

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych

Rozprawa doktorska

**Otrzymywanie i scharakteryzowanie materiałów kolagenowych
wzbogaconych w związki biobójcze pochodzenia naturalnego**

Preparation and characterization of collagen materials enriched with
antimicrobial agents of natural origin

mgr Marta Michalska-Sionkowska

Promotor

prof. dr hab. Maciej Walczak

Toruń, 2020

Z całego serca pragnę podziękować za pomoc w realizacji niniejszej pracy:

prof. dr hab. Maciejowi Walczakowi

*za umożliwienie realizacji tematu niniejszej rozprawy doktorskiej
w swoim zespole badawczym, a także za opiekę merytoryczną i motywację.*

prof. dr hab. Alinie Sionkowskiej

za udostępnienie aparatury badawczej i dotychczasową współpracę.

dr Beacie Kaczmarek

za owocną współpracę i okazane wsparcie.

Dziękuję również pracownikom i doktorantom

Katedry Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii

oraz Katedry Chemii Biomateriałów i Kosmetyków,

którzy swoją życzliwością i pomocą przyczynili się do powstania tej pracy.

Spis treści

Streszczenie	7
Abstract	9
1. AKTUALNY STAN WIEDZY	11
1.1. Antybiotykooporność	11
1.2. Proces gojenia ran.....	13
1.3. Materiały opatrunkowe.....	15
1.4. Polimery stosowane w materiałach opatrunkowych.....	17
1.4.1. Poli(alkohol winylowy).....	18
1.4.2. Poli(ϵ -kapolakton).....	20
1.4.3. Chitozan.....	22
1.4.4. Celuloza bakteryjna	24
1.4.5. Kolagen	26
1.4.5.1. Budowa kolagenu	27
1.4.5.2. Wykorzystanie kolagenu	27
1.5. Związki przeciwdrobnoustrojowe stosowane w materiałach opatrunkowych	30
1.5.1. Nanocząstki	31
1.5.1.1. Nanocząstki srebra (AgNPs)	31
1.5.1.2. Nanocząstki tlenku cynku (nZnO).....	32
1.5.1.3. Nanocząstki dwutlenku tytanu (TiO ₂ NP).....	33
1.5.2. Miód	34
1.5.3. Olejki eteryczne.....	36
1.5.4. Związki fenolowe	38
2. CEL PRACY	42
3. MATERIAŁY I METODY	43
3.1. Mikroorganizmy stosowane podczas badań laboratoryjnych.....	43
3.2. Testy przesiewowe	43
3.3. Analiza statystyczna	45
3.4. Izolacja kolagenu.....	46
3.5. Przygotowanie materiałów kolagenowych z dodatkiem związków fenolowych	46
3.6. Właściwości bakteriobójcze otrzymanych materiałów	47
3.7. Wpływ materiałów na aktywność łańcucha transportu elektronów	49
3.8. Wpływ materiałów na ilość ATP syntetyzowanego przez komórki bakterii	50
3.9. Biokompatybilność.....	51

3.10.	Tworzenie biofilmu na powierzchni materiałów	51
3.11.	Degradacja enzymatyczna w warunkach <i>in vitro</i>	52
3.12.	Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni	52
3.13.	Topografia i chropowatość powierzchni.....	53
3.14.	Pomiar kąta zwilżania	53
3.15.	Właściwości antyoksydacyjne	54
3.16.	Ubytek masy w warunkach <i>in vitro</i>	56
3.17.	Uwalnianie związków aktywnych.....	56
3.18.	Przepuszczalność par i gazów	57
4.	WYNIKI I Dyskusja.....	58
4.1.	Testy przesiewowe.....	58
4.2.	Otrzymanie materiałów.....	67
4.3.	Właściwości bakteriobójcze otrzymanych materiałów	67
4.4.	Wpływ materiałów na aktywność łańcucha transportu elektronów	71
4.5.	Wpływ materiałów na ilość ATP syntetyzowanego przez komórki bakterii.....	74
4.6.	Biokompatybilność	77
4.7.	Tworzenie biofilmu na powierzchni badanych materiałów	78
4.8.	Degradacja enzymatyczna w warunkach <i>in vitro</i>	83
4.9.	Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni	84
4.10.	Topografia i chropowatość powierzchni.....	89
4.11.	Pomiar kąta zwilżania	99
4.12.	Właściwości antyoksydacyjne	101
4.13.	Ubytek masy w warunkach <i>in vitro</i>	103
4.14.	Uwalnianie związków aktywnych.....	106
4.15.	Przepuszczalność par i gazów	108
5.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI	111
6.	LITERATURA	115

Streszczenie

W niniejszej pracy przedstawiono opis wyników badań materiałów kolagenowych z wprowadzonymi do nich związkami bakteriobójczymi. Badania miały na celu otrzymanie i scharakteryzowanie biomateriałów na bazie kolagenu, który stanowił matrycę do inkorporacji związków aktywnie czynnych, którymi były fenole pochodzenia naturalnego.

Podczas realizacji pracy doktorskiej wykonano testy przesiewowe związków fenolowych i ich mieszanin w celu ustalenia ich właściwości biobójczych. Tymol, karwakrol i ich mieszanina 1:1 wykazywały najsilniejsze właściwości hamujące wzrost drobnoustrojów. Fenole te wprowadzono do matrycy polimerowej, którą stanowił kolagen typu I. Do otrzymania materiałów kolagenowych z wbudowanymi związkami fenolowymi wykorzystano metodę odparowania rozpuszczalnika. Interdyscyplinarny charakter pracy polegał na scharakteryzowaniu właściwości fizykochemicznych materiałów oraz ich właściwości bakteriobójczych.

Właściwości bakteriobójcze otrzymanych materiałów scharakteryzowano zgodnie z normą ISO 22196. Zbadano również ich wpływ na aktywność łańcucha transportu elektronów oraz na ilość ATP syntetyzowanego przez komórki bakteryjne. Na podstawie zdjęć SEM oceniono wpływ otrzymanych materiałów na tworzenie się biofilmu bakteryjnego na ich powierzchni. Biokompatybilność materiałów została oceniona względem erytrocytów.

Strukturę chemiczną kolagenu i jego układów ze związkami aktywnymi badano metodą osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-FTIR). Wpływ fenoli na strukturę powierzchni analizowano na podstawie zdjęć AFM. Określono również ich wpływ na zwilżalność powierzchni i swobodną energię powierzchniową materiałów. Degradacja enzymatyczna i degradacja w buforze PBS pozwoliła określić ubytek masy materiałów w warunkach *in vitro*. Określono również stopień uwalniania związków aktywnych z matrycy. Ponadto zbadano właściwości antyoksydacyjne otrzymanych materiałów i ich przepuszczalność względem par i gazów.

Otrzymane wyniki badań wskazują, że fenole mogą stanowić bakteriobójczy związek aktywny a materiały kolagenowe z ich dodatkiem mogą zostać otrzymane metodą odparowania rozpuszczalnika. Uzyskane wyniki pozwoliły na wytypowanie optymalnego składu materiału, który mógłby potencjalnie zostać wykorzystany jako materiał opatrunkowy stosowany na trudno gojące się rany.

Abstract

The aim of the research was to obtain and characterize biomaterials based on collagen, which was a matrix for incorporation of active compounds - natural origin phenols.

During this work, screening tests of phenolic compounds and their mixtures were performed to determine their biocidal properties. Thymol, carvacrol and their mixture 1:1 showed the strongest inhibitory properties of microbial growth. These phenols were introduced into type I collagen matrices. Materials were obtained during solvent evaporation method. The interdisciplinary character of this work based on characterizing the physicochemical and bactericidal properties of the materials.

Bactericidal properties of the obtained materials were characterized according to ISO 22196 standard. The influence of prepared materials on the activity of electron transport chain and on the amount of ATP synthesized by bacterial cells was also investigated. The antibiofilm properties of materials were investigated based on SEM photos. The biocompatibility of the materials was evaluated in relation to erythrocytes.

The chemical structure of collagen as well as the interaction between collagen and phenols were confirmed by attenuated total reflection infrared spectroscopy (ATR-FTIR). The influence of phenols on the surface structure was analyzed based on AFM images. Their influence on surface wettability and surface free energy of materials was also determined. Enzymatic degradation and degradation in PBS buffer allowed to determine the weight loss of materials in *in vitro* conditions. The release of active compounds from the matrices was also determined. Moreover, the antioxidant properties of the obtained materials were tested as well as gases permeability through materials.

The results indicate that phenols can be used as bactericidal active compounds and collagen materials with their addition can be obtained by solvent evaporation method. The data obtained during this research allowed to select the optimal composition of the material, which could potentially be used as a dressing material for hard to heal wounds.

1. AKTUALNY STAN WIEDZY

1.1. Antybiotykooporność

Wzrost oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (eng. *antimicrobial resistance* AMR) ma znaczący wpływ na zdrowie społeczeństwa, rozwój globalny a nawet na gospodarkę światową (Padiyara i wsp. 2018). Do roku 2016 około 700 000 zgonów rocznie na całym świecie było wynikiem infekcji powodowanych przez mikroorganizmy odporne na środki przeciwdrobnoustrojowe. Szacuje się, że do roku 2050 liczba ta osiągnie 10 milionów zgonów każdego roku, jeśli problem oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe nie zostanie rozwiązany (O'Neill, 2016). Ponadto ciągły wzrost oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe jest przyczyną dłuższych pobyków w szpitalach i kosztownej intensywnej opieki. Powoduje to i w dalszym ciągu będzie powodować znaczne obciążenie finansowe (Tavoukjian 2019).

Nieprawidłowe stosowanie i nadużywanie antybiotyków, bez identyfikacji czynnika etiologicznego jest przyczyną narastania lekooporności (Jabłoński i wsp. 2010). Zdolność bakterii do nabywania antybiotykooporności zależy od ich możliwości dostosowywania się do selekcyjnej presji. Jednym z mechanizmów nabywania antybiotykooporności jest posiadanie przez bakterie pomp efluksowych, dzięki którym antybiotyk wydalany jest z komórki. Inny mechanizm stanowią zmiany w składzie i funkcji błony komórkowej, które powodują jej zredukowaną przepuszczalność. Kolejnym jest inaktywacja antybiotyku przez enzymy zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe. Dostosowywanie się komórek bakteryjnych może polegać na redukcji substratu stanowiącego cel działania antybiotyku lub mutacje bakterii (Truszczyński i wsp. 2013).

Istnieją dwa typy antybiotykooporności. Pierwszym jest antybiotykooporność naturalna, wynikająca z biologii komórki, jej cech strukturalnych lub funkcjonalnych (Li i Webster, 2018). Drugim typem jest antybiotykooporność nabyta. Powstaje na przykład na skutek mutacji chromosomalnych lub w wyniku transferu materiału genetycznego z innej bakterii za pośrednictwem plazmidów (Chellat i wsp. 2016). Przekazywanie genów przy

pomocy plazmidów zachodzi na drodze koniugacji, transdukcji i transformacji lub przy pomocy fimbrii zwanych pilami (Hershberg, 2017). W procesie transdukcji, geny kodujące oporność przekazywane są z komórki bakterii odpornej do wrażliwej. Komórki wrażliwe na antybiotyki mogą pobierać materiał genetyczny, który został uwolniony na skutek autolizy komórek opornych – proces ten nazywany jest transformacją (Sieber i wsp. 2017; Truszczyński i wsp. 2013).

W 1987 roku Gristina sformułowała wyrażenie wyścig o powierzchnię (“race for the surface”) aby opisać współzawodnictwo o kolonizację powierzchni między komórkami somatycznymi a bakteriami (Gristina, 1987). Komórki bakteryjne mają przewagę w tym wyścigu ze względu na zdolność kolonizowania powierzchni zarówno biotycznych jak i abiotycznych (Shah i wsp. 2013). Otwarta rana stanowi niszę sprzyjającą zasiedlaniu przez drobnoustroje. W większości rany zakażone są kilkoma rodzajami drobnoustrojów, szczególnie przedostającymi się tam ze środowiska zewnętrznego i mikrobiomu pacjenta (Sarheed i wsp. 2016).

Drobnoustroje przedłużają czas gojenia rany, pozostawiając obszar dotknięty zakażeniem w stanie zapalnym przez dłuższy czas. W początkowych stadiach ran przewlekłych dominują organizmy Gram dodatnie, w szczególności *Staphylococcus aureus*. W późniejszych stadiach obserwuje się Gram ujemne *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*, które mają tendencję do zakażeń głębszych warstw skóry, powodując znaczne uszkodzenie tkanek (Simões i wsp. 2018).

Staphylococcus aureus odpowiedzialny jest za największy odsetek zakażeń szpitalnych (Alharbi, 2020). Na początku lat 60. XX w. po raz pierwszy opisano *S. aureus* opornego na metycylinę (MRSA). Oporność *S. aureus* na ten antybiotyk rozwinęła się, przez mutację genu *mecA*, który koduje białko wiążące penicylinę PBP2a (Nicholas i wsp. 2010). *S. aureus* kolonizuje 20-30% populacji ludzkiej, podczas gdy MRSA-1,5%. Ryzyko kolonizacji MRSA jest większe u pacjentów hospitalizowanych, przebywających na oddziałach intensywnej terapii, dializowanych, z zakażeniami ran i tkanek miękkich oraz zakażonych wirusem HIV (Lohr i wsp. 2017). W szpitalach w Stanach Zjednoczonych *S. aureus* stanowi 52% izolowanych gronkowców, z czego 30% stanowią MRSA (Nicholas

i wsp. 2010). Ponadto znaczny odsetek zakażeń szpitalnych powodowanych jest przez enterokoki odporne na wankomycynę (VRE) i odporne na antybiotyki β -laktamowe bakterie Gram ujemne (Chellat i wsp. 2016).

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) w 2011 roku uruchomiła program pt. „Przeciwno lekooporności: brak działań dzisiaj, brak leków jutro” (Zhang i wsp. 2019a). W odpowiedzi na światowej skali problem antybiotykooporności, szuka się nowych związków przeciwdrobnoustrojowych, które mogą stanowić alternatywę względem antybiotyków.

1.2. Proces gojenia ran

Skóra jest największym i najbardziej zewnętrznym organem pokrywającym całe ciało. Jej powierzchnia u dorosłego człowieka wynosi 1,5 – 2 m² a jej masa wraz z tkanką podskórną może dochodzić do 20 kg (Sybilski, 2012). Zbudowana jest z trzech warstw: naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej. W skórze właściwej i tkance podskórnej rozmieszczone są przydatki tj. mieszki włosowe, gruczoły potowe, łojowe oraz naczynia krwionośne, limfatyczne i zakończenia nerwowe (Jurzak i wsp. 2012). Jej podstawową funkcją jest ochrona znajdujących się pod nią mięśni, więzadeł, kości i narządów wewnętrznych przed fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi czynnikami zewnętrznymi (Simões i wsp. 2018). Warstwa rogową skóry zapobiega dehydratacji a zwężanie i rozszerzanie naczyń krwionośnych umożliwia termoregulację. Skóra odpowiedzialna jest także za syntezę witaminy D, hormonów i melaniny (Reichrath i wsp. 2017). Skóra ludzka jest skolonizowana przez mikroorganizmy, nazywane mikrobiomem skóry, który zazwyczaj spełnia funkcję ochronną, konkurując z patogenami o miejsce i pokarm (Gliński i Kostro, 2015). Zaburzenia w mikrobiomie mogą przyczyniać się do patogenezы chorób skóry np. trądziku pospolitego, łuszczycy i egzemy (Lai-Cheong i McGrath, 2017).

Zdrowa i prawidłowo funkcjonująca skóra uczestniczy w zachowaniu homeostazy, natomiast jej uszkodzenie powoduje utratę naturalnej ochrony (Hu i wsp. 2019). Do przerwania ciągłości skóry może dochodzić m.in. poprzez

skaleczenia, otarcia, oparzenia, nacięcia chirurgiczne czy występujące jednostki chorobowe (Paul i wsp. 2015). By zachować homeostazę i zmniejszyć ryzyko zakażenia, proces gojenia rany rozpoczyna się bezpośrednio po urazie. Opóźnienie procesu gojenia może wiązać się z powstawaniem ciężkich obrzęków i przewlekłych wrzodów (Simões i wsp. 2018). Gojenie rany zachodzi w trzech, nakładających się na siebie etapach: zapalenia, proliferacji i przebudowy (Otterço i wsp. 2018). Faza zapalna obejmuje reakcje naczyniowe, charakteryzujące się krzepnięciem krwi, dochodzi do oczyszczania rany z drobnoustrojów oraz uwalniania cytokin, które inicjują odpowiedź proliferacyjną na naprawę rany (Li i wsp. 2007). Faza proliferacji występuje między 4 a 21 dniem, dochodzi w niej do angiogenezy (tworzenie naczyń krwionośnych), tworzenia macierzy pozakomórkowej (ECM) i epitelializacji (regeneracji uszkodzonego naskórka). Tkanka ziarninowa rozrasta się od brzegu rany, stopniowo wypełniając ubytek, warstwa płynu surowiczo-włóknikowego i leukocytów zapobiega wtórnym zakażeniom. Faza przebudowy, w zależności od wielkości i głębokości rany, rozpoczyna się około 3 tygodni do roku po urazie. Powierzchnia rany ulega obkurczeniu i zmniejszeniu, ta faza charakteryzuje się przebudową włókien kolagenowych (Childs i Murthy, 2017). W efekcie rana pokryta zostaje cienką warstwą nabłonka a następnie naskórka. Powstająca tkanka bliznowata jest bledsza i twardsza od otaczającej skóry, ze względu na większą ilość włókien ulegającym zmianom szklistym i mniejszej ilości naczyń krwionośnych (Karpiński i wsp. 2015).

Istnieje wiele czynników, które mogą upośledzać proces gojenia, należą do nich m.in. infekcje mikrobiologiczne. Leczenie zmian skórnych (np. ran, owrzodzeń i oparzeń) wymaga zastosowania opatrunków, które zapobiegają infekcjom, wspomogą proces gojenia, zminimalizują powstałą bliznę oraz zmniejszą odczuwany przez pacjenta ból i dyskomfort (Miguel i wsp. 2019).

1.3. Materiały opatrunkowe

Udokumentowana historia materiałów opatrunkowych i pielęgnacji ran sięga czasów prehistorycznych, kiedy to już 2600 lat p.n.e. Egipcjanie wykorzystywali miód, tłuszcz zwierzęcy i włókna roślinne do opatrywania ran. Włókna roślinne wspomagały drenaż rany a miód i tłuszcz zwierzęcy zapobiegały infekcjom i przedostawaniu się drobnoustrojów do jej wnętrza (Ficms, 2017). Do pielęgnacji ran wykorzystywali również minerały tj. chryzokola i malachit, posiadające właściwości ściągające i antyseptyczne (Forrest, 1982). Na 2200 r p.n.e. datowana jest gliniana tabliczka stanowiąca prawdopodobnie jeden z pierwszych manuskryptów medycznych, opisującej „trzy gesty uzdrawiające - mycie ran, stosowanie plastrów i bandażowanie”. Ówczesne plastry były mieszaninami glinki, roślin i ziół, miały za zadanie absorbować wydzieliny i chronić ranę przed czynnikami zewnętrznymi (Shah, 2011).

Starożytni Grecy podkreślali znaczenie czystości rany, zalecali jej przemywanie przegotowaną wcześniej wodą, octem (kwasem octowym) i winem (Forrest, 1982). Natomiast Hipokrates wprowadził koncept utrzymywania suchego środowiska rany, które miało wspomagać jej gojenie. Technika ta stosowana była do XIX wieku znajdując zarówno zwolenników jak i przeciwników (Mouès i wsp. 2009). *De Medicina* była pierwszym medycznym skrypcem, napisanym przez Celsus'a, gdzie opisano podstawowe objawy infekcji - zaczerwienienie, obrzęk, gorączka i ból (Broughton i wsp. 2006).

Obserwacja ran ponoszonych przez żołnierzy, również przyczyniła się do rozwinięcia metod ich leczenia. Początkowo, rany postrzałowe były wyżarzane lub zalewane gorącym olejem. Ambroise Parè, zaobserwował, że lepszy skutek przynosi aplikacja mieszaniny z żółtka, oleju rózanego i terpentyny, zmniejszając obrzęk, gorączkę i ból (Broughton i wsp. 2006). Ponadto, zauważył, że larwy rozwijające się w ranach, zjadają tkankę martwiczą - oczyszczając ranę i przyśpieszając jej leczenie. Niestety, mimo innowacyjnego jak na tamte czasy podejścia, jego metody nie znalazły uznania wśród innych chirurgów i tradycyjne

podejście do tego typu urazów było kontynuowane (Mouès i wsp. 2009; Shah, 2011; Cohen, 2007).

Przełom w opatrywaniu ran nastąpił dzięki wprowadzeniu technik antyseptycznych, zaczęto stosować antybiotyki aby kontrolować infekcje i zmniejszyć śmiertelność wśród chorych (Dhivya i wsp. 2015). Przyczyniły się do tego badania mikrobiologiczne prowadzone przez Jamesa Young Simpsona i Louisa Pasteura (Sabbatani i wsp. 2014). Joseph Lister korzystając z ich odkryć wprowadził kwas karbolowy jako środek do odkażania ran, zmniejszając tym samym ilość amputacji wynikających z rozprzestrzeniania się infekcji (Sabbatani i wsp. 2014).

W XIX-XX wieku koncepcja opatrywania ran opierała się na dwóch zasadach. Ranę należało przykryć i utrzymać ją suchą. Opatrunki na rany promujące jej suche środowisko, stały się podstawą opieki. Materiały opatrunkowe obejmowały głównie waty, naturalne i syntetyczne gazy oraz bandaże, miały charakter pasywny i nie usprawniały naturalnego procesu gojenia (Szycher i Lee, 1992).

Badania naukowe prowadzone przez Wintera w latach 60. XX wieku pokazały, że wilgotne środowisko rany, sprzyja szybszej regeneracji rany i jej reepitelizacji. Badania były przeprowadzone względem ran ostrych, jednak zalecenia dotyczące zapewnienia wilgotnego środowiska rany, rozszerzono do wszystkich ich typów (Vowden i Vowden, 2017). W rezultacie podejście do projektowania opatrunków uległo zmianie a idealny materiał opatrunkowy spełnić musi szereg stawianych mu wymagań.

Obecnie uważa się, że materiały opatrunkowe powinny usuwać nadmiar wysięków i zapewniać wilgotne środowisko rany, zapewniać wymianę gazową m.in. tlenu i pary wodnej. Powinny być elastyczne, tak by ich aplikacja była komfortowa i nie uszkadzała materiału opatrunkowego. Ponadto nie mogą przywierać do rany a ich usuwanie nie może jej naruszać, by nie powodować wtórnego urazu, dodatkowego bólu i dyskomfortu. Materiały opatrunkowe, jak i produkty ich degradacji powinny być biokompatybilne z tkankami. Dodatkowo materiał powinien zapewniać mechaniczną ochronę przed zabrudzeniami i drobnoustrojami (Hu i wsp. 2019; Farokhi i wsp. 2018).

Materiały opatrunkowe możemy podzielić na trzy kategorie. Pierwotne, bezpośrednio przylegające w miejscu rany, wtórne - pokrywające opatrunek pierwotny. Trzecią kategorię stanowią materiały wyspowe, zawierające centralny obszar chłonny otoczony samoprzylepną częścią (Fahimirad i Ajalloueian, 2019). W ostatnich latach, wiele uwagi poświęcono opracowaniu nowatorskich opatrunków, o zwiększonej wydajności, przyspieszających regenerację skóry i promowaniu gojenia ran. Materiały opatrunkowe nowej generacji w swoim składzie mogą zawierać również składnik aktywny np. żywe komórki, czynniki wzrostu czy związki przeciwdrobnoustrojowe (Gorczyca i Tylingo, 2011a).

1.4. Polimery stosowane w materiałach opatrunkowych

Nowoczesne materiały opatrunkowe występują w różnych formach m.in. nanowłókien, materiałów porowatych, membran czy hydrożeli (Jatoi i wsp. 2019; Kamoun i wsp. 2017; Ghosal i wsp. 2019; Koehler i wsp. 2018). Do ich produkcji wykorzystuje się zarówno polimery naturalne jak i syntetyczne.

Materiały wykonane z polimerów syntetycznych charakteryzują się dobrymi właściwościami mechanicznymi, stabilnością termiczną oraz odpowiednim czasem degradacji (Miguel i wsp. 2018). Jednak ich hydrofobowy charakter (np. polikaprolakton, kwas poliglikolowy) oraz brak grup aminowych na powierzchni materiałów, negatywnie wpływa na adhezję i proliferację komórek somatycznych (Tallawi i wsp. 2015).

Z kolei polimery naturalne wykazują biokompatybilność, nietoksyczność i biodegradowalność (Sionkowska, 2011), niestety często ich wykorzystanie jest kosztowne, a właściwości zależą od metody ich otrzymywania. Materiały z nich wykonane często wykazują słabe właściwości mechaniczne i degradują zbyt szybko (Tallawi i wsp. 2015).

Obiecującą strategią jest więc mieszanie polimerów naturalnych i syntetycznych w celu uzyskania materiału o nowych właściwościach. Podejście takie łączy ze sobą trwałość i wytrzymałość polimerów syntetycznych i biokompatybilność oraz bioaktywność naturalnych (Miguel i wsp. 2018).

1.4.1. Poli(alkohol winylowy)

Poli(alkohol winylowy) (PVA) jest syntetycznym, niejonowym polimerem, rozpuszczalnym w wodzie (Lewandowska, 2012). Otrzymywany jest w wyniku hydrolizy polimerycznego estru – poli(octanu winylu), syntezowanego w reakcji polimeryzacji octanu winylu, uzyskiwanego z acetyleny i kwasu octowego (acylowanie alkinu) (Teodorescu i wsp. 2019). Właściwości PVA zależą głównie od jego masy cząsteczkowej oraz stopnia hydrolizy. Stosowany jest w przemyśle medycznym jako nietoksyczny, niekancerogenny i biokompatybilny materiał.

Przygotowywany materiał może być dostosowywany do pożądanego kształtu i rozmiaru, może również występować w wielu formach tj. włókna, gąbki i filmy stosowane w inżynierii tkankowej skóry. Wykorzystywany jest także w leczeniu ran cukrzycowych i jako matryca do kontrolowanego uwalniania leków (Joorabloo i wsp. 2019). Jest hydrofilowy i może pochłaniać dużą ilość wody, dlatego stosowany jest najczęściej w produkcji materiałów hydrożelowych (Sikka i Midha, 2019). Dzięki tej właściwości, jako materiał opatrunkowy, jest w stanie zapewnić wilgotne środowisko rany a także pochłaniać jej wysięki. Materiały z PVA są przepuszczalne dla tlenu oraz przezroczyste co jest dodatkowym ich atutem w leczeniu ran (Tavakoli i Tang, 2017). Wysięki z ran zawierają składniki odżywcze i zapewniają odpowiednie warunki dla rozwoju bakterii, dlatego materiały z PVA wzbogacane są w środki przeciwbakteryjne (Jatoi i wsp. 2019). Często PVA mieszany jest z innymi polimerami w celu uzyskania nowych, lepszych właściwości lub materiał poddawany jest sieciowaniu.

Ardekani i wsp. (2019) wykonali elektroprzędzone maty z nanowłókien poli(alkoholu) winylowego, wzbogacone w olejek eteryczny z *Zataria multiflora*. Materiał ten hamował wzrost drobnoustrojów patogennych takich jak *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *Candida albicans*. Ponadto, autorzy nie stwierdzili toksycznego działania wobec mysich fibroblastów (L929) w warunkach *in vitro*, sugerując potencjalne użycie takich materiałów jako opatrunków na oparzenia. PVA może być również wzbogacany w nanocząstki metali jako środki przeciwdrobnoustrojowe. Nanocząstki tlenku cynku (nZnO) w materiałach hydrożelowych z PVA hamowały wzrost *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans* (Raafat

i wsp. 2018). Khorasani i wsp. (2018) wykorzystali nZnO w połączeniu z chitozanem i PVA, takie hydrożele hamowały rozwój patogenów. Ponadto zaobserwowano ich pozytywny wpływ na właściwości fizykochemiczne tj. przepuszczalność pary wodnej, pęcznienie i porowatość. Jatoi i wsp. (2019) przygotowali nanocząstki srebra unieruchomione na nanorurkach węglowych, osadzonych na nanowłóknach PVA, takie rozwiązanie pozwoliło na otrzymanie materiału o przedłużonym działaniu antybakteryjnym, zmniejszając koszty związane z częstą aplikacją dodatkowo zwiększając komfort leczonych pacjentów. Materiały opatrunkowe na bazie PVA były również wzbogacane w tygecyklinę (antybiotyk glicylocyklinowy) czy serycynę (pozostałość po produkcji jedwabiu), dzięki czemu materiał zyskał właściwości antybakteryjne jak i przyspieszał proces leczenia w warunkach *in vivo* (Chao i wsp. 2018).

Czasami nadanie właściwości biobójczych materiałom z PVA nie wystarcza, by mogły być z sukcesem wykorzystane w przemyśle medycznym. Ich hydrofilowość wpływa na ich małą stabilność w wilgotnych warunkach, często materiały z PVA nie mają odpowiednich właściwości mechanicznych, dlatego też stosuje się ich sieciowanie, zarówno metodami fizycznymi jak i chemicznymi (Kumar i wsp. 2019).

Jedną z prostych, skutecznych i przyjaznych dla środowiska metod sieciowania chemicznego materiałów z PVA jest użycie kwasu cytrynowego. Nanowłókna na bazie alginianu i PVA, sieciowane tym kwasem, były bardziej stabilne w wodzie i płynie imitującym płyn ustrojowy a także wykazywały lepszą termostabilność w stosunku do nanowłókien niesieciowanych (Stone i wsp. 2013). Aldehyd glutarowy i alginian sodu, wykorzystywane do sieciowania PVA zwiększały termostabilność elektroprzędzonych włókien PVA. Fibroblasty 3T3 hodowane na tych włóknach, miały odpowiednią żywotność a także proliferowały w czasie (Yang i wsp. 2016).

W celu modyfikacji właściwości polimerów, również czynniki fizyczne takie jak zmiany temperatur i promieniowanie gamma, mogą zostać wykorzystane jako crosslinkery. Syntezę hydrożeli przez napromienianie wodnych roztworów

polimerów promieniowaniem gamma uznano za łatwą i odpowiednią metodę projektowania czystych, sterylnych, wolnych od dodatków chemicznych opatrunków hydrożelowych - również w stosunku do hydrożeli PVA. Stopień usieciowania polimeru można kontrolować zmieniając warunki napromieniowania (Singh i wsp. 2017).

Technika freeze-thaw (zamrażać - rozmrażać) to kolejna fizyczna metoda sieciowania stosowana do modyfikacji materiałów hydrożelowych na bazie PVA. Polega na kilkukrotnym wykonaniu cykli zamrażania i rozmrażania powodujących krystalizację i wytworzenie struktury hydrożelu. Właściwości fizyczne otrzymanego materiału, będą zależą od ilości wykonanych cykli (Kamoun i wsp. 2015). Pomimo wielu zalet PVA jak i metod jego modyfikacji, z powodu braku składników bioaktywnych PVA odporne jest na wchłanianie białka i adhezję komórek (Kim i wsp. 2018).

1.4.2. Poli(ϵ -kaprolakton)

Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) jest niepolarnym poliestrem alifatycznym, otrzymywanym w wyniku polimeryzacji ϵ -kaprolaktonu. W organizmie ulega powolnej i stopniowej degradacji. Jest hydrolizowany do kwasu 6-hydroksykapronowego, który w cyklu kwasu cytrynowego jest metabolizowany, a następnie wydalany z organizmu (Kruk i wsp. 2017). Dlatego, materiały na bazie PCL wykorzystywane są do celów biomedycznych i farmaceutycznych. Nanowłókna PCL mogą naśladować działanie włókien kolagenowych w macierzy zewnątrzkomórkowej, dzięki czemu otrzymywane elektroprzędzone włókna o wielkości nanometrów mogą stanowić rusztowanie, które można wykorzystać jako tymczasową sztuczną macierz zewnątrzkomórkową (Croisier i wsp. 2012).

Elektroprzędzone membrany z PCL w postaci nanowłókien posiadają odpowiednie właściwości, które sprzyjać będą procesowi gojenia ran. Charakteryzuje je wysoka porowatość, która umożliwia wymianę gazową, zapewnia dostęp tlenu do oddychania komórek, jak również wchłaniania pojawiający się wysięk (Sundaramurthi i wsp. 2014). Poza tym, elektroprzędzone włókna PCL mają doskonałe właściwości mechaniczne i fizyczne, a także są elastyczne, co sprawia,

że opatrunek przylega w miejscu rany, mimo ruchu części ciała pacjenta i służy jako bariera ochronna przed czynnikami zewnętrznymi. Ponadto, wykorzystanie procesu elektroprzędzenia do przygotowania materiałów PCL, ułatwia wprowadzenie leków i innych substancji czynnych (Thanh i wsp. 2018).

Pomimo wielu zalet, elektroprzędzone rusztowania na bazie PCL mają również wady, wpływające na proces gojenia ran. W szczególności, porowata struktura materiału ma tendencję do silnego przylegania do powierzchni rany z powodu pochłaniania wilgoci, a puste pory zapewniają środowisko ułatwiające infiltrację i migrację komórek do membrany, powodując uszkodzenie nowo utworzonej tkanki, gdy opatrunek jest usuwany, opóźniając tym samym proces gojenia tkanki (Thanh i wsp. 2018).

