



(21) Numer zgłoszenia: **427430**

(22) Data zgłoszenia: **16.10.2018**

(51) Int.Cl.

**A61L 15/44 (2006.01)**

**A61L 29/16 (2006.01)**

**A61K 31/155 (2006.01)**

**A61K 31/29 (2006.01)**

**A61K 31/47 (2006.01)**

**A61P 31/04 (2006.01)**

(54) **Zastosowanie medyczne kompozytu antybakteryjnego w materiałach opatrunkowych  
zwłaszcza do profilaktyki lub leczenia miejscowych zakażeń**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**20.04.2020 BUP 09/20**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**02.11.2020 WUP 17/20**

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny w Lublinie,  
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**DOROTA KOWALCZUK, Lublin, PL**

**AGATA GŁADYSZ, Krężnica Jara, PL**

**GRAŻYNA GINALSKA, Lublin, PL**

**MAŁGORZATA MIAZGA-KARSKA, Lublin, PL**

**BARBARA RAJTAR, Lublin, PL**

**MAŁGORZATA POLZ-DACEWICZ, Lublin, PL**

**RAFAŁ PIETRAŚ, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Bełz**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie medyczne kompozytu antybakteryjnego w materiałach opatrunkowych zwłaszcza do profilaktyki lub leczenia miejscowych zakażeń.

Szacuje się, że w 2015 roku blisko 6,5 miliona osób na świecie dotkniętych było problemem ran przewlekłych, z czego w Polsce około 500 tysięcy. Ze względu na starzenie się społeczeństwa i wzrost zachorowalności na choroby cywilizacyjne (cukrzyca, otyłość, choroby układu sercowo-naczyniowego) liczba ta będzie się stale powiększać [Rusak. A., Rybak Z., *Polim. Med.*, 2013, 43 (3), 199–204; Dreifke M.B. i współautorzy, *Mater. Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015, 48, 651–662].

Ranami przewlekłymi nazywa się te, których proces gojenia jest zaburzony i trwa dłużej niż trzy miesiące. Charakteryzuje je długotrwale utrzymujący się stan zapalny, którego przyczyną w większości przypadków jest infekcja bakteryjna spowodowana przez więcej niż jeden szczep. Najczęściej występujące w zakażonej ranie drobnoustroje to *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* koagulazoujemne gronkowce (m.in. *Staphylococcus epidermidis*). Bardzo prawdopodobne jest, że bakterie te występują w ranach przewlekłych w postaci struktury kompleksowej zwanej biofilmem, którego obecność utrudnia leczenie wydłużając czas jego trwania. Leczenie zakażeń ran przewlekłych z wykorzystaniem popularnych antybiotyków i antyseptyków jest utrudnione ze względu na wzrastającą liczbę szczepów opornych na dotychczas stosowane i dostępne preparaty. Najpowszechniej występujące w ranach gatunki bakterii opornych to *P. aeruginosa* i *S. aureus* [Nunan R. i współautorzy, *Dis. Model Mech.*, 2014, 7, 1205–1213; Davies C.E. i współautorzy, *Rep Reg*, 2001, 9, 332–340; Gjødtsbøl K. i współautorzy, *Int Wound J*, 2006, 3 (3), 225–231].

Specyfika leczenia ran przewlekłych wymagająca stosowania odpowiednich opatrunków, często związana z czasową niezdolnością do pracy i potrzebą opieki osób trzecich znacznie obciąża system opieki zdrowotnej i socjalnej, generując ogromne wydatki; natomiast zmniejszająca się liczba możliwych do zastosowania preparatów antybakteryjnych sprawia, że jest to nadal duże wyzwanie terapeutyczne dla współczesnej medycyny i nauki, czyniąc z niego problem o zasięgu globalnym [Sen C.K. i współautorzy, *Wound Repair Regen.*, 2009, 17, 763–771].

Aktualne badania skupiają się na poszukiwaniach bardziej efektywnego sposobu leczenia ran poprzez włączanie w strukturę opatrunków substancji o właściwościach przeciwbakteryjnych, przeciwbólowych i przyspieszających proces gojenia, a co za tym idzie dążą do zastąpienia ogólnoustrojowego podawania leków – podawaniem miejscowym. Zahamowanie i/lub zlikwidowanie infekcji bakteryjnej można osiągnąć przez, zastosowanie antybiotyków, chemioterapeutyków i antyseptyków oraz coraz powszechniej – z wykorzystaniem substancji pochodzenia naturalnego: olejków eterycznych, ekstraktów, roślin, enzymów, czy peptydów.

Powszechnie wykorzystywanym w prototypach opatrunków chemioterapeutykiem jest cyprofloksacyna. Lek włącza się w strukturę opatrunków chitozanowo-alginiowych [Han F. i współaut. *Appl Surf Sci*, 2014, 311, 626–634], chitozanowo-żelatynowych [Hima B.TVL. i współaut., *International Journal of Drug Delivery*, 2010, 2, 173–182] uzyskując opatrunki w formie błony posiadające aktywność przeciwbakteryjną przez długi okres czasu (nawet 28 dni).

Kolejną metodą jest wytwarzanie mikrowłókien poliuretanowo-dekstranowych techniką elektroprzędzenia, w których strukturę, włącza się lek [Unnithan A.R. i współaut., *Carbohydr Polym*, 2012, 90, 1786–1793].

