wartościami parametru  $EC_{50}$  i w konsekwencji najniższą zdolnością do neutralizacji roztworu kationo-rodników (wartości odpowiednio równe 15,42; 141,01 oraz 34,94 mg/ml). Opatrunek Silvercell dołączył do materiałów, które w warunkach prowadzonego doświadczenia były obojętne względem obecnych w roztworze kationo-rodników ABTS. Natomiast zdolność do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$  wykazały jedynie cztery dostępne komercyjnie opatrunki: Mepilex Ag, Suprasorb C, Aquagel, Fabricoll Plus oraz materiał chitozanowo-białkowy, z których najwyższe działanie wykazały dwa ostatnie wymienione materiały (wartość  $EC_{50}$  odpowiednio na poziomie 0,17 i 4,67 mg/ml). Rola materiałów wykazujących aktywność przeciwutleniającą w procesie regeneracji ran została przeze mnie szczegółowo omówiona podczas charakterystyki otrzymanych w ramach niniejszej rozprawy różnych materiałów zbudowanych z kolagenu, żelatyny, chitozanu, a także we wprowadzeniu teoretycznym (**Wprowadzenie 2.2.4.2, Wyniki i Dyskusja 5.2.1, 5.3.1.7**). W przeciwieństwie do właściwości przeciwdrobnoustrojowych, zaprezentowane porównanie jest jednym z niewielu dostępnych w literaturze doniesień opisujących właściwości przeciwutleniające komercyjnie dostępnych materiałów opatrunkowych i najprawdopodobniej pierwszym, jakie w jednorodnych warunkach ukazuje relacje pomiędzy tak różnorodną grupą materiałów. Pomimo wskazanej różnorodności, w zestawionych wynikach trzech testów można doszukać się pewnych prawidłowości. Materiały zbudowane w 100% z włókien alginianu sodu/wapnia (Melgisorb Ag, Kaltostat, Silvercell) wykazały w warunkach prowadzonego doświadczenia najniższą aktywność bądź nie wykazały jej wcale wobec roztworów DPPH, ABTS i jonów żelaza (II). Natomiast wśród materiałów o najwyższym charakterze przeciwutleniającym znalazły się materiały zawierające w swojej matrycy kolagen (Fabricoll, Suprasorb C oraz otrzymany przeze mnie materiał chitozanowo-białkowy). Wyniki aktywności uzyskane dla materiałów alginianowych nie mają potwierdzenia w znanych doniesieniach literaturowych, bowiem już kilkakrotnie wykazano zarówno aktywność względem rodników DPPH, jak i zdolność do wiązania/chelatowania jonów metali ciężkich w tym żelaza, przez roztwory alginianów sodu o różnej masie cząsteczkowej [Berner i in. 1983, Papageorgiou i in. 2006, Sen 2011, Sellimi i in. 2015]. Przedstawione doniesienia skupiają się jednak na oznaczeniach aktywności alginianów w postaci ich roztworów, a nie w postaci materiałów włóknistych, co może być przyczyną dokonanych obserwacji. Opatrunki Algivon oraz Inadine, impregnowane związkami o dobrze scharakteryzowanych właściwościach przeciwutleniających [Al-Kaisy i in. 2005, Bertonecelj i in. 2007, Ferreira i in. 2009], należały także do materiałów, które w przeprowadzonym doświadczeniu wykazały bardzo dobre rezultaty względem pozostałych materiałów (testy DPPH i ABTS), aczkolwiek nie wykazały zdolności do chelatowania jonów



żelaza (II). Właściwości przeciwutleniające związków i otrzymanych z nich materiałów stanowią wypadkową bardzo wielu mechanizmów. Należy mieć na uwadze, że wybrane przeze mnie testy pozwalają na określenie jedynie części z nich, dlatego brak bądź niskie wyniki oznaczone dla niektórych porównywanych materiałów opatrunkowych nie muszą wskazywać o całkowitym braku ich aktywności przeciwutleniających.

## 6. PODSUMOWANIE

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej doprowadziły do:

1. Zaproponowania nowej metody otrzymywania materiałów na bazie chitozanu, kolagenu i żelatyny, charakteryzującej się tym, że chitozan rozpuszczany jest w wodzie na skutek saturacji gazowym ditlenkiem węgla wodnej zawiesiny chitozanu mikrokryształicznego, a nie jak w dotychczas znanych postępowaniach w wodnych roztworach kwasów organicznych, a następnie tak otrzymany wodny roztwór chitozanu mieszany jest z wodną zawiesiną kolagenu w roztworze żelatyny, dodatkami funkcyjnymi, kondycjonowany, zamrażany i poddawany suszeniu sublimacyjnemu w celu uzyskania porowatej struktury. Nowa metoda pozwoliła na wyeliminowanie czaso- i energochłonnych etapów związanych z wypłukiwaniem resztkowej zawartości kwasów i powtórным suszeniem, co w konsekwencji umożliwiło jej wykorzystanie do otrzymywania materiałów chitozanowo-białkowych z inkorporowaną lizostafiną, która może być wprowadzana do układu już na etapie formułowania matrycy chitozanowo-białkowej bez obawy o jej częściową utratę na skutek procesów towarzyszących przemywaniu bądź bez obawy o częściową utratę jej aktywności, na skutek wprowadzenia jej do roztworu o kwaśnym odczynie.
2. Otrzymania szeregu materiałów chitozanowo-białkowych, z wykorzystaniem w/w nowej technologii, przy różnym stężeniu genipiny, użytej jako czynnika sieciującego, które następnie poddano szczegółowej charakterystyce:
  - zaobserwowano liniową zależność pomiędzy stężeniem wprowadzanej do układu biopolimerów genipiny, a stopniem usieciowania otrzymanych materiałów chitozanowo-białkowych, uzyskując wartości stopnia usieciowania w zakresie od 7,3 do 27,6% odpowiednio dla stężenia genipiny w zakresie od 0,5 do 2,0%, w/w względem suchej masy biopolimerów.
  - wykazano, że wbrew oczekiwaniom wraz ze wzrostem stężenia dodawanej genipiny rosła porowatość otrzymanych w zaproponowanym układzie materiałów chitozanowo-białkowych;
  - wykazano, że wszystkie otrzymane materiały cechowały się dużą zdolnością do wiązania cieczy, uzyskując średnią wartość na poziomie 25 g/g swojej masy względem Cieczy A, o składzie jonowym zbliżonym do wysięku z rany, przy czym wraz ze wzrostem stężenia genipiny wartość tego parametru nieznacznie malała. Otrzymane materiały spełniają zatem wytyczne farmakopei europejskiej dla materiałów opatrunkowych wysokochłonnych ( $\geq 6,0$  g/g). Wykazano także, że chłonność tych materiałów jest ponad dwukrotnie wyższa, gdy oznaczenie prowadzone jest w wodzie destylowanej.
  - zgodnie z oczekiwaniami wraz ze wzrostem użytego stężenia czynnika sieciującego otrzymywano materiały o coraz mniejszej rozpuszczalności, przy czym ubytek masy na skutek 24 godzinnej inkubacji w roztworze Cieczy A wynosił od 28,4 do 15,5% w/w.

Profil rozpuszczania, wyznaczony w trakcie pięciodniowego testu wskazał, że zarówno materiały sieciowane 0,5 i 2,0%-wym stężeniem genipiny uzyskiwały maksymalną rozpuszczalność po około 72 godzinach od momentu rozpoczęcia testu (31,4 i 22,5% w/w). Zaproponowano, że mechanizm rozpuszczania otrzymanych materiałów chitozanowo-białkowych, związany jest głównie z rozpuszczaniem zawartej w nich żelatyny.

- wykazano, że wszystkie otrzymane materiały są przepuszczalne względem par wilgoci i cechują się wartością tego parametru na poziomie  $400 \text{ g/m}^2$ , co nie wpływa na normalne tempo utraty wody przez skórę. Natomiast nie zaobserwowano wpływu stopnia usieciowania na wartość tego parametru.
  - wykazano, że wraz ze wzrostem stopnia usieciowania rosła twardość, a malała elastyczność otrzymanych materiałów. Wszystkie materiały chitozanowo-białkowe za wyjątkiem materiałów niezawierających genipiny pozytywnie ukończyły test wytrzymałościowy polegający na dwudziestopięciokrotnym ściskaniu materiałów po ich uprzedniej preinkubacji w wodnym roztworze Cieczy A, do połowy ich wysokości. Materiały sieciowane zachowały swoją przestrzenną strukturę, tracąc jedynie około 6% związanej początkowo cieczy, podczas gdy ubytek masy dla materiałów niesieciowanych wyniósł około 40%.
  - oznaczenie ubytku masy na skutek hydrolitycznej aktywności lizozymu, w trakcie siedmiodniowego testu, w stosunku do materiału otrzymanego przy 0,5%-wym stężeniu genipiny, wykazało niewielką jego podatność na wskazane działanie po pierwszych 24 h (1,05%, w/w). Wartość ta wzrosła do 5,78%, w/w na koniec eksperymentu. Zaproponowano, że w warunkach docelowego użytkowania materiałów, ten rodzaj mechanizmu degradacji matrycy, nie będzie wywierał istotnego wpływu na profil uwalniania inkorporowanych w takich matrycach związków aktywnych.
  - wykazano, że wybrany materiał chitozanowo-białkowy, sieciowany 0,5% genipiną, może efektywnie neutralizować wolne rodniki DPPH, kationo-rodniki ABTS, jak również chelatować dwuwartościowe jony żelaza. We wszystkich trzech testach uzyskano liniową odpowiedź mierzonego parametru od masy materiału, co pozwoliło na wyznaczenie wartości parametrów  $EC_{50}$ , odpowiednio na poziomie równym:  $EC_{50 \text{ DPPH}} = 6,45 \text{ mg/ml}$ ,  $EC_{50 \text{ ABTS}} = 0,79 \text{ mg/ml}$  oraz  $EC_{50 \text{ Fe}^{2+}} = 4,67 \text{ mg/ml}$ .
  - badanie cytotoksyczności względem mysich komórek fibroblastów (NIH-3T3), przeprowadzone za pomocą testu MTT, nie wykazały negatywnego wpływu na żywotność i morfologię komórek, które wzrastały w obecności materiałów chitozanowo-białkowych sieciowanych 0,5% genipiną. Wynik na poziomie  $102,99 \pm 9,25\%$ .
3. Otrzymanie szeregu materiałów chitozanowo-białkowych z inkorporowaną lizostafyną o różnym stężeniu lizostafiny i genipiny, które następnie poddano analizie pod kątem aktywności względem komórek *S. aureus* oraz profilu uwalniania lizostafiny:

- wykazano, że zaproponowana metoda otrzymywania matryc chitozanowo-białkowych z inkorporowaną lizostafyną pozwala utrzymać aktywność biologiczną lizostafiny, jaka wprowadzana była do układu już na etapie jego formulacji, przy czym w warunkach otrzymywania nie dochodziło do całkowitego jej unieruchomienia, a kinetyka jej uwalniania zależna była zarówno od stężenia użytej do sieciowania genipiny, jak również początkowego stężenia enzymu. W przypadku materiału niesieciowanego, o początkowym stężeniu użytej lizostafiny równej 10 U/ml dyspersji polimerów, uwolnieniu uległo prawie 90% zawartej w materiałach lizostafiny, w ciągu 90 minut od rozpoczęcia oznaczeń. Wzrost stężenia czynnika sieciującego spowodował wyraźne ograniczenie tego zjawiska do poziomów 50, 40 i 30% odpowiednio dla materiałów sieciowanych 0,5, 1,0 i 2,0% genipiną. Ocena profilu uwalniania enzymu z materiałów otrzymanych przy różnej jego zawartości wykazała, że wraz ze wzrostem zawartości lizostafiny uwalnianiu ulegał coraz mniejszy jej procent. Zasugerowano, że większa zawartość lizostafiny w roztworze polimerów na etapie otrzymywania materiałów chitozanowo-białkowych sprzyja jej unieruchomieniu w wyniku reakcji z genipiną. Bez względu na stężenie użytej genipiny, a także początkową ilość lizostafiny, charakter uzyskanego profilu uwalniania wskazał, że większość niezwiązanej z matrycą lizostafiny została uwolniona w ciągu pierwszych 30 minut prowadzenia doświadczenia.
  - wykazano, że żaden ze 143 szczepów *S. aureus* pochodzących z różnych populacji, gdzie 59 wyizolowano z zakażonych ran ludzkich (w tym 6 MRSA), a 84 pochodziło z gruczołu mlekowego zwierząt chorych na *mastitis*, nie jest oporny na działanie aktywowanych lizostafyną wybranych materiałów chitozanowo-białkowych. Oznaczenia przeprowadzono z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej poprzez wyznaczenie czasu, po jakim gęstość optyczna OD<sub>595</sub> zawiesiny komórek *S. aureus* spadła do zera w wyniku jej dynamicznego kontaktu z materiałem chitozanowo-białkowym zawierającym lizostafynę. Wykazano, że czas ten zawierał się w przedziale od 10 do 95 minut, przy czym ciekawą obserwację stanowiły różnice we wrażliwości na działanie zawartej w materiale lizostafiny pomiędzy szczepami wyizolowanymi z różnych źródeł. W warunkach przeprowadzonego doświadczenia szczepami, których komórki uległy całkowitej lizie w najkrótszym czasie okazały się być te pochodzenia bydłowego. W obrębie populacji komórek wyizolowanych z ran ludzkich, pochodzących z różnych ośrodków, bardziej wrażliwymi szczepami okazały się być te pochodzące od pacjentów ze szpitala w Koszalinie niż te otrzymane ze szpitala w Vaxjo. Ważną informacją uzyskaną w wyniku przeprowadzonego doświadczenia jest także brak oporności na działanie lizostafiny szczepów z grupy MRSA.
4. Porównania wybranych właściwości fizykochemicznych oraz aktywności przeciwdrobnoustrojowej wybranych materiałów chitozanowo-białkowych aktywowanych lizostafyną z piętnastoma komercyjnie dostępnymi materiałami opatrunkowymi, wśród których znalazły się opatrunki zbudowane zarówno z polimerów naturalnych (kolagenu, karboksymetylocelulozy, soli kwasu alginowego, bawełny), jak

i opatrunki syntetyczne (poliuretanowe i z poliwinylpirolidonu); materiały należące do grupy opatrunków hydrożelowych, hydrokoloidowych, włóknistych, gąbczastych, a także opatrunki o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych:

- wykazano, że wśród dziewięciu materiałów o deklarowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej (Bactigras, Inadine, Matopad Silver Pad, Melgisorb Ag, Mepilex Ag, Algivon, Silvercell, Aquacel Ag), jedynie Mepilex Ag i Inadine, a także opracowany materiał chitozanowo-białkowy zawierający lizostafinę, zredukowały liczbę komórek *S. aureus* do poziomu poniżej progu oznaczalności, już po czterogodzinnym kontakcie z ich zawiesiną, natomiast opatrunki Algivon i Matopad Silver Pad wykazały najniższą aktywność powodując spadek liczby drobnoustrojów jedynie o dwa rzędy logarytmiczne (metoda ilościowa polegająca na określeniu spadku ilości komórek mikroorganizmów w czasie, w trakcie dynamicznego kontaktu ich zawiesiny z materiałem opatrunkowym, metodą seryjnych rozcieńczeń). Opatrunki Mepilex Ag i Inadine wykazały także najwyższą skuteczność względem pozostałych trzech badanych szczepów *S. epidermidis*, *E. coli* i *P. aeruginosa*.
- wykazano istotne różnice w aktywności opatrunków srebrowych (Matopad Silver Pad, Melgisorb Ag, Mepilex Ag, Aquacel Ag), przy czym nie zaobserwowano korelacji pomiędzy deklarowaną zawartością srebra, a oznaczoną aktywnością przeciwdrobnoustrojową wobec badanych mikroorganizmów.
- badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej z wykorzystaniem metody dyfuzyjnej potwierdziło, że wszystkie badane materiały były aktywne wobec wybranych szczepów, o czym świadczą zaobserwowane mniejsze bądź większe strefy zahamowania wzrostu.
- wykazano brak korelacji wyników aktywności przeciwdrobnoustrojowej dla niektórych materiałów oznaczonych za pomocą obu metod badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Opatrunek Inadine, który należał do grupy opatrunków o największej aktywności względem wszystkich badanych mikroorganizmów w oznaczeniu ilościowym, w przypadku metody dyfuzyjnej na podłożu stałym okazał się być jednym z materiałów powodujących najmniejsze strefy zahamowania wzrostu. Podobny wynik uzyskano dla materiału chitozanowo-białkowego aktywowanego lizostafiną wobec komórek *S. aureus*. Natomiast opatrunek Algivon, który powodował spadek liczby drobnoustrojów podczas testu ilościowego jedynie o 1-2 jednostki logarytmiczne, okazał się należeć do materiałów, wokół których zaobserwowano największe strefy zahamowania wzrostu względem obu komórek bakterii Gram (+). Zasugerowano, że brak korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi obiema metodami może wynikać zarówno z różnic w budowie chemicznej wykorzystanych związków aktywnych, a także z różnic w metodologiach dla obu wykorzystanych metod.
- porównanie cytotoksyczności względem komórek NIH-3T3 wykazało, że żaden z komercyjnie dostępnych materiałów opatrunkowych nie wpłynął korzystnie na poziom proliferacji fibroblastów, powodując w mniejszym bądź w większym stopniu redukcję

żywności komórek, w stosunku do próby kontrolnej. Jedynie materiały chitozanowo-białkowe, otrzymane na drodze opisanej w tej pracy metodologii, nieznacznie stymulowały wzrost fibroblastów, osiągając tym samym najlepszy wynik w grupie wybranych materiałów, wzrost komórek na poziomie  $103 \pm 9\%$  i  $98 \pm 8\%$  odpowiednio dla materiałów bez dodatku lizostafiny i materiałów ją zawierających. Wśród materiałów powodujących najmniejsze zahamowanie wzrostu komórek znalazły się materiały Fibracoll Plus, Suprasorb C, Matopat Silver Pad, oraz Hydrocoll, dla których osiągnięto wzrost komórek w zakresie od około 90 do 70% względem próby kontrolnej. Zgodnie z oczekiwaniami wykazano, że wśród opatrunków powodujących największe zahamowanie wzrostu fibroblastów, znajdowały się materiały o najwyższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, co uzasadniono niespecyficznymi mechanizmami aktywności zawartych w nich związków aktywnych. Zasugerowano, że wykorzystanie czynników aktywnych, takich jak lizostafina, o wysoce specyficznych mechanizmach aktywności mogłoby doprowadzić do konstrukcji materiału opatrunkowego, który nie wprowadzałby do środowiska zakażonej rany dodatkowego czynnika negatywnie oddziałującego na proces jej regeneracji, zachowując przy tym wysoką aktywność względem komórek patogennych.

- porównanie wybranych właściwości fizykochemicznych wykazało, że otrzymany z wykorzystaniem nowej technologii materiał chitozanowo-białkowy cechuje się największą zdolnością do pochłaniania cieczy i razem z opatrunkami: Aquacel, Aquacel Ag, Melgisorb Ag, Kaltostat, Silvercell, Fabricoll Plus, Mepilex Ag oraz Matopat Silver Pad spełnia farmakopealne kryteria dla materiałów wysokochłonnych.
- badanie stopnia rozpuszczalności wybranych materiałów opatrunkowych wykazało, że wyższą rozpuszczalnością cechowały się wszystkie materiały wykonane z polimerów naturalnych, tracąc na skutek 24 godzinnej inkubacji w roztworze Cieczy A od około 20 do 100% swojej wyjściowej masy.
- przeprowadzone oznaczenia pH roztworów, jakie pozostały po badaniu chłonności/rozpuszczalności wykazały, że jedynie dwa materiały nie wywołały istotnego wpływu na wartość mierzonego parametru: otrzymany w ramach niniejszej rozprawy materiał chitozanowo-białkowy oraz opatrunek Hydrocoll. Pozostałe czternaście można podzielić na trzy grupy: 1) materiały powodujące spadek pH o nie więcej niż 0,5 jednostki (Matopat Silver Pad, Silvercell, Aquagel, Mepilex Ag); 2) materiały powodujące spadek pH w zakresie 0,5 do 1,0 jednostki (Melgisorb Ag, Algivon, Bactigras, Suprasorb C) oraz 3) materiały powodujące spadek pH w zakresie od 1,0 do 2,0 jednostek (Aquacel, Aquacel Ag, Inadine, Fabricoll, Kaltostat i Granuflex), przy czym największy spadek pH zaobserwowano dla materiałów Granuflex i Kaltostat, odpowiednio do poziomu pH równego 4,4.
- wykazano, że materiały zbudowane w 100% z włókien alginianu sodu/wapnia (Melgisorb Ag, Kaltostat, Silvercell) wykazywały w warunkach prowadzonego doświadczenia

najniższą aktywność bądź nie wykazywały jej wcale, wobec roztworów DPPH, ABTS i jonów żelaza (II). Natomiast wśród materiałów o najwyższym charakterze przeciwutleniającym znalazły się materiały zawierające w swojej matrycy kolagen (Fibracoll, Suprasorb C oraz otrzymany przeze mnie materiał chitozanolowo-białkowy).