W celu zapewnienia lepszych właściwości materiałów PCL, stosuje się ich modyfikacje m.in. łącząc kilka komponentów matrycy. Łatwiejszy w usuwaniu opatrunek otrzymano w wyniku zmieszania PCL, żelatyny i chlorku trimetoksylilopropylu oktadecylodimetyloamoniowego (QAS; nazwa komercyjna: DOW CORNING® 5700 antimicrobial agent). Otrzymano membranę o przedłużonym uwalnianiu środka bakteriostatycznego działającego wobec *S. aureus* i *P. aeruginosa* i niewielkiej cytotoksyczności (Shi i wsp. 2018). Wbudowanie rozproszonego w matrycy PCL nanodiamentu, poprawia właściwości biologiczne matrycy, zwiększając proliferację komórek nabłonka, przy jednoczesnym ograniczeniu aktywności drobnoustrojów. Włączenie nanodiamentu do matrycy PCL, spowodowało lepsze zarządzanie wilgocią i wyższą stabilność termiczną (Houshyar i wsp. 2019). Maty wykonane z PCL, chitozanu i kwasu kawowego, powodowały lepszą adhezję fibroblastów ludzkich a następnie ich proliferację w stosunku do materiału wykonanego wyłącznie z PCL. Ponadto, trójskładnikowe kompozyty były bakteriobójcze wobec *S. aureus* (Oh i wsp. 2016). Membrany wykonane z nanowłókien PCL zostały także wzbogacane w nanochitozan (NC), w celu uzyskania materiału do kontrolowanego uwalniania składnika aktywnego, w tym przypadku kurkuminy. Włączenie nanochitozanu do mat PCL zwiększało ich hydrofilowość, pochłanianie PBSu i przepuszczalność

pary wodnej. Testy hemolizy i koagulacji krwi potwierdziły hemokompatybilność materiału. NC nadał również odpowiednią aktywność przeciwbakteryjną i biokompatybilność, dzięki czemu otrzymano materiał o obiecujących właściwościach jako opatrunek (Reshmi i wsp. 2018).

Niewątpliwą zaletą PCL jest możliwość wykorzystania go w produkcji materiałów opatrunkowych metodą drukowania 3D z równoczesnym wbudowaniem do matrycy nanocząstek metali o charakterze bakteriobójczym. To nowatorskie podejście umożliwia drukowanie 3D spersonalizowanych materiałów opatrunkowych. Dodatkowo, materiały wzbogacone w nanocząstki miedzi i srebra, wykazały działanie biobójcze wobec *S. aureus*. Wykorzystanie druku 3D w projektowaniu materiałów z PCL pozwala na otrzymanie opatrunku dostosowanego indywidualnie do pacjenta pod względem kształtu, rozmiaru i środka biobójczego (Muwaffak i wsp. 2017).

1.4.3. Chitozan

Chitozan (CS) jest naturalnym liniowym polisacharydem zbudowanym z dwóch powtarzających się jednostek, D-glukozaminy i N-acetyloglukozaminy, połączonych wiązaniami β - (1 \rightarrow 4) glikozydowymi. Otrzymywany jest w wyniku deacetylacji chityny, która jest drugim pod względem dostępności, naturalnie występującym polisacharydem. Chitynę można ekstrahować z egzoszkieletu skorupiaków, kalmarów lub ścian grzybów (Biranje i wsp. 2019). W 1970 roku odkryto, że przyspiesza zasklepienie ran, dlatego chitozan i jego pochodne stosowane są w produkcji materiałów opatrunkowych od lat 80. XX wieku, kiedy to na rynek trafił opatrunek Beschitin® (Patrulea i wsp. 2015). Jednakże zastosowanie chitozanu nie ogranicza się wyłącznie do przemysłu medycznego, z powodzeniem stosuje się go w oczyszczaniu ścieków, filtracji powietrza czy w przemyśle spożywczym i kosmetycznym (Dimassi i wsp. 2018).

Właściwości chitozanu, takie jak rozpuszczalność, krystaliczność, biodegradowalność, lepkość i biokompatybilność, związane są ze stopniem deacetylacji (DD) i masą cząsteczkową (MW). DD chitozanu to stosunek D-glukozaminy do sumy D-glukozaminy i N-acetylo-D-glukozaminy. Polimer ten,

by nazwać go chitozanem musi mieć stopień deacetylacji wyższy niż 60% (Croisier i Jérôme, 2013). Chitozan spełnia szereg wymagań stawianych polimerom, które wykorzystywane są do produkcji materiałów opatrunkowych. Chitozan stanowić może tani surowiec, który posiada odpowiednie właściwości mechaniczne, jest stabilny termicznie i ma zdolność do tworzenia filmu (Avcu i wsp. 2019). Pomimo właściwości przeciwdrobnoustrojowych, materiały chitozanowe wzbogacone są w biobójcze czynniki aktywne. Filmy chitozanowe wzbogacone w olejek z *Hypericum perforatum* (Dziurawiec zwyczajny) wykazywały lepsze działanie hamujące wzrost *S. aureus* i *E. coli*, nie hamując wzrostu fibroblastów (NIH3T3) (Güneş i Tihminlioğlu, 2017). Gritsch i wsp. (2018) nie obserwowali działania hamującego wzrost drobnoustrojów dla materiału chitozanowego, jednak wprowadzenie do matrycy cząstek miedzi, powodowało zahamowanie wzrostu, testowanych bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych. Filmy chitozanowe lepiej hamowały wzrost *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans*, kiedy zostały wzbogacone sproszkowaną skórką banana (Kamel i wsp. 2017). Natomiast, chitozanowe cząsteczki aerożelu, nie wykazywały działania hamującego wzrostu *S. aureus*, jednak wprowadzenie do nich wankomycyny, spowodowało zahamowanie wzrostu tego patogenu po 48h ekspozycji (López-Iglesias i wsp. 2019).

Chitozan może depolimeryzować, uwalniając N-acetylo- β -D-glukozaminę, która inicjuje proliferację fibroblastów podczas procesu gojenia się ran. Monomery chitozanu pomagają w uporządkowanym odkładaniu się kolagenu i stymulują zwiększony poziom naturalnej syntezy kwasu hialuronowego w miejscu rany. Ponadto ten biopolimer zapewnia matrycę do regeneracji tkanek skóry i aktywuje makrofagi w celu zatrzymania nieprawidłowej aktywności wzrostu tkanki. Pomaga to w szybszym gojeniu ran o pełnej grubości i zapobiega powstawaniu blizny (Bano i wsp. 2017).

Chitozan ceniony jest w przemyśle medycznym również dzięki swoim właściwościom hemostatycznym. Powoduje zatrzymanie krwawienia, co uznaje się za pierwszy etap gojenia ran. Prawdopodobnie, związane jest to z obecnością

pozytywnie naładowanych grup aminowych, które oddziałują z negatywnie naładowanymi błonami erytrocytów (Bano i wsp. 2017). Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration; FDA) zatwierdziła opaski hemostatyczne oparte na chitozanie do zastosowań militarnych po tym jak badania prowadzone na zwierzętach, wykazały, że były one równie skuteczne jak gaza bojowa (Khan i Mujahid, 2019). Opatrunki chitozanowe HemCom testowane podczas udzielania pomocy przedszpitalnej 64 żołnierzom, w 97% przypadków zahamowały krwawienie i poprawiły hemostazę. Lekarze biorący udział w testach, potwierdzili ich skuteczność, niestety zauważyli trudność w nakładaniu takich opatrunków na kończyny dolne (Wedmore i wsp. 2006). Materiały te nie są elastyczne, przez co utrudnione jest ich stosowanie w miejscach trudnodostępnych np. w pachwinach (Khan i Mujahid, 2019).

1.4.4. Celuloza bakteryjna

Celuloza jest polimerem najczęściej występującym w przyrodzie, chociaż głównie pochodzi z roślin, niektóre mikroorganizmy takie jak glony, grzyby i bakterie również mogą ją syntetyzować (Lin i wsp. 2013). Celuloza bakteryjna (CB) może być wytwarzana przez wiele gatunków bakterii, jednak tylko *Gluconacetobacter xylinus* jest w stanie syntetyzować przemysłowe ilości tego polimeru (Fijałkowski i wsp. 2016). Zarówno celuloza bakteryjna jak i roślinna zbudowane są z reszt β -D- glukopiranozowych połączonych wiązaniem β -1-4- glikozydowym, tworząc liniowy, nierozgałęziony polisacharyd. Celuloza bakteryjna posiada różne zalety w stosunku do celulozy roślinnej m.in. wysoką czystość, dobrze zorganizowaną nanowłóknistą strukturę sieci, wysoką porowatość z włóknami w rozmiarze nanometrów, znacznie cieńszymi niż w przypadku celulozy roślinnej (Ye i wsp. 2019).

Celuloza bakteryjna ze względu na swoje właściwości wykorzystywana jest w przemyśle medycznym. Szeroko stosowana jest w chirurgii rekonstrukcyjnej m.in. jako sztuczne chrząstki, naczynia krwionośne i tymczasowe implanty kostne (Niyazbekova i wsp. 2018; Torgbo i Sukyai, 2018). Materiał z CB pozwala na dostęp tlenu do ran, leczy i zapobiega powstawaniu blizn, zmniejsza również ból,

chroni skórę przed różnymi infekcjami i nie powoduje utraty płynów ustrojowych. Dlatego, może być używany jako sztuczna skóra w leczeniu owrzodzeń i poparzeń (Niyazbekova i wsp. 2018). Celuloza bakteryjna, używana jest do produkcji materiałów opatrunkowych ze względu na swoją wysoką wytrzymałość na rozciąganie, elastyczność i zdolność do zatrzymywania wody. Materiały celulozowe są przepuszczalne dla gazów a także nie wykazują działania cytotoksycznego wobec komórek somatycznych (Czaja i wsp. 2006).

Wysoka porowatość tego polimeru, pozwala na wprowadzenie do matrycy, środków przeciwdrobnoustrojowych, leków i innych materiałów biofunkcyjnych (Shah i wsp. 2013). Obecność chemicznie reaktywnych miejsc w jej strukturze, zapewnia dodatkową możliwość wprowadzenia specyficznych nienatywnych funkcji. Reaktywność chemiczna łańcucha polimeru może przyczynić się do powstania nowych materiałów opatrunkowych o ulepszonych właściwościach do leczenia każdego typu rany (Sulaeva i wsp. 2015).

Tabaï i Emtiazi (2018) otrzymali transparentny materiał na bazie celulozy bakteryjnej z nanocząstkami srebra, powstałymi w wyniku redukcji azotanu srebra w obecności tripolifosforanu sodu. Powstały materiał redukował liczebność *E. coli* i *S. aureus* o 100% i 99%, odpowiednio. Kontrolowane uwalnianie jonów srebra z matrycy CB, nie było cytotoksyczne wobec komórek jednojądrzastych krwi obwodowej. Hydrożele z CB wzbogacone w tymol, hamowały wzrost patogenów i wspomagały szybsze zasklepienie ran po oparzeniach trzeciego stopnia (Jiji i wsp. 2019). Innymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi wprowadzanymi w matrycę CB są antybiotyki np. kwas fusydowy (Liyaskina i wsp. 2017), tetracyklina (Shao i wsp. 2016) i amoksycylina (Ye i wsp. 2018). Celuloza bakteryjna była również wzbogacona w sól srebrową sulfadiazyny, która często aplikowana jest w postaci maści na oparzenia. Taki kompozyt, wykazywał działanie biobójcze, przy zachowaniu biokompatybilności. Zastosowanie matrycy CB jako nośnika związku aktywnego, niwelowało cytotoksyczny wpływ na fibroblasty i keratynocyty, dzięki jego kontrolowanemu uwalnianiu (Shao i wsp. 2019). Nie tylko środki przeciwdrobnoustrojowe stosowane są jako środek

aktywny w tych matrycach. Często spotykane są leki przeciwbólowe tj. ibuprofen, lidokaina (Trovatti i wsp. 2012) i diklofenak (Silva i wsp. 2014), ale także wspomagające gojenie ran królicze mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (Silva i wsp. 2018) czy wspomagające produkcję kolagenu – argininę (Qiao i wsp. 2018) i serycynę jedwabiu (Napavichayanun i wsp. 2015).

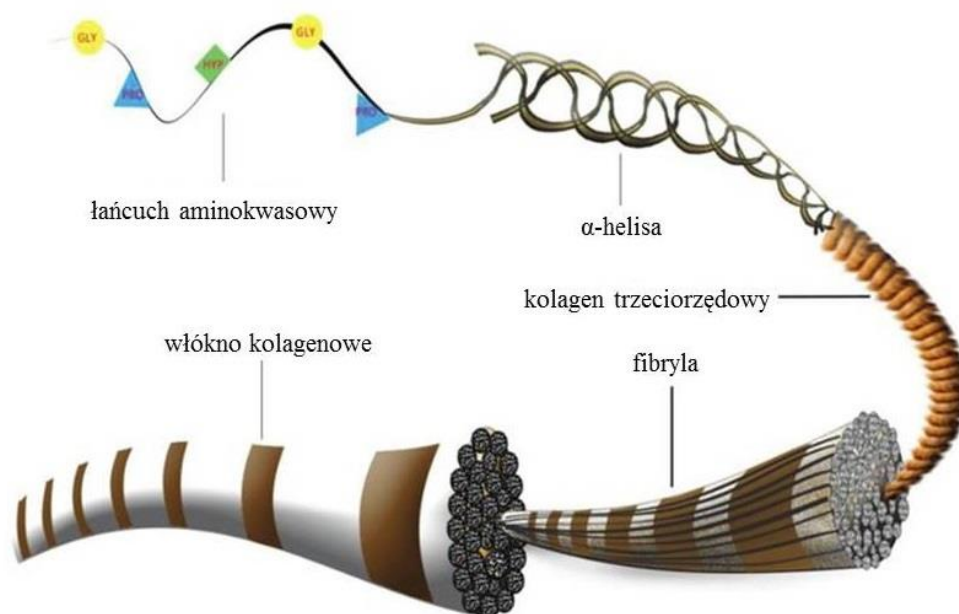
Początkowo otrzymywanie celulozy bakteryjnej wiązało się z dużym nakładem finansowym, ze względu na wysoki koszt substratów. Substrat do produkcji CB obejmuje kilka rodzajów źródeł węgla, takich jak glukoza, sacharoza, fruktoza, glicerol, mannitol i arabitol. Tradycyjna pożywka Hestrin-Schramm była powszechnie stosowana do produkcji CB, jest droga i wymaga dodatkowych substratów np. dodatkowych źródeł węgla. Dlatego często rozważane są niedrogie surowce zawierające wysokie stężenia cukrów redukujących jako obiecujące substraty do produkcji CB (Abdelraof i wsp. 2019). Ostatnim trendem jest wykorzystanie do jej produkcji produktów ubocznych z różnych gałęzi przemysłu. Dzięki czemu, zmniejsza się koszt uzyskania CB a także zaproponowane metody wpisują się w zasady zielonej chemii (Revin i wsp. 2018).

1.4.5. Kolagen

Kolagen jest białkiem naturalnie występującym w organizmach żywych. Polimer ten stanowi 25-35% masy wszystkich białek ssaków (Bazrafshan i Stylios, 2019). W organizmie pełni funkcję strukturalną, zapewnia stabilność mechaniczną, wytrzymałość i elastyczność tkankom miękkim, łącząc je ze szkieletem (Sionkowska, 2011). Również tkanki twarde tj. zęby i kości składają się z kolagenu wraz z częściami mineralnymi, głównie hydroksyapatytem. Dotychczas znanych jest 29 typów genetycznych kolagenu, różniących się sekwencją aminokwasową, masą cząsteczkową, strukturą przestrzenną, lokalizacją tkankowym i stopniem skomplikowania budowy. Do głównych typów kolagenu należą: typ I występujący w kościach, skórze i ścięgnach, typ II obecny w chrząstce oraz typ III w skórze i naczyniach krwionośnych. Najliczniej występującym jest typ I kolagenu (Lewandowska i Sionkowska, 2019).

1.4.5.1. Budowa kolagenu

Każdy α łańcuch zbudowany jest z około 1000 aminokwasów, trzy lewoskrętne łańcuchy polipeptydowe, splecione wokół wspólnej osi tworzą superhelisę. Występowanie struktury trójhelikalnej jest cechą wspólną wszystkich typów kolagenu (Banaś i Pietrucha, 2009). Ta unikalna struktura, związana jest z jego budową aminokwasową. Najczęściej występującą sekwencją aminokwasową jest ta, gdzie co trzecim aminokwasem jest glicyna, a pozostałymi - prolina i hydroksyprolina (Ryc. 1) (Kisling i wsp. 2019). Dojrzały kolagen jest wysoce usieciowany, co czyni go nie rozpuszczalnym w wodzie. Rozpuszczalny w wodzie i kwasach kolagen, pochodzi z tkanek młodych osobników. Procesy starzenia prowadzą do sieciowania kolagenu, wpływając na jego właściwości mechaniczne (Sionkowska, 2006).



Rycina 1. Hierarchiczna struktura kolagenu (Lin i wsp. 2019, zmodyfikowany)

1.4.5.2. Wykorzystanie kolagenu

Do tej pory głównymi źródłami z których kolagen do celów przemysłowych był pozyskiwany, były tkanki ssacze tj. skóry bydlęce i świńskie (Arumugam i wsp. 2018). Niestety, ze względu na ryzyko przeniesienia chorób odzwierzęcych

na ludzi (pryszczycza czy gąbczasta encefalopatia bydła) a także względy religijne związane z wykorzystaniem kolagenu wołowego i wieprzowego, ogranicza się jego stosowanie kliniczne. Alternatywnymi źródłami stają się organizmy wodne. Kolagen typu I został otrzymany ze skór i łusek rybich wielu gatunków, zarówno słodko jak i słonowodnych (Sionkowska i wsp. 2015; Bhagwat i Dandge 2016).

Kolagen wykorzystywany jest między innymi w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym i medycznym (Liu i wsp. 2019). Dzieje się tak, ze względu na jego właściwości - biokompatybilność, nietoksyczność i biodegradowalność. W szczególności kolagen stosuje się do regeneracji skóry, tkanki łącznej i tkanki nerwowej (Muthukumar i wsp. 2014). Ponadto materiały opatrunkowe oparte na kolagenie absorbują duże ilości płynów ustrojowych i utrzymują wilgotny mikroklimat rany (Rethinam i wsp. 2018). Opatrunki na bazie kolagenu wykazały, że sprzyjają wzrostowi produkcji fibroblastów i stymulują szybsze gojenie ran (Moura i in. 2014). Kolagen typu I jest najczęstszym typem genetycznym stosowanym jako sztuczna skóra (Song i wsp. 2017). Ponadto materiały kolagenowe charakteryzują się zdolnością do uwalniania zawartych w nich leków, dlatego są szeroko stosowane jako ich nośniki (Ramanathan i wsp. 2018). Dodatkowo metaloproteinazy (enzymy proteolityczne) obecne w wysiękach z ran, zdolne są do degradacji włókna kolagenowego. Dzięki czemu możliwe jest wykorzystanie materiału kolagenowego jako alternatywnego źródła tego białka, w celu wspomaganie procesu gojenia - podczas angiogenezy i procesu przebudowy tkanki (Oryan i wsp. 2018; Lipka i Boratyński, 2008).

Właściwości kolagenu mogą być modyfikowane, podobnie jak pozostałych polimerów. Jedną z najczęściej wybieranych metod jest przygotowywanie materiałów kilkuskładnikowych. Jednymi z częściej wykorzystywanych polimerów są: chitozan, kwas hialuronowy (Michalska-Sionkowska i wsp. 2018), fibroina jedwabiu (Ramadass i wsp. 2019), elastyna (Skopińska-Wiśniewska i wsp. 2016) i keratyna (Arslan i wsp. 2017). Często materiały kolagenowe modyfikowane są dodatkami nieorganicznymi m.in. hydroksyapatytem (Kozłowska i wsp. 2019a) i fosforanem wapnia (Kaczmarek i wsp. 2018a), które

potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie jako tymczasowe rusztowania w regeneracji tkanki kostnej.

Materiały kolagenowe mogą być przygotowywane w różnych formach, materiał może być sieciowany a także wzbogacany w związki aktywne. Jednym z takich materiałów były mikrosfery kolagenowo-żelatynowe sieciowane chemiczne mieszaniną EDC (etylo-3(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimid) i NHS (N-hydroksysukcynimid) lub stosując sieciowanie fizyczne wysoką temperaturą (110°C, 24h). Do mikrosfer wprowadzano ekstrakt z kwiatów *Calendula officinalis* (nagietek lekarski). W rezultacie otrzymano obiecujący system dostarczania związków biologicznie czynnych o profilu przedłużonego działania, który znalazłby zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym i medycznym (Kozłowska i wsp. 2019b).

Kolagen wykorzystywany jest również do produkcji gąbczastych materiałów wzbogaconych w leki np. cyprofloksacynę i gentamycynę. Leki te wraz z kolagenem i chitozanem łączą się wiązaniem kowalencyjnym - tworząc wiązanie amidowe. Dzięki temu, ich działanie antybakteryjne zostało wydłużone. Ponadto takie materiały promowały proliferację komórek fibroblastów *in vitro* i przyspieszały proces gojenia ran zakażonych *E. coli* i *S. aureus* w badaniach *in vivo*. Wpływały pozytywnie na reepitelizację, odkładanie kolagenu i właściwości angiogenezy (Hu i wsp. 2019).

Natomiast usieciowane przy pomocy oligomerycznych proantocyjanidyn (OPC) membrany kolagenowe, charakteryzowały się lepszą stabilnością termiczną niż te nieusieciowane. Dodatkowo były bardziej odporne na działanie kolagenazy - stabilność wynosiła 50 dni. Ponadto OPC promowały wzrost komórek L929. W badaniach *in vivo* test podskórny wykazał, że membrana uległa degradacji po około 30 dniach, a odpowiedź zapalna zmniejszyła się w czasie implantacji (Li i wsp. 2019).

1.5. Związki przeciwdrobnoustrojowe stosowane w materiałach opatrunkowych

Powstanie rany skutkuje utratą podstawowej funkcji skóry, jaką jest ochrona organizmu przed czynnikami zewnętrznymi, w tym inwazją drobnoustrojów. Zraniona część ciała produkuje duże ilości wydzieliny, która wraz z temperaturą ciała i składnikami odżywczymi stanowi idealne miejsce dla rozwoju bakterii. Kiedy system odpornościowy nie jest w stanie usunąć patogenów, pojawia się infekcja (Qin, 2019).

Dlatego zaprojektowanie i otrzymanie materiału opatrunkowego, zapobiegającego infekcji, cieszy się wśród naukowców i lekarzy dużym zainteresowaniem. Zastosowanie czynnika przeciwdrobnoustrojowego w materiale pozwala na precyzyjne jego dostarczenie w miejscu zakażenia, co wydaje się być kluczowym aspektem w kształtowaniu mechanizmów oporności drobnoustrojów, długotrwale narażonych na działanie czynnika antydrobnoustrojowego (Gorczyca i Tylingo, 2011b).

W latach 40 ubiegłego wieku Alexander Fleming wraz z Howardem Floreyem i Ernestem Chainem, pozyskali i uruchomili produkcję penicyliny. Kolejne trzy dekady, uznawane są za złotą erę antybiotyków, podczas których odkryto wiele naturalnych, jak i opracowano syntetyczne. Efektem tego był spadek liczby zachorowań i śmierci wywołanych przez zakażenia bakteryjne (Grupta i Birdi, 2017). Jednakże, z każdą mijającą dekadą, ilość drobnoustrojów opornych na ich działanie wzrasta. Szacuje się, że ponad 70% bakterii wywołujących infekcje oporna jest na przynajmniej jeden z antybiotyków stosowanych w szpitalach. Niektóre z nich podatne są tylko na terapie eksperymentalne lub potencjalnie toksyczne (Ranghar i wsp. 2013). Szczególnie alarmujące jest pojawienie się lekooporności enterokoków na wankomycynę i *Staphylococcus aureus* (MRSA) na metycylinę, które często odpowiedzialne są za zakażenia ran (Cittterio i wsp. 2017).

Wzrastająca liczba szczepów lekoopornych rodzi konieczność poszukiwania nowych, alternatywnych związków przeciwdrobnoustrojowych. W ostatnich latach

szczególnym zainteresowaniem cieszą się nanocząstki, miód, olejki i ekstrakty roślinne oraz związki fenolowe.

1.5.1. Nanocząstki

Nanotechnologia to interdyscyplinarna dziedzina naukowa, która przykuła uwagę świata nauki i przemysłu. Spowodowane jest to możliwością syntezy nanomateriałów na bazie metalu, których zakres potencjalnych zastosowań jest bardzo szeroki. Nanomateriały wykorzystywane są między innymi w naukach medycznych, w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i wielu innych (Ge i wsp. 2014; Kumar i wsp. 2018). Nanomateriały i nanocząstki to struktury o wielkości 1-100 nm, dzięki czemu charakteryzują się korzystnym stosunkiem powierzchni do objętości, zwiększając powierzchnię aktywną (Rajendran i wsp. 2018). Najpopularniejszymi, stosowanymi w materiałach opatrunkowych nanocząstkami są nanocząstki srebra (AgNPs), cynku i dwutlenku tytanu.

1.5.1.1. Nanocząstki srebra (AgNPs)

Srebro stosowane jest w celu uzyskania właściwości antybakteryjnych materiałów medycznych takich jak opatrunki, cewniki czy stabilizatory zewnętrzne. Srebro, może być stosowane w postaci soli srebra np. azotanu srebra i sulfadiazyny lub w postaci nanocząstek. W porównaniu do soli srebra, AgNPs charakteryzują się przedłużonym uwalnianiem jonów srebra, niwelując konieczność częstych zmian opatrunków, zwiększając komfort pacjenta a zmniejszając ból oraz redukując koszty leczenia (Shao i wsp. 2019). Nanocząstki srebra otrzymuje się metodami fizycznymi i chemicznymi, często toksycznymi dla środowiska o niskiej efektywności. Coraz częściej do syntezy AgNPs wykorzystywane są mikroorganizmy lub substancje pochodzenia roślinnego, dzięki czemu uzyskanie AgNPs jest bezpieczniejsze dla środowiska (Siemieniec 2013; Golińska i wsp. 2015). Nanocząstki srebra działają bakteriobójczo na szerokie spektrum bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych w tym antybiotykoopornych (Ge i wsp. 2014). Istnieją cztery mechanizmy działania srebra na komórki bakteryjne. Srebro może powodować permeabilizację błony

komórkowej, wiązać się z DNA hamując podział komórkowy, wytwarzać wolne rodniki i reaktywne formy tlenu oraz hamować aktywność enzymatyczną w łańcuchu oddechowym (Namviriyachote i wsp. 2019). Ponadto AgNPs blokują quorum sensing, redukując powstawanie biofilmu oraz usuwają egzotoksyny (Rajendran i wsp. 2018). Różnorodność materiałów opatrunkowych z nanocząstkami srebra jest bardzo duża. W połączeniu z polimerami uzyskuje się hydrożele, bandaże, materiały porowate i membrany (Masood i wsp. 2019; Mehrabani i wsp. 2018; Natarajan i Kiran, 2019; Shao i wsp. 2019). Materiały hydrożelowe na bazie chitozanu i glikolu polietylenowego uwalniały AgNPs powoli, przez 7 dni. Dodatkowo AgNPs wprowadzone do matrycy wykazywały lepsze działanie bakteriobójcze wobec *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i *S. aureus* w porównaniu do samych nanocząstek (Masood i wsp. 2019). Pomimo dużego zainteresowania użyciem AgNPs do celów medycznych, część wyników badań pokazuje ich toksyczność wobec komórek somatycznych. Poon i Burd (2004) zaobserwowali toksyczny wpływ srebra uwolnionego z komercyjnie dostępnego materiału opatrunkowego na fibroblasty i keratynocyty. Hsin i wsp. (2008) odkryli prawdopodobny mechanizm działania cytotoksycznego na fibroblasty, polegający na powstawaniu reaktywnych form tlenu oraz uwalnianiu cytochromu c do cytozolu prowadząc ostatecznie do apoptozy komórek.

1.5.1.2. Nanocząstki tlenku cynku (nZnO)

Wykorzystanie nanocząstek tlenku cynku w materiałach opatrunkowych jest popularnym rozwiązaniem ze względu na właściwości antybakteryjne. Ponadto ich otrzymanie nie jest kosztowne a nZnO są biozgodne i nietoksyczne (Joorabloo i wsp. 2019). Uwolnione jony cynku pozytywnie wpływają na proces zasklepienia rany, wspierając proliferację keratynocytów i powstawanie nowych naczyń krwionośnych (Khorasani i wsp. 2018; Augustine i wsp. 2014). Wyniki innych badań pokazują, pozytywny wpływ na namnażanie fibroblastów (Ahmed i wsp. 2018). Cynk jest ważnym pierwiastkiem obecnym w wielu enzymach np. polimerazie DNA i RNA, wpływa na syntezę białek, hormonów i czerwonych krwinek a także odpowiedzialny jest za prawidłowe funkcjonowanie skóry i błon

śluzowych (Augustine i wsp. 2014). Uczestniczy w wytwarzaniu prostaglandyn, które wpływają na funkcje wydzielnicze skóry. Pierwiastek ten, bierze udział w przetwarzaniu kwasów tłuszczowych i metabolizmie kolagenu, przyspieszając gojenie się ran (Szcześniak i wsp. 2014). Dodatkową zaletą nanocząstek tlenku cynku jest zakwalifikowanie ich przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) jako bezpieczne (21CFR182.8991) w kontakcie z człowiekiem (Khorasani i wsp. 2018). Nanocząstki tlenku cynku działają biobójczo na bakterie Gram dodatnie, Gram ujemne a także na grzyby (Augustine i wsp. 2014). Mechanizm ich działania bakteriobójczego polega na zaburzaniu potencjału błonowego komórek bakteryjnych i rozerwaniu błon komórkowych (Liu i wsp. 2009). nZnO wprowadzone do materiałów z gumy z nasion bazylii, karbometylocelulozy i karragenianu, wykazywały silniejsze działanie bakteriobójcze wobec bakterii Gram dodatnich. Prawdopodobnie, wynikało to z różnicy w budowie błony komórkowej bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych (Tantiwatcharothai i Prachayawarakorn, 2019; Kanmani i Rhim, 2014). Ze względu na różnice w budowie ścian komórkowych, bakterie Gram dodatnie są bardziej wrażliwe na działanie bakteriobójcze nZnO. Nanocząstki cynku wpływały również pozytywnie na stabilność termiczną i właściwości mechaniczne materiałów hydrożelowych z gumy z nasion bazylii, nie wykazując przy tym cytotoksyczności względem ludzkich keratynocytów (Tantiwatcharothai i Prachayawarakorn, 2019). Niestety, Elen i wsp. (2012) zauważyli, że w zależności od morfologii nanostruktur, tlenek cynku wprowadzony do matrycy polimerowej, hamuje jej przepuszczalność dla tlenu, którego dostęp podczas gojenia ran jest jednym z kluczowych elementów.

1.5.1.3. Nanocząstki dwutlenku tytanu (TiO₂NP)

Dwutlenek tytanu (TiO₂) stanowi jeden z najczęściej stosowanych nanomateriałów, ze względu na swoje właściwości tj. kolor, wysoki współczynnik załamania światła i odporność na przebarwienia, stosowany jest głównie jako pigment. Prawie 70% wszystkich produkowanych nanocząsteczek TiO₂ stosuje się

jako pigmenty w farbách, szklwach, emaliach, tworzywach sztucznych, papierze, włóknach, żywności, farmaceutykach i kosmetykach. Ponadto TiO_2 może być również stosowany jako środek przeciwbakteryjny, nieorganiczny filtr UV oraz katalizator do oczyszczania powietrza i wody oraz w przemyśle medycznym (Tomankova i wsp. 2015). TiO_2 charakteryzuje się dobrą biokompatybilnością, przyspiesza proces zrastania kości i tkanek miękkich. Ze względu na właściwości osteokonduktywne, TiO_2NP wykorzystywany jest w medycynie regeneracyjnej, do syntezy rusztowań stosowanych w naprawie tkanek (Zhang i wsp. 2018). Ponadto syntetyczne nanomateriały TiO_2 posiadają wysoką porowatość, pozwalając na migrację komórek, tworzenie naczyń krwionośnych, transport składników odżywczych i usuwanie metabolitów (Sengottuvelan i wsp. 2017). Naświetlany światłem bliskim UV i UVA, ten półprzewodnik wykazuje zdolność utleniania fotokatalitycznego, dzięki czemu może niszczyć zanieczyszczenia mikrobiologiczne. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa TiO_2 przypisywana jest produkcji reaktywnych form tlenu w tym nadtlenku wodoru i rodników hydroksylowych (Siripatrawan i Kaewklin, 2018). TiO_2NP w połączeniu z metalami (Ag, Ni, Pt, Au, Ag, Cu, Rh, Pd), tlenkami (ZnO , WO_3 , SiO_2 , CrO_3) i niemetalami (C, N, S, P) zwiększa absorpcję światła widzialnego i zwiększa swoją aktywność fotokatalityczną pod wpływem promieniowania UV (Ghosal i wsp. 2019).