W celu większej kontroli nad uwalnianiem chemioterapeutyku tworzy się także kompleksy cyprofloksacyna montmorylonit, a następnie zamyka w żelatynie, co skutkuje powolniejszym i dłuższym w czasie uwalnianiem leku [Kevadiya B.D. i współaut., *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 122, 175–183].

W przypadku niewielkiej infekcji rany lub by zapobiec rozwojowi zakażenia zamiast antybiotyków stosuje się antyseptyki. Najpowszechniej używanymi w tworzeniu potencjalnych materiałów opatrunkowych są pochodne biguanidu oraz związki jodu.

Chlorheksydyna ze względu na właściwości odkażające została zastosowana w kilku typach opatrunków. Podobnie jak w przypadku cyprofloksacyny utworzono jej kompleks z montmorylonitem i włączono go w strukturę opatrunku chitozanowego co spowolniło uwalnianie substancji czynnej. Badania aktywności biologicznej wykazały działanie antyseptyczne zapobiegające powstawaniu biofilmu w ranie [Ambrogio V. i współaut., *J Colloid Interface Sci* 2017, 491, 265–272].

Omawiane sposoby otrzymywania opatrunków przeciwbakteryjnych dotyczą rutynowo używanych w lecznictwie związków o udowodnionych właściwościach przeciwbakteryjnych, które jednak przestają być skuteczne ze względu na rosnącą liczbę przypadków wielolekooporności szczepów mikroorganizmów.

**Istota wynalazku** dotyczy zastosowania kompozytu zawierającego bizmut oraz chlorheksydynę (jako ligand x) i fluorochinolon (jako ligand y) w stosunku molowym odpowiednio 1:1:1-3 w materiałach opatrunkowych zwłaszcza do profilaktyki lub leczenia miejscowych zakażeń, zwłaszcza dermatologicznych, jamy ustnej, urologicznych. Kompozyt ma strukturę kompleksu skomponowanego z ligandów x i y połączonych kowalencyjnie z jonem bizmutu(III) w odróżnieniu od kombinacji znanej w stanie techniki.

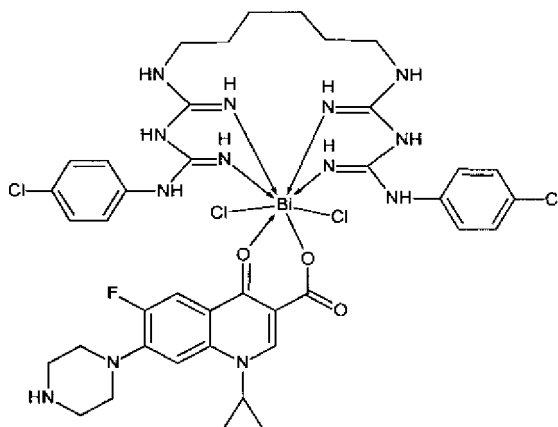
Kompozyt do zastosowania jako środek przeciwbakteryjny i potencjalnie przyspieszający proces gojenia w materiałach opatrunkowych może mieć postać proszku, roztworu, zawiesiny, hydrożelu, kapsułek (makro, mikro lub nanokapsułek), granul, błon (plastra, filmu). Kompozyt korzystnie do zastosowania w matrycy chitozanowo-alginianową, chitozanowo-żelatynowo-alginianową, chitozanowo-keratynową.

Kompozyt korzystnie do inkorporowania w macierz gotowych form opatrunkowych, cewników lub innych biomateriałów przeznaczonych do terapii zakażeń miejscowych.

Celem wynalazku jest zastosowanie kompozytu o składzie wyżej opisanym do otrzymywania przeciwbakteryjnych i potencjalnie leczniczych form opatrunkowych, biogodnych z tkankami ludzkimi, gdzie kompozyt włącza się w matrycę o właściwościach biokompatybilnych, nietoksyczną i umożliwiającą sukcesywne jego uwalnianie, korzystnie chitozanowo-alginianową, chitozanowo-żelatynowo-alginianową, chitozanowo-keratynową. Zastosowanie kompozytu w formie opatrunkowej, pozwala na przedłużone działanie przeciwbakteryjne dzięki stopniowemu uwalnianiu substancji aktywnych. Ponadto możliwa jest redukcja cytotoksyczności kompozytu inkorporowanego do matrycy formy opatrunkowej i/lub leczniczej, szczególnie po zamknięciu w makro-, mikro- lub nano- cząstkach dzięki spowolnieniu jego dystrybucji.

Struktura, spektrum aktywności antybakteryjnej i toksyczność względem komórek ssaków dla kompozytu zawierającego bizmut, chlorheksydynę i cyprofloksacynę jako fluorochinolon (CIP-Bi-CHX), wybranego celem otrzymania form opatrunkowych do profilaktyki lub leczenia miejscowych zakażeń, została określona odpowiednio na podstawie analizy instrumentalnej NMR, testów mikrobiologicznych i testów cytotoksyczności.