5. Wskazania zależności pomiędzy rodzajem preparatu biopolimerowego (chitozanu, żelatyny bądź kolagenu), a wybranymi właściwościami wytworzonych z nich materiałów gąbczastych przy wykorzystaniu standardowych procedur przetwarzania chitozanu (rozpuszczanie w wodnym roztworze kwasu octowego):
  - analiza wartości cząstkowych zmiennych (chłonność, rozpuszczalność, twardość, elastyczność, zdolność do wymiatania rodnika DPPH, zdolność do wymiatania kationo-rodnika ABTS, zdolność do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$ , wrażliwość na degradację enzymatyczną względem lizozymu po 1 dniu ekspozycji, wrażliwość na degradację enzymatyczną względem lizozymu po 5 dniach ekspozycji) oraz analiza podobieństwa, za pomocą metody głównych składowych, materiałów otrzymanych na bazie chitozanu, kolagenów i żelatyny, a także materiałów otrzymanych w wyniku połączenia chitozanu z preparatami białkowymi, wykazała wyraźne różnice pomiędzy materiałami otrzymanymi w 100% z kolagenów, żelatyn i chitozanu. Wynik przeprowadzonej analizy wskazuje także, że łącząc dane dwa polimery w tej samej ilości możliwe jest uzyskanie materiału o właściwościach stanowiących wypadkową właściwości dla materiałów wykonanych z obu polimerów.
  - wykazano, że największą zdolnością do wiązania cieczy charakteryzowały się układy zawierające w swojej strukturze chitozan, najmniejszą zaś układy otrzymane wyłącznie z polimerów białkowych. Badanie rozpuszczalności wykazało, że w warunkach prowadzonego doświadczenia najmniejszy ubytek masy zaobserwowano dla materiałów otrzymanych w 100% z kolagenów, zaś największą dla materiałów żelatynowych. Ubytek masy dla materiału otrzymanego w 100% z chitozanu stanowił natomiast trzykrotnie mniejszą wartość w stosunku do obu materiałów żelatynowych i ponad dwukrotnie wyższą wartość w stosunku do materiałów kolagenowych. Materiały zawierające w swoim składzie żelatynę okazały się być twardsze i jednocześnie wolniej odzyskiwały kształt po ściśnięciu, niż te zawierające kolagen. Z kolei materiały otrzymane w 100% z chitozanu okazały się być twardsze od materiałów kolagenowych średnio o 30% i ponad dwukrotnie mniej elastyczne. Natomiast w stosunku do materiałów żelatynowych cechowały się mniejszymi wartościami obu mierzonych parametrów średnio o 40 i 30%.
  - wykazano, że wszystkie otrzymane materiały posiadają zdolność do neutralizacji rodników DPPH, kationo-rodników ABTS, a także wykazują zdolność do chelatowania jonów  $Fe^{2+}$ , przy czym materiały zawierające w swojej strukturze kolageny wyizolowane z obu gatunków ryb cechują się wyraźnie niższymi wartościami trzech mierzonych parametrów w stosunku do materiałów zawierających żelatynę. Uzyskane wyniki

wskazały, że materiały chitozanowe posiadają średnio ponad cztero- i dwukrotnie niższą zdolność do wymiatania rodników DPPH oraz dziewięć- i trzykrotnie niższą zdolność do chelatowania jonów żelaza (II) względem materiałów zbudowanych odpowiednio z kolagenów i żelatyn.

- analiza uzyskanych wyników wykazała wyraźne różnice we właściwościach materiałów otrzymanych z preparatów białkowych wyizolowanych z różnych gatunków ryb – dotyczy to także materiałów chitozanowo-białkowych. Wykazano, że materiały gąbczaste zawierające w sobie kolagen bądź żelatynę z łososia atlantyckiego cechowały się mniejszą chłonnością, wyższą rozpuszczalnością, niższą twardością, wyższą elastycznością, w stosunku do materiałów otrzymanych z kolagenu bądź żelatyny z suma afrykańskiego, a także różniły się wartościami parametrów określających właściwości przeciwutleniające. Zaproponowano, że zaobserwowane różnice mogą być wynikiem różnic w składzie aminokwasowym obu preparatów, odwołując się do uzyskanych przez dr. Tylingo wyników oznaczeń składów aminokwasowych.
  - zgodnie z oczekiwaniami wykazano, że jedynie materiały zawierające w swoim składzie chitozan podatne są na hydrolityczne działanie lizozymu, przy czym ubytek masy związany z tym mechanizmem degradacji matrycy zwiększył się z poziomu 3,6 do 8,4%, dla materiałów otrzymanych w 100% z tego biopolimeru. Zaproponowano, że ubytek masy spowodowany aktywnością lizozymu w przypadku materiałów chitozanowo-kolagenowych, w stosunku do ubytku masy utraconej na skutek procesów rozpuszczania, może mieć dużo większe znaczenie w projektowaniu systemów do kontrolowanego uwalniania związków aktywnych, niż w przypadku materiałów chitozanowo-żelatynowych.
6. Zwiększenia skali wytwarzania lizostafiny, poprzez optymalizację procesu jej ekspresji, w układzie *E. coli* TOP10F'/pBAD2lys, w bioreaktorze o objętości roboczej 5 l (prace związane z tym wątkiem badawczym przedstawiono w załączonym do rozprawy suplemencie):
- wykazano, że optymalnymi warunkami dla wskazanego procesu są: częstotliwość obrotów mieszadła mechanicznego 400 rpm, pH 6,0; temperatura 37°C oraz czas 8h od momentu indukcji, dla których uzyskano następujące wartości parametrów procesu ekspresji lizostafiny: mokra masa osadu komórek bakteryjnych 5,65±1,04 g/l, wydajność ekspresji białka 18,39±0,92 mg/l, aktywność specyficzna lizostafiny 639±62 U/mg, liczba jednostek lizostafiny uzyskiwana z jednego litra hodowli 11787±1701 U/l. Wykazano, że w tak zdefiniowanych warunkach możliwe jest uzyskanie odpowiednio o 377 i 28% wyższe wartości dla wydajności specyficznej ekspresji i aktywności specyficznej enzymu w stosunku do procesu prowadzonego wcześniej w kolbach laboratoryjnych w tym samym układzie ekspresyjnym przez Szwedę i współpracowników.
  - wykazano, że modyfikacja składu pożywki hodowlanej oraz warunków prowadzenia hodowli komórkowej, dla procesu prowadzonego w warunkach uznanych za optymalne,



może prowadzić do dalszego zwiększenia wydajności ekspresji lizostafyny w układzie *E. coli* TOP10F'/pBAD2lys. Wykazano bowiem, że wykorzystując jako medium hodowlane wzbogaconą pożywkę LB z suplementacją glicerolem w natężeniu 3g/l/h, można uzyskać wydajność ekspresji lizostafyny na poziomie 35,6 mg/l oraz enzym o aktywności specyficznej 728 U/mg i w konsekwencji wydajność specyficzną procesu ekspresji na poziomie 26000 U/l prowadzonej hodowli, co stanowi wynik ponad ośmiokrotnie wyższy w stosunku do wydajności jaką uzyskali Szweda i współpr. prowadząc proces w kolbach laboratoryjnych (3125 U/l).

Badania w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej sfinansowane zostały w ramach projektu VENTURES Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. Umowa nr: VENTURES/2010-5/2.



**INNOWACYJNA  
GOSPODARKA**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI FUNDUSZ  
ROZWOJU REGIONALNEGO



## 7. LITERATURA

- Adekogbe I., Ghanem A., Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials* 26: 7241-7250 (2005).
- Adhirajan N., Shanmugasundaram N., Shanmuganathan S., Babu M., Functionally modified gelatin microspheres impregnated collagen scaffold as novel wound dressing to attenuate the proteases and bacterial growth. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36: 235-245 (2009).
- Alemán A., Giménez B., Montero P., Gómez-Guillén M.C., Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT-Food Sci. Technol.* 44: 407-413 (2011).
- Aley S.B., Zimmerman M., Hetsko M., Selsted M.E., Gillin F.D., Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides. *Infect. Immun.* 6: 5397-5403 (1994).
- Al-Kaisy A.A., Salih Sahib A., Role of the Antioxidant Effect of Vitamin E With Vitamin C and Topical Povidone-Iodine Ointment in The Treatment of Burns. *Ann. Burn. Fire Disasters.* 18(1):19-30 (2005).
- Amidi M., Mastrobattista E., Jiskoot W., Hennink W.E., Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62: 59-82 (2010).
- Annabi N., Mithieux S.M., Weiss A.S., Dehghani F., The fabrication of elastin-based hydrogels using high pressure CO<sub>2</sub>. *Biomaterials* 30: 1-8 (2009).
- Annabi N., Mithieux S.M., Boughton E.A., Ruys A.J., Weiss A.S., Dehghani F., Synthesis of highly porous crosslinked elastin hydrogels and their interaction with fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 30: 4550-4557 (2009a).
- Annabi N., Mithieux S.M., Weiss A.S., Dehghani F., Cross-linked open-pore elastic hydrogels based on tropoelastin, elastin and high pressure CO<sub>2</sub>. *Biomaterials* 31: 1655-1665 (2010).
- Anraku M., Fuji T., Furutani N., Kadowaki D., Maruyama T., Otagiri M., Gebicki J.M., Tomida H., Antioxidant effects of a dietary supplement: reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan. *Food Chem. Toxicol.* 47: 104-109 (2009).
- Anraku M., Kabashima M., Namura H., Maruyama T., Otagiri M., Gebicki, J.M., Furutani N., Tomida H., Antioxidant protection of human serum albumin by chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 43: 159-164 (2008).
- Aoyagi S., Onishi H., Machida Y., Novel chitosan wound dressing loaded with minocycline for the treatment of Chitosan Sponges to Locally Deliver Amikacin and Vancomycin. *Int. J. Pharm.* 330: 138-145 (2007).
- Aramwit P., Muangman P., Amviriyachote N., Srichana T., Moisture Binding Properties of Wound Dressings. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 2864-2874 (2010).
- Arpornmaeklong P., Pripatnanont P., Suwatwirote N., Properties of chitosan-collagen sponges and osteogenic differentiation of rat bone-marrow stromal cells. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 37:357-66 (2008).
- Austero M.S., Donius A.E., Wegst U.G.L., Schauer C.L., New crosslinkers for electrospun chitosan fibre mats. I. Chemical analysis. *J. R. Soc. Interface* 9(75): 2551-2562 (2012).
- Aytimur S., Kocyigit I., Synthesis and Characterization of Poly(vinyl alcohol)/Poly(vinyl pyrrolidone)-Iodine Nanofibers with Poloxamer 188 and Chitosan. *Polym-Plast. Technol.* 52: 661-666 (2013).
- Badylak S.F., Gilbert T.W., Immune response to biologic scaffold materials. *Semin. Immunol.* 20: 109-116 (2008).
- Baran T., Menteş A., Arslan H., Synthesis and characterization of water soluble O-carboxymethyl chitosan Schiff bases and Cu(II) complexes. *Int. J. Biol. Macromol.* 72: 94-103 (2015).
- Barrett S. Mepilex ag: an antimicrobial, absorbent foam dressing with safetac technology. *Br. J. Nurs.* 18(20): 30-36 (2009).

- Berner L.A., Hood L.F., Iron Binding by Sodium Alginate. *J. Food Sci.* 48(3): 755-758 (1983).
- Bertoncelj J., Doberšek U., Jamnik M., Golob T., Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.* 105: 822-828 (2007).
- Bhatia S.C., Ravi N., Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Biomacromolecules* 4: 723-732 (2003).
- Bi L., Cao Z., Hu Y., Song Y., Yu L., Yang B., Mu J., Huang Z., Han Y., Effects of different cross-linking conditions on the properties of genipin-cross-linked chitosan/collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22: 51-62 (2011).
- Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., Rubini K., Roveri N., Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials* 22(8): 763-768 (2001).
- Boateng J.S., Matthews K.H., Stevens H.N.E., Eccleston G.M., Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J. Pharm. Sci.* 97(8): 2892-2923 (2008).
- Boddohi S., Moore N., Johnson P.A., Kipper M.J., Polysaccharide-based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan, heparin, and hyaluronan. *Biomacromolecules* 10: 1402-1409 (2010).
- Bohling A., Hagge S.O., Roes S., Podschun R., Sahly H., Harder J., Schröder J.M., Grotzinger J., Gutschmann T., Lipid-Specific Membrane Activity of Human beta-Defensin-3. *Biochemistry* 45: 5663-5670 (2006).
- Boman H.G., Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 61-92 (1995).
- Boucard N., Viton C., Domard A., New aspects of the formation of physical hydrogels of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomacromolecules* 6: 3227-3237 (2006).
- Bowler P.G., The 10(5) Bacterial Growth Guideline: Reassessing Its Clinical Relevance in Wound Healing. *Ostomy Wound Manag.* 49: 44-53 (2003).
- Brack H.P., Tirmizi S.A., Risen W.M., A spectroscopic and viscometric study of the metal ion-induced gelation of the biopolymer chitosan. *Polymer* 38: 2351-2362 (1997).
- Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976).
- Bradshaw C.E., An in vitro comparison of the antimicrobial activity of honey, iodine and silver wound dressings; *Bioscience Horizons* 4: 61-70 (2011).
- Brock J.H., The physiology of lactoferrin. *Biochem. Cell. Biol.* 80: 1-6 (2002).
- Browder H.P., Zygmunt J.R., Young, J.R., Tavormina P.A., Lysostaphin: Enzymatic mode of action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19: 383-389 (1965).
- Brown M.L., Aldrich H.C., Gauthier J.J., Relationship between glycocalyx and povidone-iodine resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) biofilms. *Appl. Environ. Microb.* 61: 187-193 (1995).
- Burek A.A., Vitello W.A., Laughlin R.T., Advances in wound healing. *Curr. Opin. Orthop.* 11: 92-98 (2000).
- Butler M., Ng Y-F., Paul D.A., Pudney A., Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 41: 3941-3953 (2003).
- Campos M.G., Rawls H.R., Innocentini-Mei L.H., Satsangi N., In vitro gentamicin sustained and controlled release from chitosan cross-linked films. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20(2): 537-42 (2009).
- Cao J.P., Wang Y.L., Jia Y.J., Simultaneous determination of geniposide and genipin in *Gardenia jasminoides Ellis* by high performance liquid chromatography. *J. Dalian Med. Univ.* 23: 61-62 (2001).

- Carlsson A., Engstrom P., Palva E.T., Bennich H., Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with omp gene transcription. *Infect. Immun.* 59: 3040–3045 (1991).
- Chang S.-J., Niu C.-C., Huang C.-F., Kuo S.-M., Evaluation of Chitosan-g-PEG Copolymer for Cell Anti-Adhesion Application. *J. Med. Bio. Eng.* 27(1): 41-46 (2007).
- Chen D., Liao J., Liu S., Chan E., Novel biodegradable sandwich-structured nanofibrous drug-eluting membranes for repair of infected wounds: an in vitro and in vivo study. *Int. J. Nanomedicine* 7: 763-771 (2012).
- Chen K.Y., Liao W.J., Kuo S.M., Tsai F.J., Chen Y.S., Huang C.Y., Yao C.H., Asymmetric Chitosan Membrane Containing Collagen I Nanospheres for Skin Tissue Engineering. *Biomacromolecules* 10(6): 1642-1649 (2009).
- Chen R.N., Ho H.O., Sheu M.T., Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. *Biomaterials* 26(20): 4229-4235 (2005).
- Chen T., Embree H.D., Brown E.M., Taylor M.M., Payne G.F.m Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for in situ applications. *Biomaterials* 24(17): 2831-2841 (2003).
- Chen W.Y.J., Rogers A.A., Lydon M.J., Characterization of biological properties of wound fluid collected during early stages of wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 99: 559-564 (1992).
- Chen Z., Mo X., He C., Wang H., Intermolecular interactions in electrospun collagen–chitosan complex nanofibers. *Carbohydr. Polym.* 72: 410-418 (2008).
- Chengdong J., Khademhosseini A., Dehghani F., Enhancing cell penetration and proliferation in chitosan hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* 32: 9719-9729 (2011).
- Chiano V., Pulieri E., Vozzi G., Ciardelli G., Ahluwalia A., Giusti P., Genipin-crosslinked chitosan\_gelatin blends for biomedical applications. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 1:, 889-898 (2007).
- Chien P.J., Sheu F., Huang W.T., Su M.S., Effect of molecular weight of chitosans on their antioxidative activities in apple juice. *Food Chem.* 102:1192-1198 (2007).
- Choi J.H., Keum K.C., Lee S.Y., Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem. Eng. Sci.* 61: 876-885 (2006).
- Chung Y.-C., Kuo C.-L., Chen C.-C., Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. *Bioresour. Technol.* 96(13): 1473-1148 (2005).
- Chung Y.C., Wang H.L., Chen Y.M., Li S.L., Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresour. Technol.* 88: 179-184 (2003).
- Climo M.W., Patron R.L., Goldstein B.P., Archer G.L., Lysostaphin treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* aortic valve endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1355-1360 (1998).
- Cooper R.A., Molan P.C., Krishnamoorthy L., Harding K.G., Manuka honey used to heal a recalcitrant surgical wound. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20: 758-759 (2001).
- Costa E.M., Silva S., Pina C., Tavarua F.K, Pintado M.M., Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral Pathogens. *Anaerobe* 18: 305-309 (2012).
- Cotter P.D., Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777–788 (2005).
- Cui F., Li G., Huang J., Zhang J., Lu M., Lu W., Huan J., Huang Q., Development of chitosan-collagen hydrogel incorporated with lysostaphin (CCHL) burn dressing with anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and promotion wound healing properties. *Drug Delivery* 18(3): 173–180 (2011).
- Cullen B., Watt P.W., Lundqvist C., Silock D., Schmitt R.J., Bogan D., Light N.D., The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 1544–1556 (2002).

- Cutting K., White R.J., Maceration of the skin and wound bed 1: Its nature and causes. *J. Wound Care.* 11: 275–278 (2002).
- Cuy J.L., Beckstead B.L., Brown C.D., Hoffman A.S., Giachelli C.M., Adhesive protein interactions with chitosan: Consequences for valve endothelial cell growth on tissue-engineering materials. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 67: 538–544 (2003).
- Czechowska-Biskup R., Rokita B., Litfy S., Ulański P., Rosiak J.M., Degradation of chitosan and starch by 360 kHz ultrasound. *Carbohydr. Polym.* 60: 175-184 (2005).
- Dambies L., Vincent T., Domard A., Guibal E., Preparation of chitosan gel beads by ionotropic molybdate gelation. *Biomacromolecules* 2:1198–205 (2001).
- Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M., Chiellini E., Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 36: 981–1014 (2011).
- Dávalos A., Miguel, M., Bartolomé B., López-Fandiño R., Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J. Food Prot.* 67: 1939-1944 (2004).
- Dembczyński I.R., Biała W., Jankowski T., Wykorzystanie dwufazowej ekstrakcji wodnej do separacji lizozym z białka kurzego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 5(66): 5-17 (2009).
- Deng C-M., He L-Z., Zhao M., Yang D., Liu Y., Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. *Carbohydr. Polym.* 69: 583–589 (2007).
- Denuziere A., Ferrier D., Damour O., Domard A., Chitosan–chondroitin sulfate and chitosan–hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. *Biomaterials* 19:1275–85 (1998).
- Deshpande L.M., Chopade B.A., Plasmid mediated silver resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Biomaterials* 7: 49-56 (1994).
- Dibrov P., Dzioba J., Gosink K.K., Hase C., Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholera*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8: 2668-2670 (2002).
- Ding C-M., Zhou Y., He Y-N., Tan W-S., Perfusion seeding of collagen–chitosan sponges for dermal tissue engineering. *Process Biochem.* 43: 287–296 (2008).
- Djagny K.B., Wang Z., Xu S., Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 41: 481–492 (2001).
- Drury J., Mooney D., Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24: 4337-4351 (2003).
- Du Toit D.F., Page B.J., An in vitro evaluation of the cell toxicity of honey and silver dressings. *J. Wound Care* 18(9): 383-389 (2009).
- Du W.-L., Niu S.-S., Xu Y.-L., Xu Z.-R., Fan C.-L.. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydr. Polym.* 75: 385–389 (2009).
- Eaglstein W.H., Alvarez O.M., Auletta M., Leffel D., Rogers G.S., Zitelli J.A., Norris J.E., Thomas I., Irondo M., Fewkes J., Hardin-Young J., Duff R.G., Sabolinski M.L., Acute excisional wounds treated with a tissue-engineered skin (Apligraf). *Dermatol. Surg.* 25: 195–201 (1999).
- Edwards R., Harding K.G., Bacteria and Wound Healing. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17: 91-96 (2004).
- Fang S.J., Puranam S., Hammond P., Release of vancomycin from multilayer coated absorbent gelatin sponges. *J. Control. Release* 157: 64-71 (2012).
- Farnaud S., Evans R. W., Lactoferrin a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol. Immunol.* 40: 395-405 (2003).
- Ferreira I.C.F.R., Aires E., Barreira J.C.M., Estevinho L.M., Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chem.* 114: 1438–1443 (2009).
- Fiedotow M., Denys A. Wybrane aspekty zakażeń szpitalnych. *Pol. Merk. Lek.* 125: 484-490 (2006).