1.5.2. Miód

Od tysiącleci terapeutyczne działanie miodu doceniane jest i stosowane w medycynie. Obecnie popularnym kierunkiem badań stało się wykorzystanie tego naturalnego surowca w leczeniu chorób np. przewodu pokarmowego (Nasuti i wsp. 2006) i jamy ustnej (Ramsay i wsp. 2019), owrzodzeń (Mayer i wsp. 2014) i ran przewlekłych (El-Malek i wsp. 2017). Miód składa się głównie z węglowodanów (75-79%) i wody (20%), poza tym z białek i enzymów takich jak amylaza, oksydaza, katalaza, fosforylaza kwasowa (Vandamme i wsp. 2013). Dodatkowo, miód zawiera aminokwasy, witaminy z grupy B, witaminę C, kwas foliowy, minerały, żelazo, cynk i przeciwutleniacze (Meo i wsp. 2017).

Kompozycja chemiczna miodów różni się w zależności od gatunku roślin i pszczoł a także czynników sezonowych i środowiskowych (Leyva-Jimenez i wsp. 2019). Dlatego różne rodzaje miodu mają inną wartość leczniczą (Oryan i wsp. 2016). Ponadto działanie przeciwdrobnoustrojowe miodu, zmieniać się będzie wraz z warunkami jego przechowywania (Osés i wsp. 2016). Aktywność przeciwdrobnoustrojowa miodu przypisywana jest jego wysokiej osmolarności, pH, produkcji nadtlenu wodoru, obecnym flawonoidom, związkom fenolowym a także zawartości innych składników fitochemicznych takich jak metyloglioksal, leptozyna i melanoidyny (Fyfe i wsp. 2017; Osés i wsp. 2016). Miód jest nietoksyczny i może stymulować proces gojenia ran poprzez wspomaganie autolitycznego oczyszczenia rany. Wykazuje on również działanie przeciwzapalne, aktywność przeciwutleniającą, zmniejsza obrzęk i zapach rany. Opatrunek zawierający w swoim składzie miód może stymulować wzrost komórek do naprawy tkanek (Simón, 2016). Tavakoli i Tang (2017) przygotowali opatrunek miód/PVA, w którym miód nie tylko posiadał właściwości antibakteryjne, ale także wpływał pozytywnie na żywotność i proliferację komórek. Szeroko wykorzystywany w medycynie i przemyśle kosmetycznym jest miód Manuka, znany jako *Leptospermum scoparium* z Nowej Zelandii i Australii. Miód Manuka jest rodzajem miodu medycznego o specyficznym parametrze Unique Manuka Factor (UMF) (Sasikala i wsp. 2018). UMF jest miarą siły działania przeciwbakteryjnego miodu przeciwko *S. aureus* i obliczany jest na podstawie stężenia roztworu fenolu, który daje podobną strefę zahamowania wzrostu w teście dyfuzji promieniowej w porównaniu do testowanego miodu (McLoone i wsp. 2016). Miód klasy medycznej może być stosowany po nacięciach chirurgicznych w miejscu wszczepienia implantu. Przyspiesza on gojenie owrzodzeń skóry głowy w miejscu umieszczenia implantów ślimakowych u pacjentów pediatrycznych (Costeloe i wsp. 2018). Fyfe i wsp. (2017) wykazali, że również inne lokalne rodzaje miodu (Szkocja) mogą mieć taką samą aktywność przeciwdrobnoustrojową jak miód Manuka względem izolatów bakteryjnych opornych na antybiotyki. Biorąc pod uwagę globalny problem oporności bakterii

na antybiotyki, stosowanie miodu jako środka antybakteryjnego może być obiecujące. Gethin i Cowman (2008) wykorzystali miód Manuka w leczeniu żylnych owrzodzeń podudzi. Miód Manuka wyeliminował *S. aureus* MRSA z 70% zakażonych ran. Dla porównania, hydrożel (kontrola) wyeliminował *S. aureus* MRSA tylko z 16% zakażonych ran. Niestety nie wszystkie doniesienia literaturowe są tak optymistyczne. W tym samym badaniu, hydrożele okazały się bardziej skuteczne wobec eliminowania zakażeń wywołanych *P. aeruginosa* (Gethin i Cowman, 2008). Jull i wsp. (2008) przeprowadzili badanie kliniczne na pacjentach z owrzodzeniami żylnymi, stwierdzili, że nie zaobserwowano znaczących różnic w leczeniu ran w stosunku do standardowych procedur. Dodatkowo, leczenie miodem było droższe i wiązało się z wystąpieniem większej ilości skutków ubocznych. Carnwath i wsp. (2013) w swoim projekcie wykazali, że wiele gatunków miodu było bardziej skutecznych wobec badanych patogenów w porównaniu do miodu Manuka. Jednakże wiele z komercyjnie dostępnych miodów była zakażona potencjalnie patogennymi drobnoustrojami, dlatego autorzy zalecają ostrożność w stosowaniu miodów z klas niemedycznych.

1.5.3. Olejki eteryczne

Olejki eteryczne (EO) stanowią największą grupę metabolitów wtórnych wytwarzanych przez rośliny. W swoim składzie zawierają lotne związki o niskiej masie cząsteczkowej i charakterystycznym zapachu. Głównymi składnikami chemicznymi odpowiedzialnymi za ich zapach są przede wszystkim terpeny, monoterpeny i linalol (Edwards-Jones i wsp. 2004). Olejki eteryczne pozyskiwane są z różnych części roślin (kwiatów, liści, pędów, pąków itd.). Głównymi metodami pozyskiwania są ekstrakcja parą wodną, rozpuszczalnikami organicznymi i wyłaczanie (Pérez-Recalde i wsp. 2018). Ze względu na ich hydrofobowy charakter, są rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych i nie mieszają się z wodą (El Asbahani i wsp. 2015). EO szczególnym zainteresowaniem cieszą się w przemyśle spożywczym, gdzie wykorzystywane są jako konserwanty i dodatki do materiałów opakowaniowych (Burt, 2004).

Ponadto dzięki swoim właściwościom biobójczym, stały się cenionym surowcem w przemyśle farmaceutycznym i medycznym (El Asbahani i wsp. 2015). Niektóre materiały opatrunkowe z wbudowanymi ekstraktami roślinnymi, posiadały takie same właściwości bakteriobójcze co nanocząstki srebra, ale koszt ich otrzymania był dużo niższy (Tan i wsp. 2013). Działanie biobójcze olejków, zależy od ich składu chemicznego, który podlega zmianom pod wpływem różnych czynników. Procentowa zawartość poszczególnych składników uwarunkowana jest m.in. od odmiany rośliny, stadium wegetacji, pochodzenia geograficznego surowca, czynników genetycznych a nawet warunków przechowywania i metody ekstrakcji (Nanasombat i wsp. 2011). Niemniej jednak, niewątpliwą zaletą olejków eterycznych jest mała podatność mikroorganizmów na wytworzenie oporności wobec nich, ze względu na złożoność ich składu (Veras i wsp. 2012). Dodatkowo, wiele z nich, zostało uznane przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) jako bezpieczne, nie zagrażające życiu człowieka (Cadena i wsp. 2018).

Olejki eteryczne mają charakter lipofilowy, a zatem są łatwo przepuszczalne przez ścianę i błonę komórkową. Interakcje EOs z polisacharydami, kwasami tłuszczowymi i fosfolipidami sprawiają, że błony bakteryjne są bardziej przepuszczalne a utrata jonów i zawartości komórek prowadzi do ich śmierci. Innymi znanymi mechanizmami działania bakteriobójczego olejków eterycznych jest zakłócenie aktywności pompy protonowej, denaturacja białek cytoplazmatycznych i inaktywacja enzymów komórkowych (Raut i Karuppayil, 2014). Niektóre z olejków eterycznych działają skutecznie wobec izolatów szpitalnych *S. aureus* MRSA (Warnke i wsp. 2009).

Niektóre z olejków eterycznych aktywnie wspomagają gojenie ran. Ostatnie badania EO na ludzkich fibroblastach wykazały, że wpływają one na białka, geny i szlaki związane z procesem zapalnym i przebudowy tkanki (Han i Parker, 2017a; Han i Parker, 2017b). Olejek z *Parrotiopsis jacquemontiana* w warunkach *in vivo* przyspieszał reepitelizację a po zagojeniu rany, blizna była cieńsza i mniej zaczerwieniona (Ali i wsp. 2019). Podobnie działał olejek z *Mentha piperita*, który ponadto zmniejszał obrzęk rany, zwiększając neowaskularyzację, infiltrację

fibroblastów i syntezę kolagenu (Ghodrati i wsp. 2019). Dias i wsp. (2013) otrzymali biokompatybilny materiał z N-karboksybutylo chitozanu i ekstraktu z *Libidibia ferrea*, jednakże nie zaobserwowali przylegania komórek do materiału. Autorzy sugerują, że może stanowić to dodatkową zaletę. Nowe komórki nie przylegają do materiału, który podczas zmiany opatrunku, nie narusza nowopowstałej tkanki. Abu-Al-Basal (2010) zaobserwowała poprawę w procesie gojenia rany po zastosowaniu olejku eterycznego z rozmarynu. Badana próbka roślinna została zebrana z kilku miejsc zróżnicowanych jakością gleby, stosowanych nawozów i nawodnienia, które wpływać mogą na jej biologiczne właściwości. W przyszłości należałoby przeprowadzić dalsze badania w celu potwierdzenia i oceny zakresu potencjału gojenia ran przez olejki eteryczne z różnych chemotypów, zebranych w różnych miejscach, w kilku odstępach czasu (Abu-Al-Basal, 2010).

Dlatego część naukowców decyduje się na użycie pojedynczych lub zmieszanych w kontrolowanych warunkach, związków naturalnie występujących w olejkach eterycznych. Dzięki czemu, możliwa jest kontrola składu i stężenia używanego związku a także jego działania. Większość badań opartych na tych związkach prowadzona jest na potrzeby przemysłu spożywczego, w którym związki fenolowe są uważane za alternatywną metodę konserwacji żywności oraz dodatek do aktywnych materiałów opakowaniowych. Ponadto są one badane pod kątem możliwości wykorzystania w branży medycznej. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków sklasyfikowała część fenoli jako bezpieczne dla konsumentów. Ponadto większość naturalnie występujących polifenoli uważana jest za nietoksyczne i niealergizujące (Vakiliana i wsp. 2018).

1.5.4. Związki fenolowe

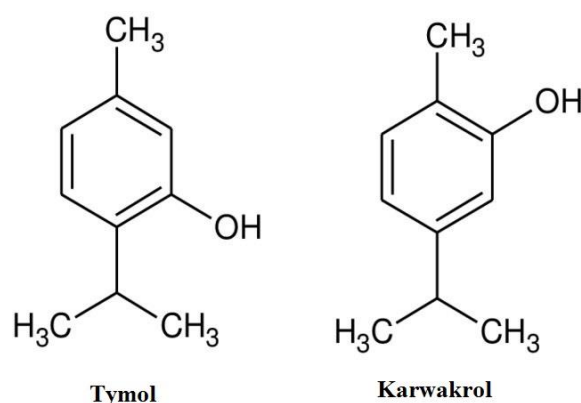
Związkiem fenolowym występującym w dużym stopniu w olejkach eterycznych z goździków (90%) i cynamonu (60%) jest eugenol (Jesudasan i wsp. 2015). Eugenol i produkty z dodatkiem eugenolu stosowane są w stomatologii (Mosquera i wsp. 2019). Badania kliniczne wykazały, że zmniejszają ból, stan zapalny i poprawiają gojenie się ran po ekstrakcji zęba (Jesudasan i wsp. 2015).

Eugenol zwiększa działanie przeciwbólowe lidokainy i jest bezpieczny do stosowania miejscowego ($\leq 5\%$), w wyższych stężeniach (8%) powoduje miejscowe podrażnienie (Ahmad i wsp. 2019). Stosowany jest również w przemyśle kosmetycznym, a także wprowadzany jest do polimerowych matryc (Cheng i wsp. 2019).

Gwajakol (2-metoksyfenol) pozyskiwany jest z żywicy gwajakowca lekarskiego lub w procesie metylowania pirokatechiny. Gwajakol i jego pochodne znane są i stosowane od ponad wieku. Stosuje się go w produkcji środków antyseptycznych i wykrztuśnych a także aromatów, dezodorantów, fungicydów i środków pasożytoobójczych (Liu i wsp. 2011).

Tymol (2-izopropyl-5-metylofenol) i karwakrol (5-izopropyl-2-metylofenol) są izomerami, mają taki sam wzór sumaryczny, ale różnią się wzorem strukturalnym (Ryc. 2). W dużych stężeniach występują w olejkach eterycznych ekstrahowanych z roślin należących do rodziny *Lamiaceae* m.in. lebidki pospolitej (*Origanum vulgare*) i tymianku (*Thymus vulgaris* L.) (Marchese i wsp. 2016). Zarówno tymol jak i karwakrol zostały sklasyfikowane przez FDA jako ogólnie uznane za bezpieczne, o znikomej toksyczności (Rivas i wsp. 2010).

Tymol ze względu na szereg sprawdzonych właściwości farmakologicznych, mechanizmów molekularnych i właściwości farmakokinetycznych został uznany za obiecujący środek terapeutyczny pochodzenia naturalnego (Rivas i wsp. 2010; Milovanovic i wsp. 2019). Wykazuje on aktywność przeciwbakteryjną, zarówno wobec bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych, w tym także wobec szczepów opornych na metycylinę (Nostro i wsp. 2004).



Rycina 2. Wzory strukturalne tymolu i karwakrolu (Shiyab i wsp. 2012 zmodyfikowany)

Tymol podawany doustnie szybko się wchłania, dlatego naukowcy uważają, że jego adsorpcja następuje w górnym odcinku jelita. Jego szybkie wchłanianie ma prawdopodobnie związek z niewielkim rozmiarem i lipofilowym charakterem (Kohlert i wsp. 2002). Jego rozkład następuje w żołądku lub jelitach. Średni okres półtrwania tymolu w końcowej fazie eliminacji wynosi 10,2h a całkowita eliminacja jego produktów degradacji następuje w około 40 h po podaniu (Kohlert i wsp. 2002; Milovanovic i wsp. 2019).

Tymol i karwakrol stosuje się w preparatach kosmetycznych, żywności, lekach do użytku zewnętrznego oraz środkach owadobójczych i grzybobójczych (Marchese i wsp. 2016). Te fenole szczególnie cenione są ze względu na swoje właściwości bakteriobójcze. Tymol może być również obiecującym środkiem przeciwzapalnym, ponieważ zmniejsza obrzęk i napływ leukocytów w obręb rany (Riella i wsp. 2012) a wbudowany do matrycy polimerowej zapewnia ochronę i idealne warunki do odbudowy uszkodzonych tkanek (Jiji i wsp. 2019).

Karwakrol, podobnie jak tymol, posiada wiele właściwości biologicznych takich jak: właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, neuroprotektoryjne, antynowotworowe, przeciwbakteryjne i inne (Marinelli i wsp. 2019). Dodatkowo, w zależności od dawki, karwakrol redukuje liczbę komórek nowotworowych, obniża ciśnienie krwi i uśmierza ból (de Souza Polli i wsp. 2019). Karwakrol może być również stosowany do łagodzenia skutków choroby alkoholowej. Khan i wsp.

2019 udowodnili, że wykazuje działanie hepatoprotekcyjne wobec indukowanego alkoholem zapalenia wątroby u myszy.

Karwakrol może być również stosowany jako repelent wobec komarów, wykazując silniejsze działanie niż te, komercyjnie dostępne. Jednocześnie pośrednio wpływając na liczbę zachorowań, na choroby przenoszone przez komary takie jak malaria, denga i żółta febra (Park i wsp. 2005).

Aplikowanie olejków eterycznych lub ich składników, w tym tymolu i karwakrolu, jest ograniczone ich niską rozpuszczalnością w wodzie i szybką degradacją z powodu reaktywności chemicznej i lotności, co skutkuje ich krótkoterminową biodostępnością (Wattanasatcha i wsp. 2012). Wbudowanie naturalnych związków bioaktywnych do nośników polimerowych może pomóc w podawaniu olejków eterycznych lub ich składników, w niezmodyfikowanej formie i wpływać na dynamikę ich dostarczenia do miejsc docelowych (Milovanovic i wsp. 2019). Dlatego coraz częściej wykorzystuje się je jako związki aktywne wbudowane w matryce polimerowe, emulsje czy mikrokapsułki (Guarda i wsp. 2011; Keawchaon i Yoksan, 2011).

2. CEL PRACY

Głównym celem badań było zaprojektowanie i otrzymanie materiałów na bazie kolagenu stanowiącego matrycę dla związków biobójczych pochodzenia naturalnego. Osiągnięcie głównego celu było możliwe dzięki wyznaczeniu i realizacji celów szczegółowych.

1. Wytypowanie związków fenolowych i ich mieszanin o najlepszych właściwościach biobójczych.
2. Wytworzenie materiału biobójczego na bazie kolagenu i substancji biobójczych.
3. Oznaczenie właściwości biobójczych otrzymanego materiału oraz jego wpływu na niektóre procesy komórkowe.
4. Charakterystyka właściwości fizykochemicznych materiałów aktywnych.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Mikroorganizmy stosowane podczas badań laboratoryjnych

W badaniach laboratoryjnych wykorzystywano mikroorganizmy takie jak *Escherichia coli* ATCC8739, *Pseudomonas aeruginosa* KKP 991, *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, *Proteus vulgaris* ATCC10541, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Aspergillus niger* ATCC16404 oraz *Candida albicans* ATCC10231.

3.2. Testy przesiewowe

Wstępne testy wykonano dla związków fenolowych i ich mieszanin w celu określenia działania hamującego wzrost drobnoustrojów i możliwych oddziaływań wybranych związków fenolowych względem siebie. W badaniach wykorzystano tymol (Warchem), karwakrol (Sigma-Aldrich), eugenol (Sigma-Aldrich) i gwajakol (Sigma-Aldrich). Sporządzono 2% (w/v) i 0,2% (w/v) roztwory badanych fenoli stosując alkohol etylowy (96%) jako rozpuszczalnik. Przygotowano także ich mieszaniny w stosunku wagowym 1:1.

Na sterylne kwadraty celulozowe (1 cm x 1 cm), nanoszono przygotowane roztwory i pozostawiano do odparowania rozpuszczalnika. W ten sposób otrzymano kwadraty celulozowe (1 cm²) zawierające związki fenolowe o stężeniach: 0,1; 0,4; 1,0; 4,0 mg/cm². W tabeli 1 przedstawiono skróty stosowane w nazewnictwie związków fenolowych i ich mieszanin.

Tabela 1. Wykaz skrótów stosowanych w nazewnictwie związków fenolowych i ich mieszanin

Badana substancja	Skrót
Tymol	TYM
Karwarkol	KAR
Eugenol	EUG
Gwajakol	GWA
Tymol/Karwarkol	TYM/KAR
Tymol/Eugenol	TYM/EUG
Tymol/Gwajakol	TYM/GWA
Karwarkol/Eugenol	KAR/EUG
Karwarkol/Gwajakol	KAR/GWA
Eugenol/Gwajakol	EUG/GWA

Zahamowanie wzrostu drobnoustrojów badano metodą dyfuzyjną. Bakterie wstępnie namnażano na pożywce bulion odżywczy o składzie [g/dm³]: pepton [5,0], ekstrakt drożdżowy [3,0], woda destylowana [1,0 dm³]. Pożywkę rozlewano po 20 ml do kolb o pojemności 50 ml i autoklawowano przez 20 minut w temperaturze 120°C. Sterylną pożywkę o temperaturze pokojowej szczepiono jednym oczkiem ezy bakteriologicznej biomasy danego szczepu. Po zaszczepieniu pożywki inkubację prowadzono w 37°C przez 24h. Z uzyskanych hodowli pobierano 2 ml, przenoszono do sterylnych probówek Eppendorf'a i wirowano przy 10 000 rpm. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w sterylnej soli fizjologicznej. *C. albicans* namnażano na pożywce stałej Sabourauda o składzie [g/dm³]: pepton [10,0], glukoza [40,0], agar [15,0], woda destylowana [1,0 dm³]. *A. niger* namnażano na pożywce stałej o składzie [g/dm³]: ekstrakt słodowy [6,0], glukoza [6,0], maltoza [6,0], ekstrakt drożdżowy [1,2], agar [15,0], woda destylowana [1,0 dm³]. Po zaszczepieniu płytki inkubowano w temperaturze 28°C przez 48h. Po inkubacji na pożywkach stałych wykonano zmyw sterylną solą fizjologiczną,

w przypadku *A. niger* z dodatkiem kropli Tween 20. Tween 20 zmniejsza napięcie powierzchniowe i umożliwia równomierne rozmieszczenie zarodników w soli fizjologicznej. Uzyskane zawiesiny komórkowe i zawiesinę zarodników (*A. niger*) przenoszono do probówek z sterylną solą fizjologiczną do otrzymania gęstości optycznej OD=0,5 w skali McFarland. Następnie wykonywano wysiew tarty na płytki Petriego z odpowiednimi podłożami. *C. albicans* i *A. niger* zaszczepiono na pożywki o składzie wymienionym powyżej. Bakterie zaszczepiano na podłoże agarowe Mueller-Hinton o składzie [g/dm³]: ekstrakt wołowy [2,0], kwaśny pepton kazeinowy [17,5], skrobia [1,5] agar [17,0], woda destylowana [1,0 dm³]. Następnie, na zaszczepione podłoża наносzono bibułę nasączoną związkami fenolowymi i pozostawiano na 2 h w temp. 4°C (w celu ułatwienia dyfuzji). Po tym czasie szalki umieszczano w temperaturze 37°C (bakterie) oraz 28°C (*C. albicans*, *A. niger*) na odpowiednio 24 h i 48 h. Po tym czasie dokonywano pomiaru strefy zahamowania wzrostu. Każdą próbę przygotowano dwa razy w dwóch powtórzeniach.

3.3. Analiza statystyczna

Wyniki otrzymane w testach przesiewowych zostały poddane obróbce statystycznej. Wykonano grupowanie hierarchiczne metodą Warda. Istotność statystyczną różnic pomiędzy grupami udowodnionymi metodą Warda, sprawdzono testem PERMANOVA. Do wykonania analiz statystycznych wykorzystano program PAST v 3.25.

3.4. Izolacja kolagenu

Kolagen (Coll) został wyizolowany ze ścięgien ogonów szczurzych młodych osobników. Wyizolowane ścięgna przemywano wodą destylowaną i rozpuszczono w 0,1M kwasie octowym przez 72h w 4°C. Nerozpuszczone części zostały usunięte podczas wirowania (10 000 rpm, 10 min., 4°C). Następnie roztwór kolagenu zamrożono i zliofilizowano w -55 °C, 5 Pa (ALPHA 1-2 LD plus, CHRIST, Niemcy). Liofilizat przechowywano w zamkniętym pojemniku w -18°C.

3.5. Przygotowanie materiałów kolagenowych z dodatkiem związków fenolowych

Na podstawie wyników otrzymanych podczas testów przesiewowych do dalszych badań wybrano tymol, karwakrol i ich mieszaninę 1:1. W celu przygotowania biobójczego materiału łączono ze sobą 1% roztwór kolagenu w 0,1M kwasie octowym jako rozpuszczalniku, 10% roztwory związków fenolowych w 96% etanolu oraz niejonowy surfaktant Polysorbate 80 (NS) ułatwiający mieszanie. Materiały otrzymywano metodą odparowania rozpuszczalnika. Do badań przygotowano materiały o następujących stężeniach związków aktywnych: 4,0; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 mg/cm². W tabeli 2 przedstawiono wykaz skrótów stosowanych w nazewnictwie materiałów.

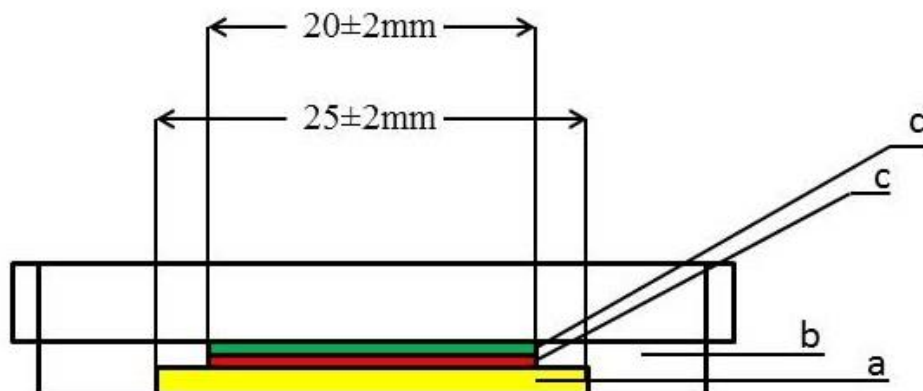
Tabela 2. Wykaz nazw i stosowanych skrótów przygotowanych materiałów

Skład materiału	Skrót
Kolagen/Polysorbate 80 (kontrola)	Coll/NS
Kolagen/tymol 4,0 mg	Coll/T4
Kolagen/tymol 1,0 mg	Coll/T1
Kolagen/tymol 0,75 mg	Coll/T0.75
Kolagen/tymol 0,50 mg	Coll/T0.5
Kolagen/tymol 0,25 mg	Coll/T0.25
Kolagen/karwakrol 4,0 mg	Coll/K4
Kolagen/karwakrol 1,0 mg	Coll/K1
Kolagen/karwakrol 0,75 mg	Coll/K0.75
Kolagen/karwakrol 0,50 mg	Coll/K0.5
Kolagen/karwakrol 0,25 mg	Coll/K0.25
Kolagen/tymol+ karwakrol 4,0 mg	Coll/TK4
Kolagen/tymol+ karwakrol 1,0 mg	Coll/TK1
Kolagen/tymol+ karwakrol 0,75 mg	Coll/TK0.75
Kolagen/tymol+ karwakrol 0,50 mg	Coll/TK0.5
Kolagen/tymol+ karwakrol 0,25 mg	Coll/TK0.25

3.6. Właściwości bakteriobójcze otrzymanych materiałów

Właściwości bakteriobójcze otrzymanych materiałów zostały zbadane zgodnie metodą zawartą w normie ISO 22196:2007 z małymi modyfikacjami. Badanie zostało wykonane wobec szczepów *Staphylococcus aureus* ATCC6538 i *Escherichia coli* ATCC8739. Badane szczepy bakterii namnażano z zastosowaniem metodyki opisanej w punkcie 3.2.

Zawiesinę komórkową w objętości 100 µl nanoszono na materiał o wymiarach 2,5 cm x 2,5 cm. Całość przykrywano sterylnym parafilmem o wymiarach 2 cm x 2 cm. Na rycinie 3 przedstawiono schemat prowadzenia eksperymentu.



Rycina 3. Schemat układu doświadczalnego; a- badany materiał, b-szalka Petriego, c- inokulum bakteryjne, d- parafilm

Przygotowane próbki inkubowano przez 24h w temperaturze 37°C. Po inkubacji, oznaczano liczbę żywych i zdolnych do wzrostu komórek bakteryjnych odzyskanych z powierzchni materiałów. Badanie wykonano metodą wysiewu wgłębnego stosując jako pożywkę TSA (agar kazeinowo - sojowy) o składzie [g/dm³]: hydrolizat kazeiny [15,0], pepton sojowy [5,0], chlorek sodu [5,0], agar [15,0], woda destylowana [1,0 dm³]. Dodatkowo sprawdzano odzysk komórek z próby kontrolnej w czasie t₀.

Właściwości bakteriobójcze materiałów określano w odniesieniu do próby kontrolnej Coll/NS. Materiał uznawany jest za biobójczy, jeżeli redukcja komórek bakteryjnych zdolnych do wzrostu (R) jest o co najmniej dwa rzędy wielkości większa w odniesieniu do próby kontrolnej. Redukcję komórek zdolnych do wzrostu obliczono zgodnie ze wzorem:

$$R = (U_t - U_o) - (W - U_o)$$

gdzie:

U_o to średnia logarytmu dziesiętnego liczby żywych i zdolnych do wzrostu komórek bakteryjnych odzyskanych z próbek kontrolnych (Coll/NS) w czasie t₀ (walidacja skuteczności odzysku);

U_t to średnia logarytmu dziesiętnego liczby żywych i zdolnych do wzrostu komórek bakteryjnych odzyskanych z próbek kontrolnych (Coll/NS) w czasie t_{24h}
 W to średnia logarytmu dziesiętnego liczby żywych i zdolnych do wzrostu komórek bakteryjnych odzyskanych z próbek badanych po 24 godzinach kontaktu. Analizę wykonano dwa razy w dwóch powtórzeniach.

3.7. Wpływ materiałów na aktywność łańcucha transportu elektronów.

Łańcuch przenoszenia elektronów nazywany jest łańcuchem oddechowym. W procesie oddychania tlenowego, elektrony są przenoszone od utlenianego związku organicznego na akceptor - tlen. Enzymy katalizujące utlenianie substratu w procesach oddechowych to dehydrogenazy. W komórkach prokariotycznych zlokalizowane są w kompleksach białkowych w błonie komórkowej (Kunicki-Goldfinger, 2006). Test aktywności dehydrogenaz przeprowadzono stosując test CellTiter 96 AQ One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Niemcy) według wskazówek producenta.

Staphylococcus aureus ATCC6538, *Escherichia coli* ATCC8739 wybrano jako szczepy wzorcowe. Badane szczepy bakterii namnażano w pożywce bulion odżywczy o składzie podanym w punkcie 3.2. Po inkubacji w 37°C przez 24 h hodowlę komórkową wirowano a osad zawieszano w sterylnej soli fizjologicznej do uzyskania gęstości optycznej $OD=1$ co odpowiada około 3×10^8 jtk/ml.

Materiały pocięto na kwadraty 10 mm x 10 mm, umieszczono w 24-dołkowych płytkach i sterylizowano promieniowaniem UV przez 20 minut dla każdej ze stron. Po sterylizacji, 450 μ l bulionu odżywczego i 50 μ l zawiesiny komórkowej dodano do materiałów i inkubowano w temperaturze 37°C przez 90 minut. Kontrolę pozytywną przygotowano przez dodanie tej samej objętości bulionu odżywczego i zawiesiny komórkowej do sterylnej studzienki, a w kontroli negatywnej zastosowano sól fizjologiczną zamiast zawiesiny komórkowej. Po 90 minutowym czasie kontaktu z materiałami, pobierano 100 μ l zawiesiny komórkowej i dodawano 20 μ l odczynnika CellTiter 96 AQ. Następnie mieszaninę inkubowano

chroniąc przed światłem w 37°C przez 1-4h w zależności od szczepu bakteryjnego. Absorbancję mierzono przy długości fali 490 nm (GloMax Discover, Promega). Każdą próbę analizowano w czterech powtórzeniach, a wyniki przedstawiono jako wartość średnią z odchyleniem standardowym.

3.8. Wpływ materiałów na ilość ATP syntetyzowanego przez komórki bakterii

Adenozyno-5'-trifosforan (ATP) jest wykorzystywany przez komórki jako uniwersalny nośnik energii. ATP jest produkowane wyłącznie w aktywnych metabolicznie komórkach, nie jest w nich magazynowane i szybko degraduje po ich śmierci (Holm-Hansen i Karl, 1978). Podczas tej analizy wykorzystuje się reakcje lucyferyny i lucyferazy oraz ATP uwolnionego ze zlizowanych komórek. Lucyferaza katalizuje reakcję, wykorzystując D-lucyferynę i ATP w obecności tlenu i jonów Mg^{2+} , której rezultatem jest luminescencja. Otrzymany sygnał luminescencji jest skorelowany z biomasą mikroorganizmów i ich stanem fizjologicznym, zdefiniowany jako całkowita ilość żywego materiału komórkowego (Karl, 1993).

Poziom adenozynotrifosforanu (ATP) analizowano przy użyciu testu BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega, Niemcy). Przed analizą bufor BacTiter-Glo™ i substrat zmieszano i pozostawiono na dwie godziny w temperaturze pokojowej, aby upewnić się, że ATP znajdujące się w odczynnikach zostało zhydrolizowane.

Jako szczepy wzorcowe wybrano *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Escherichia coli* ATCC8739, które namnożono na pożywce płynnej o składzie podanym w pkt. 3.2. Po 24h czasie inkubacji w temperaturze 37°C, hodowlę komórkową zwirowano a biomasę zawieszono w sterylnej soli fizjologicznej do uzyskania OD=1.

Sterylnie materiały o wielkości 10 mm x 10 mm, umieszczono w 24-dołkowej płytce zawierającej 450 µl bulionu odżywczego i 50 µl zawiesiny komórkowej. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 90 min. Po tym czasie do 96-dołkowej płytki pobierano 50 µl zawiesiny komórkowej i mieszano z 50 µl

odczynnika BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay. Następnie płytkę wytrząsano na wytrząsarce przez 5 minut. Luminescencja została mierzona za pomocą GloMax Discover (Promega).