### Struktura kompozytu CIP-Bi-CHX:



Wzór sumaryczny:  $C_{39}H_{47}BiCl_4FN_{13}O_3$

Masa molowa: 1115,67 g/mol

Temperatura topnienia: 294,7°C

Widma NMR kompozytu CIP-Bi-CHX wskazują na obecność cyprofloksacyny i chlorheksydyny, gdyż zawierają sygnały charakterystyczne dla tych substancji. Analiza porównawcza widm NMR wskazuje również na wiązanie CIP i CHX poprzez atom bizmutu z uwagi na pojawienie się znacznych zmian sygnałów w widmie kompozytu w porównaniu do tych samych sygnałów w widmach substancji macierzystych. Zmiany dotyczą różnic w multipletowości pasm (dodatkowy pik lub zanik pików), rozszerzenia pasm, różnicy w intensywności pasm (głównie redukcja sygnału), znacznych przesunięć pasm jak również zanik pasm. Zmiany świadczą o zdecydowanej ingerencji w cząsteczki substancji niezwiązanych z możliwością tworzenia struktury kompozytowej, a nawet hybrydowej (tworzenia wiązań atomowych i koordynacyjnych).

W widmie  $^1\text{H}$  NMR kompozytu są obecne pasma protonowe charakterystyczne dla cyprofloksacyny: 1.19, 1.30–1.33, 3.84–3.85, 7.55–8.66, zaś pasmo protonowe grupy karboksylowej: 15.14 znika prawdopodobnie ze względu na podstawienie atomu wodoru grupy karboksylowej atomem bizmutu.

W widmie  $^1\text{H}$  NMR kompozytu są obecne pasma protonowe charakterystyczne dla chlorheksydyny: 1.29, 1.46, 3.04–3.08, 7.31–7.43. Pasma protonowe szczególnie ugrupowania biguanidynowego chlorheksydyny w zakresie 7.26–7.39 uległy znacznym przesunięciom po włączeniu jej w strukturę kompozytu.

Zmiany w widmach  $^{13}\text{C}$  NMR kompozytu w odniesieniu do widm substancji macierzystych są podobne do obserwowanych w widmie  $^1\text{H}$  NMR co potwierdza wiązanie tych substancji z możliwością tworzenia kompozytu.

Widma  $^1\text{H}$  NMR ( $d_6$ -DMSO, ppm)

CIP HCl: 1.19, 1.20, 1.32, 1.34, 3.57, 3.85, 3.87, 3.88, 7.60, 7.63, 7.93, 7.98, 8.68, 9.43, 15.14 (-COOH)

CHX 2CH<sub>3</sub>COOH: 1.26, 1.44, 1.72 (-CH<sub>3</sub> w octanie), 3.04, 3.06, 3.09, 7.26, 7.28, 7.29, 7.39

CIP-Bi-CHX: 1.19, 1.29, 1.30, 1.33, 1.46, 3.04, 3.08, 3.84, 3.85, 7.31, 7.34, 7.41, 7.43, 7.55, 7.57, 7.88, 7.92, 8.66

Widma  $^{13}\text{C}$  NMR ( $d_6$ -DMSO, ppm)

CIP HCl: 8.09, 36.47, 42.95, 46.78, 46.84, 107.29, 107.41, 111.50, 111.81, 119.76, 119.87, 139.55, 144.54, 144.68, 148.70, 151.70, 155.01, 166.33, 176.84, 176.87

CHX 2CH<sub>3</sub>COOH: 25.29 (-CH<sub>3</sub> w octanie), 26.37, 122.47, 126.18, 128.69, 160.07, 176.39 (-COOH w octanie)

CIP-Bi-CHX: 8.05, 26.39, 36.37, 44.89, 49.79, 106.81, 107.23, 111.30, 111.61, 119.08, 119.18, 122.16, 126.73, 128.93, 138.28, 138.76, 139.66, 145.64, 145.77, 148.48, 151.82, 155.13, 155.38, 160.74, 166.45, 176.81

#### Badania mikrobiologiczne

Kompozyt (CIP-Bi-CHX) zsyntetyzowany z użyciem chemioterapeutyku-cyprofloksacyny (CIP) i antyseptyku-chlorheksydyny (CHX), poddano ocenie aktywności przeciwbakteryjnej wobec wybranych szczepów drobnoustrojów:

bakterii tlenowych Gram-dodatnich:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

bakterii tlenowych Gram-ujemnych:

- *Escherichia coli* ATCC 25992
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

**Ocena stref zahamowania wzrostu bakterii** z użyciem testu przesiewowego polegającego na dyfuzji substancji czynnej do pożywki stałej Mueller-Hinton.

Doświadczenie – przygotowano kolejno: roztwory lub zawiesiny badanych substancji o stężeniu 10 mg/ml w DMSO; pożywki Mueller-Hinton agar, które wylano w ilości ok. 20 ml na płytki Petry'ego i pozostawiono do zastygnięcia w temperaturze pokojowej; inokulum bakteryjne o stężeniu 0,5 McFarlanda używając wymienionych szczepów bakterii.