- Fitzmaurice S.D., Sivamani R.K., Isseroff R.R. Antioxidant Therapies for Wound Healing: A Clinical Guide to Currently Commercially Available Products. *Skin Pharmacol. Physiol.* 24: 113-126 (2011).
- Flisikowska M., Możliwości wykorzystania kolagenu i żelatyny z łososia bałtyckiego (*Salmo salar*) i sumy afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) do otrzymywania aktywnych materiałów opatrunkowych. Promotor dr inż. Robert Tylingo. Katedra Chemii Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska (2013).
- Friess W., Collagen-biomaterial for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45: 113-136 (1998).
- Gallant-Behm C.L., Yin H.Q., Liu S., Hegggers J.P., Langford R.E., Olson M.E., Hart D.A., Burrell E., Comparison of in vitro disc diffusion and time kill-kinetic assays for the evaluation of antimicrobial wound dressing efficacy. *Wound Repair. Regen.* 13: 412–421 (2005).
- Gardner S.E., Frantz R.A., Doebbeling B.N., The Validity of the Clinical Signs and Symptoms Used to Identify Localised Chronic Wound Infection. *Wound Repair. Regen.* 9: 178-86 (2001).
- Gethin G., The significance of surface pH in chronic wounds. *Wounds UK* 3(3): 52-56 (2007).
- Gheldof N., Wang X.H., Engeseth, N.J., Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agr. Food. Chem.* 50: 5870-5877 (2002).
- Ghica M.V., Albu M.G., Leca M., Popa L., Moisescu S., Design and optimization of some collagen-minocycline based hydrogels potentially applicable for the treatment of cutaneous wound infections. *Pharmazie* 66: 853–861 (2011).
- Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Mocchegiani F., Viticchi C., Orlando F., D'Amato G., Del Prete M.S., Kamysz W., Lukasiak J., Saba V., Scalise G., Antiendotoxin activity of protegrin analog IB-367 alone or in combination with piperacillin in different animal models of septic shock. *Peptides* 24: 1747–1752 (2003).
- Gilliland E.L., Bacterial colonisation of legulcers and its effect on success rate of skin grafting. *Ann. R. Coll. Surg.* 70:105–108 (1988).
- Gilsenan P.M., Ross-Murphy S.B., Rheological characterizations of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocoll.* 14: 191-195 (2000).
- Giménez B., Gòmez-Estaca J., Alemán A., Gòmez-Guillén M.C., Montero M.P., Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatin films by the addition of hydrolysates from squid gelatin. *Food Hydrocoll.* 23: 1322–1327 (2009).
- Glowacki J., Mizuno S., Collagen Scaffolds for Tissue Engineering. *Biopolymers* 89(5): 338-344 (2007).
- Goddard P.A., Bull A.T., The isolation and characterization of bacteria capable of accumulating silver. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 308-313 (1989).
- Goel S.K., Beckman E.J., Generation of microcellular polymeric foams using supercritical carbon-dioxide. Effect of pressure and temperature on nucleation. *Polym. Eng. Sci.* 34: 1137-1147 (1994).
- Gomathi K., Gopinath D., Ahmed M. R., Jayakumar R., Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. *Biomaterials* 24: 2767-2772 (2003).
- Gómez-Guillén M.C., Giménez B., López-Caballero M.E., Montero M.P., Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll.* 25(8): 1813-1827 (2011).
- Gómez-Guillén M.C., López-Caballero M.E., López de Lacey A., Alemán A., Giménez B., Montero P., Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. In E. Le Bihan, & N. Koueta (Eds.), Sea by-products as a real material: New ways of application. Transworld Research Network Signpost, Kerala, India, 89-115 (2010).

- Gorczyca G., Rafiński Z., Opatowicz M., Sposób wytwarzania polimeru typu superabsorbent, polimer typu superabsorbent oraz kompozycja zawierająca polimer typu superabsorbent. Patent nr. B1 218903 (2010).
- Gorczyca G., Szweda P., Tylingo R., Sadowska M., Milewski S., Preparation of a aqueous chitosan solutions by CO<sub>2</sub> saturation process and its application in the formulation of genipin crosslinked hydrogel membranes. *J. Chitin Chitosan Sci.* 1: 246-250 (2013).
- Gorczyca G., Tylingo R., Natural polymers in designing modern antimicrobial medical materials. Part II: antimicrobial activation methods of medical materials. *Polimery* 11/12: 790-800 (2011).
- Gorczyca G., Tylingo R., Szweda P., Milewski S., Sadowska M., Augustin E., Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan-collagen-gelatin scaffolds using chitosan-CO<sub>2</sub> solution. *Carbohydr. Polym.* 102: 901–911 (2014).
- Gorzalanny C., Poppelmann B., Strozyk E., Moerschbacher B.M., Schneider S.W., Specific interaction between chitosan and matrix metalloprotease 2 decreases the invasive activity of human melanoma cells. *Biomacromolecules* 8: 3035–3040 (2007).
- Gottler L.M., Ramamoorthy A., Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan — A highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochim. Biophys. Acta* 1788: 1680–1686 (2009).
- Guaní-Guerra E., Lugo-Reyes S.O., Terán L.M., Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin. Immunol.* 135: 1-11(2010).
- Guo X.D., Zheng Q.X., Du J.Y., Yang S.H., Wang H., Shao Z.W, Sun E.J., Molecular tissue engineering: Concepts, status and challenge. *J. Wuhan Univ. Technol.* 17: 30-34. (2002).
- Gupta A., Kazuaki M., Lo J.F., Silver S., Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat. Med.* 5: 183 (1999).
- Gwiazdowska D., Trojanowska K., (Bakteriocyny – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia* 68: 114-130 (2005).
- Gwiazdowska D., Vuyst L., Vandamme E. J., Bacteriocins of lactic acid bacteria, London, Blackie Academic & Professional. 151-221 (1994).
- Han F., Dong Y., Su Z., Yin R., Song A., Li S., Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin–chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. *Int. J. Pharm.* 476(1–2): 124-133 (2014).
- Hancock R.E.W., Patrzykat A., Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Curr. Drug Targets: Infect. Disord.* 2: 79-83 (2002).
- Hancock, Sahl H.G., Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnol.* 24: 1551–1557 (2006).
- Harder J., Bartels J., Christophers E., Schroder J.M., Isolation and Characterization of Human b-Defensin-3, a Novel Human Inducible Peptide Antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276(8): 5707–5713 (2001).
- Harding K.G., Morris H.L., Patel G.K., Science, medicine and the future: Healing chronic wounds. *Br. Med. J.* 324: 160–163 (2002).
- Harris R., Lecumberri E., Heras A., Chitosan-Genipin Microspheres for the Controlled Release of Drugs: Clarithromycin, Tramadol and Heparin. *Marine Drugs* 8(6):1750-1762 (2010).
- Hasmann A., Novel peptidoglycan-based diagnostic devices for detection of wound infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 71: 12-23 (2011).
- Hécharde Y., Sahl H. G., Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84: 545–57 (2002).
- Helander I.M., Nurmiäho-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S., Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* 71: 235-244 (2001).

- Heraa A., Rodríguez N.M., Ramosc V.M., Agulló E., N-methylene phosphonic chitosan: a novel soluble derivative. *Carbohydr. Polym.* 44(1): 1-8 (2001).
- Hernández-Ledesma B., Dávalos A., Bartolomé B., Amigo L., Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from a -lactalbumin and b -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 53(3): 588-593 (2005).
- Holmes C., Wrobel J.S., MacEachern M.P., Boles B.R., Collagen-based wound dressings for the treatment of diabetes-related foot ulcers: a systematic review. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 6: 17–29 (2013).
- Hoyer B., Bernhardt A., Heinemann S., Stachel I., Meyer M., Gelinsky M., Biomimetically mineralized salmon collagen scaffolds for application in bone tissue engineering. *Biomacromolecules* 13:1059-66 (2012).
- Hu L., Wang C.A., Huang Y., Sun C., Lu S., Hu Z., Control of pore channel size during freeze casting of porous YSZ ceramics with unidirectionally aligned channels using different freezing temperatures. *J.Eur. Ceram. Soc.* 30: 3389-96 (2010).
- Huan J.N., Chen Y.L., Ge S.D., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection and its treatment in burned patients. *Zhoushua Wai Ke Za Zhi* 32: 244–245 (1994).
- Huang C-C., Lou C-W. Lin J-H., Manufacturing Process and Characterization of Tenc0el/Gelatin Composite Dressing. *Text. Res. J.* 80(4): 325–333 (2010).
- Huang X., Sun Y., Nie J., Lu W., Yang L., Zhang Z., Yin H., Wang Z.Q., Using absorbable chitosan hemostatic sponges as a promising surgical dressing. *Int. J. Biol. Macromol.* 75: 322-329 (2015).
- Huang Y., Onyeri S., Siewe M., Moshfeghian A., Madihally S.V., In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 26: 7616-7627 (2005).
- Huber M.M., Huber T.W., Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to lysostaphin. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1122–1124 (1989).
- Hussain I., Singh T., Chittenden C., Preparation of chitosan oligomers and characterization: Their antifungal activities and decay resistance. *Holzforschung* 66: 119-125 (2012).
- Il'ina A.V., Varlamov V.P., Chitosan-based polyelectrolyte complexes: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 41: 5-11 (2005).
- Inoue K., Baba Y., Yoshizuka K., Noguchi H., Yoshizaki M., Selectivity series in the adsorption of metal ions on a resin prepared by crosslinking copper (II)-complexed chitosan. *Chem. Lett.* 8: 1281–1284 (1988).
- Ishihara M., Obara K., Ishizuka T., Fujita M., Sato M., Masuoka K., Saito Y., Yura H., Matsui T., Hattori H., Kikuchi M., Kurita A., Controlled release of fibroblast growth factors and heparin from photocrosslinked chitosan hydrogels and subsequent effect on in vivo vascularization. *J. Biomed. Mater. Res. A* 64A: 551–559 (2003).
- Ito A., Mase A., Takizawa Y., Shinkai M., Honda H., Hata K.-I., Ueda M., Kobayashi T., Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 196–199 (2003).
- Iversen O., Grov A., Studies on lysostaphin. Separation and characterization of three enzymes. *Eur. J. Biochem.* 38: 293-300 (1973).
- Jameson G.B., Anderson B.F., Norris G.E., Thomas D.H., Baker E.N., Structure of human apolactoferrin at 2.0 Å resolution. Refinement and analysis of ligand-induced conformational change. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 54: 1319–35 (1998).
- Jayakumar R., Prabakaran M., Sudheesh Kumar P.T., Nair S.V., Tamura H., Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol. Adv.* 29: 322-337 (2011).
- Je J-Y., Kim S-K., Chitosan Derivatives Killed Bacteria by Disrupting the Outer and Inner Membrane. *J. Agric. Food. Chem.* 54(18): 6629-6633 (2006).



- Jeon Y.J., Park P.-J., Kim S.-K., Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr. Polym.* 44: 71-76 (2001).
- Jeong L., Park W.H., Preparation and Characterization of Gelatin Nanofibers Containing Silver Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 6857-6879 (2014).
- Ji C., Annabi N., Khademhosseni A. Dehghani F., Fabrication of porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering using dense gas CO<sub>2</sub>. *Acta Biomater.* 7: 1653–1664 (2011).
- Jiang Y., Chen L., Zhang S., Tong T., Zhang W., Liu W., Xu G., Tuan R.S., Heng B.C., Crawford R., Xiao Y., Ouyang H.W., Incorporation of bioactive polyvinylpyrrolidone–iodine within bilayered collagen scaffolds enhances the differentiation and subchondral osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Acta Biomater.* 9(9): 8089-8098 (2013).
- Jin J., Song M., Hourston D.J., Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. *Biomacromolecules* 5: 162-168 (2004).
- Jones A., Vaughan D., Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: A review. *J. Orthop. Nurs.* 9(1): 1-11 (2005).
- Jones V., Harding K., Rodeheaver G.T., Sibbald R.G., Chronic Wound Care: A Clinical Source Book for Healthcare Professionals (ed 3), Wayne, PA, HMP Communications, 254-252 (2001).
- Jumaa M., Furkert F.H., Muller B.W., A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. *J. Pharm. Biopharm.* 53(1): 115-123 (2002).
- Jun S.Y., Park P.J., Jung W.K., Kim S.K., Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Eur. Food Res. Technol.* 219: 20–26 (2004).
- Karim A.A., Bhat R., Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocoll.* 23: 563–576 (2009).
- Kaye E.T., Topical antibacterial agents. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 14: 321-339 (2000).
- Kędzia B., Hołderna-Kędzia E., The activity of honey on microorganisms isolated from infected wounds. *Postępy Fitoterapii* 1: 40-43 (2014).
- Kempf M., Kimble R.M., Cuttle L., Cytotoxicity testing of burn wound dressings, ointments and creams: A method using polycarbonate cell culture inserts on a cell culture system. *Burns* 37: 994-1000 (2011).
- Kempf M., Miyamura Y., Liu P.-Y., Chen A.C.-H., Nakamura H., Shimizu H., Tabata Y., Kimble R.M., McMillan J.R., A denatured collagen microfiber scaffold seeded with human fibroblasts and keratinocytes for skin grafting. *Biomaterials* 32(21): 4782-4792 (2011).
- Khan M.N., Naqvi A.H., Antiseptics, iodine, povidone iodine and traumatic wound cleansing. *J. Tissue Viability* 16(4): 6-10 (2006).
- Khor E., Lim L.Y., Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24: 2339-2349 (2003).
- Kim G.H., Ahn S.H., Yoon H., Kim Y.Y., Chun W., A cryogenic direct-plotting system for fabrication of 3D collagen scaffolds for tissue engineering. *J. Mater. Chem.* 19: 8817-8823 (2009).
- Kim M.M., Kim, S.K., Chitooligosaccharides inhibit activation and expression of matrix metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts. *FEBS Lett.* 580: 2661–2666 (2006).
- Kim S. K., Byun H.G., Park P.J., Shahidi F., Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 49(6): 2992-2997 (2001).
- Kim S.E., Park J.H., Cho Y.W., Chung H., Jeong S.Y., Lee E.B., Kwon I.C., Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor- $\beta$ 1: Implications for cartilage tissue engineering. *J. Control. Release* 91(3): 365–374 (2003).

- Kirsebom H., Aguilar M.R., Roman J.S., Fernandez M., Prieto M.A., Bondar B., Macroporous Scaffolds Based on Chitosan and Bioactive Molecules. *J. Bioact. Compat. Polym.* 22(6): 621-636 (2007).
- Kleinman H.K., Klebe R.J., Martin G.R., Role of Collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell. Biol.* 88:473-85 (1981).
- Ko Y.-G., Kawazoe N., Tateishi T., Chen G., Preparation of chitosan scaffolds with a hierarchical porous structure. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 93(2): 341-350 (2010).
- Kokai-Kun J.F., Chanturiya T., Mond J.J., Lysostaphin as a treatment for systemic *Staphylococcus aureus* infection in a mouse model. *J. Antimicrob. Chemother.* 60: 1051-1059 (2007).
- Kołodziejska I., Piotrowska B., Bulge M., Tylingo R., Effect of transglutaminase and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide on the solubility of fish gelatin–chitosan films. *Carbohydr. Polym.* 65: 404–409 (2006).
- Kozłowska J., Sionkowska A., Effects of different crosslinking methods on the properties of collagen–calcium phosphate composite materials. *Int. J. Biol. Macromolec.* 74: 397- 403(2015).
- Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J., Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int. J. Food. Microbiol.* 144(1): 51-63 (2010).
- Krithiga R.N., Jayachitra A., Antioxidant Activity of the Chitosan Extracted from Shrimp Exoskeleton. *Middle East J. Sci. Res.* 16(10): 1446-1451 (2013).
- Kumar G., Bristow J.F., Smith P.J., Payne G.F., Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. *Polymer* 41: 2157–2168 (2000).
- Kumar T.R.S., Bai M.V., Krishnan L.K., Freeze dried fibrin discs as biodegradable drug release matrix. *Biologicals* 32: 49-55 (2004).
- Kwiatkowska K., Możliwości wykorzystania chitozanu oraz kolagenu i żelatyny ze skór łososia (*Salmo salar*) i suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) do otrzymywania aktywnych materiałów opatrunkowych. Praca magisterska, Opiekun: dr inż. Robert Tylingo. Katedra Chemii Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska (2011).
- Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970).
- Lai H.L., Abu’Khalil A., Craig D.Q.M., The preparation and characterisation of drug-loaded alginate and chitosan sponges. *Int. J. Pharm.* 251:175-181 (2003).
- Lai J-Y., Li Y-T., Cho C-H., Yu T-C., Nanoscale modification of porous gelatin scaffolds with chondroitin sulfate for corneal stromal tissue engineering. *Int. J. Nanomed.* 7: 1101–1114 (2012).
- Landa A., Iméneza L., Willmsa K., Jiménez-García L.F., Lara-Martínez R., Robert L., Cirioni O., Baran W., Kamysz W., Antimicrobial peptides (Temporin A and Isegran IB-367). *Mol. Biochem. Parasitol.* 164: 126–130 (2009).
- Lansdown A.B., A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2010: 1–17 (2010).
- Lansdown A.B., Sampson B., Laupattarakasem P., Vuttivirojana A., Silver aids healing in the sterile skin wound; experimental studies in the laboratory rat. *Br. J. Dermatol.* 137: 728-735 (1997).
- Lansdown A.B., Silver. I: its antibacterial properties and mechanism of action. *J. Wound Care* 11: 125-130 (2002).
- Larson E.L., APIC guideline for handwashing and hand antisepsis in health care settings. *Am. J. Infect. Control.* 23: 251-269 (1995).
- Leaper D.J., Durani P., Topical antimicrobial therapy of chronic wounds healing by secondary intention using iodine products. *Int. Wound. J.* 5: 361–368 (2008).
- Lee C.H., Singla A., Lee Y., Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* 221: 1–22 (2001).

- Lee H., Kim G.H., Cryogenically fabricated three-dimensional chitosan scaffolds with pore size-controlled structures for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 85: 817–823 (2011).
- Lee J.E., Park J.C., Lee K.H., Oh S.H., Suh H., Laminin modified infection-preventing collagen membrane containing silver sulfadiazine-hyaluronan microparticles. *Artif. Organs.* 26(6): 521-528 (2002).
- Lee S.J., Heo D.N., Moon J.H., Ko W.K., Lee J.B., Bae M.S., Park S.W., Kim J.E., Lee D.H., Kim E.C., Lee C.H., Kwon I.K. Electrospun chitosan nanofibers with controlled levels of silver nanoparticles. Preparation, characterization and antibacterial activity. *Carbohydr. Polym.* 111: 530-537 (2014).
- Lee Y.M. Park Y.J., Lee S.J., Ku Y., Han S.B., Choi S.M., Klokkevold P.R., Chung C.P., Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J. Periodontol.* 71: 410-417 (2000).
- Leffler C.C., Müller B.W., Influence of the acid type on the physical and drug liberation properties of chitosan-gelatin sponges. *Int. J. Pharm.* 25: 229-237 (2000).
- Levy S.B., *The Antibiotic Paradox: How the Misuse of Antibiotics Destroys Their Curative Powers.* Cambridge, Mass., Perseus Publishing (2002).
- Lewis J.R., Lewis S.A., Colistin interactions with the mammalian urothelium. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 286: 913-922 (2004).
- Li B., Chen F., Wang X., Ji B., Wu Y., Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chem.* 102: 1135–1143 (2007).
- Li D., Diao J., Zhang J., Liu J., Fabrication of new chitosan-based composite sponge containing silver nanoparticles and its antibacterial properties for wound dressing. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11(6): 4733-4738 (2011).
- Li X., Jastui B.R., *Design of controlled release drug delivery system.* The McGraw-Hill Companies, Inc. Chemical Engineering, New York (2006).
- Liang H.C., Chang W.H., Liang H.F., Lee M.H., Sung H.W., Crosslinking Structures of Gelatin Hydrogels Crosslinked with Genipin or a Water-Soluble Carbodiimide. *J. Appl. Polym. Sci.* 91: 4017–4026 (2003).
- Lima A.C., Campos J.F., Lima Filho J.L., Converti A., Carneiro da Cunha M.G., Porto A.L.F., Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. *J. Food Sci. Technol.* DOI 10.1007/s13197-014-1463-y.
- Lin S.B., Chen S.H., Peng K.C., Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of  $\beta$ -chitosan in a *Trichoderma harzianum* chitinase-hydrolysing process. *J. Sci. Food Agric.* 89(2): 238-244 (2009).
- Lin Y.C., Tan F.J., Marra K.G., Jan S.S., Liu, D.C., Synthesis and characterization of collagen/hyaluronan/chitosan composite sponges for potential biomedical applications. *Acta Biomater.* 5: 2591-2600 (2009).
- Lipsky B.A., Kuss M., Edmonds M., Reyzelman A., Sigal F., Topical application of a gentamicin-collagen sponge combined with systemic antibiotic therapy for the treatment of diabetic foot infections of moderate severity: a randomized, controlled, multicenter clinical trial. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* 102(3):223-32 (2012).
- Lisek M., Ocena właściwości przeciwutleniających biomateriałów chitozanowo-białkowych (kolagen, żelatyna). Praca magisterska, Opiekun: dr hab. inż. Sławomir Milewski. Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska (2013).
- Liu H., Fan H., Cui Y., Chen Y., Yao K., Goh J.C.H., Effects of the Controlled-Released Basic Fibroblast Growth Factor from Chitosan-Gelatin Microspheres on Human Fibroblasts Cultured on a Chitosan-Gelatin Scaffold. *Biomacromolecules* 8: 1446-1455 (2007).