3.9. Biokompatybilność

Badanie biokompatybilności materiałów wykonano względem komórek krwi – erytrocytów, przy użyciu metody bezpośredniego kontaktu, opisanej przez Zhou i wsp. (2011) z małymi modyfikacjami. Antykoagulowaną krew owczą (0,2 ml) dodawano do 10 ml roztworu soli fizjologicznej, zawierającego badane próbki (o powierzchni 1 cm²). Kontrole pozytywną i negatywną przygotowano przez dodanie 0,2 ml świeżej krwi odpowiednio do wody destylowanej i soli fizjologicznej. Wszystkie próbki inkubowano w temperaturze 37°C. Po 1 godzinie zawiesinę wirowano przy 10 000 rpm przez 10 minut, 100 µl supernatantu przenoszono do płytki 96-dołkowej. Udział zhemolizowanych erytrocytów, oznaczano spektrofotometrycznie na podstawie ilości hemoglobiny uwolnionej po rozpadzie czerwonych krwinek. Absorbancję mierzono za pomocą czytnika mikroplatek Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) przy długości fali 540 nm. Każdą próbkę przygotowano w trzech powtórzeniach. Udział procentowy komórek zhemolizowanych obliczono za pomocą równania:

$$\text{Udział komórek zhemolizowanych [\%]} = (OD_{\text{próbki}} - OD_{-}) / (OD_{+} - OD_{-}) * 100$$

Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z odchyleniem standardowym.

3.10. Tworzenie biofilmu na powierzchni materiałów

Kolby z 20 ml sterylnego bulionu odżywczego o składzie podanym w punkcie 3.2. zaszczepiono *S. aureus* i inkubowano 24h w 37°C. Następnie zawiesinę komórkową pobrano i odwirowano w sterylnych probówkach Eppendorf'a. Supernatant usunięto a osad komórkowy zawieszono w sterylnej soli fizjologicznej do uzyskania OD=1. Tak przygotowaną zawiesiną zaszczepiono kolby z pożywką płynną i pozostawiono na 24h w 37°C. Do przygotowanych hodowli wprowadzono

materiały kolagenowe o wymiarach 0,5 cm x 1,5 cm i pozostawiono na 5 i 10 dni w temperaturze 21°C. Po odpowiednim czasie materiały wyciągnięto, przemyto buforem PBS w celu odmycia komórek niezwiązanych ze strukturą biofilmu. Następnie materiały wysuszono a biofilm obserwowano przy użyciu Elektronowego Mikroskopu Skaningowego (LEO Electron Microscopy Ltd, England) po napyleniu złotem. Badanie powstawania biofilmu przeprowadzono dla materiału kontrolnego oraz materiałów z 0,5 i 0,75 mg/cm² tymolu.

3.11. Degradacja enzymatyczna w warunkach *in vitro*

Degradacja enzymatyczna została przeprowadzona zgodnie z metodyką opisaną przez Kaczmarek i wsp. (2018b). Materiały o wymiarach 10 mm x 10 mm o znanej wadze zanurzono w 1 ml 0,1 M Tris-HCl (pH = 7,4) zawierającego 50 mM CaCl₂ i inkubowano w temperaturze 37°C przez 0,5h. Następnie materiały przeniesiono do 1 ml 0,1 M Tris-HCl zawierającego 50 jednostek kolagenazy *Clostridium histolyticum* Typ I (Sigma-Aldrich, Polska). Reakcję zatrzymano po 1h przez dodanie 0,2 ml 0,25 M EDTA i ochłodzenie w lodzie. Materiały przemyto wodą destylowaną trzy razy i zanurzono w alkoholu metylowym na 3h. Następnie próbki zostały wyjęte, zamrożone i zliofilizowane (ALPHA 1-2 LD plus, CHRIST, Niemcy). Zliofilizowane próbki zważono i obliczono procentowy ubytek masy. Analizę przeprowadzono dla materiałów z dodatkiem tymolu w trzech powtórzeniach. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z odchyleniem standardowym.

3.12. Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni

Widma ATR-FTIR otrzymanych materiałów o najwyższych stężeniach (4,0 mg/cm²) tymolu i karwakrolu i ich mieszaniny zarejestrowano spektrofotometrem „Nicolet iS10” z rozdzielczością 4 cm⁻¹ i liczbą 64 skanów, wykorzystując kryształ diamentowy. Widma ATR-FTIR otrzymano również dla materiału kolagenowego bez związków fenolowych a także, dla tymolu i karwakrolu nie wbudowanego w materiały. Spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni została wykonana w celu obserwacji

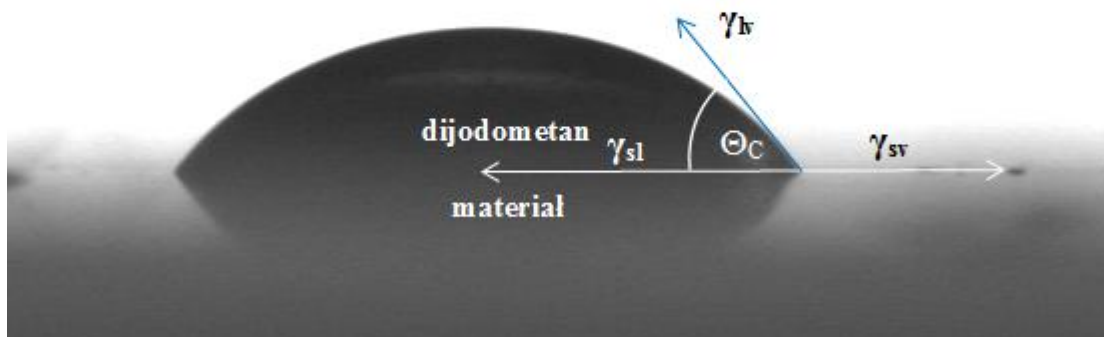
położenia charakterystycznych pasm pochodzących od grup funkcyjnych fenoli i kolagenu, umożliwiając stwierdzenie obecności tymolu i karwakrolu w filmach kolagenowych.

3.13. Topografia i chropowatość powierzchni

Topografię powierzchni zbadano za pomocą mikroskopu sił atomowych Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, CA), w trybie przerywanego kontaktu (Tapping mode), w atmosferze powietrza, w temperaturze pokojowej. Obrazy powierzchniowe uzyskano w stałej rozdzielczości (512×512 punktów) z szybkością skanowania 1,97 Hz. Zastosowano końcówki silikonowe o stałej sprężynowej 2–10 N/m. Parametr chropowatości obliczono ze skanowanego obszaru $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ przy użyciu oprogramowania Nanoscope.

3.14. Pomiar kąta zwilżania

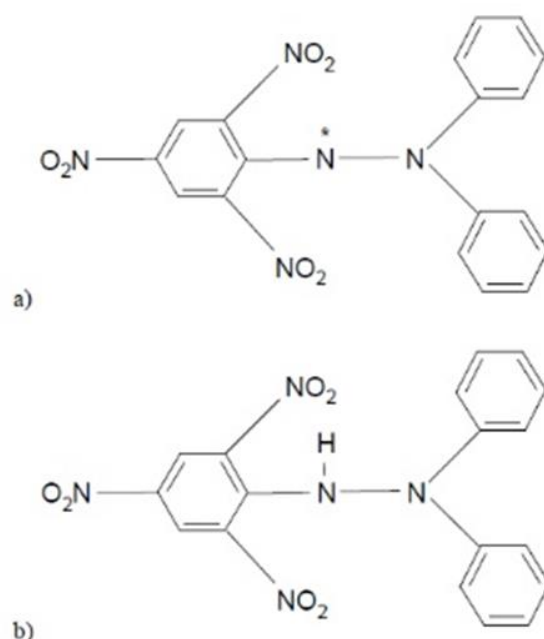
Materiały do tej analizy przygotowano na podstawowych szkiełkach mikroskopowych w postaci powłoki. Pomiary kąta zwilżania przeprowadzono dla dwóch cieczy, stosując goniometr wyposażony w system analizy kształtu kropli (DSA 10 Control Unit, Krüss, Niemcy). Jako ciecz hydrofilową zastosowano glicerynę, jako hydrofobową - diiodometan. Ciecze te, są szeroko stosowane do badania materiałów, które w kontakcie z wodą pęcznieją (Skopińska-Wiśniewska i wsp. 2016). Swobodną energię powierzchniową (γ) oraz jej składowe - polarną (γ_p^d) i dyspersyjną (γ_s^d) obliczono za pomocą metody Owensa-Wendta (Żenkiewicz, 2014). Na rycinie 4 przedstawiono przykładowe zdjęcie kropli cieczy pomiarowej na materiale kolagenowym wraz z zaznaczonym kątem zwilżania.



Rycina 4. Przykładowe zdjęcie pomiaru kąta zwilżania metodą siedzącej kropli (Walczak i wsp. 2020, zmodyfikowane)

3.15. Właściwości antyoksydacyjne

Właściwości antyoksydacyjne materiałów kolagenowych wzbogaconych w fenole zostały określone z wykorzystaniem odczynnika DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, free radical, 95%) (Alfa Aesar, Niemcy). DPPH jest stabilnym wolnym rodnikiem posiadającym niesparowany elektron na powłoce walencyjnej na jednym z atomów azotu tworzących mostek azotowy. Roztwór DPPH ma ciemnofioletową barwę, która zmienia się na żółtą w wyniku jego redukcji. Spadek absorbancji jest proporcjonalny do ilości formy utlenionej DPPH w roztworze (Ryc. 5). Zależność ta jest wykorzystywana w metodzie z zastosowaniem DPPH do określania właściwości antyoksydacyjnych olejków eterycznych i naparów roślinnych (Zych i Krzepiło, 2010).



Rycina 5. DPPH: a) wolny rodnik, b) forma zredukowana (Zych i Krzepiłko, 2010)

Do reakcji przygotowano 250 μM roztwór DPPH w alkoholu metylowym jako rozpuszczalniku. Materiały pocięto na kwadraty o powierzchni 1 cm^2 , umieszczono w 24-dołkowej płytce i zalano 2 ml roztworu DPPH. Próby pozostawiono bez dostępu światła na 1h. Próby badane wykonano w 4 powtórzeniach. Próbę kontrolną stanowił roztwór DPPH pozostawiony w płytce, bez kontaktu z materiałem. Po inkubacji dokonano pomiaru spektrofotometrycznego przy długości fali 517 nm (Hitachi U-1900). Aktywność antyoksydacyjną obliczono ze wzoru:

$$\text{Aktywność antyoksydacyjna [\%]} = \frac{Abs_{DPPH} - Abs_{PB}}{Abs_{DPPH}} * 100$$

gdzie:

Abs_{DPPH} to absorbancja roztworu DPPH bez kontaktu z materiałami

Abs_{PB} to absorbancja roztworu DPPH po kontakcie z badanym materiałem

Wyniki przedstawiono jako wartość średnią z odchyleniem standardowym.

3.16. Ubytek masy w warunkach *in vitro*

Analizę ubytku masy materiałów wykonano na podstawie metodyki zaproponowanej przez İnal i Mülazımoğlu (2019) z małymi modyfikacjami. Każdy rodzaj materiału zważono (powierzchnia 1 cm²) a następnie umieszczono w 5 ml buforu fosforanowego (PBS) (0,8 g NaCl, 0,2 g KCl, 2,9 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄ rozpuszczonych w 1 dm³ wody destylowanej) o pH=7,4. Tak przygotowane próbki umieszczano w temperaturze 37°C. Po 7 dobach próbki wyciągano, zamrażano i poddawano procesowi liofilizacji (ALPHA 1-2 LD plus, CHRIST, Niemcy) a następnie wazono. Analizę przeprowadzono w 3 powtórzeniach, wyniki podano jako średnia z odchyleniem standardowym.

Ubytek masy obliczano korzystając ze wzoru:

$$\text{ubytek masy [\%]} = \frac{\text{waga początkowa} - \text{waga końcowa}}{\text{waga początkowa}} * 100$$

Dodatkowo, w celu obserwacji morfologii powierzchni materiałów wykonano zdjęcia za pomocą Elektronowego Mikroskopu Skaningowego (LEO Electron Microscopy Ltd, England) po napyleniu złotem. Zdjęcia wykonano dla materiałów przed i po 7 dobach degradacji w PBS.

3.17. Uwalnianie związków aktywnych

Uwalnianie związków fenolowych wykonano z wykorzystaniem metody Folin-Ciocalteu, wykorzystywanej do oznaczania całkowitej zawartości związków fenolowych (Pieszko i wsp. 2015). Metoda ta oparta jest na barwnej reakcji, która zachodzi między związkami fenolowymi a odczynnikiem Folin-Ciocalteu. Związki fenolowe w środowisku zasadowym znajdują się w postaci anionu fenolowego, który redukuje odczynnik Folina-Ciocalteu tworząc niebieski barwnik. Dlatego możliwe jest zastosowanie metody spektrofotometrycznej do oznaczenia stężenia fenoli w próbce.

Przygotowane materiały pocięto na fragmenty 10 mm x 10 mm i umieszczono w 24-dółkowej płytce. Następnie, materiały zostały zalane buforem fosforanowym PBS (pH=7,4) i umieszczone w 37°C na 7 dni. Po tym czasie z każdego dołka pobierano 20 µl roztworu i zastępowano świeżym roztworem PBS (20 µl), tak by utrzymać stałą objętość w układzie badawczym. Pobrane próby (20 µl) mieszano z 1580 µl wody destylowanej i 100 µl odczynnika Folin-Ciocalteu. Dokładnie po 3 minutach do mieszaniny dodawano nasycony roztwór Na₂CO₃ (Kozłowska i wsp. 2019b). Przygotowane próby inkubowano w 40°C przez 30 min, do uzyskania charakterystycznego, niebieskiego zabarwienia. Absorbancja została zmierzona przy pomocy spektrofotometru Hitachi U-1900 przy długości fali 725 nm. Krzywa standardowa została przygotowana z użyciem kwasu galusowego w stężeniach 0-2,5 mg/ml ($R^2=0,9994$). Analizę przeprowadzono w 4 powtórzeniach dla każdego rodzaju matrycy.

3.18. Przepuszczalność par i gazów

Jedną z najważniejszych cech, którymi powinien charakteryzować się materiał opatrunkowych jest przepuszczalność par i gazów (Hu i wsp. 2019). Badanie przepuszczalności par i gazów zostały przeprowadzone w Instytucie Inżynierii Materiałów Polimerowych i Barwników w Toruniu. Badano przepuszczalność materiałów wobec pary wodnej, tlenu i dwutlenku węgla. Ze względów finansowych, przebadano tylko dwie próbki - kontrolną i Coll/T4. Zdecydowano się na badanie próby z tymolem na podstawie wyników, uzyskanych w pozostałych analizach.

Przepuszczalność pary wodnej (WVTR) oceniono zgodnie z PN-EN ISO 15106-1: 2007 przy użyciu aparatu LYSSY L80-5000, określając ilość [g] pary wodnej, przenikającej przez jednostkę powierzchni w jednostce czasu i stałej temperaturze. Testy przeprowadzono w temperaturze 38°C i wilgotności 90%.

Przepuszczalność tlenu (OTR) i dwutlenku węgla (CDTR) przeprowadzono zgodnie z normą PN-EN ISO 2556:2002 przy użyciu aparatu LYSSY L 100-5000,

określając objętość [ml] gazu, który w stałych warunkach przenika przez jednostkę powierzchni w jednostce czasu przy stałej temperaturze.

4. WYNIKI I DYSKUSJA

4.1. Testy przesiewowe

Zahamowanie wzrostu drobnoustrojów przez związki fenolowe, oceniano na podstawie pomiaru średnicy strefy bez widocznego wzrostu drobnoustrojów. Tabele 3-6 przedstawiają wyniki pomiarów średnicy zahamowania wzrostu drobnoustrojów.

Tabela 3. Średnice stref zahamowania wzrostu [mm] po aplikacji związków fenolowych w stężeniu 0,1 mg/cm²

	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
KAR	0	15,0 ± 0,6	0	0	11,1 ± 0,3	0	0
TYM	0	11,0 ± 0,0	0	0	10,6 ± 0,5	10,8 ± 1,0	0
GWA	0	0	0	0	0	0	0
EUG	0	0	0	0	0	0	0
TYM/KAR	0	12,0 ± 0,0	0	0	11,3 ± 0,5	10,5 ± 0,6	0
KAR/GWA	0	0	0	0	0	0	0
KAR/EUG	0	0	0	0	0	0	0
TYM/GWA	0	0	0	0	0	0	0
TYM/EUG	0	0	0	0	0	0	0
EUG/GWA	0	0	0	0	0	0	0

W tabeli 3 przedstawiono strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów po zastosowaniu związków fenolowych w stężeniu 0,1 mg/cm². Tymol oraz mieszanina tymol/karwakrol hamowała wzrost *S. aureus*, *P. vulgaris* i *C. albicans*, ponadto karwakrol hamował wzrost *S. aureus* i *P. vulgaris*. Pozostałe mikroorganizmy, nie były podatne na działanie związków fenolowych w tak niskim stężeniu.

W tabeli 4 zaprezentowano wyniki stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów po zastosowaniu związków fenolowych w stężeniu 0,4 mg/cm². Gwajakol, eugenol i ich mieszanina nie działała hamująco na wzrost badanych

mikroorganizmów. *A. niger* był oporny na działanie wszystkich badanych związków fenolowych. Również, oporny na ich działanie był *P. aeruginosa*, dla którego zanotowano niewielkie strefy bez wzrostu tej bakterii po zastosowaniu tymolu, tymolu+karwakrolu i tymolu+eugenolu. Najbardziej podatnym na związki fenolowe był *S. aureus*, szczególnie po aplikacji tymolu, karwakrolu i ich mieszaniny.

Tabela 4. Średnice stref zahamowania wzrostu [mm] po aplikacji związków fenolowych w stężeniu 0,4 mg/cm²

	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A.niger</i>
KAR	12,0 ± 0,0	17,0 ± 1,5	0	10,8 ± 0,3	11,8 ± 0,5	11,7 ± 1,2	0
TYM	12,0 ± 0,5	15,0 ± 1,5	10,3 ± 0,3	11,0 ± 0,0	11,3 ± 0,5	12,5 ± 1,0	0
GWA	0	0	0	0	0	0	0
EUG	0	0	0	0	0	0	0
TYM/KAR	13,0 ± 1,0	18,0 ± 2,0	10,8 ± 0,8	11,0 ± 0,4	12,8 ± 0,5	12,5 ± 1,0	0
KAR/GWA	11,0 ± 0,0	11,0 ± 0,0	0	0	10,6 ± 0,8	10,5 ± 0,6	0
KAR/EUG	11,0 ± 0,0	13,0 ± 1,0	0	10,3 ± 0,3	10,9 ± 0,3	0	0
TYM/GWA	12,0 ± 1,0	12,0 ± 0,0	0	10,4 ± 0,5	10,9 ± 0,3	11,5 ± 0,6	0
TYM/EUG	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	10,2 ± 0,3	10,5 ± 0,4	11,0 ± 0,0	10,3 ± 0,5	0
EUG/GWA	0	0	0	0	0	0	0

W tabeli 5 zostały przedstawione wyniki hamowania wzrostu drobnoustrojów po zastosowaniu związków fenolowych w stężeniu 1 mg/cm². Gwajakol nie hamował wzrostu badanych mikroorganizmów, eugenol minimalnie hamował wzrost *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* i *C. albicans*, mieszanina tych dwóch fenoli hamowała wzrost tylko *E. coli*. Natomiast pozostałe związki i mieszaniny hamowały wzrost badanych patogenów.

Tabela 5. Średnice stref zahamowania wzrostu [mm] po aplikacji związków fenolowych w stężeniu 1,0 mg/cm²

	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A. niger</i>
KAR	28,5 ± 0,5	25,0 ± 1,5	10,2 ± 0,3	12,1 ± 0,6	15,5 ± 1,3	15,5 ± 2,3	10,5 ± 0,6
TYM	18,0 ± 2,3	17,0 ± 0,6	10,7 ± 0,6	12,4 ± 0,5	16,5 ± 3,0	18,3 ± 1,7	11,1 ± 0,9
GWA	0	0	0	0	0	0	0
EUG	11,0 ± 0,0	0	0	10,3 ± 0,5	10,4 ± 0,5	10,3 ± 0,5	0
TYM/KAR	20,5 ± 0,5	30,0 ± 2,0	11,3 ± 1,2	12,8 ± 0,9	17,8 ± 1,3	16,5 ± 4,0	10,8 ± 0,3
KAR/GWA	20,0 ± 1,0	13,0 ± 1,0	10,7 ± 0,8	12,4 ± 1,1	13,8 ± 1,0	13,5 ± 1,7	10,1 ± 0,3
KAR/EUG	17,0 ± 1,0	13,0 ± 1,2	10,5 ± 0,5	12,0 ± 0,4	14,8 ± 1,3	13,8 ± 1,9	10,9 ± 0,6
TYM/GWA	18,0 ± 1,0	14,0 ± 1,0	11,3 ± 1,2	12,8 ± 1,0	14,5 ± 1,3	13,0 ± 0,0	10,4 ± 0,5
TYM/EUG	18,0 ± 1,0	12,0 ± 0,0	10,7 ± 0,6	11,6 ± 0,5	14,3 ± 1,3	12,0 ± 0,8	10,6 ± 0,5
EUG/GWA	11,0 ± 0,0	0	0	0	0	0	0

Średnice stref zahamowania wzrostu badanych mikroorganizmów po aplikacji związków fenolowych w stężeniu 4,0 mg/cm² zostały przedstawione w tabeli 6. Również najwyższe badane stężenie gwajakolu było najmniej skuteczne. Minimalną średnicę zahamowania wzrostu można było zauważyć wobec *E. coli*. Analizując wyniki można zauważyć, że mikroorganizmami najbardziej wrażliwymi na działanie badanych fenoli były *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, natomiast najmniej podatnym patogenem był *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 6. Średnice stref zahamowania wzrostu [mm] po aplikacji związków fenolowych w stężeniu 4,0 mg/cm²

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
KAR	32,0 ± 1,0	27,0 ± 2,6	10,8 ± 0,6	19,0 ± 2,9	23,3 ± 2,2	37,0 ± 3,6	17,3 ± 1,3
TYM	25,0 ± 1,0	45,0 ± 0,6	12,0 ± 1,3	17,3 ± 3,2	23,8 ± 4,1	35,7 ± 4,0	13,8 ± 1,0
GWA	11,0 ± 0,0	0	0	0	0	0	0
EUG	21,0 ± 0,0	16,0 ± 3,0	10,2 ± 0,3	12,4 ± 1,5	12,5 ± 1,3	23,5 ± 3,1	10,9 ± 0,9
TYM/KAR	39,0 ± 0,6	53,0 ± 2,0	12,3 ± 1,3	19,5 ± 4,2	26,3 ± 3,2	35,3 ± 4,6	15,0 ± 1,4
KAR/GWA	24,5 ± 1,5	27,0 ± 2,0	11,8 ± 0,8	16,6 ± 1,7	24,8 ± 5,7	29,6 ± 3,9	13,8 ± 2,2
KAR/EUG	25,0 ± 2,0	30,0 ± 0,0	10,8 ± 0,8	18,3 ± 2,0	22,3 ± 2,2	27,8 ± 2,8	14,0 ± 0,8
TYM/GWA	26,0 ± 2,0	25,0 ± 2,0	12,7 ± 1,9	15,6 ± 1,1	25,3 ± 4,6	28,1 ± 2,5	11,8 ± 0,6
TYM/EUG	28,0 ± 2,0	25,0 ± 2,0	11,5 ± 1,3	13,8 ± 1,0	23,5 ± 5,8	29,6 ± 4,3	12,2 ± 1,0
EUG/GWA	16,0 ± 1,0	16,0 ± 1,0	10,5 ± 0,5	0	13,0 ± 1,4	16,3 ± 3,1	0

W przeprowadzonym badaniu gwajakol wykazywał najslabsze działanie, hamując minimalnie *E. coli* (11 mm) w najwyższym z testowanych stężeń (4,0 mg/cm²), pozostałe mikroorganizmy nie były wrażliwe na jego działanie. Również eugenol i mieszanina eugenolu z gwajakolem wykazywały słabe działanie hamujące wzrost. Yu i wsp. (2015) również zaobserwowali słabe działanie biobójcze gwajakolu wyizolowanego z olejku eterycznego *Ligustrum compactum*. Liu i wsp. (2011) metodą seryjnych rozcieńczeń określili MIC (minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów) = 4,3 mg/ml (35 mM) wobec *Bacillus subtilis*.

Devi i wsp. (2010) badali wpływ eugenolu na wzrost *Salmonella typhi*. Eugenol wykazywał działanie bakteriostatyczne w stężeniu 0,0125% wobec *Salmonella typhi* i działanie bakteriobójcze przy stężeniu 0,025%. Otrzymane przez nich wyniki badań, sugerują, że eugenol uszkadza błonę cytoplazmatyczną powodując wyciek składników wewnątrzkomórkowych poza komórkę. Tippayatum i Chonhenchob (2007) zbadali wpływ tymolu i eugenolu na *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* i *Bacillus cereus*. Otrzymane przez nich wyniki również wskazywały na silniejsze działanie tymolu wobec badanych bakterii. W przypadku eugenolu, najniższe stężenie hamujące wzrost zanotowali wobec *E. coli* i *S. aureus* (8 mg/ml), natomiast tymol najefektywniej hamował wzrost

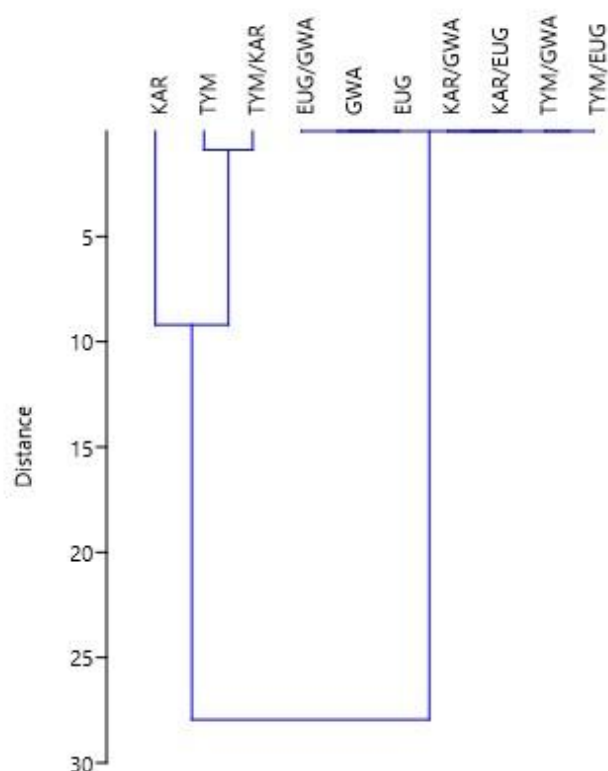
E. coli (3 mg/ml). Słabsza aktywność bakteriostatyczna eugenolu względem tymolu i karwakrolu, może być spowodowana jego mniejszą hydrofobowością i słabszym oddziaływaniem na lipidy błony komórkowej. Ponadto, położenie grupy metoksyłowej w pozycji orto może zakłócać uwalnianie jonów H⁺, zakłócając aktywność przeciwdrobnoustrojową (Arfa i wsp. 2006; Pinheiro i wsp. 2017). Arfa i wsp. (2006) badając zależność między strukturą chemiczną a aktywnością karwakrolu, eugenolu i dwóch związków pochodnych karwakrolu stwierdzili, że obecność wolnej grupy hydroksylowej w fenolach jest ważna dla aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Engel i wsp. (2017) oznaczyli wartości MIC = 0,662 mg/ml zarówno dla tymolu, jak i karwakrolu wobec *S. aureus*. Jednak Lambert i wsp. (2001) wykazali, że wartości MIC dla tymolu i karwakrolu wobec *S. aureus* były niższe i wynosiły odpowiednio 0,140 mg/ml i 0,175 mg/ml.

Badanie wspólnego (synergistycznego lub antagonistycznego) działania związków fenolowych naturalnie występujących w olejkach eterycznych na wzrost drobnoustrojów, było już wcześniej przeprowadzone. Pei i wsp. (2009) stwierdzili, że zastosowanie niektórych kombinacji związków biobójczych (aldehid cynamonowy/eugenol, tymol/eugenol, karwakrol/eugenol, tymol/karwakrol) skutkuje zmniejszeniem wartości MIC wobec *E. coli*. Skuteczniejsze hamowanie wzrostu bakterii, skutkuje zmniejszeniem stężenia potrzebnych związków aktywnych, zmniejszając odczuwanie ich charakterystycznego zapachu. Umożliwiając ich zastosowanie jako konserwanty do żywności. Wspólne działanie związków pochodzenia roślinnego było badane wobec *Staphylococcus epidermidis*. Tymol i aldehid cynamonowy działały synergistycznie na komórki planktonowe oraz biofilm. Również, zastosowanie aldehydu cynamonowego wraz z tymolem skutkowało lepszą biokompatybilnością względem linii komórkowej Vero, w porównaniu do działania samego aldehydu cynamonowego (Sharma i wsp. 2017).

Na podstawie danych zawartych w tabelach 3-6 wykonano grupowanie hierarchiczne metodą Warda otrzymując dendrogramy przedstawione na rycinach 6-9. Zobrazowano w ten sposób grupy tworzone przez badane związki.

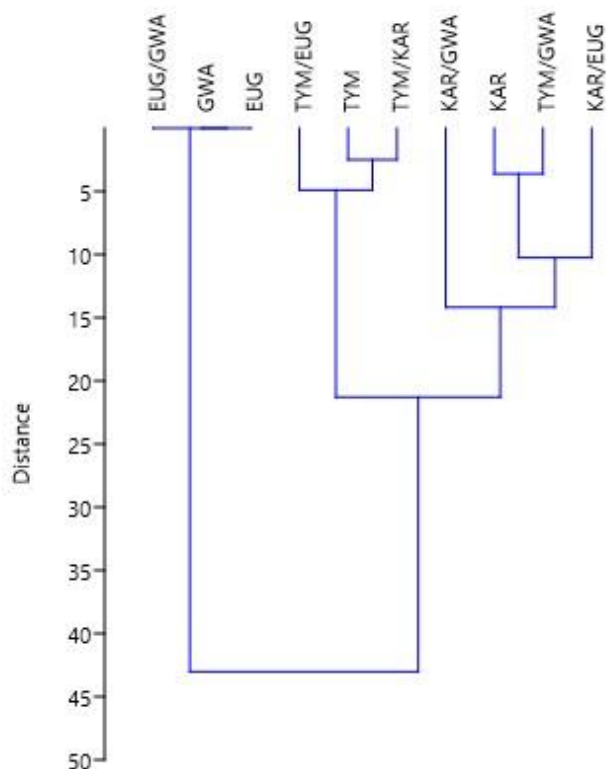
W przypadku najmniejszego stężenia fenoli (0,1 mg/cm²) wyodrębniają się dwie główne grupy (Ryc. 6). Najliczniejsza i najbardziej podobna jest grupa utworzona dla gwajakolu, eugenolu i mieszanin z ich udziałem. Były to te mieszaniny, które w teście dyfuzyjnym, w tym stężeniu, nie wykazały żadnego wpływu na badane drobnoustroje. Drugą grupą jest ta, tworzona przez tymol, karwakrol oraz ich mieszaninę. Różnice pomiędzy dwoma głównymi grupami są istotne statystycznie $p < 0,01$. W grupie drugiej, możemy wyodrębnić dwie podgrupy, jednak różnice między nimi nie są istotne statystycznie $p = 0,3$.