Zawiesiny poszczególnych bakterii zaszczerpiono za pomocą głaszczki na zastygniętych płytkach, a następnie na oznaczone odpowiednie miejsca płytki naniesiono przygotowane wcześniej roztwory badanych związków o stężeniu końcowym 100 µg. Gotowe płytki inkubowano 24 godziny w temp. 37°C, w warunkach tlenowych. Po okresie inkubacji zmierzono za pomocą linijki mikrobiologicznej powstałe strefy zahamowania wzrostu bakterii wytworzone wokół badanych związków. Wyniki doświadczenia przedstawia poniższa tabela:

Badany związek	Strefy zahamowania wzrostu [mm]			
	bakterii Gram-		bakterii Gram+	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Cyprofloksacyna (CIP), w postaci chlorowodorku	42	28	40	38
Chlorheksydyna (CHX) w postaci diocjanu	12	10	19	18
Kompozyt (CIP-Bi-CHX)	44	40	42	38

Przedstawione dane liczbowe wskazują na intensyfikację aktywności przeciwbakteryjnej otrzymanego kompozytu w odniesieniu do związków użytych do jego syntezy, wobec bakterii *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*, z pośród których *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* uważane są za najczęstszy czynnik etiologiczny wywołujący zakażenia ran, w tym zakażenia owrzodzeń stopy cukrzycowej i oparzeń (Arkadiusz Jawień i inni. Wytyczne postępowania miejscowego i ogólnego w ranach objętych procesem infekcji. Leczenie Ran 2012, 9(3), 59–75). Największą strefę zahamowania wzrostu wykazywał badany kompozyt w stosunku do *E. coli*, zaś największą intensyfikację aktywności przeciwbakteryjnej zaobserwowano wobec *P. aeruginosa*.

#### Ocena stopnia wrażliwość testowanych komórek bakteryjnych

Celem określenia stopnia wrażliwość testowanych komórek bakteryjnych w odniesieniu do kompozytu wyznaczono wartości MIC (ocena ilościowa wrażliwości) i MBC:

- gdy  $MBC \leq 4 \times MIC$ , środki bakteriobójcze względem danego patogenu
- gdy  $MBC > 4 \times MIC$ , środki bakteriostatyczne względem danego patogenu

Celem określenia skuteczności przeciwbakteryjnej kompozytu wyznaczono wartość MBC/MIC (im niższa wartość MBC/MIC tym środek bardziej skuteczny)

- gdy  $MBC/MIC \geq 32$  występuje zjawisko tolerancji komórek bakteryjnych na terapeutyk w danych warunkach.

**Ocena minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIC).** Wartość MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) w odniesieniu do kompozytu wyznaczono z zastosowaniem metody szeregu mikrorozcieńczeń w płytkach 96-dółkowych, w odpowiednich pożywkach bakteryjnych. W tym celu sporządzono roztwory badanych substancji o stężeniu 50 mg/ml w odpowiednim rozpuszczalniku, nie wykazującym hamującego wpływu na testowane bakterie (2,5% kwas octowy) oraz inokulum bakteryjne o stężeniu 0,5 McFarlanda badanych drobnoustrojów (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*). Do pierwszego dołka w płytce odmierzono 392  $\mu\text{l}$ , a do pozostałych 200  $\mu\text{l}$  bulionu Müellera. Następnie do pierwszego dołka dodano 8,16  $\mu\text{l}$  roztworu testowanej substancji i na zasadzie podwójnych mikrorozcieńczeń uzyskiwano stężenia końcowe: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,91; 1,96; 0,976; 0,488; 0,244; 0,122; 0,061; 0,0305  $\mu\text{g/ml}$ . W kolejnym etapie każdy dołek zaszczerpiano daną bakterią w ilości 2  $\mu\text{l}$ . W każdej płytce przygotowywano także kontrolę dodatnią (czyli bulion zaszczerpiony daną bakterią) oraz kontrolę ujemną (czysty bulion) w celu oceny poprawności i jałowości prowadzonego doświadczenia. Gotowe płytki inkubowano w odpowiednich warunkach (temp. 37°C. 24 godziny, warunki tlenowe). Odczyt wykonano z użyciem czytnika płytek BioTek przy długości fali 600 nm. Wyznaczone wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIG) dla testowanych związków wobec tlenowych bakterii Gram ujemnych i Gram dodatnich przedstawia poniższa tabela.

Badany związek	Wartości MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ]			
	bakterii Gram-		bakterii Gram+	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Cyprofloksacyna (CIP), w postaci chlorowodorku	0.122	0.122	0.0305	0.122
Chlorheksydyna (CHX) w postaci diocjanu	0.488	7.800	0.488	0.244
Kompozyt (CIP-Bi-CHX)	0.122	0.244	0.488	0.122

Wyniki wskazują, że otrzymany kompozyt jest aktywniejszy od chlorheksydyny w stosunku do *S. epidermidis*, *E. coli* i *P. aeruginosa*, szczególnie wobec *P. aeruginosa*. W pozostałych rozpatrywanych przypadkach jego aktywność jest równa lub nieznacznie niższa w porównaniu z aktywnością chlorheksydyny i cyprofloksacyny, jako związków użytych do jego syntezy.