- Liu H., Yin Y., Yao K., Construction of Chitosan–Gelatin–Hyaluronic Acid Artificial Skin *In Vitro*. *J. Biomater. Appl.* 2: 413-430 (2007).
- Liu X., Ma L., Mao Z., Gao C., Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Repair and Regeneration. *Adv. Polym. Sci.* 244: 81-128 (2011).
- Liu X.F., Guan Y.L., Yang D.Z., Li Z., De Yao K., Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.*, 79(7); 1324-1335 (2001).
- Liu Y., Ma L., Gao C., Facile fabrication of the glutaraldehyde cross-linked collagen/chitosan porous scaffold for skin tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 32(8): 2361–2366 (2012).
- Loh J.V., Percival S.L., Woods E.J., N.J. Williams, Cochrane C.A., Silver resistance in MRSA isolated from wound and nasal sources in humans and animals. *Int. Wound J.* 6(1): 32-38 (2009).
- Lukaszczyk J., Smig, M., Jaszcz K., Adler H.J.P., Jahne E., Kaczmarek M., Evaluation of oligo(ethylene glycol) dimethacrylates effects on the properties of new biodegradable bone cement compositions. *Macromol. Biosci.* 5: 64–69 (2005).
- Lusby P.E., Coombes A., Wilkinson J.M., Honey: a potent agent for wound healing. *J. Wound. Ostomy Continence Nurs.* 29(6): 295-300 (2002).
- Ma L., Gao C., Mao Z., Zhou J., Shen J., Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. *Biomaterials* 24: 2997-3004 (2004).
- Ma L., Gao C., Mao Z., Zhou J., Shen J., Hu X., Han C., Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* 24: 4833–4841 (2003).
- Makoto M.A., Jun'ichi K., Akira O., Masaru I., Design of Controlled Release Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm.* 169: 255-264 (1998).
- Malafaya P.B., Silva G.A., Reis R.L., Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv. Drug Delivery. Rev.* 59: 207–223 (2007).
- Mamatas N., A sudden absence of bees. *Nature* 450: 134 (2007).
- Mao J.S., Cui Y.L., Wang X.H., Sun Y., Yin Y.J., Zhao H.M., De Yao K., A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. *Biomaterials* 25: 3973–3981 (2004).
- Marova I., Kovar J., Spectrophotometric detection of bacteriolytic activity of diluted lysostaphin solutions. *Folia Microbiol.* 38(2): 153-158 (1993).
- Martin A., The use of antioxidants in healing. *Dermatol. Surg.* 22(2): 156-160 (1996).
- Marumo T., Schini-Kerth V.B., Fisslthaler B., Busse R., Platelet-derived growth factor stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF- $\kappa$ B and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 96: 2361–2367 (1997).
- Maxwell S.R., Anti-oxidant therapy: does it have a role in the treatment of human disease? *Expert. Opin. Investig. Drugs* 6: 211–236 (1997).
- Megías C., Pedroche J., Yust M.M., Girón-Calle J., Alaiz M., Millán F., Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *Food Sci. Technol.* 41: 1973-1977 (2008).
- Mendis E., Rajapakse N., Kim S.K., Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 53(3): 581-587 (2005).
- Metters A., Hubbell J., Network formation and degradation behavior of hydrogels formed by Michael-type addition reactions. *Biomacromolecules* 6: 290–301 (2005).

- Mi F.-L., Shyu S.-S., Penf C.-K., Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 43: 1985-2000 (2005).
- Mi F.-L., Wu Y.B., Shyu S.S., Schoung J.Y., Huang Y.B., Tsai Y.H., Hao J.Y., Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery. *J. Biomed. Mater. Res.* 59(3): 438-449 (2002).
- Mi F.-L., Shyu S.S., Chen C.T., Schoung J.Y., Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and in vitro release. *Biomaterials* 20(17): 1603-1612 (1999).
- Mi F.-L., Shyu S.S., Wu Y.B., Lee S.T., Shyong J.Y., Huang R.N., Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials* 22: 165-173 (2001).
- Mi F.-L., Tan Y.C., Liang H.F., Sung H.W., In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. *Biomaterials* 23: 181-191 (2002).
- Mi F.-L., Yan Y.C., Liang H.C., Huang R.N., Sung H.W., In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 12: 835-850 (2001).
- Micklefield J., Daptomycin Structure and Mechanism of Action. *Revealed Chemistry & Biology* 11: 887-895 (2004).
- Minagawa T., Okamura Y., Shigemasa Y., Minami S., Okamoto Y., Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydr. Polym.* 67(4): 640-644 (2007).
- Minami S., Morimoto M., Okamoto Y., Saimoto H., Shigemasa Y., Wound healing acceleration. W: Uragami T., Tokura S. (Eds.), *Material Science of Chitin and Chitosan.* 206-207 (2010).
- Moghazy A. M., Shams M. E., Adly O. A., Abbas A. H., El-Badawy M. A., Elsakka D. M., Hassan S.A., Abdelmohsen W.S., Ali O.S., Mohamed B.A., The clinical and cost effectiveness of bee honey dressing in the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 89(3): 276-281 (2010).
- Mogoşanu G.D., Grumezescu A.M., Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int. J. Pharm.* 463(2): 127-36 (2014).
- Mohammad F.V., Noorwala M., Ahmad V.U., Sener B., Bidesmosidic triterpenoidal saponins from the roots of *Symphytum officinale*. *Planta Med.* 61: 94-102 (1995).
- Molan P.C., The antibacterial activity of honey. *Bee World* 73(2): 59-76 (1992).
- Moll G.N., Roberts G.C., Mechanism of lantibiotic-induced pore-formation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 69: 185-191 (1996).
- Moura L.I.F., Dias A.M.A., Suesca E., Casadiegos S., Leal E.C., Fontanilla M.R., Carvalho L., Sousa H.C., Carvalho E., Neurotensin-loaded collagen dressings reduce inflammation and improve wound healing in diabetic mice. *Biochim. Biophys. Acta Molecular Basis of Disease* 1842(1): 32-43 (2014).
- Mu C., Zhang K., Lin W., Li D., Ring-opening polymerization of genipin and its long-range crosslinking effect on collagen hydrogel. *J. Biomed. Mater. Res. A* 101: 385-393 (2013).
- Mucha M., Chitozan - wszechstronny polimer ze źródeł odnawialnych. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 20-21 (2010).
- Murakami T., Niwa M., Tokunaga F., Miyata T., Direct virus inactivation of tachyplesin I and its isopeptides from horseshoe crab hemocytes. *Chemotherapy* 37: 327-334 (1991).
- Muthukumar T., Senthil R., Sastry T.P., Synthesis and characterization of biosheet impregnated with *Macrotyloma uniflorum* extract for burn/ wound dressings. *Colloids Surf. B* 102: 694-699 (2012).
- Muzzarelli R.A.A., Chitins and chitosans for the repair of wounded skin. *Carbohydr. Polym.* 76: 167-182 (2009).

- Muzzarelli R.A.A., Genipin-chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydr. Polym.* 77: 1-9 (2009a).
- Mygind P.H., Fischer R.L., Schnorr K.M., Hansen M.T., Sonksen C.P., Ludvigsen S., Ravento's D., Buskov S., Christensen B., De Maria L., Taboureau O., Yaver D., Elvig-Jørgensen S.G, Sørensen M.V., Christensen B.E., Kjærulff S., Frimodt-Møller N., Lehrer L.I., Zaslof F., Kristensen H.H., Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* 437(13): 975-980 (2005).
- Nagai T., Suzuki N., Isolation of collagen from fish waste material – skin, bone and fins. *Food Chem.* 68: 277-281 (2000).
- Nagoba B.S., Suryawanshi N.M., Wadher B., Selkar S., Acidic Environment and Wound Healing: A Review. *Wounds* 27(1): 5-11 (2015).
- Nandagiri V.K., Gentile P., Chiono V., Tonda-Turo C., Matsiko A., Ramtools Z., Montevecchi F.M., Ciardelli G., Incorporation of PLGA nanoparticles into porous chitosan-gelatin scaffolds: influence on the physical properties and cell behavior. *J. Mech. Behav. Biomed.* 4: 1318-1327 (2011).
- Nasnas R., Saliba G., Hallak P., The revival of colistin: An old antibiotic for the 21st century. *Pathol. Biol.* 57: 229–235(2009).
- Natarajan S., Williamson D., Grey J., Harding K.G., Cooper R.A., Healing of an MRSA-colonized, hydroxyurea-induced leg ulcer with honey. *J. Dermatolog. Treat.* 12(1): 33-36 (2001).
- Netz D.J.A., Bastos M.C.F., Sal H.-G., Mode of action of the antimicrobial peptide aureocin A53 from *Staphylococcus aureus*. *Appl. Envir. Microbiol.* 68: 5274-5280 (2002).
- Nguyen K.T., Ritz D., Gu J.Q., Alexander D., Chu M., Miao V., Brian P., Baltz R.H., Combinatorial biosynthesis of novel antibiotics related to daptomycin. *PNAS* 103(46): 17462–17467 (2006).
- No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P., Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.* 74(1-2): 65-72 (2002).
- Noel S.P., Courtney H.S., Bumgardner J.D., Haggard W.O., Chitosan Sponges to Locally Deliver Amikacin and Vancomycin A Pilot In Vitro Evaluation. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 468: 2074-2080 (2010).
- Norziah M.H., Al-Hassan A., Khairulnizam A.B., Mordi M.N., Norita M., Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: Thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocoll.* 23: 1610–1616 (2009).
- Obara K., Ishihara M., Ishizuka T., Fujita M., Ozeki Y., Maehara T., Saito Y., Yura H., Matsui T., Hattori H., Kikuchi M., Kurita A., Photo-crosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired mice. *Biomaterials* 24: 3437–3444 (2003).
- Okamoto Y., Yano R., Miyatake K., Tomohiro I., Shigemasa Y., Minami S., Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr. Polym.* 53(3): 337-342 (2003).
- Oliveira J.M., Rodrigues M.T., Silva S.S., Malafaya P.B., Gomes M.E., Viegas C.A., Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 27: 6123-6137 (2006).
- Ong P.Y., Ohtake T., Brandt C., Strickland I., Boguniewicz M., Ganz T., Gallo R.L., Leung D.Y., Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 347: 1151–1160 (2002).
- Ono K., Saito Y., Yura H., Ishikawa K., Kurita A., Akaike T., Ishihara M. Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive. *J. Biomed. Mater. Res.* 49: 289–295 (2000).
- Paddle-Ledinek J.E., Nasa Z., Cleland H.J., Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation. *Plast. Reconstr. Surg.* 117(7 Suppl): 110–118 (2006).

- Panzavolta S., Gioffre M., Focerete M.L., Gualandi C., Foroni L., Bigi A. Electrospun gelatin nanofibers Optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water. *Acta Biomater.* 7: 1702–1709 (2011).
- Papageorgiou S.K., Katsaros F.K., Kouvelos E.P., Nolan J.W., Le Deit H., Kanellopoulos NK Heavy metal sorption by calcium alginate beads from *Laminaria digitata*. *J. Hazard. Mater. B137*: 1765–1772 (2006).
- Parenteau-Bareil R., Gauvin R., Berthod F., Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials* 3: 1863-1887 (2010).
- Pariante J.L., Kim B.-S., Atala A., In vitro biocompatibility assessment of naturally derived and synthetic biomaterials using normal human urothelial cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 55: 33–39 (2001).
- Parikh D.V., Fink T., DeLucca A.J., Parikh A.D., Absorption and swelling characteristics of silver (I) antimicrobial wound dressings. *Text. Res. J.* 81(5): 494-503 (2011).
- Park J.-E., Lee J.-Y., Kim H.-G., Hahn T.-R., Paik Y.-S., Isolation and Characterization of Water-Soluble Intermediates of Blue Pigments Transformed from Geniposide of *Gardenia jasminoides*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6511-6514 (2002).
- Park P.J., Je J.Y., Byun H.G., Moon S.H., Kim S.K., Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights.: *J. Microbiol. Biotechnol.* 14(2): 317-323 (2004).
- Parsons D., Bowler P.G., Myles V., Jones S., Silver Antimicrobial Dressings in Wound Management: A Comparison of Antibacterial, Physical, and Chemical Characteristics. *Wounds* 17(8): 222–232 (2005).
- Patel A., Preparation and Characterization of Freeze-dried Chitosan-Poly(Ethylene Oxide) Hydrogels for Site-Specific Antibiotic Delivery in the Stomach. *Pharmac. Res.* 13(4): 588-593 (1996).
- Percival J.N., Classification of wounds and their management. *Surgery* 20: 114–117 (2002).
- Percival S.L., Bowler P.G., Russell D., Bacterial resistance to silver in wound care. *J. Hosp. Infect.* 60(1): 1-7 (2005).
- Percival S.L., Emanuel C., Cutting K.F., Williams D.W., Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *Int. Wound J.* 9: 14–32 (2012).
- Pereira A.O., Cartucho D.J., Duarte A.S., Gil M.H., Cabrita A.M., Patrício J.A., Barros M.M., Immobilisation of Cardosin A in Chitosan Sponges as a Novel Implant for Drug Delivery. *Curr. Drug Discov. Technol.* 2(4): 231-8 (2005).
- Phaechamud T., Charoenteeraboon J., Antibacterial Activity and Drug Release of Chitosan Sponge Containing Doxycycline Hyclate. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 9(3): 829-835 (2008).
- Pinto R.J., Fernandes S.C., Freire C.S., Sadocco P., Causio J., Neto C.P., Trindade T., Antibacterial activity of optically transparent nanocomposite films based on chitosan or its derivatives and silver nanoparticles. *Carbohydr. Res.* 1(348): 77-83 (2012).
- Polak J., Della L.P., Blachburn P., In vitro activity of recombinant lysostaphin-antibiotic combinations towards methicillin-resistant *Staphylococcus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 17: 265–270 (1993).
- Portero A., Teijeiro-Osorio D., Alonso M.J., Remunan-Lopez C., Development of chitosan sponges for buccal administration of insulin. *Carbohydr. Polym.* 68: 617–625 (2007).
- Postlethwaite A.E., Seyer J.M., Kang A.H., Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 871–875 (1978).
- Puoci F., Iemma F., Curcio M., Parisi O.I., Cirillo G., Spizzirri U.G., Picci N.J., Synthesis of methacrylic-ferulic acid copolymer with antioxidant properties by single-step free radical polymerization. *Agric. Food Chem.* 56(22): 10646–10650 (2008).

- Qian Z.J., Jung W.K., Kim S.K., Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* shaw. *Bioresour. Technol.* 99: 1690-1698 (2008).
- Qin Y., The chelating properties of chitosan fibers. *J. Appl. Polym. Sci.* 49: 727-731 (1993).
- Raafat D., Bargaen K., Haas A., Sahl H.G., Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(12): 3764-3773 (2008).
- Rabea E.I., Badawy M.E.-T., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W., Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4: 1457-1465 (2003).
- Rai M., Yadav A., Gade A., Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* 27(1): 76-83 (2009).
- Rajapakse N., Mendis E., Byun H. G., Kim S. K., Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *J. Nutr. Biochem.* 16: 562-569 (2005).
- Ramadass S.K., Perumal S., Gopinath A., Nisal A., Subramanian S., Madhan B., Sol-gel assisted fabrication of collagen hydrolysate composite scaffold: a novel therapeutic alternative to the traditional collagen scaffold. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6(17): 15015-15025 (2014).
- Ratanavaraporn J., Damrongsakkul S., Sanchavanakit N., Banspraser T., Kanokpanont S., Comparison of Gelatin and Collagen Scaffolds for Fibroblast Cell Culture. *Journal of Metals, Materials and Minerals* 16(1): 31-36 (2006).
- Rawdkuen S., Sai-Ut S., Benjakul S., Properties of gelatin films from giant catfish skin and bovine bone: a comparative study. *Eur. Food Res. Technol.* 231(6): 907-916 (2010).
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237 (1999).
- Regenhard P., Leippe M., Schubert S., Podschun R., Kalm E., Gro J., Looft C., Antimicrobial activity of bovine psoriasin. *Vet. Microbiol.* 136: 335-340 (2009).
- Reich G., Kolagen - zarys metod, wyniki i kierunki badań. WNT, Warszawa (1970).
- Revilla E., Maria C. S., Miramontes E., Bautista J., García-Martínez A., Cremades O., Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. *Food Res. Int.* 42: 387-393 (2009).
- Rieg S., Seeber S., Steffen H., Humeny A., Kalbacher H., Stevanovic S., Kimura A., Garbe C., Schittek B., Generation of Multiple Stable Dermcidin-Derived Antimicrobial Peptides in Sweat of Different Body Sites. *J. Investig. Dermatol.* 126: 354-365 (2006).
- Rosenkranz H.S., Carr H.S., Silver Sulfadiazine: Effect on the Growth and Metabolism of Bacteria. *Antimicrob. Chemother.* 2(5): 367-372 (1972).
- Rotshtein D.M., Spacciopoli P., Tran L.T., Xu T., Roberts F.D., Serra M.D., Buxton D.K., Oppenheim F.D., Friden P., Anticandida Activity Is Retained in P-113, a 12-Amino-Acid Fragment of Histatin 5. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(5): 1367-1373 (2001).
- Roy S., Khanna S., Nallu K., Hunt T.K., Sen C.K., Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol. Ther.* 13: 211-220 (2006).
- Rubinichik E., Dugourd D., Algara T., Pasetka C., Friedland D., Antimicrobial and antifungal activities of a novel cationic antimicrobial peptide, omiganan, in experimental skin colonisation models. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34: 457-461 (2009).
- Rujitanaroj P., Pimpha N., Supaphol P., Wound-dressing materials with antibacterial activity from electrospun gelatin fiber mats containing silver nanoparticles. *Polymer* 49: 4723-4732 (2008).
- Russell A.D., Hugo W.B., Antimicrobial activity and action of silver. *Prog. Med. Chem.* 31: 351-70 (1994).



- Sadeghi M., Synthesis and Swelling Behaviors of graft copolymer Based on Chitosan-g-poly(AA-co-HEMA). *Int. J. Chem. Eng. App.* 1: 354-358 (2010).
- Sader H.S., Fedler K.A., Rennie R.P., Stevens S., Jones R.N., Omiganan Pentahydrochloride (MBI 226), a Topical 12-Amino-Acid Cationic Peptide: Spectrum of Antimicrobial Activity and Measurements of Bactericidal Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(8): 3112–3118 (2004).
- Sadowska M., Kolagen mięsa: budowa, oznaczanie I właściwości funkcjonalne. Rozprawa habilitacyjna. Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk (1992).
- Sadowska M., Kołodziejska I., Optimisation of conditions for precipitation of collagen from solution using  $\kappa$ -carrageenan. Studies on collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chem.* 91(1): 45-49 (2005).
- Sadowska M., Kotłowski R., Fizykochemiczne właściwości kolagenu ryb świni i bydła. W: Żelatyna. Właściwości-Technologia-Użytkowanie. Red. A. Rutkowski, Wydawnictwo APEKS s.c., Konin 13-26 (1999).
- Sai M., Guo R., Chen L., Xu N., Tan Y., Ding D., Research on the preparation and characterization of chitosan grafted polyvinylpyrrolidone gel membrane with iodine. *J. Appl. Polym. Sci.* 132(14) DOI: 10.1002/app.41797 (2015).
- Sai P.K., Babu M., Collagen based dressings. *Burns* 26: 54-62 (2000).
- Saiga A., Tanabe S., Nishimura T., Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.* 51(12): 3661-3667 (2003).
- Sajjan U.S., Tran L.T., Sole N., Rovaldi C., Akiyama A., Friden P.M., Forstner J.F., Rothstein D.M., P-113D, an Antimicrobial Peptide Active against *Pseudomonas aeruginosa*, Retains Activity in the Presence of Sputum from Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(12): 3437-3444 (2001).
- Sakanaka S., Tachibana Y., Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chem.* 95: 243-249 (2006).
- Samaranayaka A.G.P., Li-Chan E.C.Y., Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). *Food Chem.* 107: 768-776 (2008).
- Sankar S., Sekar S., Mohan R., Rani S., Sundaraseelan J., Sastry T.P., Preparation and partial characterization of collagen sheet from fish (*Lates calcarifer*) scales. *Int. J. Biol. Macromol.* 42(1): 6-9 (2008).
- Santhosh S., Sini T.K., Anandan R., Mathew P.T., Effect of chitosan supplementation on antitubercular drugs-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology* 219: 53–59 (2006).
- Sarema M., Moztarzadeha F., Mozafari M., How can genipin assist gelatin/carbohydrate chitosan scaffolds to act as replacements of load-bearing soft tissues? *Carbohydr. Polym.* 93(2): 635–643 (2013).
- Sasikala L., Durai B., Rathinamoorthy R., Manuka Honey Loaded Chitosan Hydrogel Films for Wound Dressing Applications. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 5(4): 1774-1785 (2013).
- Sassa V., Paga U., Tossib A., Bierbaum G., Sahla H.G., Mode of action of human b-defensin 3 against *Staphylococcus aureus* and transcriptional analysis of responses to defensin challenge. *Int. J. Med. Microbiol.* 298: 619–633 (2008).
- Savard T., Beaulieu C., Boucher I., Champagne C.P., Antimicrobial action of hydrolyzed chitosan against spoilage yeasts and lactic acid bacteria of fermented vegetables. *J. Food Prot.* 65(5): 828-833 (2002).
- Sawada Y., Tadashi O., Masazumi K., Kazunobu S., Koichi O., Sasaki J., An evaluation of a new lactic acid polymer drug delivery system: A preliminary report. *Br. J. Plast. Surg.* 47: 158-161 (1994).