Rycina 6. Wyniki grupowania hierarchicznego wpływu związków fenolowych o stężeniu 0,1 mg/cm² na badane mikroorganizmy

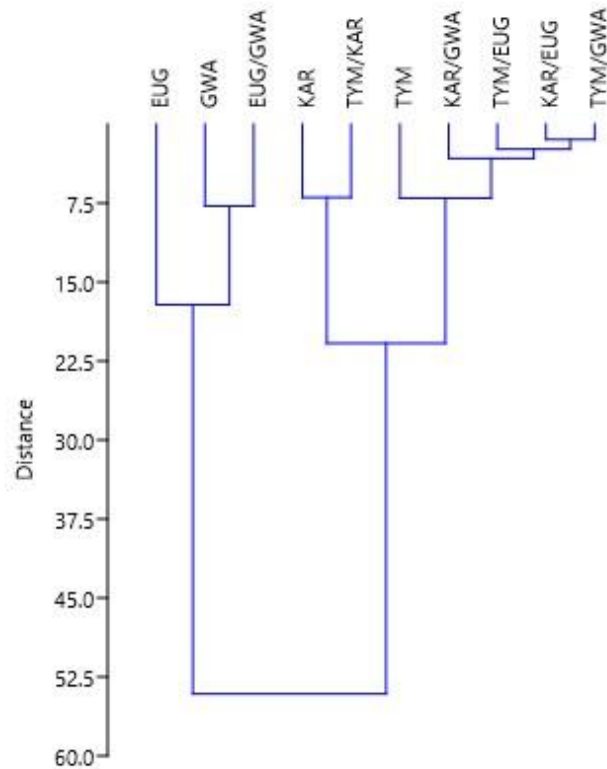
Na rycinie 7 przedstawiono wyniki grupowania hierarchicznego związków fenolowych zastosowanych w stężeniu 0,4 mg/cm². Wyodrębnić można dwie grupy główne. Pierwsza z nich składa się z eugenolu, gwajakolu i ich mieszaniny, druga z tymolu, karwakrolu i mieszanin z ich udziałem. Różnice

między grupami są istotne statystycznie ($p < 0,01$) i podział ten utrzymuje się również w przypadku większych stężeń (Ryc. 8-9). W drugiej grupie, możemy wyodrębnić dwie podgrupy, których różnice są istotne statystycznie ($p < 0,03$)



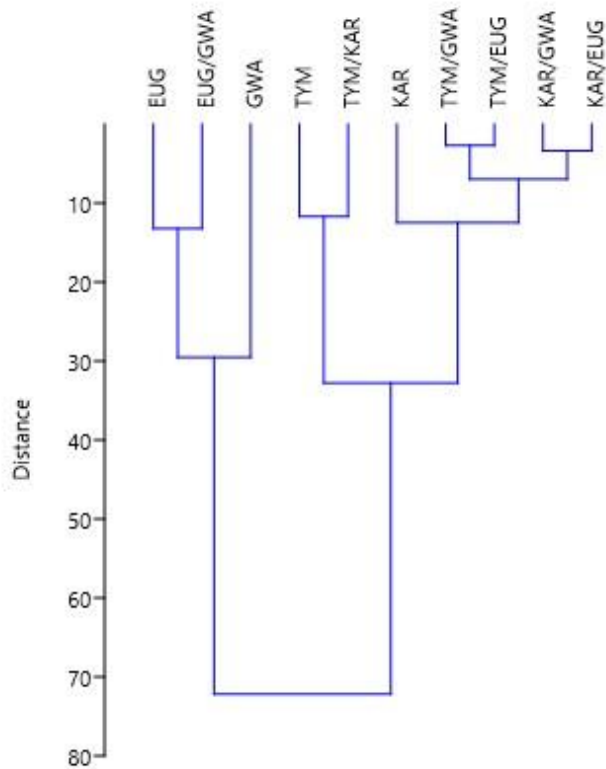
Rycina 7. Wyniki grupowania hierarchicznego wpływu związków fenolowych o stężeniu $0,4 \text{ mg/cm}^2$ na badane mikroorganizmy

Analizując grupy wyodrębnione dla związków fenolowych w stężeniu $1,0 \text{ mg/cm}^2$ (Ryc. 8) w grupie tworzonej przez tymol, karwakrol i mieszaniny z ich udziałem, wyodrębnić możemy dwie podgrupy. Pierwsza, zbudowana z karwakrolu i mieszaniny TYM/KAR oraz drugiej, składającej się z TYM; TYM/GWA; TYM/EUG; KAR/GWA; KAR/EUG. Różnice między tymi podgrupami są istotne statystycznie ($p < 0,05$). Tymol jest bardziej wyodrębniony niż pozostałe mieszaniny. Analizując różnice względem tymolu i pierwszej podgrupy (KAR; TYM/KAR) są one nieistotne statystycznie ($p = 0,32$).



Rycina 8. Wyniki grupowania hierarchicznego wpływu związków fenolowych o stężeniu 1,0 mg/cm² na badane mikroorganizmy

Wyniki grupowania hierarchicznego związków fenolowych o stężeniu 4,0 mg/cm², przedstawiono na rycinie 9. Zauważyć można podobny układ związków fenolowych i ich mieszanin w grupach jak w przypadku stężenia 1,0 mg/cm². Jediną różnicą było przyporządkowanie karwakrolu, a nie tymolu do podgrupy z TYM/GWA; TYM/EUG; KAR/GWA; KAR/EUG. Różnice pomiędzy tymolem, karwakralem i ich mieszaniną, względem podgrupy TYM/GWA; TYM/EUG; KAR/GWA; KAR/EUG były istotne statystycznie (p=0,03).

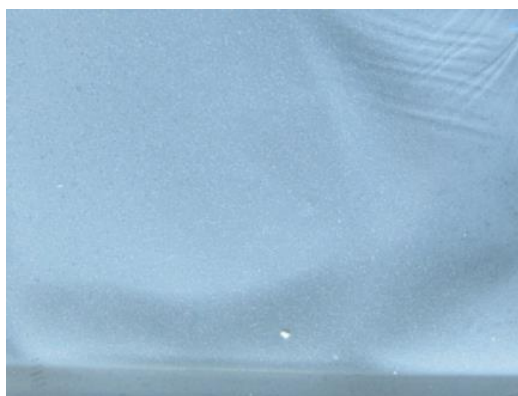


Rycina 9. Wyniki grupowania hierarchicznego wpływu związków fenolowych o stężeniu 4,0 mg/cm² na badane mikroorganizmy

Na podstawie uzyskanych wyników, do dalszych badań wykorzystano tymol, karwakrol oraz ich mieszaninę jako związki aktywne, które wbudowano do matryc kolagenowych.

4.2. Otrzymanie materiałów

Drugim celem szczegółowym niniejszej pracy było wyizolowanie kolagenu typu I ze ścięgien ogonów szczurzych a następnie wykorzystanie tego polimeru jako matrycy dla wytypowanych związków fenolowych i ich mieszaniny. Do otrzymania materiałów wykorzystano metodę odparowania rozpuszczalnika. Na rycinie 10 przedstawiono zdjęcie przykładowego materiału otrzymanego w trakcie realizacji badań.

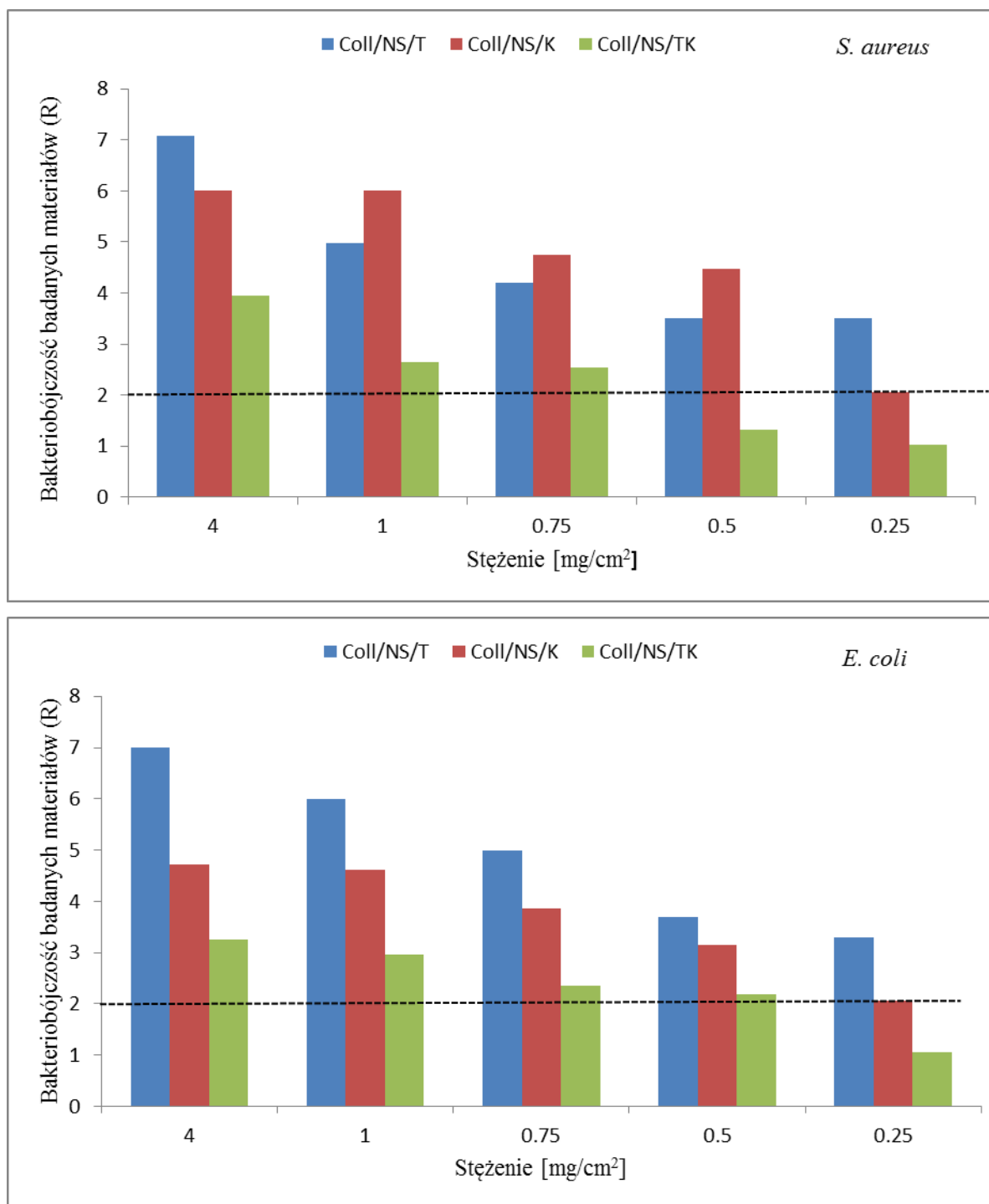


Rycina 10. Zdjęcie przykładowego materiału kolagenowego zawierającego tymol (fot. Michalska-Sionkowska)

4.3. Właściwości bakteriobójcze otrzymanych materiałów

Badanie właściwości bakteriobójczych otrzymanych materiałów przeprowadzono zgodnie z normą ISO 22196:2011. Przyjęto, że materiały wykazują właściwości bakteriobójcze jeżeli, redukują liczbę zdolnych do wzrostu komórek bakterii testowych względem próby kontrolnej o co najmniej 2 rzędy wielkości (współczynnik redukcji $R \geq 2$).

Na rycinie 11 przedstawiono w formie wykresów, wyniki właściwości bakteriobójczych materiałów kolagenowych z tymolem, karwakrolem i ich mieszaniną.



Rycina 11. Właściwości bakteriobójcze materiałów kolagenowych zawierających tymol, karwakrol i ich mieszaninę względem *S. aureus* i *E. coli*.

Wszystkie badane stężenia tymolu lub karwakrolu po 24 godzinnym czasie kontaktu powodowały redukcję liczby komórek bakteryjnych *S. aureus* zdolnych do wzrostu o co najmniej 2 rzędy wielkości ($R \geq 2$). Dlatego materiały te uznano za bakteriobójcze względem komórek *S. aureus*. Mieszanina tymol/karwakrol

wprowadzona do matrycy kolagenowej nie była tak efektywna. Współczynnikiem redukcji większym niż dwa ($R \geq 2$) charakteryzowały się jedynie materiały o stężeniu mieszaniny TYM/KAR w przedziale 0,75-4,0 mg/cm². Współczynnik redukcji R po kontakcie z materiałami Coll/NS/TK0.5 i Coll/NS/TK0.25 wynosił odpowiednio 1,31 i 1,02, dlatego nie można zaklasyfikować ich jako materiały bakteriobójcze. Karwakrol wprowadzony do matrycy w stężeniach 1,0-0,50 mg/cm² wykazywał większy współczynnik redukcji w porównaniu do materiałów z tymolem w tych samych stężeniach.

Materiały kolagenowe z tymolem powodowały największą redukcję liczby komórek bakteryjnych *E. coli*, zdolnych do wzrostu po 24 godzinnym czasie kontaktu. Wraz ze spadkiem stężenia tymolu wprowadzonego do matrycy, obserwowano stopniowy spadek działania bakteriobójczego. Materiały o stężeniu tymolu 4,0 mg/cm² redukowały liczbę komórek zdolnych do wzrostu o około 7 rzędów wielkości. Współczynnik redukcji dla materiałów Coll/NS/K0.25 i Coll/NS/TK0.25 był poniżej dwa ($R \leq 2$), dlatego materiały te nie zostały uznane za bakteriobójcze. Pozostałe materiały charakteryzowały się współczynnikiem redukcji powyżej dwa ($R \geq 2$). Pozwoliło to zaklasyfikować te materiały jako bakteriobójcze.

Lumbreras-Aguayo i wsp. (2019) osadzali kwas polimetakrylowy na włóknach gazy medycznej wzbogacając materiał w nZnO. Wyniki bakteriobójczości tych materiałów wykazały, że niemodyfikowana gaza medyczna nie wpływa na komórki bakteryjne. Natomiast, gaza modyfikowana kwasem polimetakrylowym, nawet bez wbudowanych nanocząstek cynku redukuje liczbę komórek zdolnych do wzrostu. W przypadku *S. epidermidis* zahamowanie wzrostu komórek było większe po aplikacji materiału z nanocząstkami cynku ($R=4,23$) w porównaniu do gazy z kwasem polimetakrylowym ($R=2$). W przypadku *E. coli*, zarówno gaza z kwasem polimetakrylowym bez i z wbudowanymi nanocząstkami redukowała liczbę komórek zdolnych do wzrostu o dwa rzędy wielkości ($R=2$). Działanie bakteriobójcze kwasu polimetakrylowego przypisano jego kwaśnemu pH, zakłócającemu homeostazę komórek, wpływającemu na działanie enzymów

i szlaków transportowych. Działanie bakteriobójcze nZnO zauważono wyłącznie względem *S. epidermidis*.

Materiały nanocelulozowe wykonane jako nośniki oktenidyny wykazywały silne działanie bakteriobójcze ($R \geq 6$) względem *S. aureus* nawet po 6 miesiącach ich przechowywania (Moritz i wsp. 2014). Natomiast, materiały wykonane z kopolimeru polihydroksymaślanu z włóknami kokosowymi do których wprowadzano 1-10% olejku z oregano, nie wykazywały działania bakteriobójczego wobec *S. aureus* zarówno po 24 godzinach jak i po 15 dniach kontaktu. Przeprowadzone metodą mikrorozcieńczeń badanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) wykazało, że MIC olejku jest czterokrotnie niższe względem olejku osadzonego na włóknach kokosowych, co przypisano stratom związanym z procesem rozpylania olejku i jego niejednorodnemu rozkładowi na włóknach (Torres-Giner i wsp. 2018).

Właściwości bakteriobójcze komercyjnie dostępnych materiałów alginianowych z jonami srebra i alginianowych z nanocząstkami srebra zostały zbadane względem *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* i *C. albicans* (Wiegand i wsp. 2009). W badaniu zastosowano materiały poliestrowe jako materiał kontrolny. Nie zaobserwowano wzrostu *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* i *E. coli* po 24 godzinnym czasie kontaktu z materiałem kontrolnym. Materiały zawierające w swoim składzie srebro, dodatkowo hamowały wzrost *S. aureus*. Jedynie materiały z nanocząstkami srebra całkowicie zahamowały wzrost *C. albicans*. Współczynnik R dla materiałów z jonami srebra wyniósł 1,8 natomiast, materiałów bez dodatku srebra – $R=0,7$ wobec *C. albicans* (Wiegand i wsp. 2009).

Wiegand i wsp. (2011) badali komercyjnie dostępne materiały zawierające w swoim składzie superabsorbent poliakrylanowy względem *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* i *C. albicans*. Największą redukcję komórek zdolnych do wzrostu zaobserwowano w badaniu *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae* po 6 godzinnym kontakcie ($R \geq 2$). Autorzy uznają jako zaletę tych materiałów to, że komórki mikroorganizmów przyklejają się do ich powierzchni i usuwane są mechanicznie z każdą zmianą opatrunku. Ponadto bakterie Gram ujemne są

bardziej podatne na niedobór wody spowodowany przez superabsorbent poliakrylanowy niż Gram dodatni *S. aureus* i drożdże *C. albicans*. Dlatego opatrunki te w większym stopniu hamują wzrost komórek bakterii Gram ujemnych.

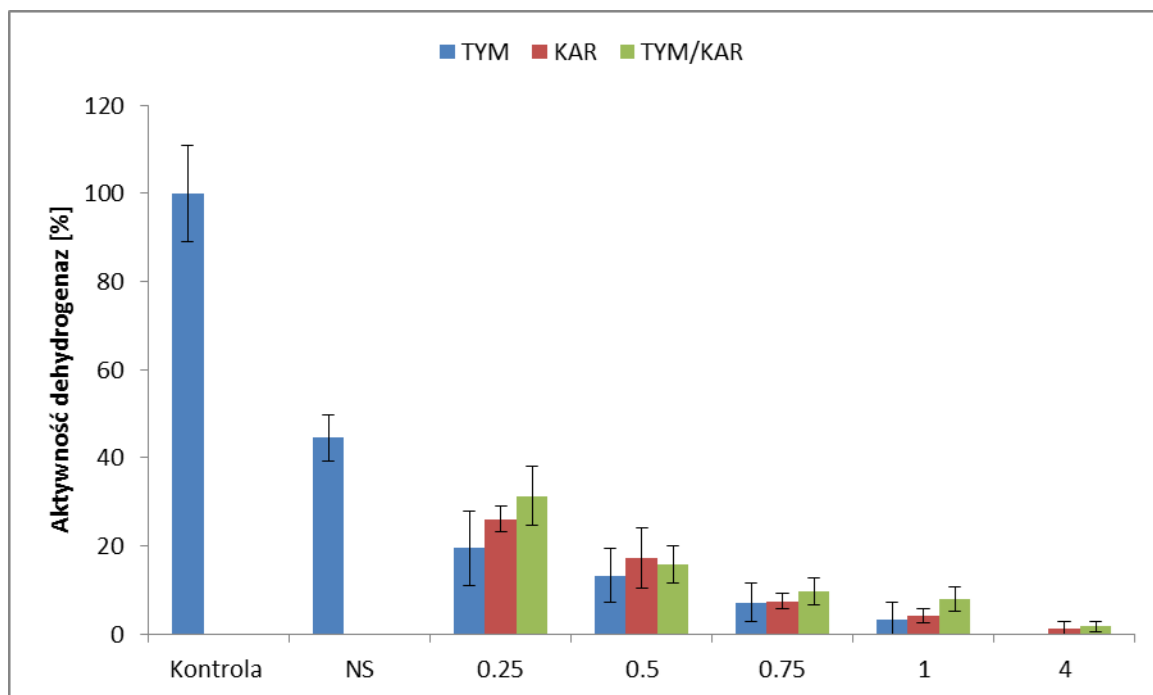
Filmy na bazie hydroksypropylometylocelulozy (HPMC) wzbogacone w olejek z oregano lub bergamotki działały bakteriobójczo względem *E. coli*. Stężenie 2% olejków w matrycy powodowało redukcję liczby komórek zdolnych do wzrostu o około 90% w obu przypadkach. Natomiast stężenie 1,5% powodowało około 80% redukcję. Olejek z bergamotki wprowadzony do matrycy z HPMC w stężeniu 1 i 0,5% powodował redukcję liczby komórek o odpowiednio 55 i 29%. Olejek z oregano był skuteczniejszy i redukował liczbę komórek *E. coli* o 37 i 72% w stężeniu 0,5 i 1% (Choi i wsp. 2016). Wartości te są jednak zbyt niskie, ponieważ $R \geq 2$ odpowiada redukcji o co najmniej 99% (Ghamrawi i wsp. 2017).

Wprowadzenie związków bakteriobójczych do matrycy może wpływać na ich działanie. Część z wprowadzanych do matrycy związków aktywnych może być utracona w procesie produkcji materiału. W przypadku tej analizy, związki aktywne nie muszą być uwalniane z materiału – działają w bezpośrednim kontakcie z komórkami bakteryjnymi. Również sam materiał może być odpowiedzialny za usuwanie komórek w sposób mechaniczny. Jednak podczas badań Coll/NS testowano odzysk komórek z materiału po 24 godzinnym czasie kontaktu. W porównaniu do liczebności wyjściowej zawiesiny bakteryjnej, liczba odzyskanych komórek zdolnych do wzrostu była mniejsza jedynie o jeden rząd wielkości ($R < 1$).

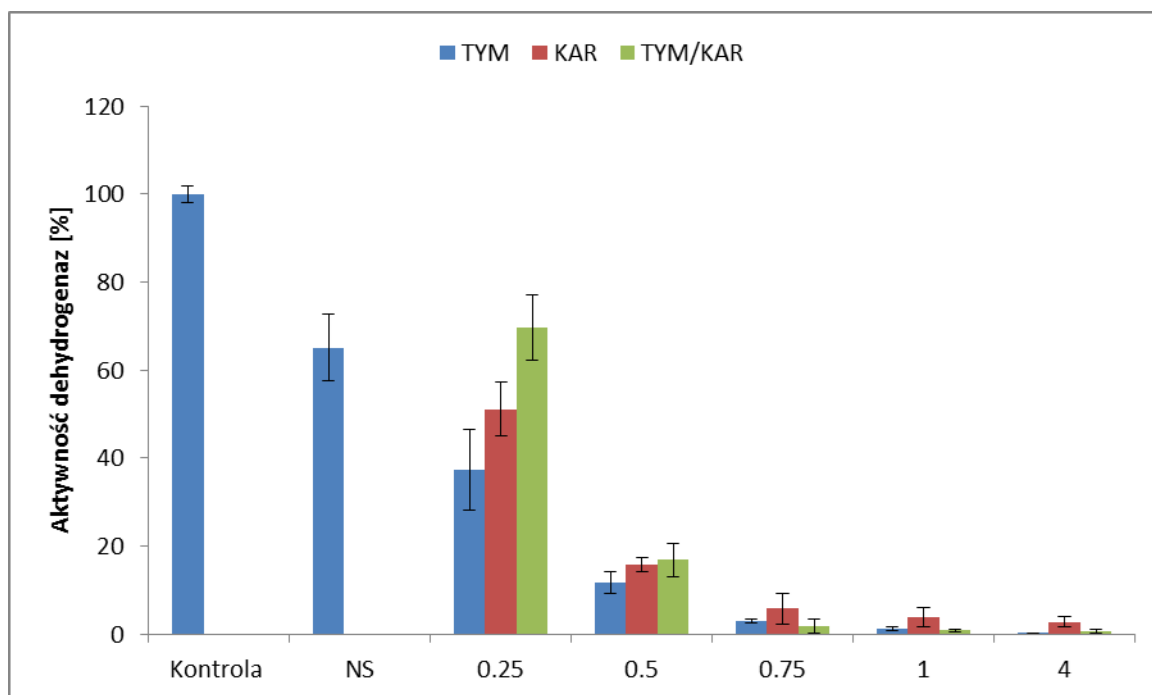
4.4. Wpływ materiałów na aktywność łańcucha transportu elektronów

Dehydrogenazy to enzymy należące do grupy oksydoreduktaz, zlokalizowane w błonie komórkowej w postaci kompleksu. Katalizują one utlenianie substratu w procesach oddychania (Kunicki-Goldfinger, 2006). Dehydrogenazy są enzymami wysoce specyficznymi, dla każdego utlenianego

w komórce substratu istnieje właściwa dla niego dehydrogenaza. Z reguły odłączają one od substratu naraz po dwa elektrony i po dwa protony przenosząc je bezpośrednio na tlen atmosferyczny lub za pomocą przenośników o wzrastającym potencjale oksydoredukcyjnym (Kunicki-Goldfinger, 2006). Aktywność dehydrogenaz szczepów *S. aureus* i *E.coli* po kontakcie z materiałami została przedstawiona na rycinie 12 i 13.



Rycina 12. Aktywność dehydrogenaz *S. aureus* po kontakcie z materiałami kolagenowymi z dodatkiem tymolu, karwakrolu i ich mieszaniny



Rycina 13. Aktywność dehydrogenaz *E. coli* po kontakcie z materiałami kolagenowymi z dodatkiem tymolu, karwakrolu i ich mieszaniny

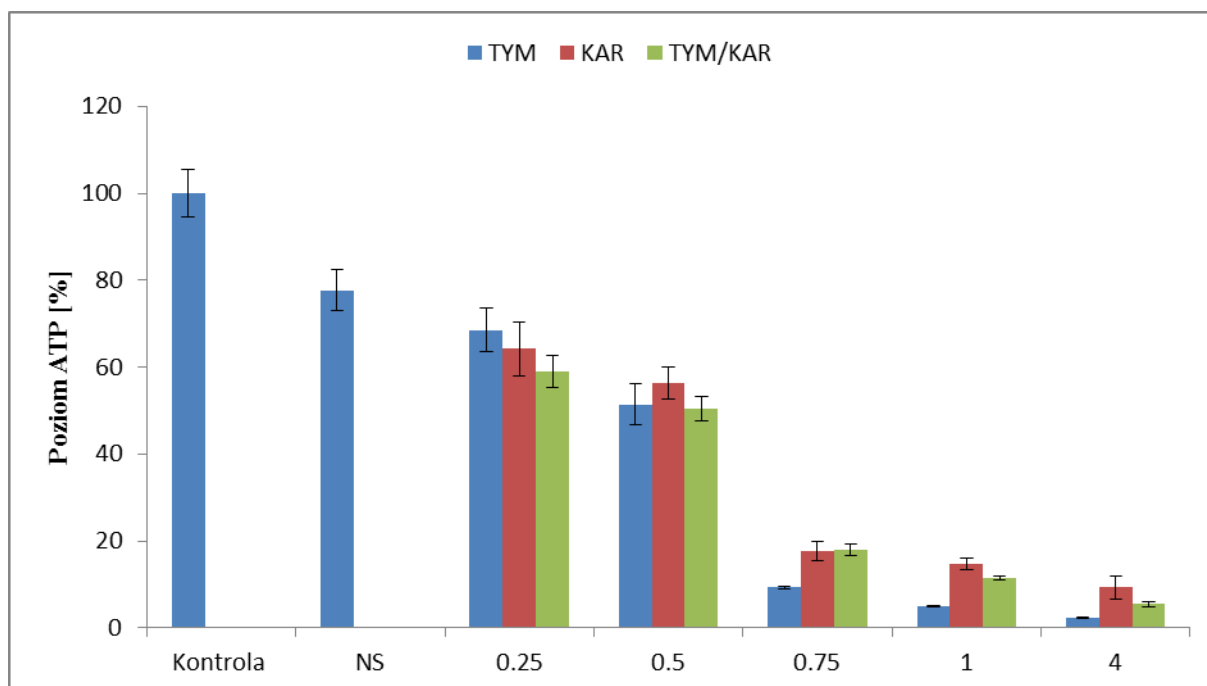
Materiał Coll/NS stanowiący materiał kontrolny, nie wykazywał działania bakteriobójczego (patrz 4.3.). Pomimo to, aktywność dehydrogenaz *S. aureus* i *E. coli* wynosiła odpowiednio 45% i 65% aktywności dehydrogenaz próby kontrolnej.

Aktywność dehydrogenaz *S. aureus* malała wraz ze wzrostem zawartości wszystkich badanych związków fenolowych w matrycach kolagenowych. Najlepiej hamującym aktywność tych enzymów okazał się tymol – najniższe zastosowane stężenie tymolu wprowadzone do materiału kolagenowego (0,25 mg/cm²) redukowało aktywność dehydrogenaz *S. aureus* do poziomu 20% już po 90 minutowym czasie kontaktu. Takie same stężenie karwakrolu i mieszaniny tymol/karwakrol powodowało spadek aktywności tych enzymów do odpowiednio 26% i 31%. Wszystkie związki aktywne w stężeniu 0,50 mg/cm² hamowały aktywność dehydrogenaz *S. aureus* - do 13-17% wartości kontrolnej. Najbardziej skuteczne było najwyższe stężenie – 4,0 mg/cm², które hamowało aktywność tych enzymów prawie całkowicie.

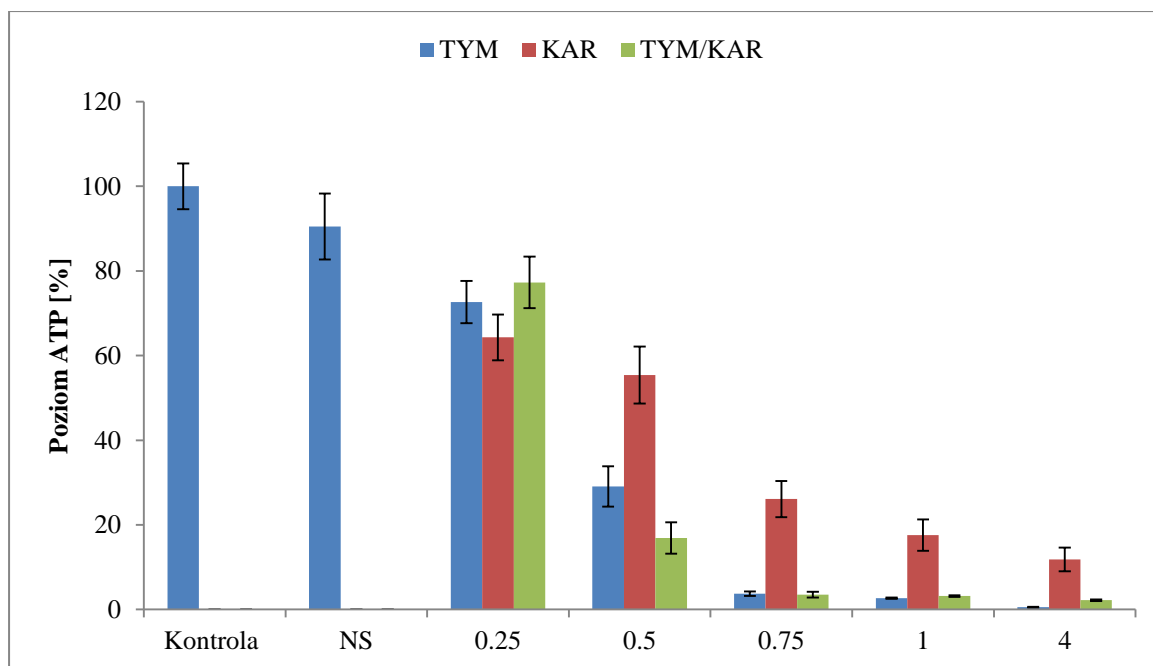
Podobną sytuację odnotowano w przypadku *E. coli*, dla której aktywność dehydrogenaz maleje wraz ze wzrostem stężenia związków fenolowych w matrycy. Najmniejsza dawka fenoli, hamowała aktywność dehydrogenaz *E. coli* do poziomu 37-70%. Jednak zastosowanie wyższych stężeń fenoli w matrycy kolagenowej skuteczniej hamowało aktywność tych enzymów u *E. coli*. Zawartość tymolu o stężeniu 4,0 mg/cm² powodowała brak aktywności dehydrogenaz *E. coli*. Po zastosowaniu karwakrolu i mieszaniny tymol/karwakrol aktywność dehydrogenaz wynosiła około 3% i 1% odpowiednio wartości wyjściowej.

4.5. Wpływ materiałów na ilość ATP syntetyzowanego przez komórki bakterii

Wyniki zawartości ATP zebrano w postaci umownych jednostek świetlnych (RLU, eng. relative light units). Wyniki przedstawiono jako wartość procentową poziomu ATP uznając kontrolę pozytywną jako 100%. Wyniki zawartości ATP zostały przedstawione na rycinach 14 i 15.



Rycina 14. Poziom ATP w komórkach *S.aureus* po kontakcie z materiałami



Rycina 15. Poziom ATP w komórkach *E. coli* po kontakcie z materiałami

Materiał Coll/NS, który nie został zaklasyfikowany jako materiał bakteriobójczy, ponieważ nie redukował liczby bakterii zdolnych do wzrostu o dwa rzędy wielkości, redukował poziom ATP o 10% i 22% odpowiednio dla *E. coli* i *S. aureus*.

W przypadku *S. aureus* synteza ATP maleje wraz ze wzrostem stężenia związków aktywnych w przygotowanych matrycach. Największy spadek syntezy ATP zanotowano po zastosowaniu materiałów o zawartości fenoli powyżej 0,75 mg/cm². Poziom ATP wynosił dla nich między 2-9% dla materiałów z tymolem, 9-18% dla materiałów z karwakrolem i 5-18% dla materiałów zawierających mieszaninę tymol/karwakrol względem próby kontrolnej. Po kontakcie z materiałami o zawartości fenoli 0,50 mg/cm² poziom ATP znajdował się w przedziale 50-56%. Natomiast najniższe stężenie związków aktywnych (0,25 mg/cm²) powodowało spadek poziomu ATP do 59-68%.

W przypadku prób *E. coli*, oprócz stężenia fenoli na zawartość ATP istotnie wpływa też ich rodzaj. Poziom ATP w próbach poddanych działaniu tych samych stężeń fenoli był najwyższy po zastosowaniu materiałów z karwakrolem w stężeniach 0,50-4,0 mg/cm² i znajdował się w przedziale 12-55%. Niższe

stężenie karwakrolu ($0,25 \text{ mg/cm}^2$) było jednak bardziej efektywne niż takie samo stężenie tymolu i mieszaniny tymol/karwakrol. Poziom ATP po zastosowaniu tymolu w stężeniach $0,50\text{-}4,0 \text{ mg/cm}^2$ wynosił między $0,5\text{-}29\%$ a dla mieszaniny tymol/karwakrol między $2\text{-}17\%$.

ATP jest uniwersalnym nośnikiem energii, a komórki mogą generować ATP podczas fosforylacji oksydacyjnej lub substratowej (Kramer i wsp. 2017). Dlatego aktywność dehydrogenaz i poziom ATP są ze sobą powiązane. W powyższym badaniu związek między stężeniem fenoli, aktywnością dehydrogenaz i poziomem ATP był podobny. Jednak poziom ATP był zawsze nieco mniej hamowany w porównaniu z aktywnością dehydrogenaz. Prawdopodobnie, ATP było nadal syntetyzowane podczas glikolizy i w cyklu kwasu cytrynowego. Ponadto różnice te mogą być spowodowane zastosowaną metodyką. Reakcja ATP i lucyferazy wymaga wyłącznie 5-cio minutowej inkubacji próbki, a redukcja soli tetrazoliowych zajmuje $1,5\text{-}4 \text{ h}$, w zależności od badanych komórek bakteryjnych (Promega, 2016). W tym czasie pewna część fenoli była nadal obecna w hodowli komórkowej, mimo że materiały oddzielono od zawiesiny komórek po dziewięćdziesięciu minutach kontaktu. Jest to rezultatem dyfuzji fenoli z matrycy kolagenowych do środowiska reakcji.