**Ocena minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC)**, przy którym 99,9% bakterii ginie. Wartość MBC ( $\mu\text{g/ml}$ ) wyznaczono w odniesieniu do kompozytu wykorzystując 96-dołkowe płytki, w których uprzednio oznaczano wartości MIC dla konkretnych związków, wobec wybranych szczepów bakterii (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*). Z dołków, w których nie odnotowano wzrostu bakterii pobierano 10  $\mu\text{l}$  medium zawierającego malejące stężenie badanego związku i przenoszono na czyste płytki Petry'ego z odpowiednim podłożem agarowym. (Müller-Hinton dla bakterii tlenowych lub BHI dla bakterii mikroaerobowych). Następnie płytki inkubowano 24 godziny w temp. 37°C, w warunkach tlenowych. Po inkubacji oceniano ewentualny wzrost bakterii. Płytki zawierające medium ze stężeniem substancji czynnej, gdzie nie pojawiały się kolonie uznano za stężenie bakteriobójcze (MBC). Wyznaczone wartości minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) dla testowanych związków wobec tlenowych bakterii Gram ujemnych i Gram dodatnich przedstawia poniższa tabela:

Badany związek	Wartości MBC [ $\mu\text{g/ml}$ ]			
	bakterii Gram-		bakterii Gram+	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Cyprofloksacyna (CIP), w postaci chlorowodorku	0.244	0.244	0.061	0.244
Chlorheksydyna (CHX) w postaci dioctanu	1.953	62.500	0.976	0.488
Kompozyt (CIP-Bi-CHX)	0.244	0.488	1.953	0.976

Obliczone wartości; MBC/MIC określające skuteczność testowanych, związków, wobec tlenowych bakterii Gram ujemnych i Gram-dodatnich przedstawia poniższa tabela:

Badany związek	Wartości MBC/MIC			
	bakterii Gram-		bakterii Gram+	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Cyprofloksacyna (CIP), w postaci chlorowodorku	2	2	2	2
Chlorheksydyna (CHX) w postaci dioctanu	4	8	2	2
Kompozyt (CIP-Bi-CHX)	2	2	4	8

Wyniki wskazują, że kompozyt ma bakteriobójczy charakter w stosunku do testowanych bakterii z wyjątkiem *S. epidermidis*, gdzie stosunek MBC/MIC wynoszący 8 świadczy o bakteriostatycznej aktywności i jest skuteczniejszy wobec bakterii Gram- niż wobec bakterii Gram+. Chlorheksydyna jest bakteriostatyczna względem *P. aeruginosa* i bakteriobójcza w stosunku do pozostałych testowanych bakterii. Cyprofloksacyna zaś ma charakter bakteriobójczy w stosunku do wszystkich testowanych bakterii.

Wniosek:

Kompozyt CIP-Bi-CHX złożony z cyprofloksacyny i chlorheksydyny związanych poprzez atom bizmutu wykazuje aktywność bakteriobójczą wobec bakterii najczęściej wywołujących zakażenia ran: *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* podobnie do cyprofloksacyny. Ze względu zaś na fakt, że jest związkiem nowym, może być skuteczniejszy od cyprofloksacyny wobec której bakterie wykształciły mechanizmy oporności.

#### Testy cytotoksyczności

Dla właściwej oceny cytotoksyczności zastosowano kilka linii komórkowych jako że różniące się pochodzeniem linie komórkowe mogą wykazywać odmienną wrażliwość na tę samą substancję (Gruber B, Anuszewska E. Ocena działania cytotoksycznego nowych pochodnych antracyklinowych w układzie różnych linii komórkowych, Biuletyn IL, 2001, 45(3), 569–578).

W badaniu wykorzystano linię komórkową FaDu (ATCC – HTB-43) pochodzącą z ludzkiego raka płaskonabłonkowego krtani. RAW 264.7 (ATCC-TIB-71) otrzymaną z mysich makrofagów oraz Vero (ECACC – 84113001) pochodzącą z nerki afrykańskiej małpy zielonej. Do prowadzenia hodowli komórek FaDu użyto podłoże Minimum Essential Medium (MEM), natomiast podłoże Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) zastosowano do hodowli komórek RAW 264,7 i Vero. Podłoża uzupełniano 10% surowicy (FBS) oraz 100 U/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny.

Testowane substancje rozpuszczono w 10% kwasie cytrynowym do końcowego stężenia 1 mg/ml. Hodowle komórek prowadzono w płytkach 96-dołkowych do których rozlewano po 100 µl zawiesiny komórek o gęstości odpowiednio  $2 \times 10^4$  (FaDu),  $4 \times 10^4$  (RAW 264.7) oraz  $1,5 \times 10^4$  komórek, na dołek przygotowanej w podłożu hodowlanym z dodatkiem 10% surowicy. Po 24 h inkubacji w temp. 37°C podłoże z hodowli usuwano i dodawano roztwory badanych ekstraktów w płynie hodowlanym z dodatkiem 12% surowicy. Końcowe stężenia substancji wyniosły 0,25; 0,5; 1; 2; 3,9; 7,8; 15,6; 31,3; 62,5; 125 µg/ml. Do kontroli hodowli komórek dodawano tylko płyn hodowlany z dodatkiem 2% surowicy. Komórki poddane działaniu testowanych substancji inkubowano w temp. 37°C w obecności 5% CO<sub>2</sub> przez 48 h.

Cytotoksyczność substancji oceniano ilościowo przy użyciu testu formazanowego, MTT (Rajtar B. i inni, Journal of Pre-Clinical and Clinical Research, 2013, 7, 104–106) stosując czytnik do płytek przy długości fali 540 i 620 nm.