- Schäfer M., Werner S., Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol. Res.* 58: 165–171 (2008).
- Schittek B., Hipfel R., Sauer B., Bauer J., Kalbacher H., Stevanovic S., Schirle M., Schroeder K., Blin N., Meier F., Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.* 2: 1133-1137 (2001).
- Schroder J.M., Harder J., Antimicrobial peptides in skin disease. *Drug Discov. Today Therap. Strat.* 3: 93-100 (2006).
- Schroder J.M., Harder J., Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 469–486 (2006).
- Sellimi S., Younes I., Ayed H.B., Maalej H., Montero V., Rinaudo M., Dahia M., Mechichi T., Hajji M., Nasri M., Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed. *Int. J. Biol. Macromol.* 72: 1358-1367 (2015).
- Sen C.K., Khanna S., Babior B.M., Hunt T.K., Ellison E.C., Roy S., Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J. Biol. Chem.* 277: 33284–33290 (2002).
- Sen C.K., The general case for redox control of wound repair. *Wound Repair. Regen.* 11: 431-438 (2003).
- Sen M., Effects of molecular weight and ratio of guluronic acid to mannuronic acid on the antioxidant properties of sodium alginate fractions prepared by radiation-induced degradation. *Int J. Appl. Radiat. I.* 69: 126–129 (2011).
- Seol Y.J., Lee J.Y., Park Y.J., Lee Y.M., Ku Y., Rhyu I.C., Lee S.J., Han S.B., Chung C.P., Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnol. Lett.* 26:1037-1041 (2004).
- Shanmugam G., Polavarapu P.L., Gopinath D., Jayakumar R., The Structure of Antimicrobial Pexiganan Peptide in Solution Probed by Fourier Transform Infrared Absorption, Vibrational Circular Dichroism, and Electronic Circular Dichroism. *Biopolymers* 80: 636–642 (2005).
- Sharma B.K., Bacon B.R., Britton R.S., Park C.H, Magiera C.J., O'Neill R., Dalton N., Smanik P., Speroff T., Prevention of hepatocyte injury and lipid peroxidation by iron chelators and tocopherol in isolated iron-loaded rat hepatocytes. *Hepatology* 12: 31–39 (1990).
- Shen E.C., Wang C., Fu E., Chiang C.Y., Chen T.T., Nieh S., Tetracycline release from tripolyphosphate–chitosan cross-linked sponge: a preliminary in vitro study. *J. Periodontal Res.* 43: 642–648 (2008).
- Shen X., Nagai N., Murata M., Nishimura D., Sugi M., Munekata M., Development of salmon milt DNA/salmon collagen composite for wound dressing. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19(12): 3473-3479 (2008).
- Sheu M.T., Chen R.N., Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. *Biomaterials* 26(20): 4229-35 (2005).
- Sheu M.-T., Huang J.-C., Yeh G.-C., Ho H.-O., Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. *Biomaterials* 22(13): 1713-1719 (2001).
- Shevchenko R.V., Eeman M., Rowshanravan B., Allan I.U., Savina I.N., Illsley M., Salmon M., James S.L., Mikhalovsky S.V., James S.E., The in vitro characterization of a gelatin scaffold, prepared by cryogelation and assessed in vivo as a dermal replacement in wound repair. *Acta Biomater.* 10(7): 3156-3166 (2014).
- Shibata Y., Metzger W. J., Myrvik Q. N., Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan. Mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. *J. Immunol.* 159: 2462–2467 (1997).
- Shu X.Z., Zhu K.J., Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. *Int. J. Pharm.* 233: 217-25 (2002).

- Shukla A., Fang J.C., Puranam S., Hammond P.T., Release of vancomycin from multilayer coated absorbent gelatin sponges *J. Control. Release* 157:64–71 (2012).
- Shukla V.K., Shukla D., Tiwary S.K., Agrawal S., Rastogi A., Evaluation of pH measurement as a method of wound assessment. *J. Wound Care*. 16(7): 291-294 (2007).
- Sigh A., Narvi S., Dutta P.K., Padney N.D., External stimuli response on a novel chitosan hydrogel crosslinked with formaldehyde. *Bull. Mater. Sci.* 29(3): 233–238 (2006).
- Sikorski Z.E., Scott D.N., Buisson D.H., The role of collagen in quality and processing of fish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 20: 301-343 (1984).
- Silver S., Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 27(2-3): 341-353 (2003).
- Silver S., Phung L.T., Silver G., Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33(7): 627-634 (2006).
- Sinh A., Narvi S.S., Dutta P.K., Padney N.D., External stimuli response on a novel chitosan hydrogel crosslinked with formaldehyde. *Bull. Mater. Sci.* 29: 233–238 (2006).
- Sionkowska A., Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Prog. Polym. Sci.* 36: 1254-1276 (2011).
- Sionkowska A., Kaczmarek B., Lewandowska K., Modification of collagen and chitosan mixtures by the addition of tannic acid. *J. Mol. Liq.* 199: 318-323 (2014).
- Sjolund M., Kahlmeter G. Staphylococci in primary skin and soft tissue infections in a Swedish county. *Scand. J. Infect. Dis.* 40: 894-898 (2008).
- Skierka E., Sadowska M., Majewska J., Wydzielanie białek mięśniowych z kręgosłupów dorsza bałtyckiego (*Gadus morhua*) na drodze ekstrakcji 5 % roztworem NaCl i/lub 0,1M roztworem NaOH. *Med. Weter.* 62: 579-582 (2004).
- Skopinska-Wisniewska J., Olszewski K., Bajek A., Rynkiewicz A., Sionkowska A., Dialysis as a method of obtaining neutral collagen gels. *Mater. Sci. Eng. C*.40: 65-70 (2014).
- Soneja A., Drews M., Malinski T., Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol. Rep.* 57(sup): 108–119 (2005).
- Song E., Yeon K.S, Chun T., Byun H.J., Lee Y.M., Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials* 27(15): 2951-2961(2006).
- Spann T.C., Taylor S.C., Weinberg J.M., Topical antimicrobial agents in dermatology. *Clin. Dermatol.* 21: 70-77 (2003).
- Spielmann M., Zuhaili B., Fossum M., Metzger M., Koehler T., Steinau H.U., Yao F., Onderdonk A.B., Steinstraesser L., Eriksson E., Human beta-defensin-3 promotes wound healing in infected diabetic wounds. *J. Gene Med.* 11: 220–228 (2007).
- Stashak T.S., Farstvedt E., Othic A., Update on Wound Dressings: Indications and Best Use. *Clin. Tech. Equine. Pract.* 3(2): 148-163 (2004).
- Steffen C., Timpl R., Wolff I., Immunogenicity and specificity of collagen. V. Demonstration of three different antigenic determinants on calf collagen. *Immunology* 15: 135–144 (1968).
- Stojadinovic A., Carlson J.W., Schultz G.S., Davis T.A., Elster E.A., Topical advances in wound care. *Gynecol. Oncol.* 111: 70-80 (2008).
- Struszczyk H., Microcrystalline chitosan. I. Preparation and properties of microcrystalline chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* 33:177-189 (1987).
- Su Y., Mo Z., Genipin crosslinked gelatin nanofibers for tissue engineering. *J. Control. Release* 152: 192–269 (2011).
- Sudarshan N.R., Hoover D.G., Knorr D., Antibacterial action of chitosan., *Food Biotechnol.* 6: 257–272. (1992).

- Suetsuna K., Ukeda H., Ochi H., Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J. Nutr. Biochem.* 11: 128-131 (2000).
- Szweda P., Gorczyca G., Filipkowski P., Zalewska M., Milewski S., Efficient production of *Staphylococcus simulans* lysostaphin in a benchtop bioreactor by recombinant *Escherichia coli*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 44: 370-381 (2014).
- Szweda P., Gorczyca G., Tylingo R., Kurlenda J., Kwiecinski J., Milewski S., Chitosan-protein scaffolds loaded with lysostaphin as potential antistaphylococcal wound dressing materials. *J. Appl. Microbiol.* 117(3): 634-642 (2014).
- Szweda P., Kotłowski R., Kur J. Lizostafyna - źródła otrzymywania i zastosowanie. *Biotechnologia* 4: 28-45 (2005).
- Szweda P., Kotłowski R., Kur J., New effective sources of the *Staphylococcus simulans* lysostaphin. *J. Biotechnol.* 117: 203–213 (2005).
- Szweda P., Scheillman M., Frankowska A., Kot B., Zalewska M., Lysostaphin, nisin and polymyxin B as effective agents against antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. *J. Vet. Med. Sci.* 76(3): 355-362 (2014b).
- Szymański S., Pobożny E., Trojanowicz M., Wilk A., Garsteczki P., Hołysz R., Net Charge and Electrophoretic Mobility of Lysozyme Charge Ladders in Solutions of Nonionic Surfactant. *J. Phys. Chem.* 111: 5503-5510 (2007).
- Tan H., Chu C.R., Payne K.A., Marra K.G., Injectable in situ forming biodegradable chitosan hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 30: 2499–2506 (2009).
- Tangsadthakun C., Kanokpanont S., Sanchavakit N., Banaprasert T., Damrongsakkul S., Properties of Collagen/Chitosan Scaffolds for Skin Tissue Engineering. *Journal of Metals, Materials and Minerals* 16(1): 37-44 (2006).
- Tangsadthakun C., Kanokpanont S., Sanchavanakit N., Pichyangkura R., Banaprasert T., Tabata Y., Damrongsakkul S., The influence of molecular weight of chitosan on the physical and biological properties of collagen/chitosan scaffolds. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 18(2): 147-163 (2007).
- Tarsi R., Muzzarelli R.A.A., Guzman C.A., Pruzzo C., Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. *J. Dent. Res.* 76, 665-672 (1997).
- Thiansilakul Y., Benjakul S., Shahidi F., Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from roundscad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chem.* 103: 1385–1394 (2007).
- Thomas S., McCubbin P., An in vitro analysis of the antimicrobial properties of 10 silver- containing dressings. *J. Wound Care* 12: 305-308 (2003).
- Toke O., Antimicrobial Peptides: New Candidates in the Fight Against Bacterial Infections. *Pept. Sci.* 80: 717–735 (2005).
- Tokura S., Ueno K., Miyazaki S., Nishi N., Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. *Macromol. Symp.* 120: 1-9. (1997).
- Tolaimate A., Desbrie`res J., Rhazi M., Alagui A., Vincendon M., Vottero P., *Polymer* 41: 2463-2469 (2000).
- Tonks A.J., Dudley E., Porter N.G., Parton J., Brazier J., Smith E.L., A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. *J. Leukoc. Biol.* 82(5): 1147-1155 (2007).
- Tsai G.J., Su W.H., Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food. Prot.* 62(3): 239-243 (1999).
- Tsai R.-Y., Hung S.-C., Lai J.Y., Wang D.-M., Hsieh H.-J., Electrospun chitosan–gelatin–polyvinyl alcohol hybrid nanofibrous mats: Production and characterization. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 45(4): 1975-1981 (2014).

- Tsukada K., Tokunaga K., Iwama T., Mishima Y., The pH changes of pressure ulcers related to the healing process of wounds. *Wounds* 4(1): 16-20 (1992).
- Tucci M.G., Mattioli-Belmonte M., Gabbanelli F., Lucarini G., Orlando F., Viticchi C., Bigi A., Panzavolta S., Roveri N., Morganti G., Muzzarelli R.A.A., Chitosan and Gelatin as Engineered Dressing for Wound Repair. *J. Bioact. Compat. Polym.* 16: 145-157 (2001).
- Turner T.D., Interactive dressings used in the management of human soft tissue injuries and their potential in veterinary practice. *Vet. Dermatol.* 8: 232-235 (1997).
- Tylingo R., Mazur-Sandomierska A., Sadowska M., Usefulness of fish collagen, gelatin and carrageenan for preparation of active biodegradable packages. *Polimery* 53: 576-580 (2008).
- Uragami T., Tokura S., Material Science of Chitin and Chitosan. Springer, 51-79 (2010).
- Uzun M., Anand T.S., In Vitro Characterisation and Evaluation of Different Types of Wound Dressing Materials. *J. Biomed. Eng.Tech.*: 1-7 (2013).
- Van Den Plas D., De Smet K., Lens D., Sollie P.. Differential cell death programmes induced by silver dressings in vitro. *Eur. J. Dermatol.* 18(4): 416-421 (2008).
- VandeVord P.J., Matthew H.W.T., DeSilva S.P., Mayton L., Wu B., Wooley P.H. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J. Biomed. Mater. Res.* 59: 585-590 (2002).
- Vermeulen H., Westerbos S.J., Ubbink D.T., Benefit and harm of iodine in wound care: a systematic review. *J. Hosp. Infect.* 76: 191-199 (2010).
- Visavadia B.G., Honeysett J., Danford M.H., Manuka honey dressing: An effective treatment for chronic wound infections. *Brit. J. Oral Max. Sur.* 46: 696-697 (2008).
- Vogelsang T.M., The incidence of penicillin-resistant pathogenic staphylococci isolated from the upper respiratory track of young persons. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 29(4): 363-367 (1951).
- Waddington R.J., Moseley R., Embery G., Review: periodontal disease mechanisms. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *J. Oral Dis.* 6: 138-151 (2000).
- Wang C.C., Su C.H., Chen J.P., Chen C.C., An enhancement on healing effect of wound dressing: Acrylic acid grafted and gamma-polyglutamic acid/chitosan immobilized polypropylene non-woven. *Mat. Sci. Eng. C* 29: 1715-1724 (2009).
- Wang L., Xu X., Guo S., Peng Z., Tang T., Novel water soluble phosphonium chitosan derivatives: Synthesis, characterization and cytotoxicity studies. *Int. J. Biol. Macromol.* 48(2): 375-380 (2011).
- Wang T., Zhu X.-K., Xue X.-T., Wu D.-Y., Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. *Carbohydr. Polym.* 88: 75-83 (2012).
- Wang W., Lin S., Xiao Y., Huang Y., Tan Y., Cai L., Li X., Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats. *Life Sci.* 82(3-4): 190-204 (2008).
- Wary R., Sivaraj S., Na G., Pathak K.R., Suraj S.A.L.M., Dasararaju G.T., Kannayiram G., Chitosan galic acid microsphere incorporated collagen matrix for chronic wounds: biophysical and biochemical characterization. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6(6): 94-100 (2014).
- White R.J., Cooper R., Kingsley A., Wound colonization and infection: the role of topical antimicrobials. *Br. J. Nurs.* 10: 563-578 (2001).
- Wieprecht T., Dathe M., Epand R.M., Beyermann M., Krause E., Maloy W.L., MacDonald D.L., Bienert M., Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry* 36: 12869-12880 (1997).
- Wilson M., Henry M., Quill R., Byrne P., The pH of varicose ulcer surfaces and its relationship to healing. *VASA* 8: 339-42 (1979).

- Wiseman H., Halliwell B., Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313: 17–29 (1996).
- Wu F., Meng G., He J., Wu Y., Wu F., Gu Z., Antibiotic-loaded chitosan hydrogel with superior dual functions: antibacterial efficacy and osteoblastic cell responses. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6(13): 10005-10013 (2014).
- Xie W., Xu P., Liu Q., Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11(13): 1699-1701 (2001).
- Xie Z., Huang J., Xu X., Jin Z., Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chem.* 111: 370-376 (2008).
- Yamaguchi K., Lavety J., Love R.M., The connective tissues of fish. VIII. Comparative studies on hake, cod and catfish collagens. *J. Food Technol.* 11: 389-399 (1976).
- Yan L.P., Wang Y.J., Ren L., Wu G., Caridade S.G., Fan J.B., Wang L.Y., Ji P.H., Oliveira J.M., Oliveira J.T., Mano J.F., Reis R.L., Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 95: 465-75 (2010).
- Yang B., Li X.Y., Shi S., Kong X.Y., Guo G., Huang M.J., Luo F., Wei Y.Q., Zhao X., Qian Z.Y., Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. *Carbohydr. Polym.* 80: 860–865 (2010).
- Yang C., Xu L., Zhou Y., Zhang X., Huang X., Wang M., Han Y., Zhai M., Wei S., Li J., A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing. *Carbohydr. Polym.* 82: 1297–1305 (2010).
- Yang J., Ho H., Chu Y., Chow C., Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chem.* 110(1): 128-136 (2008).
- Yao C.-H.Y., Liu B.-S., Chang C.-J., Hsu A.H., Chen Y.-S., Preparation of networks of gelatin and genipin as degradable biomaterials. *Mater. Chem. Phys.* 83: 204–208 (2004).
- Yeaman M.R., Yount N.Y., Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 50: 27-55 (2003).
- Yen M.-T., Yang J.H., Mau J.L., Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydr. Polym.* 74: 840-844 (2008).
- Yen M.-T.Y., Tseng Y.-H., Li R.-C., Mau J.-L., Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. *LWT* 40: 255–261 (2007).
- Yin X.Q., Lin Q., Zhang Q., Yang L.-C., Reactive oxygen scavenging activity of chitosan and its metal complexes. *Chemical Abstracts* 138: 66601 (2002).
- Yin Y.J., Yao K.D., Cheng G.X., Ma J.B., Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. *Polym. Int.* 48: 429–432 (1999):
- Yoo H.S., Photo-cross-linkable and thermo-responsive hydrogels containing chitosan and pluronic for sustained release of human growth hormone (hGH)., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 18: 1429–1441 (2007).
- Yoon H.J., Moon M.E., Park H.S., Kim H.W., Im S.Y., Lee J.H., Kim Y.H., Effects of chitosan oligosaccharide (COS) on the glycerol-induced acute renal failure in vitro and in vivo. *Food Chem. Toxicol.* 46: 710–716 (2008).
- Young S., Wong M., Tabata Y., Mikos A.G., Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J. Controll. Release* 109: 256-274 (2005).
- Yuan Y., Chesnut B.M., Utturkar G., Haggard W.O., Yang Y., Ong J.L., Bumgardner J.D., The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydr. Polym.* 68: 561-567 (2007).
- Yuan Y., Chesnutt B.M., Utturkar G., Haggard W.O., Yang J., Ong L.Y., Bumgardner J.D., The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydr. Polym.* 68: 561–567 (2007).

- Yunoki S., Suzuki T., Takai M., Stabilization of low denaturation temperature collagen from fish by physical cross-linking methods. *J. Biosci. Bioeng.* 96(6): 575-757 (2003).
- Yusof N.A.H., Hafiza A., Zohdi R.M., Bakar M.Z.A., Development of honey hydrogel dressing for enhanced wound healing. *Radiat. Phys. Chem.* 76(11-12): 1767-1770 (2007).
- Zahedi P., Rezaeian I., Ranaei-Siadat S.-O., Jafari S.-H., Supaphol P., A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymer. Adv. Tech.* 21(2): 77-95 (2010).
- Zakrzewska A., Boorsma A., Brul S., Hellingwerf K.J., Klis F.M., Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the Plasma Membrane-Perturbing Compound Chitosan. *Eukaryotic Cell* 4: 703-715 (2005).
- Zeiger E., Gollapudi B., Spencer P., Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde a review. *Mutat Res.* 589(2): 136-151(2005).
- Zhang M., Haga A., Sekiguchi H., Hirano S., Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. *Int. J. Biol. Macromol.* 27: 99-105 (2000).
- Zhang Y., Cheng X., Wang J., Wang Y., Shi B., Huang C., Yang X., Liu T., Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor-beta1 DNA for periodontal tissue engineering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344(1): 362-369 (2006).
- Zhang Z.-L., Xu S.-W., Zhou X.-L., Preventive effects of chitosan on peritoneal adhesion in rats. *World J. Gastroenterol.* 12(28): 4572-4577 (2006).
- Zhao Q.S., Ji Q.X., Xing K., Li X.Y., Liu C.S., Chen X.G., Preparation and characteristics of novel porous hydrogel films based on chitosan and glycerophosphate. *Carbohydr. Polym.* 76: 410-416 (2009).
- Zhou T., Wang N., Xue Y., Ding T., Liu X., Mo X., Sun J., Development of Biomimetic Tilapia Collagen Nanofibers for Skin Regeneration through Inducing Keratinocytes Differentiation and Collagen Synthesis of Dermal Fibroblasts. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7(5): 3253-3262 (2015).
- Zhou Y., Zhao Y., Wang L., Xu L., Zhai M., Shicheng Wei Radiation synthesis and characterization of nanosilver/gelatin/carboxymethyl chitosan hydrogel. *Radiat. Phys. Chem.* 81: 553-560 (2012).
- Zhuang X., Cheng B., Kang W., Xu X., Electrospun chitosan/gelatin nanofibers containing silver nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 82: 524-527 (2010).
- Ziółkowski G., Ochocka B., Malara M., Sobania M., Czechowska D., Pielęgnacja skóry i rany. Podstawowe informacje w zakresie pielęgnacji rany. Produkty do przygotowania łożyska i antyseptyki rany. Zeszyt VII. Polskie Stowarzyszenie Pielęgniarek Epidemiologicznych Katowice (2011).
- Zygmunt W.A., Tavormina P.A., Lysostaphin: model for a specific enzymatic approach to infectious disease. *Prog. Drug Res.* 16: 309-333 (1972).

## 8. DOROBEK NAUKOWY

*\*prace niezwiązane z tematem rozprawy*

*Publikacje w czasopismach z listy ISI*

1. **Gorczyca G.**, Tylingo R., Szweda P., Milewski S., Sadowska M., Augustin E., Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan-collagen-gelatin scaffolds using chitosan-CO<sub>2</sub> solution. *Carbohydr. Polym.* 102: 901–911 (2014).
2. Szweda P., **Gorczyca G.**, Tylingo R., Kurlenda J., Kwiecinski J., Milewski S., Chitosan-protein scaffolds loaded with lysostaphin as potential antistaphylococcal wound dressing materials. *J. Appl. Microbiol.* 117(3): 634-642 (2014).
3. Szweda P., **Gorczyca G.**, Filipkowski P., Zalewska M., Milewski S., Efficient production of *Staphylococcus simulans* lysostaphin in a benchtop bioreactor by recombinant *Escherichia coli*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 44: 370-381 (2014).
4. **Gorczyca G.**, Szweda P., Tylingo R., Sadowska M., Milewski S., Preparation of a aqueous chitosan solutions by CO<sub>2</sub> saturation process and its application in the formulation of genipin crosslinked hydrogel membranes. *J. Chitin Chitosan Sci.* 1: 246-250 (2013).
5. Szweda P., Schielmann M., Kotłowski R., **Gorczyca G.**, Zalewska M., Milewski S., Peptidoglycan hydrolases – potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96:1157-1174 (2012).
6. **Gorczyca G.**, Tylingo R., Natural polymers in designing modern antimicrobial medical materials. Part I: Biopolymeric medical devices (collagen, chitosan). *Polimery* 10: 709-715, (2011).
7. **Gorczyca G.**, Tylingo R., Natural polymers in designing modern antimicrobial medical materials. Part II: antimicrobial activation methods of medical materials. *Polimery* 11/12: 791-800 (2011).
8. Śliwka-Kaszyńska M., **Gorczyca G.**, Ślebioda M., Characterization of 1,3-alternatecalix[4]arene-silica bonded stationary phases and their comparison to selected commercial columns by using principal component analysis. *J. Chromatogr. A* 1217(3): 329-336 (2010).\*

*Monografie i druki zwarte*

1. **Gorczyca G.**, Tylingo R., Kinetics of the crosslinking reaction between genipin and chitosan solutions, Materiały pokonferencyjne, 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers: Advances in Chemical and Mechanical Engineering. ISBN 978-83-88579-62-2., 1/2: 197-200 (2011).
2. Rutkowska A., Gibas I., Gorczyca G., Polyurethanes as a carrier of drugs for gentamicin. Materiały pokonferencyjne, 14th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers: Advances in Chemical and Mechanical Engineering, ISBN 978-83-88579-62-7.2/2: 212-214 (2011).