Tymol i niektóre inne związki fenolowe, które występują w olejkach eterycznych mają zdolność do interakcji z błoną komórkową bakterii za pomocą wiązań wodorowych. Prowadzi to do rozerwania błony i wycieku składników komórkowych (Cai i wsp. 2019). Churklam i wsp. (2020) zaobserwowali zmiany zwyrodnieniowe ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej oraz zaburzenia strukturalne komórek *Listeria monocytogenes* po kontakcie z karwakrolem. Otrzymane wyniki sugerowały, że karwakrol inaktywuje bakterie poprzez wieloczynnikowe działanie, które rozrywa błony komórkowe prowadząc do lizy komórek, a także hamuje aktywność oddechową drobnoustrojów. Dlatego hamowanie aktywności dehydrogenaz i poziomu ATP może być związane z mechanizmami działania przeciwdrobnoustrojowego.

4.6. Biokompatybilność

Udział całkowitej objętości erytrocytów w zdrowej ludzkiej krwi wynosi około 48%. Dlatego materiały, które mają kontakt z krwią powinny być badane pod względem hemokompatybilności (Rahimi i wsp. 2019). Biokompatybilność materiałów względem komórek krwi badano metodą bezpośredniego kontaktu. W tym teście bada się uwalnianie hemoglobiny do osocza z powodu uszkodzenia błon erytrocytów pod wpływem kontaktu z biomateriałem (Bajpai i wsp. 2015). Uszkodzenie erytrocytów po kontakcie z biomateriałami, które nie posiadają odpowiedniej hemokompatybilności może doprowadzić do niepożądanych odpowiedzi immunologicznych, powstawania zakrzepicy i zapalenia w miejscu rany, zakłócając cykl jej gojenia (Gharibi i wsp. 2019). W tabeli 7 przedstawiono wyniki badań wpływu otrzymanych materiałów na hemolizę krwi.

Tabela 7. Udział zhemolizowanych komórek krwi po kontakcie z badanymi materiałami

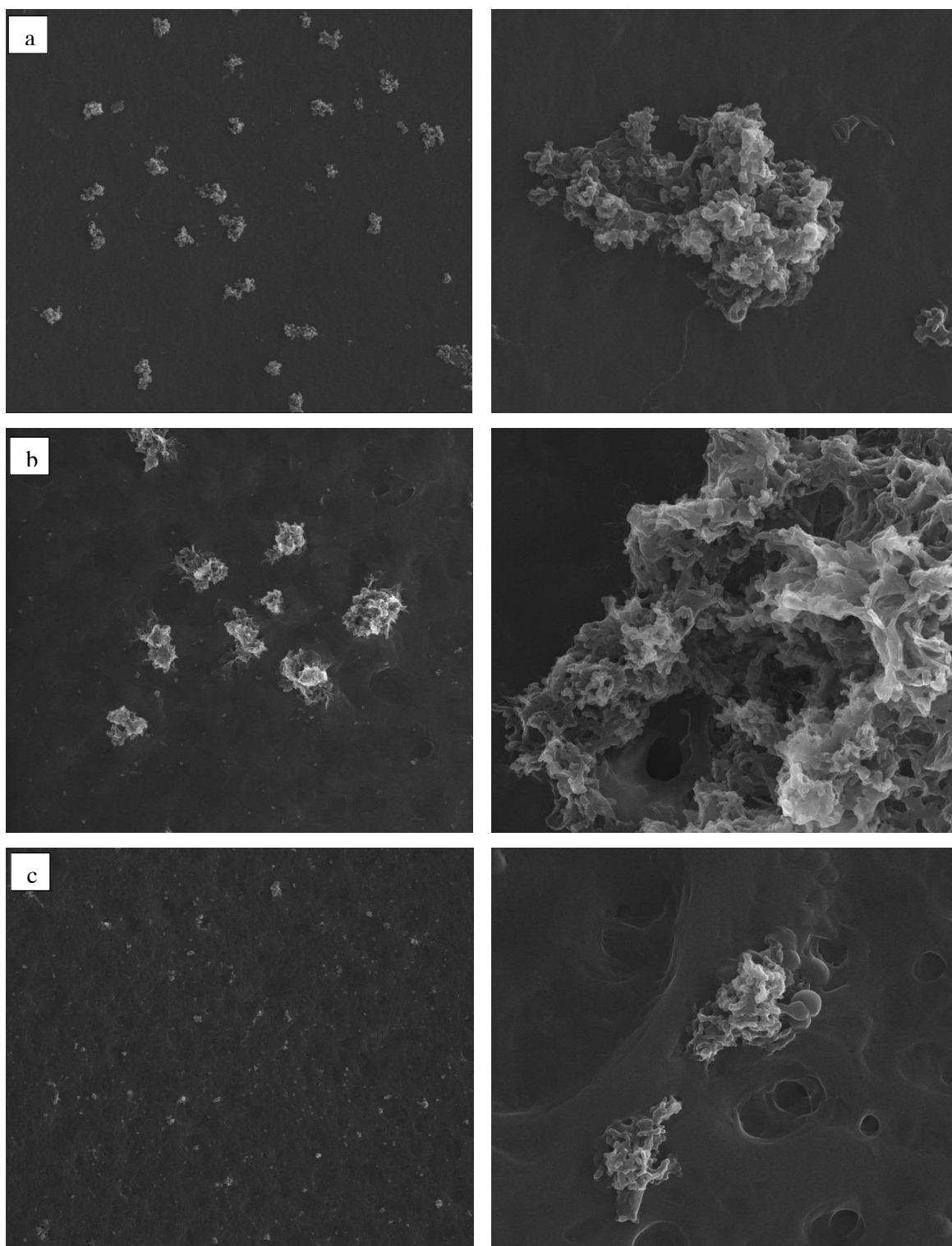
Material	Udział komórek zhemolizowanych [%]
Coll	0,1± 0,05
Coll/NS	5,5 ± 0,5
Coll/NS/T0.25	6,4 ± 0,7
Coll/NS/T0.5	7,1 ± 0,4
Coll/NS/T0.75	8,4 ± 1,4
Coll/NS/T1	12,2 ± 2,1
Coll/NS/T4	28,8 ± 2,6
Coll/NS/K0.25	6,6 ± 1,7
Coll/NS/K0.5	8,1± 0,8
Coll/NS/K0.75	9,2 ± 0,7
Coll/NS/K1	12,3 ± 2,4
Coll/NS/K4	31,4 ± 2,6
Coll/NS/TK0.25	6,6 ± 1,8
Coll/NS/TK0.5	9,1 ± 0,8
Coll/NS/TK0.75	9,2 ± 1,6
Coll/NS/TK1	18,1 ± 1,8
Coll/NS/TK4	25,1 ± 2,3

Zgodnie ze standardem ASTM F756-00 materiały dzieli się na niehemolizujące, lekko hemolizujące i hemolizujące. Za niehemolizujące uważane są te charakteryzujące się udziałem zhemolizowanych erytrocytów do 2%, te powodujące hemolizę w przedziale 2-5% uważane są za lekko hemolizujące i >5% klasyfikowane są jako hemolizujące (Pires i wsp. 2018). Materiał kolagenowy uznany został za niehemolizujący, ponieważ odpowiadał za hemolizę około 0,1% erytrocytów. Pozostałe materiały, charakteryzowały się hemolizą komórek krwi powyżej 5%, która w przypadku najwyższych stężeń związków fenolowych sięgała do około 30%. Warto zwrócić uwagę na wyniki hemolizy kolagenu z dodatkiem niejonowego surfaktantu, który znacząco pogarszał jego parametry biologiczne. Materiały z małymi dodatkami związków fenolowych (<0,75 mg/cm²) w porównaniu do Coll/NS, zwiększały hemolizę krwi o <5%. Zamiana Polisorbate 80 na inny surfaktant, mogłaby korzystniej wpłynąć na właściwości hemokompatybilne materiałów ze związkami fenolowymi. Inni autorzy wykazali niehemolizujący charakter tymolu i olejków eterycznych a nawet zauważyli zmniejszenie hemolizy (Chaouche i wsp. 2015; Manikandan i wsp. 2017; Pires i wsp. 2018). Biorąc pod uwagę niehemolizujący charakter materiału kolagenowego oraz różnice <5% pomiędzy Coll/NS a materiałami z niewielką ilością związków fenolowych, można przypuszczać, że jest możliwe otrzymanie materiału kolagenowego o właściwościach bakteriobójczych będących jednocześnie materiałami biokompatybilnymi.

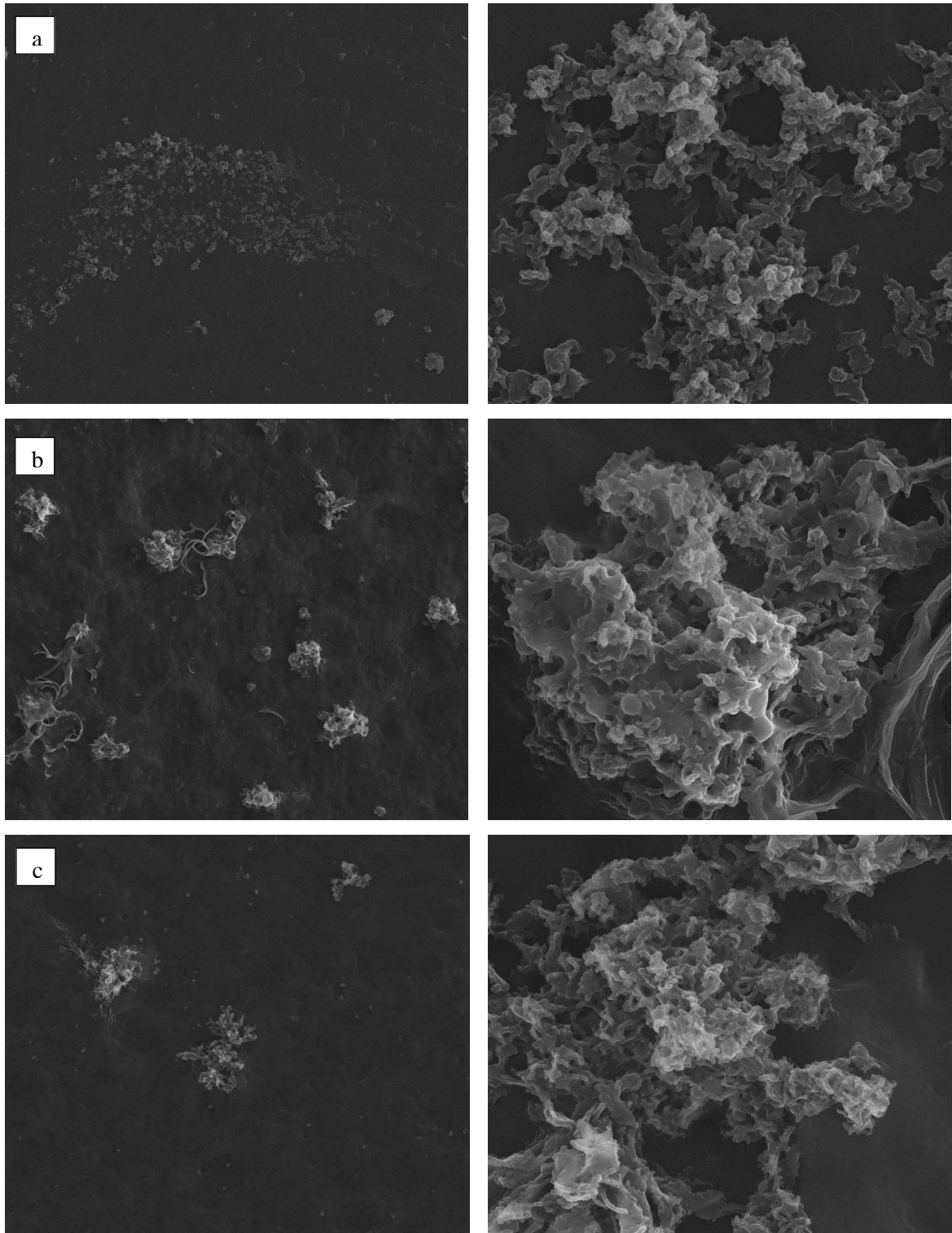
4.7. Tworzenie biofilmu na powierzchni badanych materiałów

Biofilm definiuje się jako zmienione fenotypowo skupiska drobnoustrojów przymocowane do powierzchni biotycznych lub abiotycznych za pomocą produkowanych przez nie pozakomórkowych substancji polimerowych (egzopolisacharydów-EPS) (Kucera i wsp. 2014). EPS składa się głównie z polisacharydów, białek, zewnątrzkomórkowego DNA, glikoprotein, lipidów, kwasów lipopolisacharydów i kwasów lipotejchojowych. EPS wraz z wodą (chroniącą biofilm przed wysuszeniem) tworzy macierz, która chroni drobnoustroje przed czynnikami zewnętrznymi (Czyżewska-Dors i wsp. 2018).

Zakażenia powodowane przez obecność biofilmu w ranach mogą opóźniać ich gojenie, powodować martwicę tkanek i zakażenia ogólnoustrojowe. *Staphylococcus aureus* jest najczęściej izolowaną bakterią z ran przewlekłych zakażonych biofilmem (Hasan i wsp. 2019). Dlatego zbadano wpływ dodatku tymolu w matrycy kolagenowej na tworzenie biofilmu przez *Staphylococcus aureus*. Na rycinach 16 i 17 przedstawiono przykładowe zdjęcia biofilmu utworzonego na powierzchni badanych materiałów po 5 i 10 dobach.



Rycina 16. Biofilm utworzony przez *Staphylococcus aureus* po 5 dobach na powierzchni: a- Coll/NS; b- Coll/NS/T0.5; c- Coll/NS/T0.75 w powiększeniu 2000 i 20 000 razy



Rycina 17. Biofilm utworzony przez *Staphylococcus aureus* po 10 dobach na powierzchni: a- Coll/NS; b- Coll/NS/T0.5; c- Coll/NS/T0.75 w powiększeniu 2000 i 20 000 razy

Na rycinie 16a struktury biofilmowe rozmieszczone są równomiernie na materiale. Struktury biofilmowe na powierzchni materiału bez dodatku tymolu po 5 dobach są mniejsze ale liczniejsze w porównaniu do tych, utworzonych na powierzchni materiału z 0,50 mg tymolu (Coll/NS/T0.5). Na powierzchni materiału z 0,75 mg tymolu, zaobserwowano redukcję w formowaniu biofilmu. Struktury biofilmu zostały zanalizowane na podstawie zdjęć mikroskopowych wykonanych dla powiększenia 20 000 razy. Struktury biofilmowe powstałe na powierzchni kontrolnej, zbudowane są z komórek. Biofilm widoczny na materiale Coll/NS/T0.5 zbudowany jest zarówno z komórek bakteryjnych jak i zewnątrzkomórkowych struktur polimerowych. Komórek nie zaobserwowano na powierzchni materiału Coll/NS/T0.75. Jedynie struktury polimerowe bez komórek bakteryjnych były obecne na powierzchni filmu.

Po 10 dobach (Ryc. 17) na powierzchni kontrolnej (Coll/NS) widoczna jest duża ilość struktur biofilmowych, jednak są one mniejsze w porównaniu do tych, utworzonych po 5 dobach. Na powierzchni materiałów z tymolem, ilość powstałych struktur jest mniejsza, w porównaniu do Coll/NS, zarówno po 5 i 10 dobach. Jednak w powiększeniu 20 000 razy, nie obserwuje się komórek bakteryjnych wbudowanych w struktury biofilmowe. Tworzone są one jedynie przez inne struktury, prawdopodobnie egzopolisacharydy. Tymol zaburza integralność błony komórkowej, prowadząc do wycieku zawartości komórki i jej śmierci (Wang i wsp. 2017). Dlatego te nieznanne struktury budujące biofilm mogą być pozostałościami po zdegradowanych komórkach. Powyższe wyniki sugerują, że nie tylko stężenie, ale i czas ekspozycji na tymol wpływa na tworzenie biofilmu przez *S. aureus*.

Zahamowanie tworzenia biofilmu *S. aureus* zaobserwowano po aplikacji olejków eterycznych *Lippia sidoides*, *Thymus vulgaris* i *Pimenta pseudochariophyllus*. Autorzy sugerują, że duża zawartość tymolu, karwakrolu, eugenolu i chlawibetolu oraz synergistyczne działanie pozostałych związków wchodzących w skład olejków, wpłynęło na tak wysoką efektywność w hamowaniu biofilmu (Vázquez-Sánchez i wsp. 2018). Ponadto, zastosowanie mieszanin olejków eterycznych, pozwoliło na zredukowanie skutecznej dawki, co wpływa korzystnie na późniejszą

przemysłową aplikację (Vázquez-Sánchez i wsp. 2018). Wang i wsp. (2018) zaobserwowali, że tymol hamuje powstawanie biofilmu *Actinobacillus pleuropneumoniae*, a także reguluje ich patogenność zmniejszając czynniki wirulencji Apx I i Apx II. Miladi i wsp. (2017) zauważyli, że zastosowanie tymolu, wpływa na zmniejszenie masy biofilmu szczepów *Salmonella typhimurium*. Ponadto, na zdjęciach SEM zauważono, że błona bakteryjna została uszkodzona. W niektórych miejscach, widoczna była również całkowita utrata integralności błon (Miladi i wsp. 2017).

4.8. Degradacja enzymatyczna w warunkach *in vitro*

Kolagenazy to enzymy proteolityczne należące do macierzowych metaloproteinaz, obecne są w wysiękach rany. Kolagenazy posiadają zdolność hydrolizowania superhelisy kolagenowej (Lipka i Boratyński, 2008). Dlatego materiały pozostające w kontakcie z nimi mogą tracić masę i swoją strukturę (Kaczmarek i wsp. 2018b). Kolagenaza preferencyjnie hydrolizuje wiązanie X-Gly w sekwencji specyficznej kolagenu R-Pro-X-Gly-Pro (Sionkowska i Kozłowska 2013; Inoue i wsp. 1996). Kolagenazy MMP-1 (Kolagenaza I, śródmiąższowa), MMP-8 (Kolagenaza II) i MMP-13 (Kolagenaza III) zdolne są do degradacji kolagenu typu I, II, III, VII, VIII, X (Trojanek, 2013).

Wyniki degradacji enzymatycznej w warunkach *in vitro* w kontakcie z kolagenazą typu I przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Wyniki degradacji enzymatycznej materiałów kolagenowych z dodatkiem tymolu

Material	Degradacja enzymatyczna [%]
Coll/NS	73,2 ± 1,3
Coll/NS/T0.25	51,5 ± 0,9
Coll/NS/T0.5	71,1 ± 1,1
Coll/NS/T0.75	73,5 ± 1,0
Coll/NS/T1	73,2 ± 1,1
Coll/NS/T4	73,4 ± 1,7

Degradacja enzymatyczna przygotowanych materiałów wynosi około 73%. Zawartość tymolu nie wpływa na podatność materiału na degradację. Jedynym materiałem, który był bardziej odporny na działanie kolagenazy był Coll/NS/T0.25 (degradacja 51%). Wyniki te nie są jednoznaczne z wynikami degradacji materiałów w środowisku buforu PBS (pH=7,4 patrz 4.13.), gdzie wraz ze stężeniem tymolu obserwowano większy stopień utraty masy. Dodatkowo degradacja enzymatyczna zachodziła w sposób nagły w krótkim czasie. Kaczmarek i wsp. (2018b) uzyskali wyniki degradacji enzymatycznej, świadczące o tym, że kolagen szczurzy typu I degradował w około 23% z zastosowaniem tej samej metodyki. Dlatego można zauważyć, że na szybkość degradacji miał wpływ dodatek niejonowego surfaktantu.

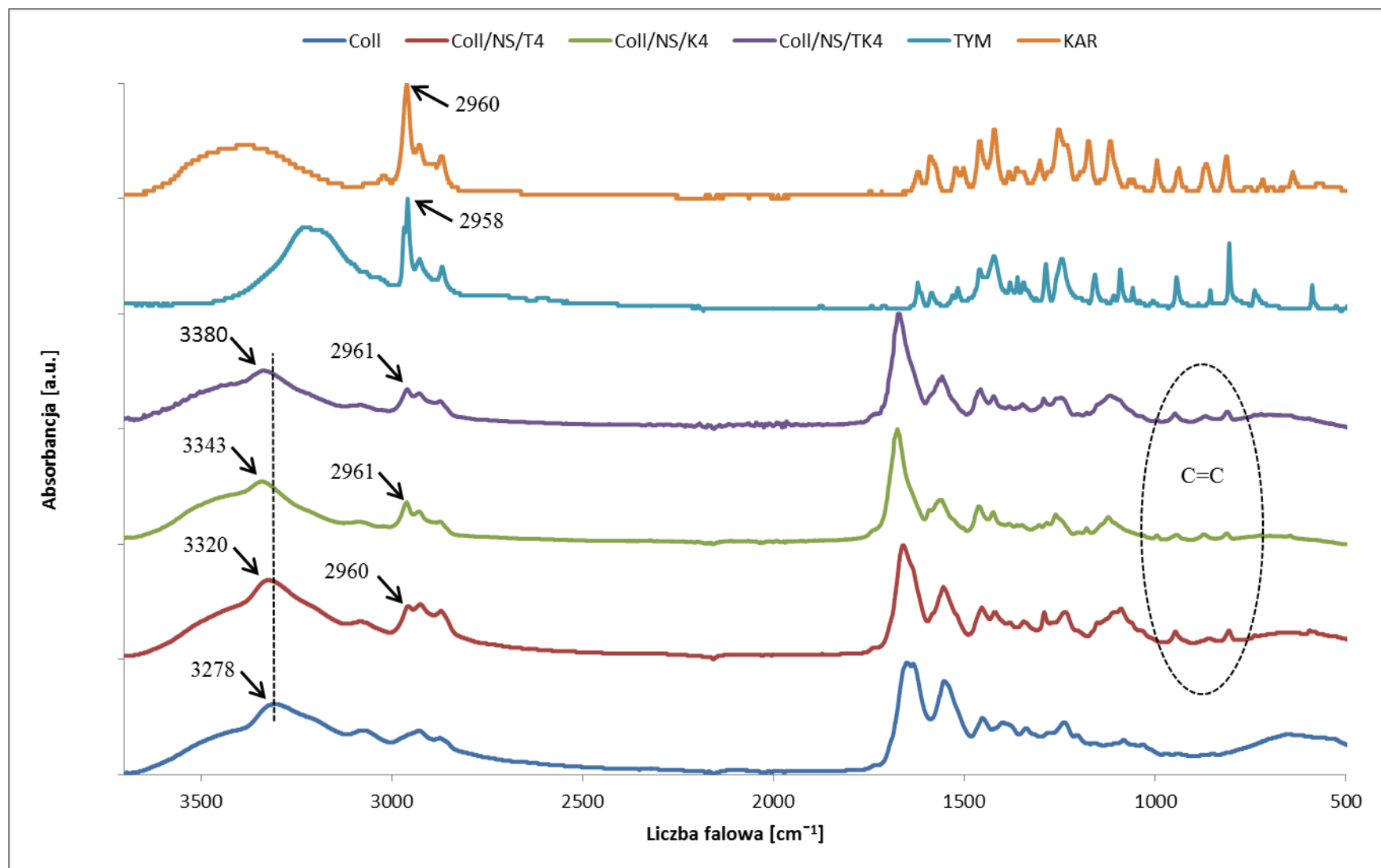
Materiał opatrunkowy na bazie kolagenu za sprawą aktywności kolagenazy może stanowić dodatkowe źródło białka wykorzystane w procesie angiogenezy i przebudowy tkanki (Oryan i wsp. 2018). Dlatego degradacja materiału pod wpływem tego enzymu wydaje się być pożądanym zjawiskiem. Zaletą jest również brak wpływu tymolu na jego aktywność. Z drugiej jednak strony, degradacja ta zachodziła zbyt szybko. Prawdopodobnie zastosowanie czynnika sieciującego kolagen, wydłużyłoby proces jego degradacji. Obserwacje takie otrzymały Sionkowska i Kozłowska (2013). Przygotowane przez nie rusztowania na bazie kolagenu i fosforanu wapnia degradowały w około 60%, natomiast materiały sieciowane mieszaniną EDC/NHS traciły około 20% swojej masy po takim samym czasie degradacji.

4.9. Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni

Spektroskopia podczerwieni FTIR może być wykorzystana do potwierdzenia struktury chemicznej polimeru, jak również, do identyfikacji interakcji pomiędzy grupami funkcyjnymi polimeru i związków aktywnych. Metoda ta została użyta przez Koosehgoł i wsp. (2017) by zdefiniować interakcje między grupami funkcyjnymi chitozanu i tymolu w materiałach do zastosowań biomedycznych oraz w wielu pracach dotyczących materiałów kolagenowych (Lewandowska i wsp. 2016; Sankar i wsp. 2008; Kumar i wsp. 2010; Sionkowska

i wsp. 2015). Ponieważ metoda FTIR może być stosowana tylko w przypadku próbek przezroczystych, dla materiałów kolagenowych z wbudowanymi związkami fenolowymi (nieprzezroczystymi) wykorzystano spektroskopię osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR). Przedstawione widma zostały poddane korekcji ATR oraz zostały znormalizowane.

Na rycinie 18 przedstawiono widma ATR-FTIR materiału kolagenowego oraz materiałów kolagenowych z tymolem, karwakralem i ich mieszaniną a także pojedynczych, nie wbudowanych w matrycę fenoli.



Rycina 18. Widma ATR-FTIR wykonane dla tymolu, karwakrolu i kolagenu a także materiałów na ich bazie

Główne pasma rejestrowane dla kolagenu odpowiadają liczbom falowym: 3278, 3082, 1648, 1550 i 1242 cm^{-1} i są charakterystyczne dla próbek kolagenowych. Liczba falowa $\nu=3278 \text{ cm}^{-1}$ przypisywana jest pasmu amidowemu A (drgania rozciągające wiązania N-H), $\nu=3082 \text{ cm}^{-1}$ – pasmu amidowemu B (drgania rozciągające wiązania C-N). Maksima pasm amidowych I (80% drgań rozciągających grupy karbonylowej C=O) i II (40% drgań rozciągających grupy C-N oraz 60% drgań skręcających grupy N-H) znajdują się przy liczbach falowych 1648 i 1550 cm^{-1} . (Wiśniewski i wsp. 2007). Liczba falowa 1242 cm^{-1} przypisywana jest maksimum pasma amidowego III (Michalska-Sionkowska i wsp. 2017). Pasma amidowe III pochodzi w 40% od drgań rozciągających grupy C-N a także od drgań skręcających (w płaszczyźnie) grupy N-H (30%) i od drgań rozciągających grupy $\text{CH}_3\text{-C-}$ (20%) (Majzner i wsp. 2013). Głównymi aminokwasami budującymi kolagen są glicyna, prolina i hydroksyprolina. Obecność proliny i hydroksyproliny a także zdolność grupy N-H do tworzenia wiązań wodorowych, wpływa na położenia pasma amidowego A. W widmie kolagenu obserwuje się pasmo amidowe A przy liczbie falowej w zakresie $\nu= 3325\text{-}3330 \text{ cm}^{-1}$, następuje jego przesunięcie o przynajmniej 25 cm^{-1} w stronę wyższych wartości w porównaniu do widm innych białek (Wiśniewski i wsp. 2007).

Charakterystyczne pasma widm w podczerwieni, otrzymanych dla tymolu i karwakrolu, pokazują maksimum przy liczbie falowej $\nu=3221$ i $\nu=3387 \text{ cm}^{-1}$ odpowiednio. Związane jest to z obecnością grup hydroksylowych (-OH) w cząsteczce. Maksimum pasm przy $\nu=2958$ i $\nu=2960 \text{ cm}^{-1}$, przypisywane jest występowaniu grup $-\text{CH}_3$. Związki fenolowe zawierają w swojej cząsteczce grupy hydroksylowe, bezpośrednio związane z atomami węgla w pierścieniu aromatycznym. Jego obecność zarejestrowana na widmach ATR-FTIR przejawia się występowaniem maksimum pasma w zakresie 1600-1400 oraz w regionie około 800 cm^{-1} , przypisywana do drgań rozciągających wiązania C-C oraz C=C (Altan i wsp. 2018). Charakterystyczne pasma absorpcji dla tymolu i karwakrolu zostały zarejestrowane przy liczbach falowych 1621-1422 cm^{-1} oraz $\nu=805 \text{ cm}^{-1}$

widma tymolu i $\nu=811\text{ cm}^{-1}$ widma karwakrolu. Schulz i wsp. (2005) zaobserwowali najintensywniejsze pasma dla tymolu i karwakrolu odpowiednio dla liczby falowej 804 cm^{-1} i 811 cm^{-1} wskazujące na obecność pierścienia aromatycznego w ich cząsteczkach. W zakresie liczb falowych $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ obserwuje się wibracje pasm C-O, spowodowane drganiami rozciągającymi C-OH (Turki i wsp. 2018). W przypadku tymolu i karwakrolu, maksima tych pasm zarejestrowano przy liczbach falowych 1244 i 1248 cm^{-1} .

Na widmach ATR-FTIR dla materiałów kolagenowych z wbudowanymi związkami fenolowymi, nie obserwujemy dodatkowych pasm. Jednakże, istotną różnicą względem widma zarejestrowanego dla kolagenu, jest przesunięcie maksimów pasma amidowego A (N-H rozciągające) oraz -OH w stronę wyższych wartości. Maksima pasma amidowego A rejestrowano przy liczbie falowej: 3320 , 3343 i 3380 cm^{-1} dla kolejno, Coll/NS/T4, Coll/NS/K4, Coll/NS/TK4. Podobną zależność zaobserwowano dla widm rejestrowanych dla włókien zeinowych z karwakrolem, gdzie maksimum absorpcji rejestrowano przy liczbie falowej $\nu=3413\text{ cm}^{-1}$ dla włókien z zeiny. Dodatek karwakrolu w objętości 5, 10, 20% spowodował przesunięcie maksimów absorpcji na $\nu=3436$, 3435 i 3437 cm^{-1} (Altan i wsp. 2018). Przesunięcia maksimów absorpcji w tym zakresie (około 200 cm^{-1}) zarejestrowano dla tymolu wbudowanego w celulozę, tłumacząc tę zmianę oddziaływaniami między tymolem a polimerem (Zamani i wsp. 2015). Zaobserwowane przesunięcia maksimów pasm N-H, -OH prawdopodobnie spowodowane są wystąpieniem interakcji pomiędzy grupami funkcyjnymi fenoli i kolagenu, gdzie tworzą się oddziaływania wodorowe między grupami -NH białka i -OH fenoli. Pozostałe maksima absorpcji charakterystyczne dla związków fenolowych jak i kolagenu, występują również w ich mieszaninach. Dlatego też, obecność tymolu i karwakrolu, została potwierdzona na podstawie analizy FTIR. Koosehgoi i wsp. (2017) charakteryzując materiały hydrożelowe na bazie chitozanu i glikolu polietylenowego z tymolem metodą FTIR, nie zauważyli żadnych znaczących interakcji pomiędzy grupami funkcyjnymi polimerów i tymolu. Nie zaobserwowano również zmian w intensywności maksimów pasm a także przesunięć liczby fal w materiałach chitozanowych z wbudowanym

olejkiem tymiankowym. Na tej podstawie stwierdzono, że włączenie do materiału chitozanowego, olejku tymiankowego nie spowodowało większych zmian strukturalnych (Altiok i wsp. 2010).