Na podstawie pomiarów określano wartość IC<sub>50</sub>, czyli stężenie badanego związku, które spowodowało spadek aktywności użytej populacji komórek o 50% w porównaniu z kontrolą. Otrzymane wyniki przedstawia poniższa tabela:

Badany związek	Linia komórkowa		
	FaDu	RAW 264.7	Vero
	IC <sub>50</sub> (µg/mL) ± SD		
Kompozyt (CIP-Bi-CHX)	3.86 ± 0.59	1.90 ± 0.06	29.4 ± 2.36
Cyprofloksacyna (CIP), w postaci chlorowodoru	13.74 ± 1.96	25.48 ± 1.93	35.95 ± 3.89
Chlorheksydyna (CHX) w postaci diocjanu	1.87 ± 0.19	0.92 ± 0.08	11.65 ± 1.29
Kwas cytrynowy (rozpuszczalnik)	16.15 ± 2.71	27.00 ± 2.69	33.5 ± 7.89

Kompozyt CIP-Bi-CHX zsyntetyzowany de novo według podanych wyżej przykładów i podany ocenie cytotoksyczności przy użyciu wszystkich wykorzystanych linii komórkowych wykazał toksyczność ponad 2 razy mniejszą niż chlorheksydyna użyta do jego syntezy. Kompozyt jak również substancje użyte do jego syntezy najmniejszą toksyczność wykazały w stosunku do linii

komórkowej nerki mały zielonej, która to linia wydaje się najbardziej odpowiadać komórkom człowieka. W stosunku do tej linii, kompozyt charakteryzował się znacznie mniejszą toksycznością (2,5 razy mniejszą) w odniesieniu do chlorheksydydy użytej do jego syntezy i nieznacznie większą toksycznością w odniesieniu do cyprofloksacyny użytej również do jego syntezy.

Z punktu widzenia cytotoxycznosci, korzystne jest stosowanie chlorheksydydy w postaci zaproponowanego kompozytu ze wzgledu na znaczna redukcje jej cytotoxycznosci przy zachowaniu spektrum dzialania z jednoczesna intensyfikacja skuteczności przeciwbakteryjnej.

#### **Propozycje form aplikacji kompozytu**

Poniżej przedstawiono przykłady zastosowania kompozytu i otrzymanych form materiałów opatrunkowych i/lub leczniczych zawierających kompozyt złożony z bizmutu, chlorheksydydy i cyprofloksacyny jako fluorochinolonu (CIP-Bi-CHX), użytych w stosunku molowym 1:1:1.

##### **P r z y k ł a d 1**

Materiał opatrunkowy w postaci błony (filmu): 25 ml 1,5% chitozanu rozpuszczonego w 1% kwasie octowym zmieszano z 19 ml 1,5% wodnego roztworu żelatyny, a następnie dodano 1 ml gliceryny jako plastyfikatora oraz 5 ml kompozytu rozpuszczonego w buforze cytrynianowym, pH 4,3, o stężeniu 0,1 mg/ml. W celu uzyskania większego stężenia kompozytu korzystnie jest rozpuścić go w kwasie cytrynowym z dodatkiem glikolu polietylenowego. Całość wymieszano, odgazowano z użyciem łaźni ultradźwiękowej, a następnie przelano do formy i pozostawiono do wysuszenia.

##### **P r z y k ł a d 2**

Materiał opatrunkowy w postaci granul (kulek): Zmieszano 87 ml 2% roztworu wodnego alginianu sodu z 8 ml 1,5% roztworu wodnego żelatyny dodając 5 ml roztworu kompozytu rozpuszczonego w buforze cytrynianowym, pH 4,3, o stężenie 0,1 mg/ml. W celu uzyskania większego stężenia kompozytu korzystnie jest rozpuścić kompozyt w kwasie cytrynowym z dodatkiem, glikolu, polietylenowego. Uzyskaną mieszaninę wkraplano powoli do 500 ml roztworu powstałego przez zmieszanie w stosunku objętościowym 1:1 3% chitosanu w 1% kwasie octowym z 5% roztworem chlorku wapnia przy stałym mieszaniu. Uzyskane granule po 30 minutach odsączono, przepłukano wodą, a następnie poddano suszeniu.

##### **P r z y k ł a d 3**

Granulat otrzymany według przykładu 2 pokryty cząsteczkami srebra poprzez redukcję Ag<sup>+</sup> do Ag<sup>0</sup>. Granulat umieszczono w roztworze azotanu srebra z dodatkiem surfaktanta i mieszając dodano roztwór kwasu askorbinowego uzyskując ciemnobrunatne zabarwienie powierzchni.

##### **P r z y k ł a d 4**

Materiał opatrunkowy w postaci kapsułek: 70 ml 1,5% roztworu chitosanu w 1% kwasie octowym zmieszano z 10 ml 1,5% wodnego roztworu żelatyny, 15 ml 5% roztworu chlorku wapnia i 5 ml roztworu kompozytu rozpuszczonego w buforze cytrynianowym, pH 4,3, o stężenie 0,1 mg/ml. W celu uzyskania większego stężenia kompozytu korzystnie jest rozpuścić kompozyt w kwasie cytrynowym z dodatkiem glikolu polietylenowego. Uzyskaną mieszaninę wkraplano do 100 ml 0,25% roztworu alginianu sodu. Następnie otrzymane kapsułki odsączono i przeniesiono na 30 minut do 2,5% roztworu chlorku wapnia, po czym ponownie odsączono i przepłukano wodą. Ułożono w formy i suszono.