### *Udzielone patenty:*

1. **Gorczyca G.**, Rafiński Z., Opatowicz M., Sposób wytwarzania polimeru typu superabsorbent, polimer typu superabsorbent oraz kompozycja zawierająca polimer typu superabsorbent. Patent nr B1 218903 Zgłoszenie patentowe nr P.392512 z dnia 27.09.2010.\*

### *Zgłoszenia patentowe:*

1. **Gorczyca G.**, Szweda P., Tylingo R., Sadowska M., Milewski S., Zalewska M., The method of obtaining the aqueous solution of chitosan, chitosan composition, chitosan aerosol, the method of producing the chitosan hydrogel membrane and the method of producing chitosan-protein biopolymer material. Zgłoszenie patentowe nr PCT/PL2013/000085 z dnia 26.06.2013
2. **Gorczyca G.**, Szweda P., Tylingo R., Sadowska M., Milewski S., Zalewska M. Sposób przygotowania roztworu chitozanu, kompozycja i sposób wytwarzania hydrożelowej membrany chitozanowej. Zgłoszenie patentowe nr P.403697 z dnia 26.04.2013
3. **Gorczyca G.**, Bloch T., Łopatka K., Gibas I., "A method and device for indentifying material types of spatial objects"; zgłoszenie patentowe nr PCT/PL2013/000101 z dnia 05.08.2013.\*
4. **Gorczyca G.**, Tylingo R., Szweda P., Milewski S., Sadowska M., Zalewska M., Sposób wytwarzania chitozanowo-białkowego materiału biopolimerowego. Zgłoszenie patentowe nr P.400078 z dnia 20.07.2012.
5. **Gorczyca G.**, Bloch T., Łopatka K., Gibas I., Sposób i urządzenie do rozpoznawania rodzajowo-materiałowego przestrzennie ukształtowanych obiektów, zwłaszcza obiektów odpadowych wykonanych z tworzyw sztucznych. Zgłoszenie patentowe numer P.400249 z dnia 06.08.2012.\*
6. **Gorczyca G.**, Bloch T., Łopatka K., Gibas I., Sposób i urządzenie do rozpoznawania rodzajowo-materiałowego przestrzennie ukształtowanych obiektów, zwłaszcza obiektów odpadowych wykonanych z tworzyw sztucznych. Zgłoszenie patentowe nr P.404841 – z dnia 25.07.2013.\*

### *Komunikaty na konferencjach naukowych*

1. **Gorczyca G.**, Szweda P., Tylingo R., Sadowska M., Milewski S.. Preparation of lysostaphin loaded chitosan/collagen scaffolds with CO<sub>2</sub> saturation method and its antistaphylococcal activity. 25th European Conference on Biomaterials. 8-12.09.2013, Madrid (plakat).
2. **Gorczyca G.**, Szweda P., Tylingo R., Sadowska M., Milewski S. Is it possible to dissolve chitosan in water by CO<sub>2</sub> saturation? Rheological study for a novel approach for chitosan blend formulation, and its application in the construction of selected biomaterial structures. EUCHIS 2013 11th International Conference of the European Chitin Society. 05-08.05.2013, Porto (plakat).
3. **Gorczyca G.**, Materiały opatrunkowe w leczeniu ran zakażonych szczepami *Staphylococcus aureus*. Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki, IV edycja., 20.04.2013 Gdańsk (plakat).

4. Zalewska M., Szweda P., Milewski S., **Gorczyca G.**, Essential oils as a potential weapon against bacterial infection. 31st Annual Chemistry Graduate Symposium, Department of Chemistry, University at Buffalo, 15-17.05.2013 Buffalo (plakat).
5. **Gorczyca G.**, Tylingo R., Szweda P., Milewski S., Antioxidant properties of novel chitosan/collagen/gelatin scaffolds for biomedical applications. 76th Prague Meeting on macromolecules, Polimers in Medicine. 01-05.07.2012. Prague (plakat).
6. **Gorczyca G.**, Tylingo R., Szweda P., Chitosan, Collagen and Gelatin in the design of novel materials with antimicrobial activity, IV Congress of Polish Biotechnology and IV EUROBIOTECH : Four Colours of Biotechnology Central European Congress of Life Sciences 12-15.10.2011. Kraków, Poland (plakat).
7. **Gorczyca G.**, Tylingo R., Szweda P., Novel biomaterials with antimicrobial activity. Bioinnovation International Summit 2011, 21-22.10.2011. Gdańsk (plakat).
8. **Gorczyca G.**, Tylingo R., Biopolymers as supports of enzymes. EuroFoodChemXVI Translting food chemistry into health benefits 6-8.07.2011. Gdańsk (plakat).
9. **Gorczyca G.**, Modern strategies in the design of antimicrobial wound dressings. Biotechnology Summer School, Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny. 27-28.10.2010. Sobieszewo (prezentacja ustna)

#### *Nagrody i osiągnięcia*

1. Złoty medal podczas 12 Międzynarodowej Wystawy Wynalazków ARCA 2014, w Zagrzebiu (15-18.10.2014).
2. Srebrny Medal podczas Międzynarodowych Targów Wynalazków i Innowacji IENA 2013 w Norymberdze (30.10-03.11.2013).
3. Złoty Medal podczas XVI Międzynarodowego Salonu Wynalazków i Innowacyjnych Technologii „ARCHIMEDES ” w Moskwie (02-05.04.2013).
4. Srebrny medal w konkursie INNOWACJE 2012 w ramach Targów Techniki Przemysłowej, Nauki i Innowacji Technikon Innowacje (2012).
5. Nominacja w plebiscycie TRAVELERY 2012 Magazynu National Geographic w kategorii Naukowe odkrycie roku 2012 (2013).
6. I miejsce w konkursie Jaskółki Przedsiębiorczości 2012, Organizator: Centrum Wiedzy i Przedsiębiorczości Politechniki Gdańskiej, Rektor Politechniki Gdańskiej oraz firma SOLWIT S.A. (2012)
7. Stypendium w ramach programu "Innodoktorant - stypendia dla doktorantów, IV edycja" . Stypendia przyznawane są w ramach Priorytetu VIII Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Działanie 8.2, Poddziałanie 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz budżetów samorządów województw.
8. Laureat stypendium w ramach projektu z Funduszy strukturalnych POKL „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” POKL.04.01.01-00- 368/09 w roku 2009/2010 i 2012/2013.
9. Złota odznaka absolwenta Politechniki Gdańskiej za wybitne osiągnięcia naukowe.

## 9. SUPLEMENT

### 9.1. Optymalizacja ekspresji lizostafiny w układzie *Escherichia coli* TOP10F'/pBAD2lys prowadzonej w bioreaktorze.

W literaturze dostępnych jest kilka doniesień związanych z opracowywaniem wydajnych systemów heterologicznej ekspresji lizostafiny, niemniej jednak ich wykorzystanie kończy się zwykle na badaniach w skali laboratoryjnej [Szweda i in. 2005, Szweda i in. 2007, Liu i in. 2011, Mierau i in. 2005, Mierau i in. 2005a]. Pośród przywołanych prac najbardziej zaawansowane wydają się być te prowadzone w zespole badawczym Mierau [Mierau i in. 2005]. Jego członkowie wykorzystali nizinowy system ekspresji genów *Lactococcus lactis* uzyskując wydajność otrzymywania lizostafiny na poziomie 40 mg/l hodowli prowadzonej w bioreaktorze o objętości 3000 litrów. Ta sama grupa badawcza opublikowała także wyniki prac, w których przy wykorzystaniu tego samego systemu ekspresyjnego, zwiększono wydajność otrzymywania lizostafiny do poziomu 300 mg/l. Tym razem wykorzystano jednak bioreaktor o objętości 1 l [Mierau i in. 2005a]. Równolegle prowadzone były prace w zespole Szwedę, w których przy wykorzystaniu systemów ekspresyjnych pBADLys i pETLys w komórkach *Escherichia coli* uzyskano najwyższą znaną do tej pory wydajność specyficzną ekspresji lizostafiny (odpowiednio 3125 i 13687 U/l). Jako, że zaproponowana przez Mierau metoda otrzymywania, wymaga wykorzystania nizinowego systemu ekspresyjnego *Lactococcus lactis*, który jest mniej znany i bardziej pracochłonny niż większości systemów *E. coli* stosowanych do produkcji białek heterologicznych, postanowiłem kontynuować prace zapoczątkowane przez Szwedę i współpracowników i pod bezpośrednią opieką dr. Szwedę dokonać optymalizacji ekspresji lizostafiny w bioreaktorze o objętości trzech litrów. Pozyskanie wydajnego, taniego i szybkiego źródła lizostafiny było ponadto niezbędne do przeprowadzenia zaplanowanych przeze mnie prac, mających na celu unieruchamianie lizostafiny w opracowywanych biopolimerowych materiałach gąbczastych (**Wyniki i Dyskusja 5.4**).

W celu wyznaczenia optymalnych warunków ekspresji lizostafiny, hodowlę bakteryjną prowadziłem z wykorzystaniem bioreaktora BIOSTAT CT o objętości roboczej 5l, firmy B. Braun Biotech International zgodnie z metodologią opisaną w części eksperymentalnej (**Materiały i Metody 9.3**). Do ekspresji lizostafiny wykorzystałem układ pBAD2lys w komórkach *Escherichia coli* TOP10F', opracowany przez Szwedę i współpr. [Szweda i in. 2007]. Powodem, dla którego nie wykorzystałem wspomnianego wyżej układu pETLys, jest jego znacznie większa wrażliwość względem szeregu parametrów, jakie mogą wpłynąć na wydajność ekspresji białka, w tym m.in. moment indukcji, czy temperatura prowadzenia hodowli po indukcji. Optymalizacji poddałem następujące parametry ekspresji białka: pH, temperaturę, intensywność procesu mieszania pożywki hodowlanej. Dla zidentyfikowanych optymalnych warunków hodowli wyznaczyłem wpływ czasu jej prowadzenia na mierzone parametry. Następnie poprzez modyfikacje składu pożywki hodowlanej i parametrów prowadzenia hodowli próbowałem zwiększyć wydajność

otrzymywanego białka. W celu porównania prowadzonych hodowli każdorazowo wyznaczałem następujące parametry: mokrą masę osadu komórek (MMO) [g/l], wydajność ekspresji białka względem masy otrzymanej lizostafiny [mg/l], masę białka przypadającą na g mokrej masy osadu [mg/g], aktywność specyficzną lizostafiny [U/mg], wydajność specyficzną, stanowiącą liczbę jednostek uzyskiwaną z jednego litra hodowli bakteryjnej [U/l] oraz liczbę jednostek lizostafiny przypadającą na 1 gram mokrej masy osadu komórek [U/g]. Rekombinowaną lizostafynę obecną w przygotowanym lizacie komórkowym oczyszczałem za pomocą chromatografii metalopowinowactwa, co było możliwe dzięki obecności na C-końcu lizostafiny domeny oligohistydynowej (**Materiały i Metody 9.3.3**). Wyniki procesu oczyszczania sprawdzałem za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, porównując obecność białka w poszczególnych frakcjach, uzyskanych po przemywaniu złoża w kolumnie buforami o rosnącym stężeniu imidazolu (**Materiały i Metody 9.3.4**). Preparaty otrzymane z frakcji uzyskanych za pomocą chromatografii metalopowinowactwa poddawałem dializie (**Materiały i Metody 9.3.5**). Następnie oznaczałem stężenie zawartego w nich enzymu przy użyciu metody Bradford (**Materiały i Metody 9.3.6**) i dokonywałem pomiaru aktywności specyficzynej (**Materiały i Metody 4.2.4.14**).

## 9.2. Materiały podstawowe i aparatura.

### 9.2.1. Odczynniki, surowce, aparatura, szczepy i podłoża mikrobiologiczne stosowane podczas optymalizacji ekspresji lizostafiny w bioreaktorze.

**Tabela 19.** Wykaz odczynników i surowców wykorzystywanych podczas optymalizacji ekspresji lizostafiny w bioreaktorze (Suplement).

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
1. Arabinoza	Sigma-Aldrich
2. Glukoza	Sigma-Aldrich
3. Marker białkowy (116; 66,2; 45; 35; 25; 18,4; 14,4 kDa)	Fermentas
4. Błona dializacyjna, Visking Dialysis Tubing 27/32, Ø 5 kDa	Serva Feinbiochemica GmBH&Co
5. Odczynnik Bradford	Fermentas
6. Surowicza albumina wołowa, BSA	Sigma-Aldrich
7. Bufor fosforanowy w tabletkach, pH 7,4	Sigma-Aldrich
8. Tris-HCl	Sigma-Aldrich
9. NaCl	POCH S.A.
10. NiCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
11. EDTA	Sigma-Aldrich
12. Imidazol	Sigma-Aldrich
13. Metanol	POCH S.A.
14. Kwas octowy, lodowaty	POCH S.A.
15. Glicyna	Sigma-Aldrich
16. 2-merkaptometanol	Sigma-Aldrich
17. SDS	Sigma-Aldrich
18. Błękit kumazyny	Sigma-Aldrich
19. Akryloamid	Sigma-Aldrich
20. Bisakryloamid	Sigma-Aldrich
21. Nadsiarczan amonu	Sigma-Aldrich

**Tabela 20.** Wykaz buforów i roztworów wykorzystywanych podczas optymalizacji ekspresji lizostafiny w bioreaktorze (Suplement). Ilości składników na 1000 ml wody destylowanej.

Nazwa odczynnika	Pochodzenie
<b>Oczyszczanie białka rekombinantowego:</b>	
1. Bufor A, pH 7,5	4,48 g Tris-HCl, 17,55 g NaCl
2. Bufor W20, pH 7,5	4,48 g Tris-HCl, 17,55 g NaCl, 1,36 g imidazol
3. Bufor W40, pH 7,5	4,48 g Tris-HCl, 17,55 g NaCl, 2,72 g imidazol
4. Bufor W80, pH 7,5	4,48 g Tris-HCl, 17,55 g NaCl, 5,44 g imidazol
5. Bufor W100, pH 7,5	4,48 g Tris-HCl, 17,55 g NaCl, 6,80 g imidazol
6. Bufor W500, pH 7,5	4,48 g Tris-HCl, 17,55 g NaCl, 34,0g imidazol
7. 0,2 M EDTA, pH 8,0	74,45 g EDTA
8. 0,5 % NiCl <sub>2</sub>	52,63 g NiCl <sub>2</sub>
<b>Bufory i roztwory do elektroforezy SDS-PAGE:</b>	
9. Bufor do elektroforezy SDS-PAGE Tris-glicyna, pH 8,3	3,0 g Tris-HCl, 14,4 g glicyna, 1,0 g SDS
10. Bufor lizujący	6,0 g Tris-HCl, 4,0 g 2-merkaptometanol, 20,0 g SDS, 1,0 g błękit bromofenolowy, 100,0 ml glicerol
11. Roztwór barwiący	0,25 g Błękit kumazyny R-25, 10,0 ml lodowaty kwas octowy, 50,0 ml metanol
12. Roztwór odbarwiający	100,0 ml lodowaty kwas octowy, 200,0 ml metanol
13. Roztwór A	292,0 g akryloamid, 80,0 g bisakryloamid
14. Roztwór B	750,0 ml Tris-HCl (2 M, pH 8,8), 40,0 ml SDS (10%)
15. Roztwór C	500,0 ml Tris-HCl (1 M, pH 6,8), 40,0 ml SDS (10%), 50 ml nadsiarazan amonu (1%)
16. Bufor do dializy	2,45 g Tris-HCl, 11,7 g NaCl

**Tabela 21.** Wykaz aparatury wykorzystywanej podczas optymalizacji ekspresji lizostafiny w bioreaktorze (Suplement).

Nazwa	Producent
1. Bioreaktor BIOSTAT CT	B. Braun Biotach International
2. Sterylizator SP 32 E	Wadem
3. Inkubator powietrzny z wytrząsaniem Unitron	Infors HT
4. Kolumna chromatograficzna	Ni-NTA His Bind Resin
5. Dezintegrator ultradźwiękowy	Sonifier W – 250D
6. Aparat do elektroforezy białkowej	DNA Gdańsk
7. Spektrofotometr UV-VIS Lambda Bio 20	Lambda Bio
8. Waga elektroniczna, dokładność 0,001g	RADWAG
9. Urządzenie do otrzymywania wody wysokiej czystości Mili-Q	Milipore

**Tabela 22.** Wykaz podłoży bakterijskich stosowanych podczas optymalizacji ekspresji lizostafiny w bioreaktorze (Suplement). Ilości składników na 1000 ml wody destylowanej. Pożywki po przygotowaniu sterylizowano w autoklawie w 120°C, przy ciśnieniu 1,5 atm. przez 30 minut. Dodatki dodawano do sterylnych pożywek przed przygotowaniem podłoża.

Nazwa podłoża		Składniki
1.	LB	10,0 g NaCl, 5,0 g ekstrakt drożdżowy, 10,0 g pepton K
2.	Medium HCDC	10,0 g glukoza, 2,0 g ekstrakt drożdżowy, 10,0 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,4 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 3,5 g sól morską
3.	Medium suplementacyjne	700,0 g glukoza, 40,0 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 40,0 g ekstrakt drożdżowy

### 9.3. Metody stosowane podczas optymalizacji ekspresji lizostafiny w bioreaktorze.

#### 9.3.1. Opis sposobu prowadzenia hodowli bakteryjnej w bioreaktorze.

Wszystkie przeprowadzone eksperymenty mające na celu wyznaczenie optymalnych warunków hodowli prowadzono z wykorzystaniem bioreaktora według schematu przedstawionego na rysunkach poniżej (**Rysunek 29-30**). Prace związane z wykorzystaniem bioreaktora prowadzone były pod opieką dr. inż. Pawła Filipkowskiego (Katedra Chemii Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska) oraz dr. inż. Piotra Szwedę (Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska). Komórki *Escherichia coli* TOP10F' transformowane plazmidem pBAD2Lys zostały przygotowane przez dr. Szwedę, zgodnie z wcześniej zaproponowaną metodologią [Szweda i in. 2007].

Hodowlę bakteryjną prowadzono z wykorzystaniem bioreaktora BIOSTAT CT (B. Braun Biotech International). Etap hodowli komórek poprzedzało przygotowanie bioreaktora do pracy. W tym celu każdorazowo wykonywano kolejno następujące po sobie czynności:

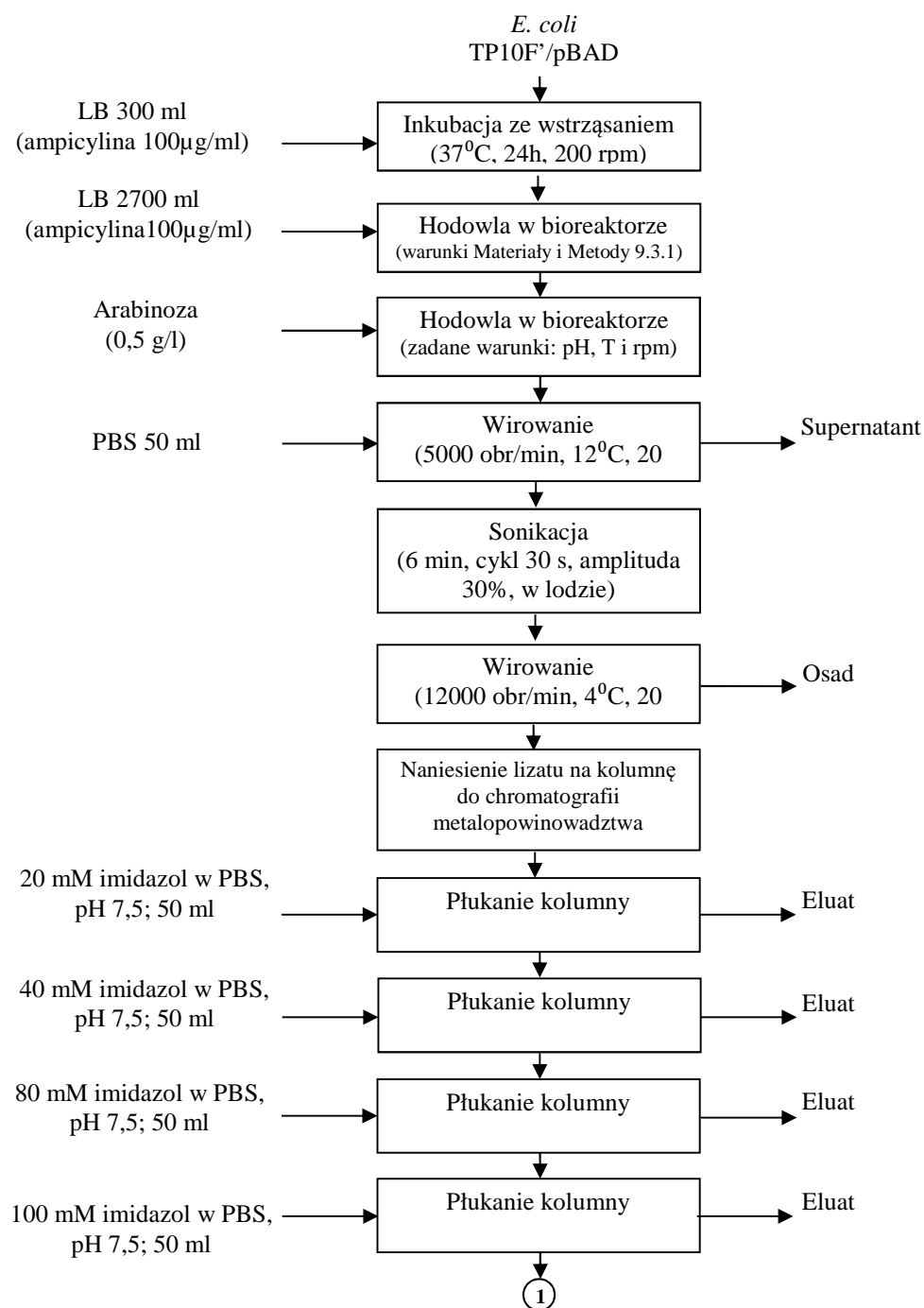
- montowano i kalibrowano elektrody; elektrodę tlenową kalibrowano poprzez zanurzenie w roztworze tiosiarczanu sodu (0% tlenu); elektrodę pH-metryczną kalibrowano poprzez zanurzenie w roztworach wzorcowych,
- uruchamiano wytwornicę pary (zamknięte zawory A i B),
- montowano filtr wchodzący i zamykano metalową pokrywę,
- wprowadzano do zbiornika bioreaktora 2,7 l niejałowej pożywki LB,
- sterylizowano pożywkę; w tym celu wprowadzano do płaszcza zbiornika bioreaktora parę wodną, proces sterylizacji prowadzono przez 20 minut, przy temp. 80-90°C i ciśnieniu 1,1bar,
- sterylizowano układ do pobierania,
- wyłączano wytwornicę pary po zakończeniu sterylizacji,
- chłodzono bioreaktor do temp. 20-30°C,
- otwierano układ napowietrzania,
- otwierano dostęp do jednostki sterującej,
- otwierano chłodnicę zwrotną,
- odpowietrzano termostat,

- ustawiano grzanie i mieszanie według pożądaných parametrów (tryb CONTROL LOOPS jednostki sterującej),
- kalibrowano elektrodę tlenową na 100% tlenu (poprzez ustawienie maksymalnego przepływu powietrza na manometrze, przy maksymalnych obrotach mieszadła, tryb CALIBRATION jednostki sterującej),
- zmniejszono przepływ powietrza oraz szybkość obrotową mieszadła mechanicznego do 400 rpm,
- ustawiano pracę pompek w trybie AUTO.