4.10. Topografia i chropowatość powierzchni

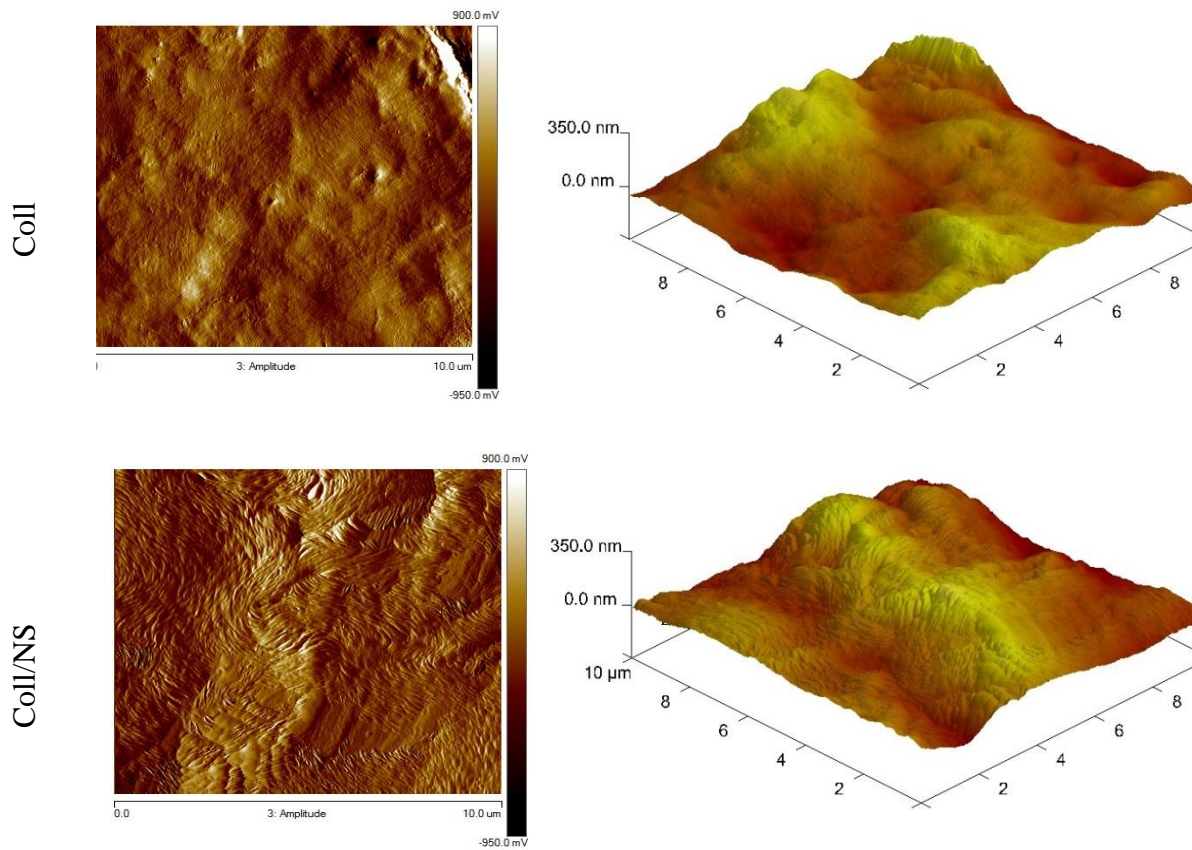
Analiza zdjęć AFM jest zwykle stosowana do pozyskiwania szczegółowych informacji jakościowych i ilościowych o powierzchni materiałów. Struktura, morfologia i chropowatość filmów polimerowych może być oceniona na podstawie zdjęć AFM (Hosseini i wsp. 2016). Zdjęcia 2D i 3D uzyskanych materiałów przedstawiono na rycinach 19-24, natomiast średnie wartości chropowatości zostały przedstawione w tabeli 9.

Tabela 9. Chropowatość powierzchni materiałów

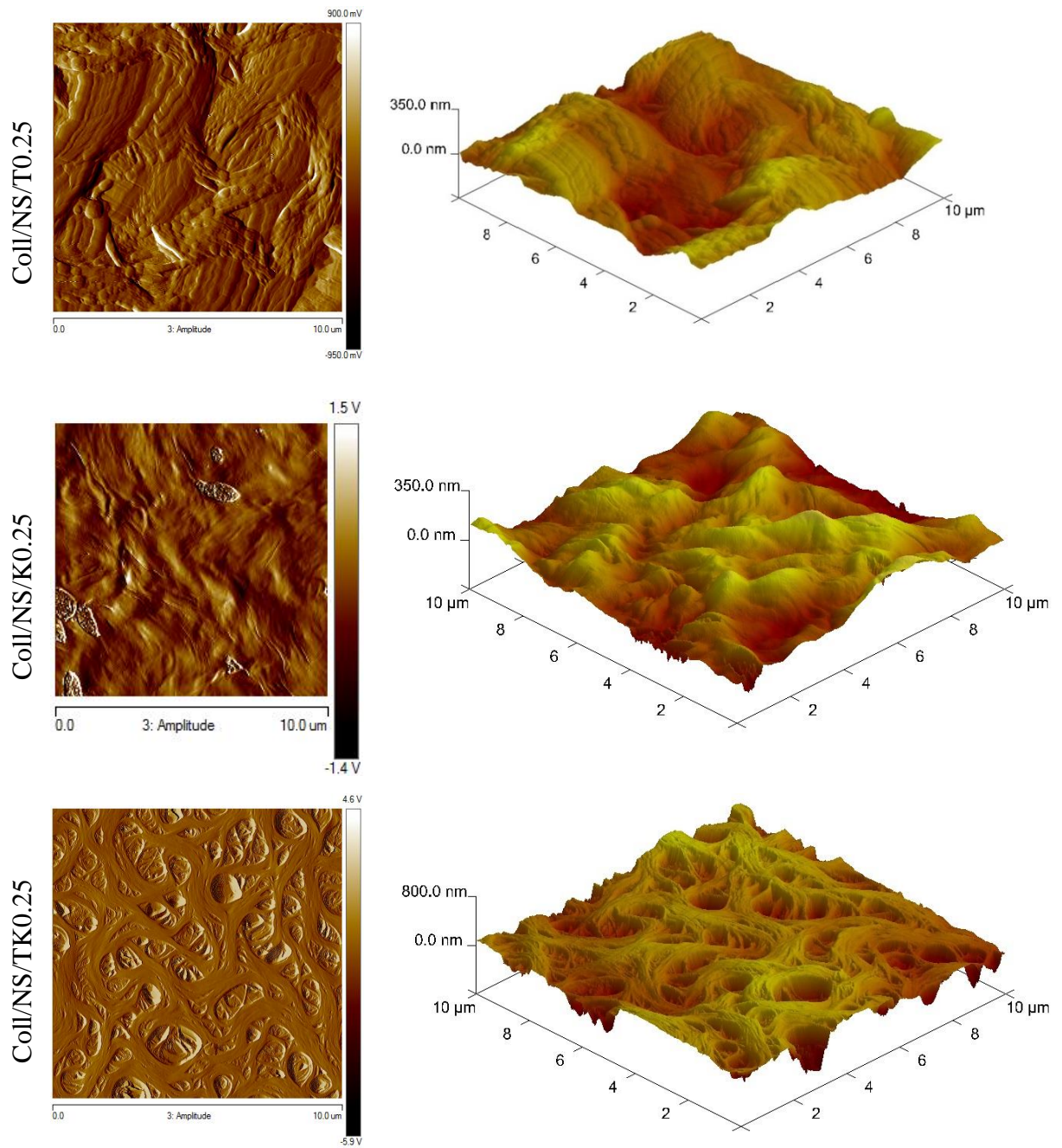
Stężenie [mg/cm ²]	Chropowatość [nm]					
	Tymol		Karwakrol		Tymol/Karwakrol	
	Ra	Rq	Ra	Rq	Ra	Rq
4	202,0	172,0	45,1	31,1	147,0	118,0
1	109,0	86,0	76,9	60,4	129,0	105,0
0.75	88,5	67,0	177,0	134,0	141,0	116,0
0.5	90,8	66,5	157,0	124,0	134,0	104,0
0.25	49,5	40,5	64,7	52,4	121,0	93,7
kontrola	Ra			Rq		
Coll	57,0			46,3		
Coll/NS	54,4			43,9		

Ra- średnie arytmetyczne odchylenie profilu od linii średniej mierzone wzdłuż odcinka pomiarowego

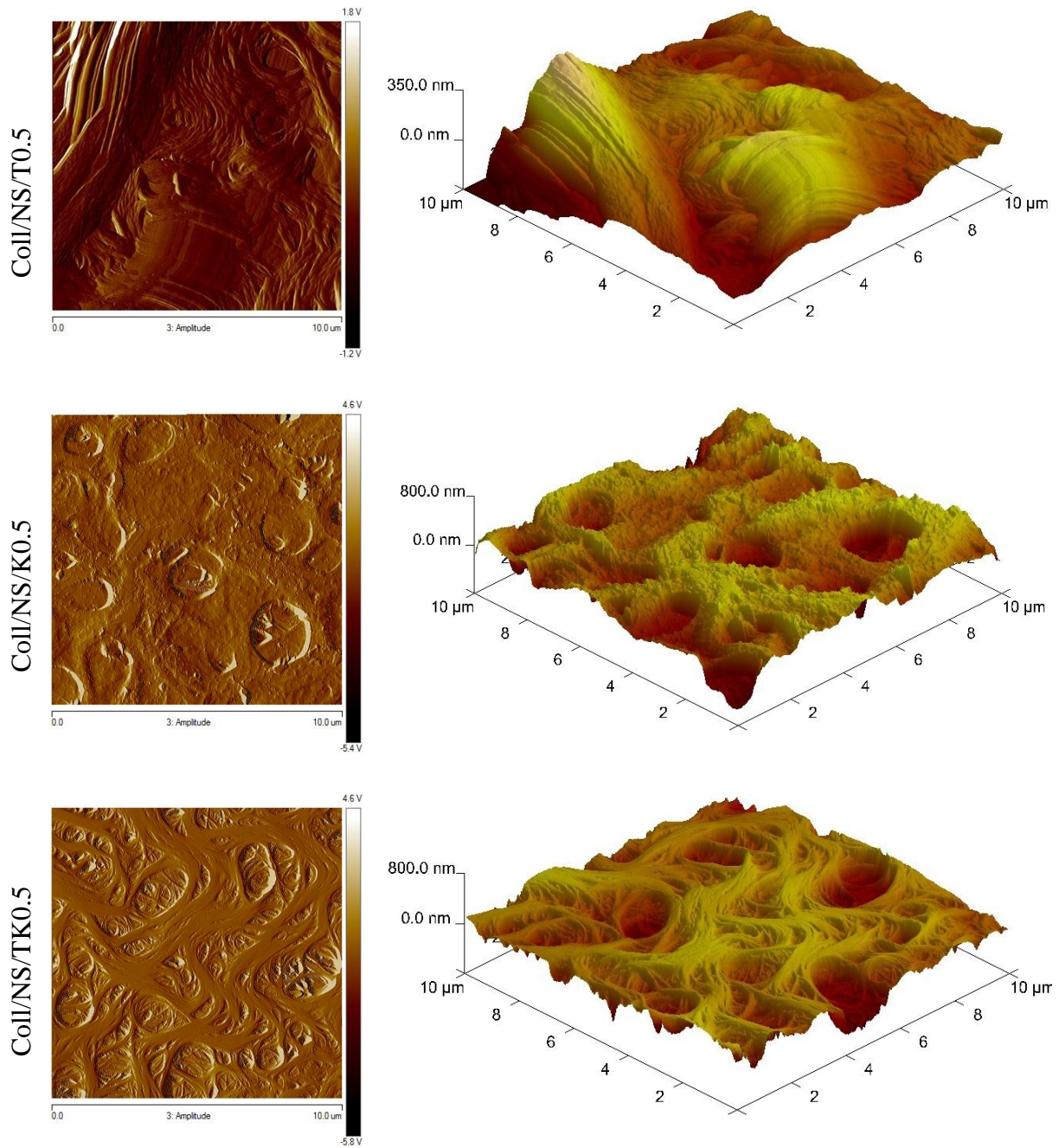
Rq- średnie kwadratowe odchylenie profilu od linii średniej wzdłuż odcinka pomiarowego



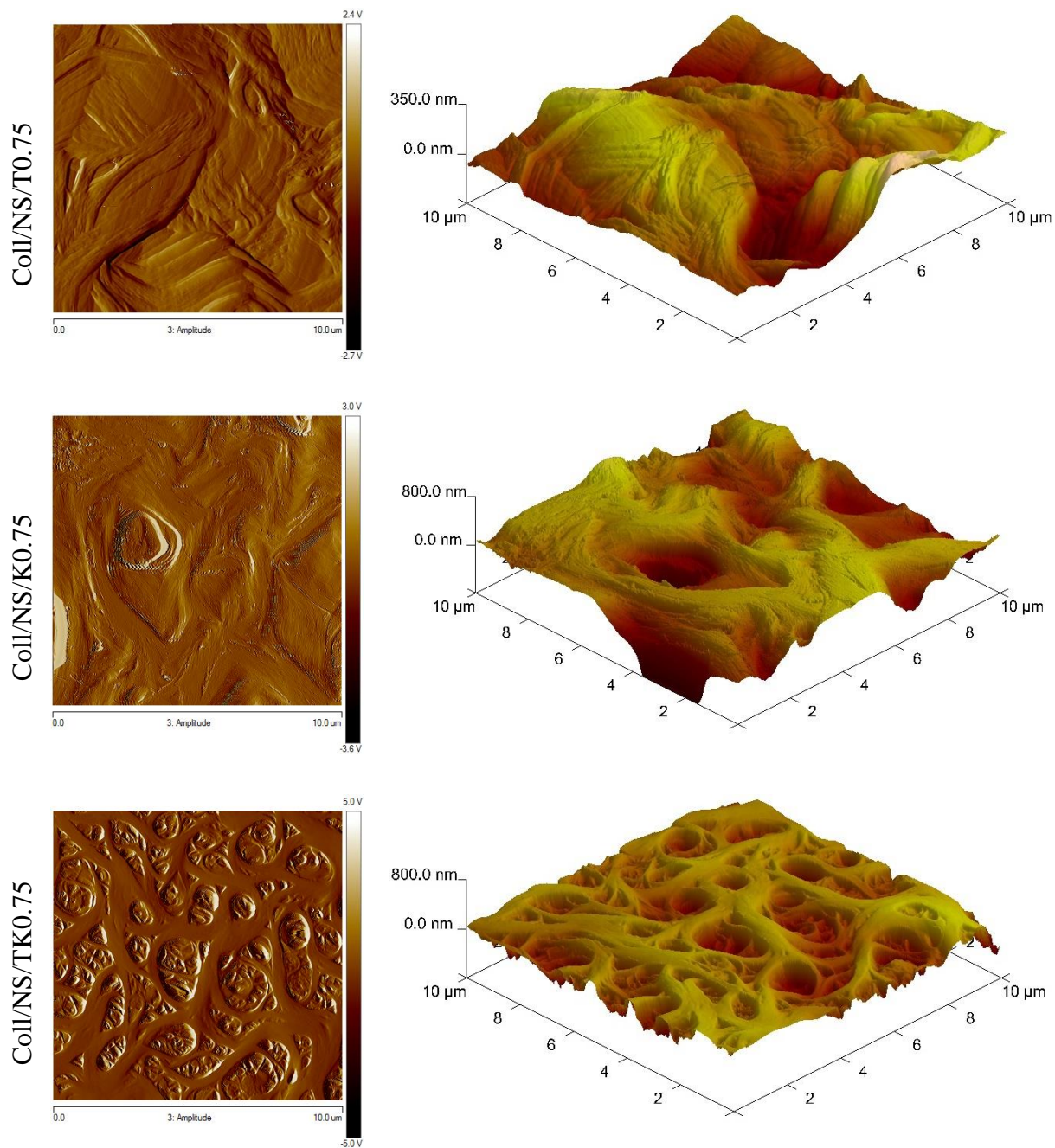
Rycina 19. Topografia powierzchni materiału kolagenowego i materiału kolagenowego z dodatkiem niejonowego surfaktantu



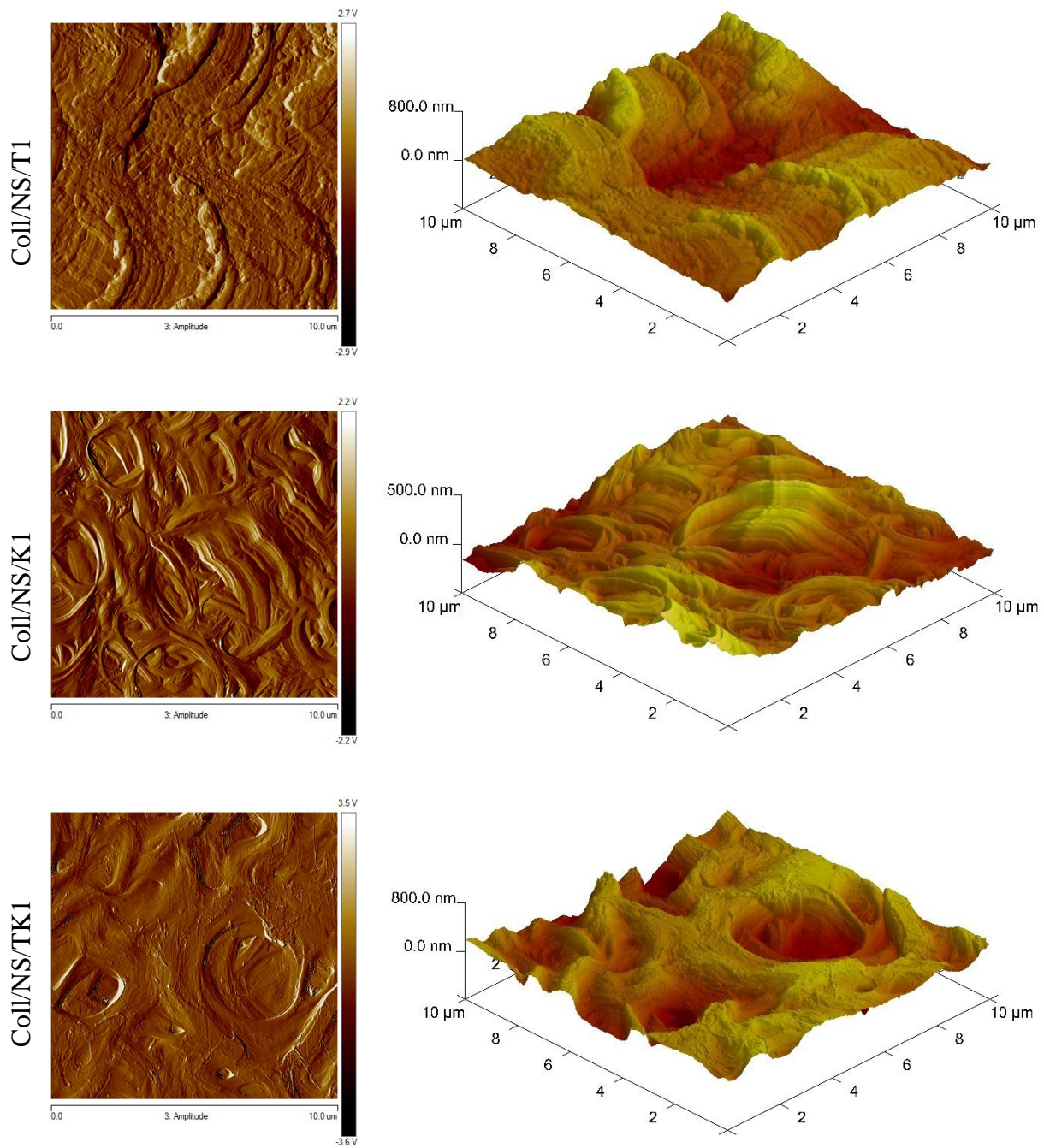
Rycina 20. Topografia powierzchni materiałów kolagenowych wzbogaconych w tymol i karwakrol oraz ich mieszaninę o stężeniu $0,25\text{mg}/\text{cm}^2$



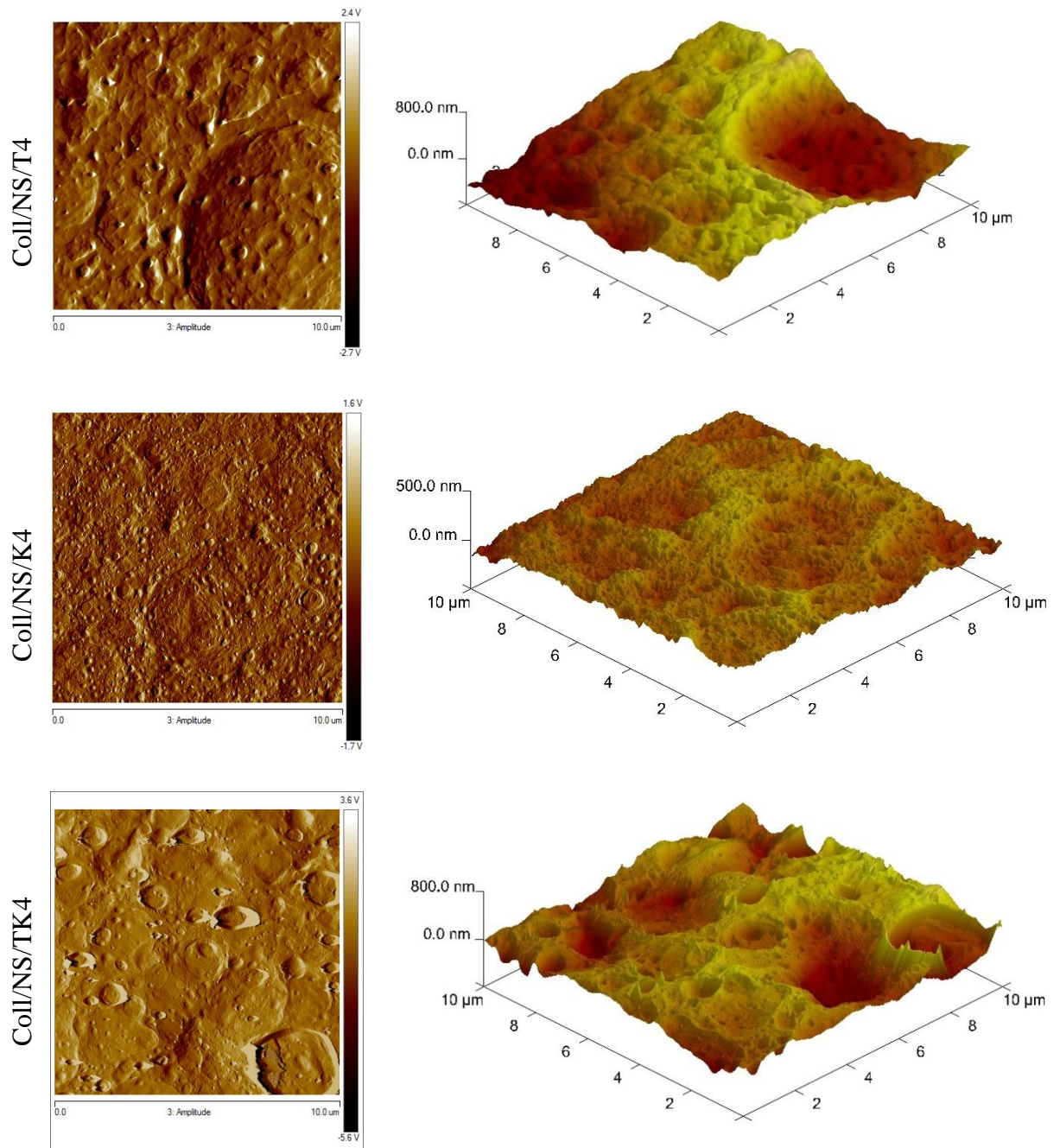
Rycina 21. Topografia powierzchni materiałów kolagenowych wzbogaconych w tymol i karwakrol oraz ich mieszaninę o stężeniu $0,50 \text{ mg/cm}^2$



Rycina 22. Topografia powierzchni materiałów kolagenowych wzbogaconych w tymol i karwakrol oraz ich mieszaninę o stężeniu $0,75\text{mg}/\text{cm}^2$



Rycina 23. Topografia powierzchni materiałów kolagenowych wzbogaconych w tymol i karwakrol oraz ich mieszaninę o stężeniu $1,0 \text{ mg/cm}^2$



Rycina 24. Topografia powierzchni materiałów kolagenowych wzbogaconych w tymol i karwakrol oraz ich mieszaninę o stężeniu $4,0 \text{ mg/cm}^2$

Struktura powierzchni materiału kolagenowego jest bardziej homogeniczna względem pozostałych próbek. Analizując zdjęcia AFM, nie jest łatwo dostrzec strukturę potrójnej helisy kolagenu, ze względu na jej małe rozmiary względem chropowatości powierzchni (Sionkowska, 2003). Topografia powierzchni materiału zmienia się po dodaniu niejonowego surfaktantu, gdzie na powierzchni można dostrzec mikrofałdy. Jednak chropowatość powierzchni Coll/NS ($R_a=54,4$ nm, $R_q=43,9$ nm) w porównaniu do Coll ($R_a=57,0$ nm, $R_q=46,3$ nm) jest podobna. Dodatek tymolu powoduje, że mikrofałdy zwiększają swoją długość i szerokość wraz ze wzrostem stężenia tymolu w materiale kolagenowym. Skutkuje to rosnącą chropowatością powierzchni. Materiał z największym stężeniem tymolu, różni się topografią. Na jego powierzchni można zobaczyć nieuporządkowane rozłożone i niejednorodne rozmiarowo wklęsnięcia, powodujące dużą chropowatość powierzchni ($R_a=202,0$ nm i $R_q=172,0$ nm). Natomiast mały dodatek tymolu ($0,25$ mg/cm²) powoduje zmniejszenie chropowatości $R_a=49,5$ nm i $R_q=40,5$ nm względem prób kontrolnych.

W przypadku materiałów z wbudowanym karwakralem, nie widać zależności pomiędzy chropowatością a stężeniem karwakrału. Najniższą chropowatością charakteryzował się materiał z Coll/NS/K4. Pomimo tego, topografia powierzchni materiału z najwyższą zawartością karwakrału była podobna do tej z $4,0$ mg/cm² tymolu. Tu również można zaobserwować, wklęsnięcia w postaci kraterów na powierzchni a nie fałdy, jednak ich rozmiar i położenie jest bardziej uporządkowane niż w próbce z tymolem. Podobnymi wartościami chropowatości względem prób kontrolnych, charakteryzował się materiał Coll/NS/K0.25, $R_a=64,7$ nm i $R_q=52,4$ nm, z mikrofałdami na powierzchni. Wartości chropowatości Coll/NS/K0.5 i Coll/NS/K0.75 są znacznie wyższe względem wartości chropowatości próbek z tymolem o tych samych stężeniach. Analizując topografię powierzchni, można zauważyć zarówno mikrofałdy jak i duże, ale pojedyncze wklęsnięcia na powierzchni.

Struktura topografii powierzchni materiałów z mieszaniną tymolu i karwakrału jest włóknista z kraterowatymi wklęsnięciami. Wszystkie materiały z mieszaniną fenoli, charakteryzowały się bardzo dużą chropowatością R_a

w zakresie 121-147 nm. Chropowatość nie rosła wraz ze wzrostem stężenia związków biobójczych w materiale. Porównując jednak zdjęcia o najwyższych stężeniach tymolu, karwakrolu i ich mieszaniny, można zaobserwować podobną topografię struktury powierzchni.

Hosseini i wsp. (2015) zauważyli, że 0,4% dodatek olejku eterycznego z *Origanum vulgare* L. do folii żelatynowo-chitozanowych powoduje znaczne zmniejszenie chropowatości materiału. Natomiast, większa zawartość olejku eterycznego, powoduje wzrost chropowatości i pojawienie się nieregularnej struktury powierzchni. Podobne wyniki uzyskali Atarés i wsp. (2010) badając filmy na bazie izolatu białka sojowego z olejkiem cynamonowym lub imbirowym. Po wprowadzeniu małej ilości stężenia obu olejków chropowatość powierzchni malała. Natomiast wraz ze wzrostem stężenia olejku imbirowego obserwowano jej wzrost. Autorzy sugerują, że olejek cynamonowy jest bardziej zintegrowany z matrycą białkową, co skutkuje bardziej regularną strukturą powierzchni w porównaniu do materiału z olejkiem imbirowym. Obecność olejków eterycznych z *Zataria multiflora* Boiss lub *Mentha pulegium* (mięta polna) powodowała spadek chropowatości powierzchni materiału na bazie skrobi kukurydzianej. Jednak, wraz ze wzrostem stężenia olejku z *Zataria multiflora* Boiss w materiale, wzrastała chropowatość. Na podstawie zdjęć AFM autorzy uznali, że olejek eteryczny z *Mentha pulegium* pozostaje bardziej zintegrowany z matrycą, dlatego powierzchnia pozostała gładka (Ghasemlou i wsp. 2013). Prawdopodobnie, bardziej płaska powierzchnia, spowodowana jest przez wypełnianie nieregularności powierzchni przez kropelki fazy rozproszonej migrujące na powierzchnię materiału w procesie śmietanowania (przejaw niestabilności emulsji, podczas którego krople oleju fazy rozproszonej unoszą się ku górze, oddzielając od fazy wodnej). Natomiast większe stężenie olejku, powoduje zwiększenie chropowatości, poprzez agregację kropelek olejku, na powierzchni materiału podczas suszenia (Ghasemlou i wsp. 2013; Atarés i wsp. 2010). Przez ich ciekły stan skupienia, aparat AFM pracujący w trybie drgania rejestruje je jako puste przestrzenie (Atarés i wsp. 2010).

Na podstawie zdjęć SEM (Scanning electron microscope) Koosehgol i wsp. (2017) oceniali strukturę i przekrój materiałów na bazie chitozanu i glikolu polietylenowego z tymolem. Zaobserwowali oni niejednorodny wzrost chropowatości powierzchni wraz ze wzrostem stężenia tymolu w materiale. Autorzy sugerują, że jest to związane z odparowaniem pewnej ilości tymolu w procesie przygotowania materiału, jednak jego część zostaje zatrzymana między łańcuchami polimerowymi. Obecność fenoli w materiałach kolagenowych została potwierdzona przez FTIR oraz testy bakteriobójcze. Altiok i wsp. (2010) na zdjęciach SEM powierzchni chitozanu z wprowadzonym olejkiem tymiankowym, obserwowali zagłębienia w postaci kraterów. Ich rozmiar i liczba wzrastała wraz ze wzrostem stężenia olejku tymiankowego. Autorzy sugerują, że jest to związane z szybkim odparowaniem olejku tymiankowego podczas procesu przygotowania materiału. Zwiększenie chropowatości struktury i obecność struktury krateru na powierzchni, obserwowano również dla materiałów chitozanowych, żelatynowych i ich mieszanin z eugenolem lub olejkiem imbirowym (Bonilla i wsp. 2018).

Na podstawie uzyskanych wyników chropowatości i struktury materiałów kolagenowych z tymolem, karwakrolem i ich mieszaniną, a także wyników prezentowanych przez innych autorów stwierdzono, że najbardziej integralnym materiałem był ten z dodatkiem tymolu, szczególnie w jego mniejszych stężeniach. Materiały z karwakrolem i mieszaniną tymol/karwakrol, prawdopodobnie nie tworzyły stabilnej emulsji, a agregujące krople w procesie śmietankowania, przemieszczały się w fazie ciągłej w górę. Skutkowało to częściowym odparowaniem związków fenolowych a także gromadzeniem się kropelek związków aktywnych, które ze względu na stan skupienia nie były widoczne przez aparat rejestrujący.

4.11. Pomiar kąta zwilżania

Oddziaływania materiału ze środowiskiem biologicznym związane są z właściwościami powierzchniowymi, spośród których najistotniejsze są te dotyczące topografii, zwilżalności, składu chemicznego i energii powierzchniowej (Liber-Kneć i Łagan, 2014). Metoda Owensa-Wedta często używana jest do obliczania swobodnej energii powierzchniowej oraz jej składowych polarnej i dyspersyjnej materiałów polimerowych. Swobodna energia powierzchniowa określa potencjalne zastosowanie materiału, a jej składowe dostarczają bardziej szczegółowych informacji na temat badanych powierzchni (Skopińska-Wiśniewska i wsp. 2009). W przypadku materiałów do zastosowań medycznych, swobodna energia powierzchniowa, może służyć do oceny stopnia oddziaływania między materiałem a organizmem żywym (Liber-Kneć i Łagan, 2014).

Hydrofilowość powierzchni jest bardzo ważnym elementem materiału opatrunkowego, od którego zależy jego biokompatybilność (Kim i wsp. 2014). Hydrofilowy charakter powierzchni materiału opatrunkowego wpływa na migrację komórek wokół rany (Zhang i wsp. 2019b). Materiały o wysokich wartościach swobodnej energii powierzchniowej, charakteryzują się dużą adsorbpcją białek i adhezją komórek. Jednak powierzchnie o zbyt hydrofilowym charakterze (o bardzo dużej swobodnej energii powierzchniowej) np. hydrożele czy metakrylany nie sprzyjają adhezji komórek (Liber-Kneć i Łagan, 2014). Optymalny kąt zwilżania materiału wodą by wspierać wzrost i proliferację komórek powinien wynosić między 40 a 65° (Gharibi i wsp. 2019). W innych źródłach, można znaleźć informację, że „magiczną” dla biomateriałów wartością kąta zwilżania jest 65°, wtedy komórki mają idealne warunki do adhezji i proliferacji (Gentleman i Gentleman, 2014). Zwilżalność powierzchni nie zawsze może być mierzona przy użyciu wody. Materiały objęte tematem dysertacji, pęcznią pod wpływem wody, dlatego do pomiaru kąta zwilżania, jako polarnej cieczy pomiarowej użyto gliceryny, niepowodującej pęcznienia w tak krótkim

czasie. Niestety, idealnych wartości zwilżalności powierzchni gliceryną, nie znaleziono w literaturze.

Wyniki swobodnej energii powierzchniowej oraz jej składowych polarnej i dyspersyjnej zostały przedstawione w tabeli 10.