##### **P r z y k ł a d 5**

Gotowe, dostępne w sprzedaży opatrunki poliuretanowe, piankowe do leczenia ran (fragmenty 0,5 x 0,5 cm) aktywowano w 0,25% etanolowym roztworze jodu lub 0,1% etanolowym roztworze bromu przez 1 h w temperaturze 37°C. Wyjęto i odsączono na gazie a następnie na każdy fragment matrycy naniesiono kroplami 0,25 ml hydrożelu zawierającego kompozyt (25 mg kompozytu rozpuszczono w 15 ml 10% kwasu cytrynowego, dodano 15 mg chitozanu rozpuszczając z udziałem ultradźwięków, następnie 0,5 ml 5% glutałdehydu oraz 0,2 ml roztworu glikolu polietylenowego) i suszono 24 h w temperaturze 37°C.

##### **P r z y k ł a d 6**

Gotowe, dostępne w sprzedaży opatrunki przeznaczone do leczenia ran nasączono roztworem hydrożelu zawierającego kompozyt lub roztworem kompozytu i wysuszono. Hydrożel przygotowany przez rozpuszczenie polimeru hydrofilowego (korzystnie chitozanu lub chitozanu i alginianu sodu) w fazie wodnej, na ciepło lub na zimno (zależnie od rodzaju polimeru), a następnie wprowadzono kompozyt przez: rozpuszczenie go w roztworze kwasu cytrynowego i dodanie do fazy wodnej przed utworzeniem hydrożelu lub mieszanie roztworu kompozytu z podłożem hydrożelowym, lub przez utarcie proszku kompozytu z podłożem hydrożelowym.

**Przykład 7**

Materiał opatrunkowy w postaci polimerowego proszku chitozanowo-alginianowo-pektynowego zawierającego kompozyt, uzyskanego techniką suszenia rozpyłowego.

**Przykład 8**

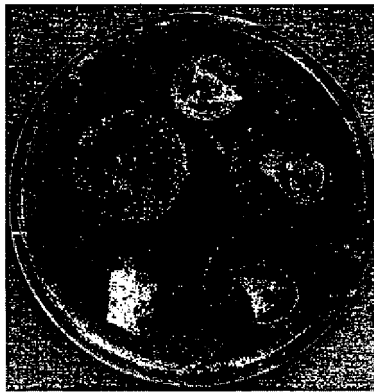
Materiał opatrunkowy w postaci hydrożelu o aktywności przeciwbakteryjnej do zastosowań stomatologicznych: kompozyt w postaci proszku, roztworu lub w formie zamkniętej w mikro/lub nanokapsułkach wprowadza się do polimerowego podłoża przygotowanego w fazie wodnej stosując znane metody postępowania. Jako polimer używa się np. chitozan, alginian sodu, gumę ksantanową, sól sodową karboksymetylocelulozy, hydroksyetylocelulozę lub kompozycję polimerów.

**Przykład 9**

Cewnik przeciwbakteryjny do leczenia infekcji związanych z cewnikowaniem: gotowy, (dostępny w sprzedaży cewnik na bazie lateksu) nasącza się roztworem kompozytu po uprzedniej aktywacji powierzchni z zastosowaniem etanolowego roztworu jodu lub bromu.

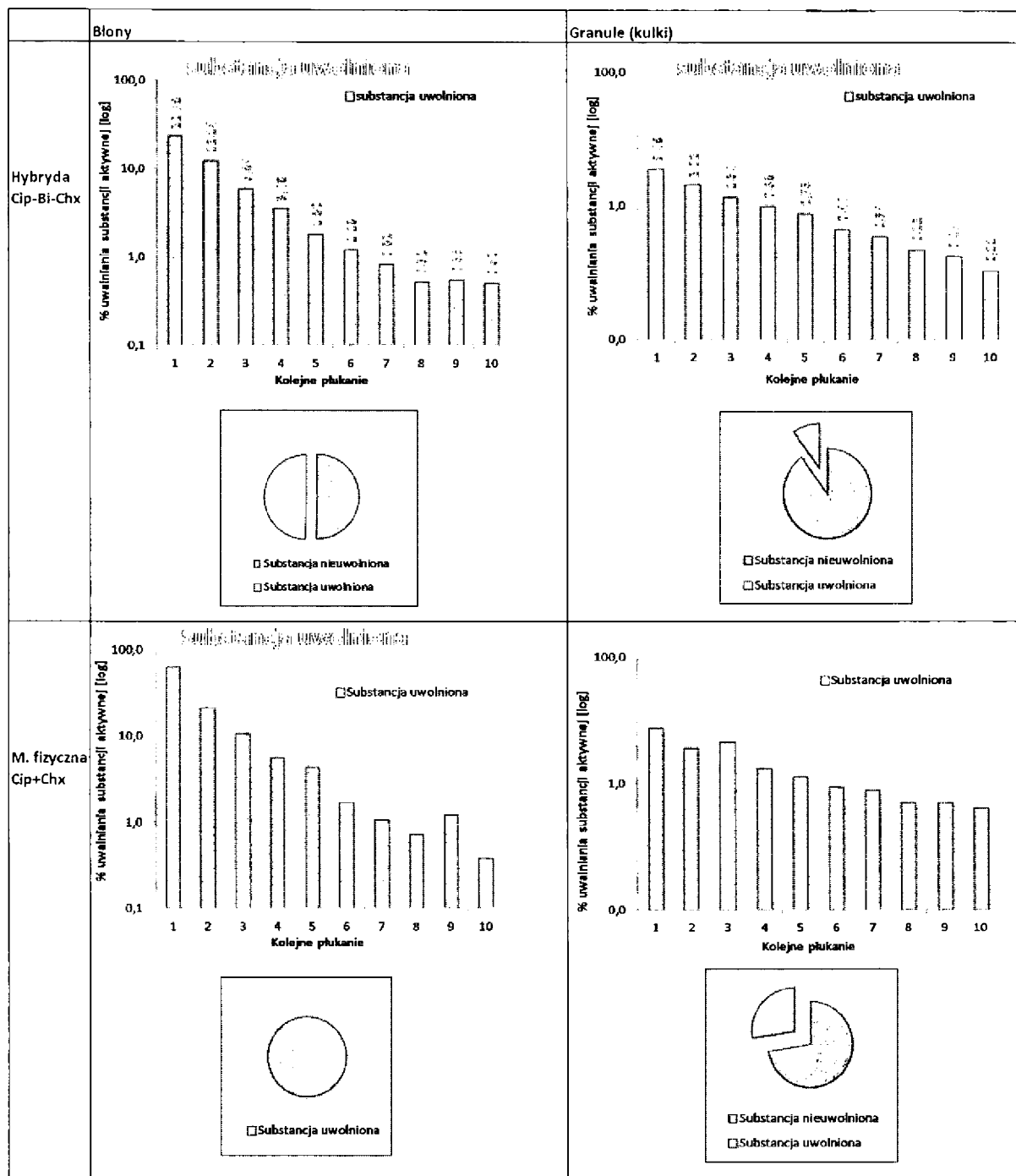
**Ocena aktywności mikrobiologicznej wybranych materiałów opatrunkowych**