Do tak przygotowanego bioreaktora wprowadzono 300 ml inokulum, hodowlę nocną *E. coli* TOP10F'/pBAD2lys. Inokulum otrzymywano poprzez zaszczepienie 300 ml jałowego płynnego podłoża LB kolonią *E. coli* TOP10F'/pBAD2lys i inkubację we wstrząsarce powietrznej w temperaturze 37°C przez 12 h. Po uzyskaniu odpowiedniej gęstości hodowli bakteryjnej ( $OD_{600} = 0,3$ ), wprowadzono induktor do naczynia fermentacyjnego (L(+)) arabinozę, do stężenia końcowego 0,5 g/l hodowli). Proces hodowlany prowadzono przez 8 h od momentu indukcji, kontrolując parametry procesu na pulpicie jednostki sterującej (w trybie PROCES VALUES). Podczas trwania hodowli pobierano próbki bezpośrednio przed indukcją oraz po upływie 2, 4, 6 i 8 h po jej rozpoczęciu. Po zakończeniu procesu hodowlanego odprowadzono hodowlę bakteryjną, a bioreaktor płukano. Uzyskaną hodowlę bakteryjną wirowano przy 5000 obr./min przez 20 minut w temperaturze 12°C. Osad ważono i zamrażano (-20°C) do dalszych analiz. Bioreaktor dokładnie myto po zakończeniu hodowli.

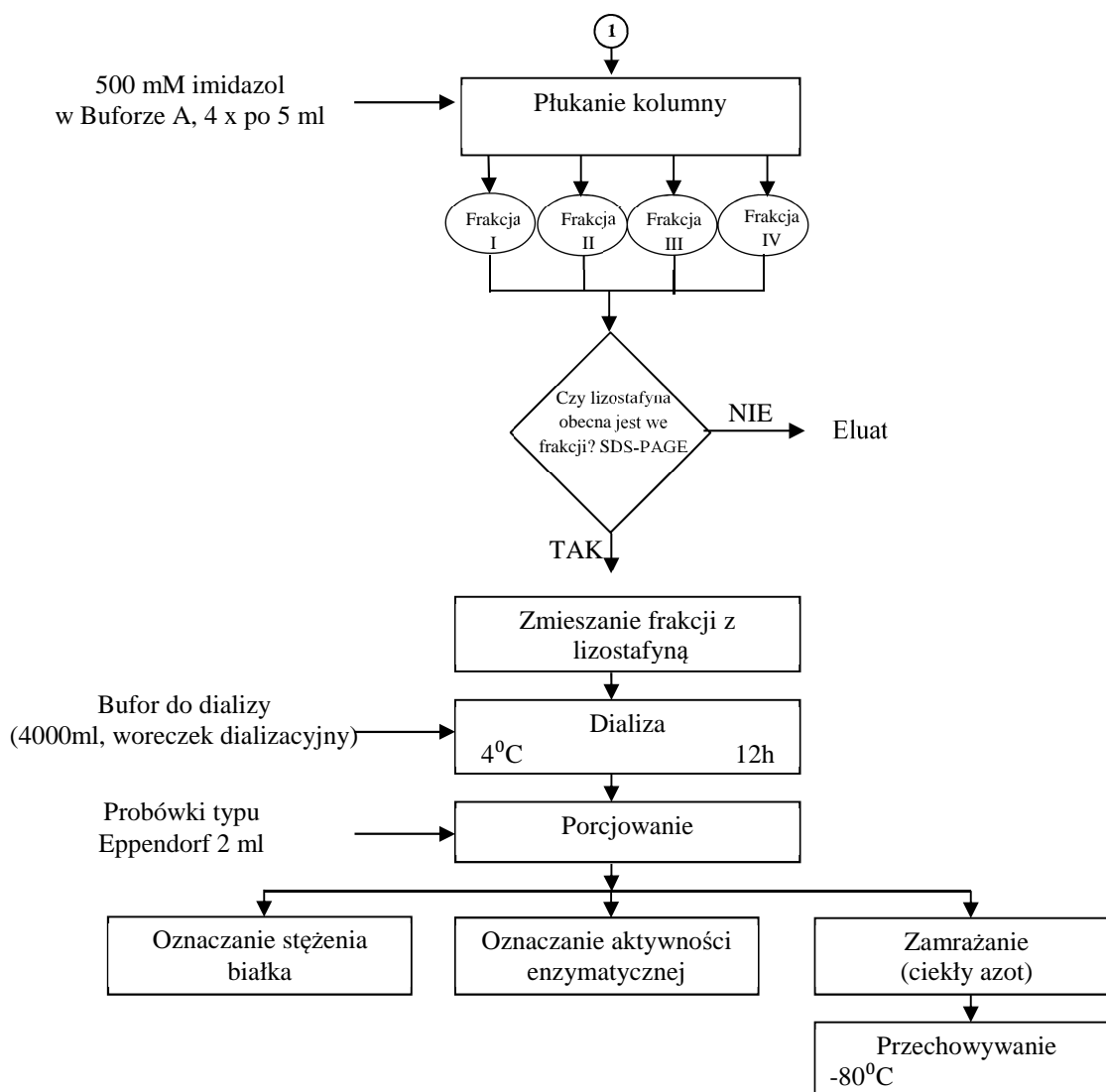
### 9.3.2. Hodowla bakteryjna z wykorzystaniem medium o zmienionym składzie.

Hodowle bakteryjne prowadzono zgodnie z opisem przedstawionym w punkcie (**Materiały i Metody 9.3.1**), przy wykorzystaniu wzbogaconej pożywki LB oraz medium HCDC [Liu i in. 2011], prowadząc proces w sposób okresowy z zasilaniem. W przypadku eksperymentów wykorzystujących wzbogaconą pożywkę LB, ekspresję białka indukowano w ten sam sposób jak w przypadku poprzednich doświadczeń prowadzonych w pożywce LB (przy  $OD_{600} = 0,3$ ). Natomiast w przypadku hodowli z medium HCDC, indukcja odbywała się po dwunastu godzinach prowadzenia hodowli bakteryjnej. W przypadku hodowli ze wzbogaconą pożywką LB wykorzystano trzy różne strategie uzupełniania składników odżywczych: dodatek glicerolu przy natężeniu przepływu 3 g/l/h (hodowla „Glicerol 3 g/l/h”); dodatek glicerolu przy natężeniu przepływu 9 g/l/h (hodowla „Glicerol 9 g/l/h”) oraz dodatek glicerolu zawierającego dodatkową ilość induktora przy natężeniu przepływu 9 g/l/h (hodowla „Glicerol 9 g/l/h + 100% ARA”). Hodowla dolewowa HCDC zasilana była z wykorzystaniem medium uzupełniającego przy natężeniu przepływu 3 ml/min. Wszystkie hodowle prowadzono przez okres 8 godzin od momentu rozpoczęcia indukcji.



**Rysunek 29.** Schemat postępowania przy optymalizacji ekspresji lizostafiny w układzie *Escherichia coli* TOP10F'/pBAD2lys.





**Rysunek 30.** Schemat postępowania przy optymalizacji ekspresji lizostafiny w układzie *Escherichia coli* TOP10F'/pBAD2lys (ciąg dalszy).

### 9.3.3. Oczyszczanie białka rekombinantowego – chromatografia metalopowinowactwa.

Proces oczyszczania lizostafiny prowadzono zgodnie z wcześniej opracowaną metodologią [Szweda i in. 2005]. Osad komórkowy z hodowli zawieszano w ok. 50 ml buforu A i mieszano, aż do uzyskania jednolitej zawiesiny komórkowej, po czym komórki znajdujące się w otrzymanej zawieszynie poddawano dezintegracji za pomocą sonikacji (warunki: 30% amplitudy, 20-30 sek., 4 powtórzenia z zachowaniem 30 sek. przerw między cyklami). Cały proces prowadzono w łaźni lodowej. Mieszaninę po dezintegracji wirowano (12 000 rpm, 20 min., 4°C), w celu oddzielenia ekstraktu bezkomórkowego od stałych elementów komórkowych. Otrzymywany ekstrakt bezkomórkowy наносzono na zregenerowane i zrównoważone złożę kolumny chromatograficznej Ni-NTA His Bind Resin (Novagen). Kolumnę przemywano za pomocą roztworów o wzrastającym stężeniu imidazolu: 20 mM, 40 mM, 80 mM, 100 mM (odpowiednio buforu W20-W100), w celu wymycia ze

złoża białek niezwiązanych. Elucję lizostafiny wykonywano za pomocą buforu z 500 mM imidazolem (W500). W celu regeneracji złoża po procesie oczyszczania, usunięcia z niego pozostałości unieruchomionych jonów i innych białek niezawierających domeny fuzyjnej, na kolumnę наносono kolejno roztwory 0,2 M EDTA (pół objętości kolumny) oraz 1% SDS (jedna objętość kolumny) i każdorazowo inkubowano przez 5 minut. Złoże następnie przemywano wodą destylowaną (trzy objętości kolumny). Po regeneracji kolumny, złoże pozostawiano w 20% roztworze etanolu i przechowywano w 4°C do czasu kolejnego użycia.

#### **9.3.4. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących – SDS-PAGE.**

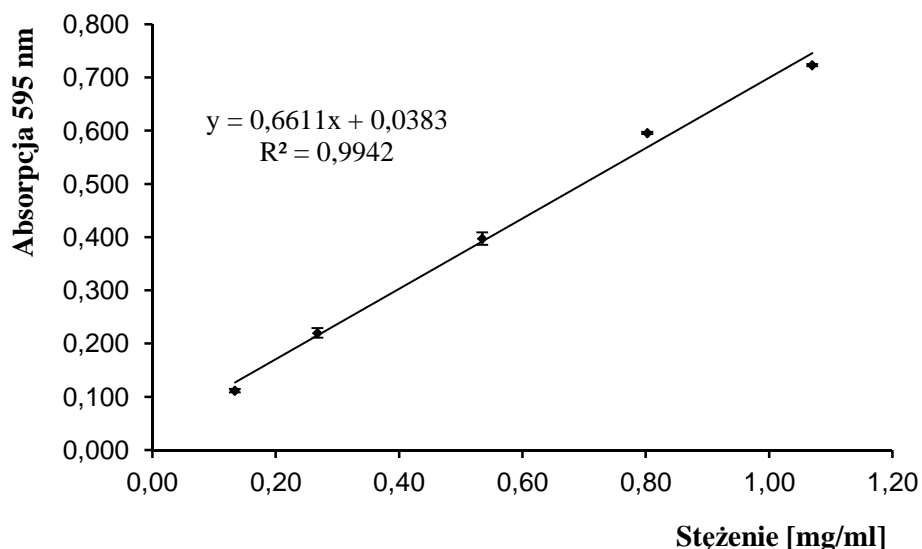
Elektroforezę białek w warunkach denaturujących SDS-PAGE prowadzono z użyciem aparatu firmy DNA-Gdańsk, w 15% żelu rozwijającym i 5% żelu zagęszczającym, w buforze Tris-glicynowym (pH 8,3), przy napięciu 15 V/cm [Laemmli 1970]. Analizowane próbki kolejnych frakcji uzyskanych po oczyszczaniu mieszano z buforem lizującym w stosunku 1:4, inkubowano w 95°C przez 5 minut, następnie schładzano i наносono do studzienek żelu poliakrylamidowego. Separację elektroforetyczną prowadzono do momentu osiągnięcia przez linię barwnika końca żelu. Po zakończeniu rozdzielania, żel inkubowano w roztworze barwiącym w 40°C przez 2 godziny, a następnie przenoszono go do roztworu odbarwiającego i inkubowano do odbarwienia tła.

#### **9.3.5. Dializa.**

Fracje zawierające lizostafinę, uzyskane po oczyszczaniu na złożu chromatograficznym, poddawano dializie w celu usunięcia pozostałości imidazolu i jonów metali. Do woreczka dializacyjnego odpowiedniej wielkości wlewano roztwór białka, woreczki umieszczano w 4000 ml buforu do dializy i inkubowano w 4°C przez 12 godzin. Następnie roztwór z woreczków przenoszono do jałowych probówek. Probówki zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

#### **9.3.6. Oznaczanie stężenia białka - metoda Bradforda.**

Stężenie białka oznaczano metodą Bradforda [Bradford 1976] w formie mikropłytki titracyjnej. Do studzienek 96-studzienkowej płytki titracyjnej zawierającej po 250 µl odczynnika Bradforda dodawano po 5 µl odpowiednio rozcieńczonej próbki roztworu enzymu bądź białka wzorcowego i mieszano z wykorzystaniem wielokanałowej pipety automatycznej. Po 5 minutach wykonywano pomiar absorpcji prób przy długości fali 595 nm względem próby odniesienia zawierającej 250 µl odczynnika Bradforda i 5 µl buforu PBS. Pomiar wykonywano w trzech powtórzeniach z wykorzystaniem czytnika mikropłatek (spektrofotometr UV-VIS Lambda Bio 20). Stężenia białka w próbach określano odnosząc uzyskane wartości absorpcji do krzywej wzorcowej sporządzonej na bazie roztworów surowiczej albuminy wołowej (**Rysunek 31**).



Rysunek 31. Krzywa wzorcowa  $A_{595}=f(C_{[BSA]})$  dla surowiczej albuminy wołowej.

#### 9.4. Wyniki i dyskusja dotyczące optymalizacji ekspresji lizostafiny w układzie *Escherichia coli* TOP10F'/pBAD2lys prowadzonej w bioreaktorze.

##### 9.4.1. Wpływ intensywności mieszania na parametry procesu produkcji lizostafiny w komórkach *E. coli*.

W celu identyfikacji optymalnej intensywności mieszania pożywki hodowlanej, przeprowadziłem trzy niezależne doświadczenia, przy stałych wartościach pH (7,0) i temperatury (37°C), w których zmian w intensywności mieszania dokonywałem poprzez zmianę szybkości obrotów mieszadła będącego na wyposażeniu użytego bioreaktora, odpowiednio 400, 600 i 800 rpm (**Tabela 23**). Intensywność mieszania wywierała bezpośredni wpływ na stopień natlenienia pożywki hodowlanej. Najniższy wzrost biomasy uzyskałem przy najniższej szybkości obrotowej mieszadła mechanicznego, prawie 4,2 g/l (P1). Co ciekawe dla tej szybkości zanotowałem także najwyższy poziom ekspresji enzymu – odpowiednio 3 i 4,5 razy wyższy w stosunku do szybkości obrotowych 600 i 800 rpm (P2). Wyraźnie niższe wartości uzyskanej masy lizostafiny przy szybkości mieszadła 800 rpm, mogą być spowodowane dużymi siłami ścinającymi powstającymi przy intensywnym ruchu wirowym wywołanym przez szybkie obroty mieszadła mechanicznego. Nie zaobserwowałem natomiast istotnego wpływu optymalizowanego parametru na aktywność specyficzną uzyskiwanego białka (P4). Każdorazowo uzyskałem enzym o aktywności specyficznej zbliżonej do 330 U/mg. Ze względu na najwyższą wydajność ekspresji (P2), przy jednocześnie najniższej ilości uzyskanej mokrej masy osadu (P1) i braku istotnej różnicy w aktywności specyficznej uzyskanej lizostafiny (P4), wartość pozostałych wyznaczanych przeze mnie parametrów była najwyższa dla układu mieszanego z szybkością mieszadła 400 rpm. Wartość tą uznałem zatem za optymalną dla prowadzonego przeze mnie procesu.

**Tabela 23.** Wpływ intensywności mieszania na parametry procesu produkcji lizostafiny prowadzonej w bioreaktorze (3L) z wykorzystaniem układu *Escherichia coli* TOP10F' / pBAD2lys (T=37°C, pH 7,0).

Nr	Parametry hodowli komórkowej	Szybkość obrotowa mieszadła [rpm]		
		400	600	800
P1	Mokra masa osadu (MMO) [g/l]	4,20	8,90	6,95
P2	Wydajność ekspresji białka [mg/l]	16,81	5,47	3,62
P3	Wydajność ekspresji względem MMO [mg/g]	4,00	0,61	0,52
P4	Aktywność specyficzna białka [U/mg]	369	326	330
P5	Wydajność specyficzna ekspresji białka [U/l]	6203	1782	1194
P6	Wydajność specyficzna ekspresji względem MMO [U/g]	3692,5	500,5	403,7
P7	Wydajność specyficzna na godzinę trwania procesu [U/L·h]	689,2	198,0	132,6
P8	Wydajność ekspresji białka na godzinę trwania procesu [mg/L·h]	1,87	0,61	0,40

#### 9.4.2. Wpływ pH pożywki hodowlanej na parametry procesu produkcji białka w komórkach *E. coli*.

W celu identyfikacji optymalnej wartości pH pożywki hodowlanej, przeprowadziłem pięć niezależnych doświadczeń, przy stałych wartościach temperatury (37°C) i szybkości obrotowej mieszadła bioreaktora uznanej wcześniej za optymalną (400 rpm), odpowiednio dla pH pożywki hodowlanej: 5,0; 5,5; 6,0; 7,0 i 8,5 (**Tabela 24**). Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że poziom stężenia jonów wodorowych nie tylko wpłynął na wzrost komórek *Escherichia coli*, ale także na wynik ekspresji lizostafiny i jej aktywność specyficzną. Ekspresja białka zachodziła na najwyższym poziomie przy zastosowaniu pożywki hodowlanej o pH = 5,5 (P2). W tych warunkach poziom ekspresji był średnio o 40% wyższy w porównaniu z procesami prowadzonymi w pożywkach o innych wartościach pH. Wzrost pH pożywki hodowlanej do wartości 8,5 doprowadził do całkowitego zahamowania wzrostu komórek. Z kolei przy pH 6 komórki wzrastały najlepiej, o czym świadczy najwyższa uzyskana ilość biomasy (P1). Przy tej samej wartości pH uzyskałem także najwyższą aktywność specyficzną lizostafiny na poziomie 695 U/mg - prawie dwukrotnie wyższą niż w pożywce o pH=7 (P4).

**Tabela 24.** Wpływ pH pożywki hodowlanej na parametry procesu produkcji lizostafiny prowadzonej w bioreaktorze (3L) z wykorzystaniem układu *Escherichia coli* TOP10F<sup>+</sup> / pBAD2lys (T=37°C, rpm 400).

Nr	Parametry hodowli komórkowej	pH				
		5,0	5,5	6,0	7,0	8,5
P1	Mokra masa osadu (MMO) [g/l]	4,47	5,65	6,43	4,2	-
P2	Wydajność ekspresji białka [mg/l]	17,49	28,33	19,32	16,81	-
P3	Wydajność ekspresji względem MMO [mg/g]	3,92	5,01	3,00	4,00	-
P4	Aktywność specyficzna białka [U/mg]	573	429	695	369	-
P5	Wydajność specyficzna ekspresji białka [U/l]	10030	12155	13427	6203	-
P6	Wydajność specyficzna ekspresji względem MMO [U/g]	5726,1	5481,1	5279	3692,5	-
P7	Wydajność specyficzna na godzinę trwania procesu [U/L·h]	1114,4	1350,5	1491,8	689,2	-
P8	Wydajność ekspresji białka na godzinę trwania procesu [mg/L·h]	1,94	3,15	2,15	1,87	-

Parametr P6 (wydajność specyficzna ekspresji względem MMO) określa liczbę przypadających jednostek lizostafiny na 1 g mokrej masy osadu i pozwala uzyskać odpowiedź na pytanie: jaką masę osadu komórek pohodowlanych, będzie trzeba poddać procesom dezintegracji, aby uzyskać zadaną liczbę jednostek lizostafiny? Im wyższa jego wartość, tym mniej czasochłonny powinien być proces otrzymywania w odniesieniu chociażby do czasu trwania procesu oczyszczania. Wyniki dla pierwszych trzech wartości pH nie różnią się w sposób istotny od siebie (choć obserwowana jest tendencja malejąca). Wartość tego parametru spadła o ok. 30%, gdy zwiększyłem pH pożywki do 7,0. Najwyższą wydajność specyficzną lizostafiny uzyskałem przy wartości pH pożywki równej 6,0, co stanowiło wartość wyższą o 25, 9,5 i 54% odpowiednio dla hodowli prowadzonych w pożywkach o pH 5,0; 5,5 i 7,0 (P5). Mając na uwadze, że parametry P5 i P3 należą do najważniejszych parametrów wpływających na ekonomię procesu otrzymywania enzymów, uznałem za optymalną wartość pH pożywki hodowlanej równą 6,0. Przy tej wartości pH uzyskałem: najwyższą liczbę jednostek lizostafiny z 1l hodowli (13427 U/l), enzym o najwyższej aktywności specyficznej (695 U/mg), niemniej jednak przy najdłuższym procesie izolacji lizostafiny z jednej partii produkcyjnej, ze względu na najwyższą ilość uzyskanej biomasy (6,43 g/l).

#### 9.4.3. Wpływ temperatury pożywki hodowlanej na parametry procesu produkcji białka w komórkach *E. coli*.

W celu identyfikacji optymalnej temperatury ekspresji białka w układzie *Escherichia coli* TOP10F<sup>+</sup>/pBAD2lys, przeprowadziłem dwa dodatkowe doświadczenia, przy uznanych jak dotąd optymalnych wartościach pH (6,0) i szybkości obrotowej mieszadła (400 rpm), dla

temperatur 25 i 30°C (**Tabela 25**). Najniższa temperatura okazała się być najdogodniejszą dla wzrostu hodowanych komórek. Przy jej wartości uzyskałem o 70 i 20% większą ilość biomasy w stosunku do hodowli prowadzonych odpowiednio w temperaturach 30 i 37°C (**Suplement 9.4.2**) (P1). Hodowla bakteryjna prowadzona w niższych temperaturach doprowadziła także do uzyskania prób lizostafiny o wyższej aktywności specyficznej (P4), niemniej jednak uzyskałem wówczas wyraźnie niższe poziomy ekspresji białka (P2). Wzrost temperatury o 12°C spowodował wzrost wydajności procesu ekspresji o 250% i w konsekwencji przy tej temperaturze uzyskałem najwyższą wydajność specyficzną ekspresji białka na poziomie 13427 U/l (P5). Mając na uwadze ten wynik, a także to, że temperatura 37°C jest optymalną temperaturą wzrostu dla komórek *Escherichia coli*, uznałem ją także za optymalną dla procesu ekspresji lizostafiny w układzie pBAD2lys.

**Tabela 25.** Wpływ temperatury pożywki hodowlanej na parametry procesu produkcji lizostafiny prowadzonej w bioreaktorze (3L) z wykorzystaniem układu *Escherichia coli* TOP10F<sup>+</sup> / pBAD2lys (400 rpm, pH 6,0).

Nr	Parametry hodowli komórkowej	Temperatura [°C]		
		25,0	30,0	37,0
P1	Mokra masa osadu (MMO) [g/l]	7,61	4,49	6,43
P2	Wydajność ekspresji białka [mg/l]	7,9	13,14	19,32
P3	Wydajność ekspresji względem MMO [mg/g]	1,04	2,93	3,00
P4	Aktywność specyficzna białka [U/mg]	863	914	695
P5	Wydajność specyficzna ekspresji białka [U/l]	6813	12014	13427
P6	Wydajność specyficzna ekspresji względem MMO [U/g]	2077,6	7095,5	5279
P7	Wydajność specyficzna na godzinę trwania procesu [U/L·h]	756,9	1334,8	1491,8
P8	Wydajność ekspresji białka na godzinę trwania procesu [mg/L·h]	0,88	1,46	2,15

#### 9.4.4. Wybór optymalnych parametrów (pH, temperatury, rpm) procesu produkcji białka w komórkach *E. coli*.

Na podstawie szeregu przeprowadzonych powyżej eksperymentów, za optymalne warunki ekspresji lizostafiny w komórkach *Escherichia coli* TOP10F<sup>+</sup>/pBAD2lys uznałem odpowiednio: częstotliwość obrotów mieszadła mechanicznego 400 rpm, pH 6,0; temperaturę 37°C. Dla wybranych warunków hodowlę bakteryjną powtórzyłem dodatkowo monitorując zmiany mierzonych parametrów procesu w czasie (**Tabela 26**). W trakcie prowadzenia hodowli pobierałem próby o objętości 100 ml, przed indukcją oraz po dwóch, czterech, sześciu i ośmiu godzinach od momentu indukcji, w celu wyznaczenia parametrów procesu ekspresji. W prezentowanej tabeli umieściłem dodatkowo wartości dla parametrów OD<sub>600</sub>

i pO<sub>2</sub> [%] odnoszące się odpowiednio do gęstości optycznej oraz stopnia natlenienia medium hodowlanego. Wykazałem, że optymalnym czasem prowadzenia procesu jest czas ośmiu godzin od momentu indukcji (odpowiednio 9 h od momentu zaszczepienia pożywki hodowlanej komórkami *Escherichia coli*). Wydłużenie tego czasu powodowało spadek aktywności specyficznej uzyskiwanego białka (P4). Podobne wyniki, wpływu czasu prowadzenia hodowli na aktywność specyficzną enzymu, uzyskał Szweda w poprzednich doświadczeniach prowadzonych w kolbach laboratoryjnych [Szweda i in. 2005].

**Tabela 26.** Wpływ czasu prowadzenia hodowli bakteryjnej na parametry procesu produkcji lizostafiny prowadzonej w bioreaktorze (3L) z wykorzystaniem układu *Escherichia coli* TOP10F' / pBAD2lys (400 rpm, pH 6,0, T 37°C).

Nr	Parametry hodowli komórkowej	Czas od momentu indukcji [h]				
		0,0	2,0	4,0	6,0	8,0
P'	OD <sub>600</sub>	0,3	0,9	1,0	1,0	1,0
P''	pO <sub>2</sub> [%]	77,5	59,0	69,0	68,2	80,6
P1	Mokra masa osadu (MMO) [g/l]	---	5,52	6,1	6,22	6,41
P2	Wydajność ekspresji białka [mg/l]	---	8,13	12,41	16,23	19,71
P3	Wydajność ekspresji względem MMO [mg/g]	---	1,47	2,03	2,61	3,07
P4	Aktywność specyficzna białka [U/mg]	---	590	630	680	641
P5	Wydajność specyficzna ekspresji białka [U/l]	---	4797	7818	11036	12634
P6	Wydajność specyficzna ekspresji względem MMO [U/g]	---	869	1281,7	1774,3	1971,0
P7	Wydajność specyficzna na godzinę trwania procesu [U/L·h]	1491,8	1598,9	1563,7	1576,6	1403,8
P8	Wydajność ekspresji białka na godzinę trwania procesu [mg/L·h]	2,15	2,71	2,48	2,32	2,19

W optymalnych warunkach prowadzenia hodowli bakteryjnej przeprowadziłem dodatkowo dwa eksperymenty, dla których wartości parametrów procesu ekspresji przedstawia **Tabela 27**. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów optymalizacyjnych uzyskałem następujące wartości parametrów procesu ekspresji lizostafiny (wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym): mokra masa osadu komórek bakteryjnych 5,65±1,04 g/l (P1), wydajność ekspresji białka 18,39±0,92 mg/l (P2), aktywność specyficzna lizostafiny 639±62 U/mg (P4), liczba jednostek lizostafiny uzyskiwana z jednego litra hodowli 11787±1701 U/l (P5). Na tym etapie optymalizacji warunków prowadzenia ekspresji lizostafiny w bioreaktorze w układzie *Escherichia coli* TOP10F' / pBAD2lys, uzyskałem wyższe wartości dla wydajności specyficznej ekspresji i aktywności specyficznej enzymu w stosunku do procesu prowadzanego przez Szwedę i wsp. w kolbach laboratoryjnych w tym samym

układzie ekspresyjnym (odpowiednio o 377 i 28%, względem wartości: 3125 U/l i 498U/mg) [Szweda i in. 2005].

**Tabela 27.** Wyniki dla trzech powtórzeń procesu produkcji lizostafiny prowadzonej w bioreaktorze (3L) z wykorzystaniem układu *Escherichia coli* TOP10F' / pBAD2lys (warunki optymalne).

Nr	Parametry hodowli komórkowej	Powtórzenie		
		1	2	3
P1	Mokra masa osadu (MMO) [g/l]	6,43	4,47	6,04
P2	Wydajność ekspresji białka [mg/l]	19,32	17,49	18,37
P3	Wydajność ekspresji względem MMO [mg/g]	3,00	3,92	3,04
P4	Aktywność specyficzna białka [U/mg]	695	573	648
P5	Wydajność specyficzna ekspresji białka [U/l]	13427	10030	11904
P6	Wydajność specyficzna ekspresji względem MMO [U/g]	5279	5726,1	4887,6
P7	Wydajność specyficzna na godzinę trwania procesu [U/L·h]	1491,8	1114,4	1583,3
P8	Wydajność ekspresji białka na godzinę trwania procesu [mg/L·h]	2,15	1,94	2,41

#### 9.4.5. Intensyfikacja wydajności produkcji lizostafiny poprzez zmianę składu pożywki hodowlanej.

Dalsze próby zwiększenia wydajności ekspresji białka prowadzonej w wybranym układzie oparłem o zmianę składu pożywki hodowlanej. W dostępnej literaturze wielokrotnie wykazywano, że tego typu strategie optymalizacyjne mogą prowadzić do uzyskiwania hodowli o dużych gęstościach komórkowych (hodowle HCDC - High Cell Density Cultures), a w przypadku komórek *Escherichia coli* możliwe jest uzyskanie biomasy nawet przekraczając 50 g suchej masy komórek na litr hodowli, co opisano w pracy przeglądowej dotyczącej dostępnych strategii prowadzenia hodowli HCDC dla komórek *E. coli* [Choi i in. 2006]. Skuteczne prowadzenie hodowli w warunkach HCDC, w których uzyskiwana jest wysoka wydajność biomasy oraz wysoki poziom ekspresji białka, uwarunkowane jest właściwym doborem składników pożywki hodowlanej, a także wyborem strategii uzupełniania składników odżywczych, co uzależnione jest od typu prowadzonej hodowli (stacjonarnej, ciągłej, dolewowej lub z retencją komórek). Proste zwiększenie ilości składników pożywki często nie prowadzi do pożądanego wyniku, ze względu na hamujący wpływ niektórych z tych składników na wzrost komórek, przy przekroczeniu ich granicznych wartości stężenia. Wzrost komórek *E. coli* hamowany jest m.in. po przekroczeniu stężeń dla następujących składników: dla glukozy 50 g/l, amoniaku 3 g/l, żelaza 1,15 g/l, magnezu 8,7 g/l, cynku 0,038 g/l [Lee 1996]. Innym ważnym problemem związanym z hodowlami *E. coli* o dużej gęstości



jest produkcja jonów octanowych, która pojawia się zwykle w warunkach ograniczonego natlenienia lub nadmiaru glukozy. Nadmiar glukozy powoduje, że bakterie produkują kwas octowy, nawet w warunkach tlenowych, na skutek wysycenia cyklu kwasów trikarboksylowych. Przekroczenie stężenia jonów octanowych powyżej 5 g/l w medium hodowlanym o pH = 7,0 hamuje wzrost komórek *E. coli*, na skutek blokady fosforylacji oksydacyjnej i w konsekwencji zahamowania replikacji, transkrypcji i translacji. W celu oceny możliwości zwiększenia wydajności ekspresji lizostafiny w komórkach *Escherichia coli* TOP10F<sup>'</sup>/pBAD2lys przeprowadziłem cztery eksperymenty wykorzystując dwa dodatkowe media: wzbogaconą pożywkę LB oraz pożywkę HCDC, prowadząc hodowle w trybie okresowym z zasilaniem – przy stałym uzupełnianiu pożywki hodowlanej. Oba media hodowlane cechowały się wyższą zawartością związków będących źródłami węgla i azotu w stosunku do standardowej pożywki LB, różniły się także zawartością soli mineralnych i sposobem uzupełniania składników odżywczych (**Suplement 9.2.1, Tabela 22**). Zmiana składników pożywki hodowlanej doprowadziła do niemal dwukrotnego zwiększenia wydajności ekspresji lizostafiny (P2), przy braku spadku jej aktywności specyficznej (P4), podczas gdy hodowlę prowadziłem z wykorzystaniem wzbogaconej pożywki LB przy jej stałym suplementowaniu glicerolem z natężeniem przepływu 3g/l/h. Wynik dla tego układu był także wyższy w stosunku do dwóch pozostałych modyfikacji sposobu suplementowania glicerolem, odpowiednio o 2,6 i 8,4 razy względem układów Glicerol 9g/l/h i Glicerol 9g/l/h + 100% ARA. Wyższy poziom ekspresji białka dla układu Glicerol 3g/l/h względem hodowli wykorzystującej niemodyfikowane podłoże LB, jest bezpośrednim wynikiem intensyfikacji ilości uzyskanej biomasy (P1). Trzykrotne zwiększenie natężenia przepływu glicerolu (układy Glicerol 9g/l/h, Glicerol 9g/l/h + 100% ARA), doprowadziło co prawda do zwiększenia biomasy o odpowiednio 63 i 34%, jednak wyraźnie spowolniło wydajność ekspresji białka. Zgodnie z oczekiwaniami, hodowlę o najwyższej gęstości uzyskałem wykorzystując medium HCDC zaproponowane przez Liu [Liu i in. 2011]. W tych warunkach ilość biomasy była wyższa średnio o 300% w stosunku do pozostałych układów, co było podyktowane znacznie większą zawartością łatwiej przyswajalnego źródła węgla (glukozy). Dla tego układu hodowlanego uzyskałem także najniższy poziom ekspresji białka, przy jednocześnie znacznie niższej aktywności specyficznej enzymu. Wynik ten jest również zgodny z moimi oczekiwaniami, jako że glukoza jest skutecznym inhibitorem arabinozowego systemu ekspresyjnego. Celem tego doświadczenia było jednak uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy wykorzystanie hodowli w medium HCDC doprowadzi do intensyfikacji biomasy komórek *Escherichia coli* transformowanych plazmidem pBAD2Lys, co może być wykorzystywane w dalszych pracach prowadzonych przez Szwedę i współpracowników.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdziłem, że najbardziej optymalnymi warunkami ekspresji lizostafiny w komórkach *Escherichia coli* TOP10F<sup>'</sup> transformowanych plazmidem pBAD2Lys zapewnia układ wykorzystujący jako medium hodowlane wzbogaconą pożywkę LB z suplementacją glicerolem w natężeniu 3g/l/h, przy

zachowaniu wartości pH, temperatury i szybkości obrotowej mieszadła mechanicznego reaktora BIOSTAT CT odpowiednio na poziomie: 6,0; 37<sup>0</sup>C i 400 rpm.

**Tabela 28.** Wpływ składu medium hodowlanego i sposobu prowadzenia hodowli na parametry procesu produkcji lizostafiny prowadzonej w bioreaktorze (3L) z wykorzystaniem układu *Escherichia coli* TOP10F' / pBAD2lys (400 rpm, pH 6,0, T 37°C).

Nr	Parametry hodowli komórkowej	Modyfikacje medium hodowlanego				
		LB	Glicerol 9g/l/h	Glicerol 9g/l/h + 100% ARA	Glicerol 3g/l/h	HCDC
P1	Mokra masa osadu (MMO) [g/l]	6,43	10,47	8,59	10,7	29,12
P2	Wydajność ekspresji białka [mg/l]	19,32	13,26	4,22	35,61	1,89
P3	Wydajność ekspresji względem MMO [mg/g]	3	1,27	0,49	3,33	0,06
P4	Aktywność specyficzna białka [U/mg]	695	379	741	728	357,7
P5	Wydajność specyficzna ekspresji białka [U/l]	13427	5026	3129	25923	676
P6	Wydajność specyficzna ekspresji względem MMO [U/g]	5279	1776,1	1328,8	7486,8	54,5
P7	Czas prowadzenia procesu [h]	9	9	25,5	9	22
P8	Wydajność specyficzna na godzinę trwania procesu [U/L·h]	1491,8	558,5	122,7	2880,3	30,7
P9	Wydajność ekspresji białka na godzinę trwania procesu [mg/L·h]	2,15	1,47	0,17	3,96	0,09

W takich warunkach uzyskałem wydajność ekspresji białka równą 35,6 mg/l, enzym o aktywności specyficznej 728 U/mg i w konsekwencji wydajność specyficzną procesu ekspresji na poziomie 26 tysięcy jednostek lizostafiny na litr prowadzonej hodowli (co stanowiło odpowiednio ponad 80000 U z jednej partii produkcyjnej). Uzyskana przeze mnie wydajność specyficzna ekspresji lizostafiny jest ponad ośmiokrotnie wyższa w stosunku do wydajności, jaką uzyskali Szweda i współpr. prowadząc proces w kolbach laboratoryjnych (3125 U/l). W zaproponowanych warunkach uzyskałem także enzym o wyższej aktywności specyficznej (o 46%, względem 498 U/mg), co ma znaczenie zarówno przy ekonomicznych aspektach dla procesów immobilizacji lizostafiny w różnych materiałach (możliwość wykorzystania mniejszej ilości lizostafiny przy wyższej aktywności), a także dla procesu przechowywania i związanego z nim spadku aktywności enzymu w czasie. Mając na uwadze powyższe wyniki, mogę stwierdzić, że proces optymalizacji ekspresji lizostafiny w układzie *Escherichia coli* TOP10F'/pBAD2Lys został przeprowadzony z sukcesem. Ponadto uzyskałem wydajność ekspresji lizostafiny na porównywalnym poziomie do procesu prowadzonego w skali przemysłowej przez Mierau (40 mg/l, przy fermentacji w reaktorze 3000 l), wykorzystując jednak dużo bardziej powszechny i mniej pracochłonny układ ekspresyjny.

Analiza kosztów surowcowych procesu ekspresji lizostafiny w układzie uznanym za optymalny wykazała, że całkowity koszt surowcowy pojedynczego eksperymentu mającego na celu otrzymanie lizostafiny z 3l hodowli prowadzonej w bioreaktorze w komórkach *Escherichia coli* TOP10F'/pBAD2lys, równy jest 266,56 PLN, a jeden cykl otrzymywania zajmuje 23,5 roboczogodziny. Uwzględniając wydajność specyficzną analizowanego procesu na poziomie 80100 U z jednej partii produkcyjnej, koszt przygotowania 1000 U tego enzymu wyniósł 3,33 PLN. Lizostafina jest enzymem komercyjnie dostępnym. Enzym ten jest podstawowym elementem większości komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji DNA z bakterii rodzaju *Staphylococcus*. Można ją zatem nabyć jako odczynnik laboratoryjny u większości dostawców mających w swoim portfolio produkty biotechnologiczne w cenie ok. 400,0 PLN za 1000 U (DNA Gdańsk, Sigma Aldrich, PROSPEC, AMBI PRODUCTS), przy czym zwykle jest ona sprzedawana w postaci preparatu, o stężeniu 1 mg/ml i aktywności zbliżonej do 400 U/mg. Tak wysoka cena może stanowić problem nawet przy jej wykorzystywaniu w pracach badawczych. Natomiast jest już kompletnie nieakceptowalna w zastosowaniach przemysłu spożywczego, czy w konstrukcji aktywowanych nią materiałów opatrunkowych. Zakładając, że techniczny koszt wytworzenia dla produktów biotechnologicznych obecnych w sprzedaży stanowi 40-50% ceny sprzedaży, wykorzystanie zaproponowanego przez nas układu hodowlanego może obniżyć koszty jej wytwarzania przynajmniej 10-ciokrotnie. Ponadto opisany wyżej proces wytwarzania lizostafiny może być łatwo wdrożony w niemal każdym badawczym bądź przemysłowym laboratorium biotechnologicznym, co przy wykorzystaniu metody Mierau jest już czynnością znacznie trudniejszą [Mierau i in. 2005]. Zaprezentowane w tym rozdziale wyniki zostały opublikowane [Szweda i in. 2014].

## 9.5. Literatura.

- Lee S.Y., High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends. Biotech.* 14: 98-105 (1996).
- Liu J.F., Zhang Z.J., Li A.T., Pan J., Xu J.H., Significantly enhanced production of recombinant nitrilase by optimization of culture conditions and glycerol feeding. *Appl. Microbiol. Biot.* 89: 665–72 (2011).
- Mierau I., Leij P., Van Swam I., Blommestein B., Floris E., Mond J., Smidt E.J., Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE: The case of lysostaphin. *Microb. Cell Fact.* 4(15): 1-9 (2005).
- Mierau I., Olieman K., Mond J., Smidt E.J., Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microb. Cell Fact.* 4:16. doi:10.1186/1475-2859-4-16 (2005a).
- Szweda P., Kotłowski R., Kur J. Lizostafina - źródła otrzymywania i zastosowanie. *Biotechnologia* 4: 28-45 (2005).
- Szweda P., Lacka I., Kotłowski R., Synowiecki J., Protective effect of lysostaphin from *Staphylococcus simulans* against *Staphylococcus aureus* in milk and some other food products. *J. Food Safety.* 27: 265–274 (2007).
- Szweda P., Górczyca G., Filipkowski P., Zalewska M., Milewski S., Efficient production of *Staphylococcus simulans* lysostaphin in a benchtop bioreactor by recombinant *Escherichia coli*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 44: 370-381 (2014).