Otrzymane według powyższych przykładów próbki błon chitozanowo-żelatynowych, granul alginianowych i gotowych opatrunków poliuretanowych zawierające kompozyt poddane ocenie właściwości przeciwbakteryjnych wobec bakterii *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* wykazywały strefy zahamowania wzrostu murawy bakteryjnej pod i wokół testowanych próbek na podłożu stałym Müller-Hinton w odróżnieniu od kontroli:

**Profile uwalniania kompozytu z wybranych materiałów z zastosowaniem metody HPLC**

Błonki chitozanowo-żelatynowe według przykładu 1 i granulaty alginianowe według przykładu 2 zawierające kompozyt i porównawczo zawierające mieszaninę fizyczną cyprofloksacyny i chlorheksydydny poddano badaniom uwalniania do buforu fosforanowego, w temperaturze 37°C przy delikatnym wstrząsaniu 50 obr./min.

Do próbek włożono błonki zawierające po 60 µg substancji aktywnej oraz odważono ilości granulatu odpowiadające zawartości 100 µg substancji aktywnej. Probówki umieszczono w inkubatorze. Do każdej probówki wlało 2 ml buforu, który wymieniało na nowy co 10 minut. Próbkę buforu po odpowiednim rozcieńczeniu poddawano analizie chromatograficznej i na podstawie uzyskanych danych wyznaczono profile uwalniania substancji aktywnych, które prezentuje poniższa rycina.



Uwalnianie substancji aktywnej z przygotowanych form opatrunkowych, błon i granul, przebiega stopniowo, w coraz mniejszych ilościach, z tendencją do stabilizacji, umożliwiając długoterminową ochronę przeciwbakteryjną, przy czym uwalnianie z błon jest intensywniejsze niż z granulatu.

Uwalnianie substancji aktywnych z form opatrunkowych, błon i granul, zawierających mieszaninę fizyczną cyprofloksacyny z chlorheksydyną (substancji nie związanych kompleksowo) przebiega znacznie szybciej w porównaniu z uwalnianiem kompozytu. Intensywniejsze uwalnianie można zaobserwować w przypadku błon, porównując je z granulatem.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozyt przeciwbakteryjny zawierający bizmut oraz chlorheksydynę – ligand x i fluorochinolon ligand y w stosunku molowym odpowiednio 1:1:1–3, o strukturze kompleksu skomponowanego z ligandów x i y połączonych kowalencyjnie z jonem bizmutu(III) do zastosowania w materiałach opatrunkowych i/lub leczniczych zwłaszcza do profilaktyki lub leczenia miejscowych zakażeń.
2. Kompozyt według zastrz. 1 do zastosowania w matrycy o właściwościach biokompatybilnych, nietoksycznej i umożliwiającej sukcesywne jego uwalnianie korzystnie chitozanowo-alginianowej, chitozanowo-żelatynowo-alginianowej, chitozanowo-keratynowej.
3. Kompozyt według zastrz. 1 do zastosowania jako materiał opatrunkowy w postaci proszku, roztworu, zawiesiny, hydrożelu, kapsułek (makro, mikro lub nanokapsułek), granul, błon (plastru, filmu).
4. Kompozyt według zastrz. 1 do inkorporowania w macierz gotowych form opatrunkowych, cewników lub innych biomateriałów przeznaczonych do terapii zakażeń miejscowych.