Tabela 10. Swobodna energia powierzchniowa (γ) oraz jej składowe dyspersyjna (γ_p^d) i polarna (γ_s^d) obliczone dla otrzymanych materiałów

Material	γ [mJ/m ²]	γ_s^d [mJ/m ²]	γ_p^d [mJ/m ²]	γ_p^d / γ_s^d
Coll/NS	40,42 ± 0,54	18,19 ± 0,20	22,23 ± 0,34	1,22
Coll/NS /T0.25	41,42 ± 0,21	20,17 ± 0,12	20,22 ± 0,17	1,00
Coll/NS /T0.5	42,18 ± 0,39	24,12 ± 0,23	17,26 ± 0,33	0,72
Coll/NS /T0.75	43,55 ± 0,24	28,30 ± 0,26	11,25 ± 0,21	0,40
Coll/NS /T1	45,03 ± 0,32	30,16 ± 0,31	9,55 ± 0,20	0,32
Coll/NS /T4	49,76 ± 0,27	35,02 ± 0,18	7,22 ± 0,35	0,21
Coll/NS /K0.25	26,35 ± 0,16	24,99 ± 0,13	1,36 ± 0,04	0,05
Coll/NS /K0.5	27,51 ± 0,29	24,20 ± 0,13	3,30 ± 0,16	0,14
Coll/NS /K0.75	35,98 ± 0,33	26,29 ± 0,23	9,69 ± 0,10	0,37
Coll/NS /K1	37,22 ± 0,35	27,96 ± 0,20	9,26 ± 0,15	0,33
Coll/NS /K4	41,51 ± 0,20	38,32 ± 0,15	3,19 ± 0,05	0,08
Coll/NS /TK0.25	28,65 ± 0,23	25,39 ± 0,09	3,26 ± 0,14	0,13
Coll/NS /TK0.5	29,27 ± 0,47	23,91 ± 0,35	5,36 ± 0,13	0,22
Coll/NS /TK0.75	30,04 ± 0,28	27,92 ± 0,21	2,12 ± 0,07	0,08
Coll/NS /TK1	33,13 ± 0,27	31,22 ± 0,14	1,92 ± 0,14	0,06
Coll/NS /TK4	38,49 ± 0,62	30,98 ± 0,46	7,51 ± 0,17	0,24

Swobodna energia powierzchniowa obliczona dla przygotowanych materiałów mieściła w zakresie 26-49 mJ/m². Materiały z dodatkiem tymolu, charakteryzują się wzrostem wartości swobodnej energii powierzchniowej wraz ze wzrostem stężenia tymolu wprowadzonego do matrycy. Rośnie również wartość składowej dyspersyjnej a wartość składowej polarnej maleje. Do porównania charakteru materiałów między sobą można zastosować stosunek składowej polarnej do dyspersyjnej γ_p^d / γ_s^d . Wraz ze wzrostem tymolu w materiale maleje wskaźnik γ_p^d / γ_s^d , świadczy to o tym, że materiały z dodatkiem tymolu są bardziej hydrofobowe względem próbki kontrolnej.

Materiały z dodatkiem karwakrolu i mieszaniny tymol/karwakrol charakteryzują się niższymi wartościami swobodnej energii powierzchniowej w stosunku do Coll/NS. Występuje jednak zależność między zawartością związku biobójczego a wartością swobodnej energii powierzchniowej. Wartości składowych polarnych

są mniejsze względem próby kontrolnej, natomiast wartości składowych dyspersyjnych są większe. Stosunek γ_p^d / γ_s^d jest dużo niższy dla materiałów z karwakrolem i mieszaniną tymol/karwakrol, co świadczy o ich bardziej hydrofobowym charakterze względem Coll/NS.

Dodatek związków fenolowych do matrycy kolagenowej powodował, że powierzchnia materiału stawała się bardziej hydrofobowa.

4.12. Właściwości antyoksydacyjne

W fazie zapalnej gojenia ran leukocyty w procesie fagocytozy oczyszczają ranę z martwych i uszkodzonych komórek a także z patogenów. Proces ten prowadzi do nadprodukcji wolnych rodników m.in. anionu nadtlenkowego, nadtlenku wodoru i anionu hydroksylowego (Agyare i wsp. 2013). Równowaga tlenowa komórek jest w pewnym stopniu utrzymywana za pomocą procesów enzymatycznych i nieenzymatycznych. Jeżeli jednak ilość reaktywnych form tlenu jest większa niż naturalna zdolność do ich eliminacji mówi się o stresie oksydacyjnym. Nadmierny poziom wolnych rodników powoduje zakłócenie równowagi komórkowej utleniacz/przeciwutleniacz i powoduje dezaktywację enzymów, uszkodzenie DNA i peroksydację lipidów. Prowadzi to do powstawania uszkodzeń otaczającej ranę tkanki skórnej i przedłuża jej proces gojenia (He i wsp. 2020).

Aktywność antyoksydacyjna przygotowanych materiałów została przedstawiona w tabeli 11. Materiały, które w swoim składzie zawierały tymol, charakteryzują się aktywnością antyoksydacyjną w przedziale 23-74%. Aktywność antyoksydacyjna przygotowanych materiałów wzrasta wraz ze wzrostem zawartości tymolu w próbie.

Tabela 11. Aktywność antyoksydacyjna materiałów kolagenowych wzbogaconych w związki fenolowe

Stężenie [mg/cm ²]	Aktywność antyoksydacyjna [%]		
	Tymol	Karwakrol	Tymol/Karwakrol
0,25	23,4 ± 1,7	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,4
0,50	38,0 ± 2,5	19,7 ± 3,8	2,9 ± 1,3
0,75	43,2 ± 7,2	7,5 ± 2,2	14,0 ± 1,3
1,0	51,8 ± 5,5	37,9 ± 8,2	30,4 ± 3,0
4,0	74,6 ± 3,4	83,1 ± 0,8	45,7 ± 5,3

Materiały wykonane z dodatkiem karwakrolu, wykazują podobną zależność właściwości antyoksydacyjnych. Jego najwyższe stężenie (4,0 mg) redukuje około 83% wolnych rodników DPPH. Materiały z 0,75 mg zawartości karwakrolu charakteryzują się aktywnością antyoksydacyjną na poziomie około 7,5% co nie koresponduje z innymi otrzymanymi podczas tej analizy wynikami. Małe stężenia karwakrolu (0,25-0,75 mg) odznaczały się mniejszą zdolnością do redukcji rodników DPPH względem materiałów z tymolem odpowiednio o 22%, 18% i 35%.

Mieszanina tymol/karwakrol wykazywała słabsze działanie antyoksydacyjne w porównaniu do materiałów z tymolem. Stężenie 4,0 mg powodowało redukcję wolnych rodników DPPH o 45,7%, wartość ta była niższa o około 29% i 37% od tych zanotowanych dla odpowiednio tymolu i karwakrolu w tych samych stężeniach. Tak samo jak w przypadku materiałów Coll/NS/K0.25 - 0,25 mg dodatek mieszaniny tymol/karwakrol wykazywał jedynie 1,5% aktywność antyoksydacyjną. Jednak w porównaniu do materiałów z karwakrolem, mieszanina tymol/karwakrol wykazywała zależność między stężeniem a właściwościami antyoksydacyjnymi. Wraz ze wzrostem zawartości fenoli w materiale wzrastała ich aktywność.

Doost i wsp. (2019) wykazali, że emulsje zawierające tymol, jak i sam tymol mają właściwości antyoksydacyjne. Tymol może w łatwy sposób oddać wodór z grupy –OH i zapobiegać tworzeniu się zredukowanych rodników DPPH. Davoodi i wsp. (2017) stwierdzili, że właściwości antyoksydacyjne tymolu są mniejsze po wprowadzeniu go do matrycy skrobiowej (z polysorbate 20 jako solubilizatorem) niż tymolu i polysorbate 20 bez matrycy. Tłumaczą

to pojawieniem się miceli z zatrzymanym wewnątrz tymolem, i zatrzymanie jego enkapsulowanej części między łańcuchami skrobiowymi. Również tymol zamknięty w nanokapsułkach chitozan/guma tragakantowa wykazywał większe działanie antyoksydacyjne w porównaniu do samego tymolu (Sheorain i wsp. 2019). Fonseca i wsp. (2019) zanotowali wpływ stężenia karwakrolu na właściwości antyoksydacyjne materiałów skrobiowych. Aktywność antyoksydacyjna 40% dodatku karwakrolu w materiale skrobiowym wynosiła 82%. Dodatkowo karwakrol nie związany z matrycą wykazywał większe właściwości antyoksydacyjne - na poziomie 92%.

Otrzymane w ramach pracy doktorskiej materiały wykazywały właściwości antyoksydacyjne zależne od zastosowanego stężenia. Zastosowanie naturalnych przeciwutleniaczy wbudowanych w materiały polimerowe, może korzystnie wpływać na proces gojenia, szczególnie przewlekłych ran.

4.13. Ubytek masy w warunkach *in vitro*

Kolagen jest biopolimerem, który stosuje się w wielu gałęziach przemysłu. Ceniony jest ze względu na swoje właściwości, wśród których znajduje się biodegradowalność i bioresorbowalność. Dlatego zbadano wpływ zawartości związków fenolowych w matrycach na degradację w warunkach *in vitro*.

Ubytek masy materiałów po 7 dobach w PBS (pH= 7,4) przedstawiono w tabeli 12. Materiał Coll/NS charakteryzował się najmniejszym ubytkiem masy w czasie. Po 7 dobach stwierdzono około 19% ubytek masy względem masy początkowej. Materiały, które w swoim składzie zawierały związki aktywne, charakteryzowały się większym ubytkiem masy w warunkach PBS.

Masa materiałów z tymolem malała w zakresie 26-70% w zależności od zastosowanego stężenia. Wolniej od materiałów wzbogaconych w tymol, degradowały te, w których składzie znalazła się mieszanina tymolu i karwakrolu. Również w tym przypadku zaobserwowano zbieżność wzrostu stężenia do ubytku masy w przedziale 23-62%. Najmniejszy ubytek masy po 7 dobach w buforze PBS zaobserwowano dla materiałów z karwakrolem. Ubytek masy materiałów z 4,0 mg

karwakrolu względem tego samego stężenia tymolu i mieszaniny fenoli był o około 11% i 6% mniejszy.

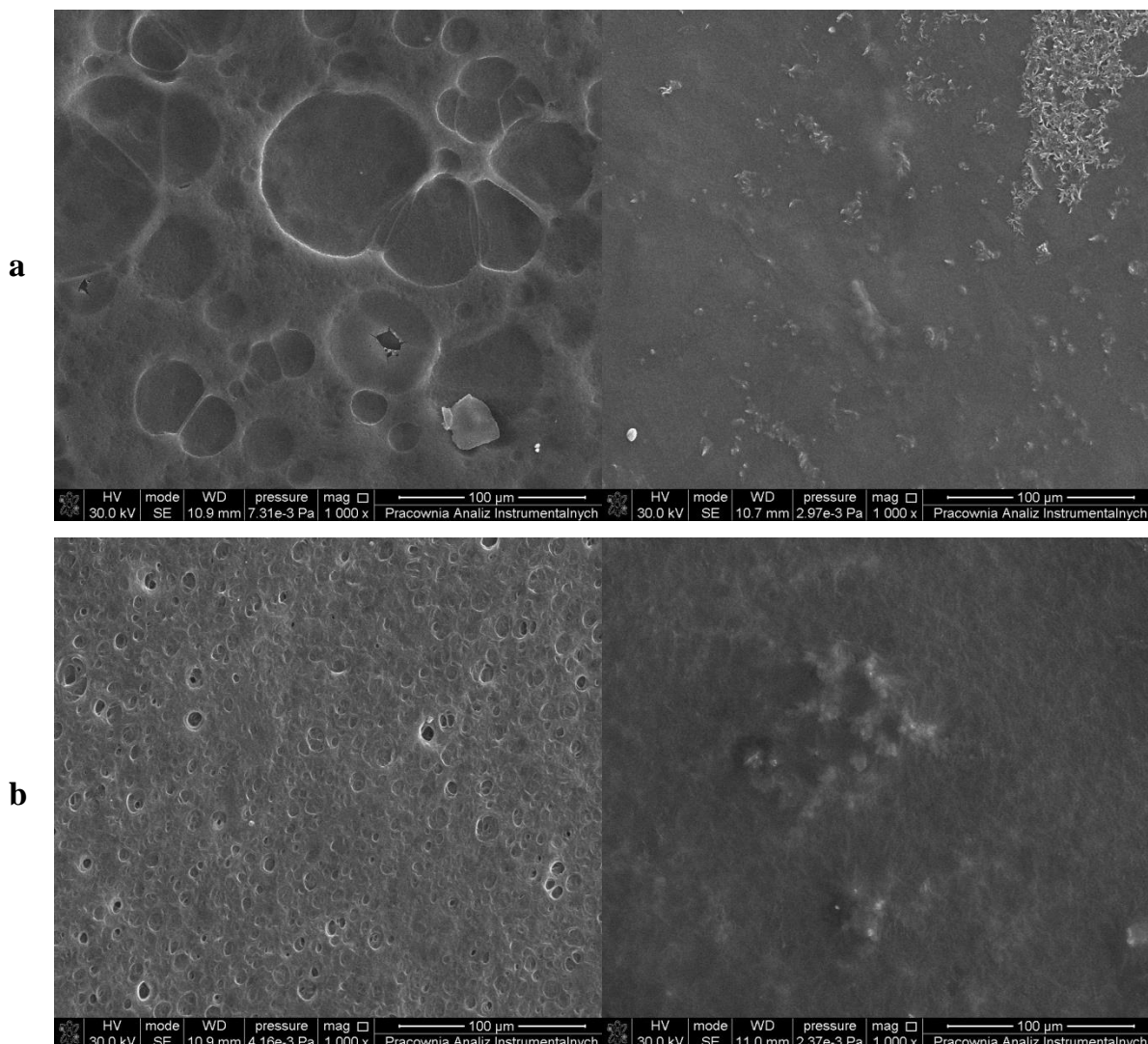
Tabela 12. Ubytek masy materiałów w warunkach *in vitro* po 7 dobach

Material	Ubytek masy [%]
Coll/NS	18,56 ± 4,49
Coll/NS/T0.25	25,61 ± 2,28
Coll/NS/T0.5	28,25 ± 2,47
Coll/NS/T0.75	39,24 ± 1,07
Coll/NS/T1	64,58 ± 2,95
Coll/NS/T4	69,58 ± 0,27
Coll/NS/K0.25	23,72 ± 1,80
Coll/NS/K0.5	25,11 ± 5,74
Coll/NS/K0.75	34,63 ± 0,21
Coll/NS/K1	52,27 ± 3,21
Coll/NS/K4	56,01 ± 1,06
Coll/NS/TK0.25	23,18 ± 1,35
Coll/NS/TK0.5	28,33 ± 2,36
Coll/NS/TK0.75	49,67 ± 1,55
Coll/NS/TK1	60,48 ± 0,67
Coll/NS/TK4	61,65 ± 0,25

Do oceny morfologii powierzchni materiałów przed i po procesie degradacji, wykorzystano również skaningową mikroskopię elektronową (SEM). Na rycinie 25 przedstawiono przykładowe zdjęcia powierzchni materiałów w powiększeniu 1000 razy.

Przed degradacją

Po degradacji



Rycina 25. Przykładowe zdjęcia SEM powierzchni materiałów przed i po degradacji. a) Coll/NS/TK4 b) Coll/NS/T0.5

Materiały przed degradacją charakteryzowały się strukturą mikrofałd z wklęsnięciami na materiale, które są większe w przypadku większego stężenia fenoli. Prawdopodobnie przez agregację hydrofobowych związków fenolowych. Podobne struktury były obserwowane na zdjęciach AFM prezentowanych w podpunkcie 4.10. niniejszej pracy jak i przez innych autorów.

Po 7 dobach degradacji można zaobserwować zmiany w strukturze powierzchni materiałów. Nie dostrzegalna jest już struktura kraterów. Na gładkiej miejscami

powierzchni, można zaobserwować oznaki degradacji materiału w postaci jego wypustek, które występują bardziej obficie w przypadku Coll/NS/TK4 w porównaniu do Coll/NS/T0.5. Wyniki te korespondują z wynikami utraty masy, gdzie materiał Coll/NS/TK4 degradował w 62% a Coll/NS/T0.5 w 28%.

Utrata masy w czasie w obecności PBS może być spowodowana nie tylko degradacją materiału, ale także uwolnieniem związków fenolowych z matrycy. Podobną sytuację zaobserwowali Tang i wsp. (2019). Zespół ten przygotował materiały hydrożelowe na bazie alginianu i PVA, które jako składnik aktywny zawierały miód. Zwiększał on właściwości antyoksydacyjne i bakteriobójcze materiałów. Jednak badacze zaobserwowali bardzo wysoki stopień degradacji w warunkach *in vitro*, których ubytek masy sięgał nawet 82% po 24 h.

W związku z powyższym, zdecydowano się sprawdzić uwalnianie związków fenolowych z matryc kolagenowych.

4.14. Uwalnianie związków aktywnych

Uwalnianie związków aktywnych z materiałów kolagenowych w temperaturze 37°C po 7 dobach przedstawiono w tabeli 13. Wszystkie przygotowane materiały uwalniały związki aktywne. Ilość uwolnionego związku aktywnego wzrastała, wraz ze wzrostem stężenia fenoli w matrycy kolagenowej.

Tymol względem karwakrolu i mieszaniny tymol/karwakrol uwalniany był najslabiej. Procentowa wartość uwalniania znajdowała się w przedziale 21-27% dla materiałów z zawartością tymolu w przedziale 0,25-1,0 mg/cm². Wyraźnie mniej uwalniało się z matrycy Coll/NS/T4, dla której procentowa wartość uwalniania wynosiła około 5,6%. Jednak w tym przypadku warto zauważyć, że ilość uwolnionego tymolu była podobna do ilości uwolnionej z Coll/NS/T1 i wynosiła około 0,23 mg/cm².

Najlepiej z matrycy uwalniany był karwakrol. Materiały o stężeniu 0,25-1,0 mg/cm² uwalniały między 24 a 42% karwakrolu. W tym przypadku również można zaobserwować mniejszą wartość procentową uwolnionego karwakrolu dla matrycy Coll/NS/K4, wynoszącą 15%. Ilościowo karwakrol uwalniał się lepiej niż tymol. Jego maksymalne stężenie w roztworze PBS

po 7 dobach wynosiło 0,321 mg/cm² uwolnionego z materiału Coll/NS/K1 i 0,604 mg/cm² uwolnionego z Coll/NS/K4. Karwakrolu z materiału Coll/NS/K4 uwalniało się ponad 2,5 razy więcej w porównaniu do tymolu uwolnionego z Coll/NS/T4.

Materiały z mieszaniną tymol/karwakrol również uwalniały związki aktywne. Stężenie uwolnionej mieszaniny związków fenolowych było mniejsze w porównaniu do uwalniania karwakrolu i większe w porównaniu do stopnia uwalniania tymolu. Najwięcej związków aktywnych uwolnionych zostało z matrycy Coll/NS/TK4 (0,303 mg/cm²). Jest to dwa razy mniej niż stężenie karwakrolu uwolnionego z materiału o analogicznym stężeniu i prawie 1/3 więcej w porównaniu do tymolu (Coll/NS/T4).

Tabela 13. Uwalnianie związków aktywnych z materiałów kolagenowych po 7 dobach

Material	Uwalnianie [mg/cm²]	Uwalnianie [%]
Coll/NS/T0.25	0,069 ± 0,003	27,56 ± 1,03
Coll/NS/T0.5	0,109 ± 0,002	21,85 ± 0,31
Coll/NS/T0.75	0,181 ± 0,015	24,20 ± 2,05
Coll/NS/T1	0,230 ± 0,040	22,96 ± 3,95
Coll/NS/T4	0,224 ± 0,031	5,59 ± 0,77
Coll/NS/K0.25	0,105 ± 0,017	42,07 ± 6,79
Coll/NS/K0.5	0,142 ± 0,016	28,44 ± 3,21
Coll/NS/K0.75	0,185 ± 0,059	24,71 ± 3,03
Coll/NS/K1	0,321 ± 0,027	32,07 ± 2,69
Coll/NS/K4	0,604 ± 0,034	15,09 ± 0,84
Coll/NS/TK0.25	0,091 ± 0,009	36,59 ± 3,66
Coll/NS/TK0.5	0,131 ± 0,012	26,30 ± 2,37
Coll/NS/TK0.75	0,167 ± 0,017	22,27 ± 2,30
Coll/NS/TK1	0,281 ± 0,030	28,07 ± 3,02
Coll/NS/TK4	0,303 ± 0,013	7,58 ± 0,33

Przygotowane materiały uwalniają związki aktywne i nie działają wyłącznie w formie bezpośredniego kontaktu. Wadą powyższej metody jest oznaczenie całości fenoli uwolnionych z matrycy. W przypadku materiałów

wzbogaconych w mieszaninę tymol/karwakrol nie ma pewności, czy są one uwalniane razem i w tym samym stężeniu.

W odniesieniu do badań degradacji materiałów zarówno w PBS jak i za pomocą enzymu, możemy zakładać, że utrata masy przez materiały, nie jest wyłącznie spowodowana ich szybką degradacją a po części odpowiedzialne jest za to uwalnianie związków aktywnych. W przypadku degradacji materiałów przy użyciu kolagenazy, metodyka wymaga użycia metanolu, który jest dobrym rozpuszczalnikiem dla fenoli. Dlatego większy ubytek masy, może być spowodowany degradacją i rozpuszczaniem związków fenolowych w metanolu w trakcie analizy.

4.15. Przepuszczalność par i gazów

Wyniki przepuszczalności par i gazów zarejestrowane dla wybranych materiałów przedstawiono w tabeli 14. Jednym z warunków stawianych materiałom opatrunkowym jest przepuszczalność par i gazów. Jednakże dokładne wartości powyższych parametrów nie są w pełni sprecyzowane.

Poziom wilgotności rany, jest jednym z kluczowych parametrów jej gojenia. Zbyt wysokie wartości WVTR (Water Vapour Transmission Rate) prowadzą do szybkiej utraty wilgotności skóry, powodując dehydratację i powstawanie blizn (Morgado i wsp. 2015). Zbyt niskie wartości WVTR powodują gromadzenie się wysięków, co może prowadzić do opóźniania gojenia a także zwiększać ryzyko infekcji bakteryjnej (Archana i wsp. 2015). Tempo parowania skóry zdrowej wynosi około $204 \text{ g/m}^2/24\text{h}$, podczas gdy w przypadku oparzeń pierwszego stopnia zwiększa się do $279 \text{ g/m}^2/24\text{h}$ do nawet $5138 \text{ g/m}^2/24\text{h}$ w przypadku tkanki granulującej (Mi i wsp. 2001). Queen i wsp. (1987a) uważają, że WVTR materiału opatrunkowego powinien znajdować się w przedziale $2000\text{-}2500 \text{ g/m}^2/24\text{h}$, tak by zapewnić optymalne warunki gojenia ran. Przedział ten został określony jedynie pośrednio, jako połowa intensywności parowania tkanki granulującej.

Tabela 14. Wyniki przepuszczalności par i gazów przez materiały

Material	WVTR [g/m ² /24h]	OTR [ml/m ² /24h]	CDTR [ml/m ² /24h]
Coll/NS	2038 ± 26	25,2 ± 0,1	79,2 ± 9,4
Coll/NS/T4	1831 ± 1150	28,2 ± 0,8	95,7 ± 3,1

Wartość WVTR dla próby kontrolnej wynosiła 2038 g/m²/24h, natomiast dodatek 4,0 mg/cm² tymolu powodował spadek przepuszczalności pary wodnej do 1831 g/m²/24h.

Niektórzy autorzy zauważają wzrost WVTR po dodaniu tymolu lub olejków eterycznych. Tłumaczą to powstaniem porowatej struktury materiału w wyniku działania kropelek olejku. Materiał nie jest w pełni spójny i WVTR wzrasta (Hosseini i wsp. 2015; Koosehgoi i wsp. 2017).

Rojas-Graü i wsp. (2007) przedstawili wyniki Water Vapor Permeability (WVP) obliczone na podstawie iloczynu WVTR i średniej grubości materiału, podzielonego przez różnicę ciśnienia parcjalnego po obu stronach materiału. Dodatki olejków eterycznych, aldehydu cynamonowego, karwakrolu i citralu do materiałów na bazie alginianu i puree jabłkowego, nie wpłynęły na WVP. Autorzy tłumaczą to składem chemicznym olejków eterycznych, które w głównej mierze składają się z terpenów a nie lipidów. Przepuszczalność pary wodnej zachodzi głównie przez hydrofilową część materiału i zależy od proporcji składników hydrofilowych i hydrofobowych (Rojas-Graü i wsp. 2007). Materiał kolagenowy z dodatkiem tymolu był bardziej hydrofobowy w porównaniu do materiału kontrolnego. Dlatego można przypuszczać, że na właściwości WVTR wpłynął bardziej hydrofobowy charakter filmu. Shojaee-Aliabadi i wsp. (2013) zaobserwowali spadek wartości WVP wraz ze wzrostem zawartości olejku z *Satureja hortensis* w materiałach z karagenianu. Dodatek olejku eterycznego (3%) do filmu karagenianowego zmniejszył WVP o około 77%. Rezultat ten mógł być spowodowany rozproszeniem fazy hydrofobowej (olejku eterycznego z *Satureja hortensis*) w hydrofilowej fazie, powodując wzrost krętności kanałów porowych, skutkując mniejszą przepuszczalnością pary wodnej. Materiały na bazie

chitozanu/kolagenu/żelatyny sieciowane genipiną charakteryzowały się WVTR około $400 \text{ g/m}^2/24\text{h}$, autorzy sugerowali, że jest to wystarczająca wartość, ponieważ nie zaburza normalnej utraty wody ze skóry zdrowej (Gorczyca i wsp. 2014). Mi i wsp. (2001) otrzymali asymetryczne membrany chitozanowe o WVTR w zakresie $2109\text{--}2792 \text{ g/m}^2/24\text{h}$. Materiały chitozan/PVP wzbogacone w nanocząstki srebra charakteryzowały się wartościami WVTR w zakresie $2000\text{--}2150 \text{ g/m}^2/24\text{h}$, które wg. wytycznych Quenn'a mieszczą się w zakresie idealnego WVTR (Archana i wsp. 2015). Dużo niższe wartości WVTR materiałów opatrunkowych otrzymano dla materiałów z polidimetylosiloksanu w połączeniu z zredukowanym tlenkiem grafenu (Qian i wsp. 2018). Materiały przygotowane przez Qian i wsp. (2018) charakteryzowały się wartościami WVTR między 119 a $137 \text{ g/m}^2/24\text{h}$. Pomimo, że wartości te są dużo niższe niż rekomendowane w badaniach *in vivo*, autorzy stwierdzili, że wartości WVTR były odpowiednie, co zapewniało właściwe środowisko gojenia ran i pozwoliło uniknąć znacznego gromadzenia się wysięków (Qian i wsp. 2018).

Tlen bierze udział w różnych procesach gojenia rany m.in. reepitalizacji, angiogenezie, syntezie kolagenu i przebudowie skóry (Koosehgoi i wsp. 2017). Dlatego do szybkiego i bezpiecznego procesu gojenia, materiały opatrunkowe powinny być dla niego przepuszczalne (Shanmugasundaram i wsp. 2018). Wartość OTR (Oxygen Transmission Rate) dla materiału Coll/NS wynosiła $25,2 \text{ ml/m}^2/24\text{h}$, natomiast dla materiału z dodatkiem $4,0 \text{ mg}$ tymolu wzrastała do $28,2 \text{ ml/m}^2/24\text{h}$. Prawdopodobnie wzrost przepuszczalności związany jest z powstaniem mikroporów związanych z częściowym odparowaniem tymolu lub powstałych na skutek tworzenia emulsji porów między hydrofilowym kolagenem a zawieszonym w nim hydrofobowym tymolem. Wartości OTR, którymi powinny charakteryzować się materiały opatrunkowe, nie zostały jeszcze sprecyzowane (Chitrattha i Phaechamud, 2016). Jednak materiały opatrunkowe na bazie chitozanu i olejku tymiankowego przygotowane przez Koosehgoi i wsp. (2017) charakteryzowały się wartościami OTR pomiędzy $1\text{--}5 \text{ ml/m}^2/24\text{h}$. Natomiast materiały z polilaktydu wzbogacone w humektant PEG 400 charakteryzowały się wartościami OTR $6254 \text{ g/m}^2/24\text{h}$ czyli $4376 \text{ ml/m}^2/24\text{h}$, ponieważ dodatek

humektantu powodował powstanie porowatej struktury materiału zwiększając przepuszczalność (Chitrattha i Phaechamud 2016). Modyfikacja materiałów chitozanowych za pomocą środka sieciującego i alkaliów również zwiększała ich przepuszczalność. Autorzy sugerują, że było to spowodowane większą kruchością materiałów, która mogła doprowadzić do pęknięć umożliwiających większą transmisję gazu (Nataraj i wsp. 2018).

Wyniki uzyskane przez Sirvio i Grussing (1989) pokazują, że przepuszczalność dwutlenku węgla wpływa na wartości pH lokalnego środowiska rany. Utrata dwutlenku węgla powoduje alkalizację środowiska, co może mieć negatywny wpływ na proces gojenia ran (Quenn i wsp. 1987b). Szybkość transmisji dwutlenku węgla (CDTR) wyniosła dla Coll/NS 79,2 ml/m²/24h a dla Coll/NS/T4 95,7 ml/m²/24h. W porównaniu do wyników uzyskanych przez Sirvio i Grussing (1989), transmisja dwutlenku węgla otrzymanych w ramach pracy doktorskiej materiałów była niska, co może być obiecującym parametrem do dalszego zastosowania materiałów jako środków opatrunkowych.

5. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Jednym z najpoważniejszych globalnych problemów dotyczących strefy zdrowia publicznego jest rosnąca wśród mikroorganizmów antybiotykoodporność. Problem ten dotyczy zarówno infekcji ogólnoustrojowych, jak i wewnętrznych, a także powierzchni ciała - skóry. Ten największy i najbardziej zewnętrzny organ ochrania organizm przed czynnikami zewnętrznymi. W wyniku różnego rodzaju urazów skóra może utracić swoją integralność i podstawowe funkcje. W celu poprawy naturalnego procesu gojenia ran, stosuje się materiały opatrunkowe a ostatnim trendem, szczególnie w przypadkach tych trudno gojących się ran, jest stosowanie aktywnych materiałów opatrunkowych.

W pierwszym etapie realizacji badań wykonano testy przesiewowe pięciu fenoli, które naturalnie występują w olejkach eterycznych roślin. Na podstawie wyników otrzymanych metodą dyfuzyjną z matryc celulozowych do dalszych badań

wybrano tymol, karwakrol i ich mieszaninę 1:1, która hamowała lepiej wzrost *S.aureus* w porównaniu do pojedynczych fenoli. Kolagen został wyizolowany ze ścięgien ogonów szczurzych a jego roztwór został wykorzystany do przygotowania materiałów z wybranymi fenolami. Do matrycy dodano także niejonowy surfaktant, który umożliwił stworzenie filmu. Następnie, tak otrzymane materiały poddano badaniom właściwości mikrobiologicznych i fizykochemicznych.

Wszystkie otrzymane materiały z dodatkiem tymolu i karwakrolu były biobójcze wobec szczepów *S. aureus* i *E. coli*. Wprowadzenie do materiałów mieszaniny tymol/karwakrol nie wykazały jednak lepszych właściwości (tak jak w przypadku testów dyfuzyjnych) a nawet ich najmniejsze stężenia w materiale kolagenowym okazały się niewystarczająco skuteczne ($R < 2$) by można je nazwać bakteriobójczymi. Również wpływ mieszaniny tymol/karwakrol na aktywność dehydrogenaz i syntezę ATP nie był lepszy niż zastosowanie pojedynczych fenoli. Analiza ATR-FTIR potwierdziła obecność fenoli w materiałach kolagenowych. Pomimo, że tymol i karwakrol są izomerami a więc ich wzory strukturalne są takie same, zaobserwowano wpływ rodzaju i stężenia fenoli na właściwości fizykochemiczne materiałów. Materiały z karwakrolem sprawiały problemy technologiczne i między stężeniem karwakrolu a zmianą poszczególnych właściwości nie było zależności. Prawdopodobnie świadczy to o nierównomiernym rozłożeniu związków aktywnych w matrycy. Lepsze pod względem właściwości fizykochemicznych w porównaniu do materiałów z karwakrolem były te, wzbogacone w mieszaninę tymol/karwakrol. Jednak tylko materiały z tymolem wykazywały całkowitą zależność między stężeniem a zmianą właściwości. Hamowały również tworzenie biofilmu przez *S. aureus* na swoich powierzchniach. Charakteryzowały się również odpowiednimi właściwościami przepuszczalności par i gazów jakie wymagane są od materiałów opatrunkowych. Otrzymane materiały wykazywały jednak większy stopień hemolizy erytrocytów, niż jest to dopuszczalne do zastosowań medycznych. Zaobserwowano, że w dużym stopniu na wartości hemolizy krwi, wpływał dodatek niejonowego surfaktantu, który poprawiał mieszalność między kolagenem a fenolami. Dlatego

możliwe jest, że zmiana tego związku na inny pozwoli na wykorzystanie materiałów kolagenowych z 0,25 mg/cm² lub 0,50 mg/cm² tymolu, które wykazywały działanie bakteriobójcze a jednocześnie nie były zbyt toksyczne. Dlatego w kolejnych etapach pracy mającego na celu rozwinięcie tego tematu należałoby otrzymać te materiały z innym, mniej toksycznym związkiem powierzchniowo czynnym. W celu zwiększenia stabilności materiału sugeruje się, wykorzystanie procesu sieciowania polimeru. A w celu potwierdzenia biokompatybilności materiału należałoby wykonać testy *in vitro* i *in vivo*.

Rezultaty badań prowadzonych w niniejszej pracy stanowią podstawę do sformułowania następujących wniosków:

1. Wybrane związki fenolowe hamują wzrost drobnoustrojów patogennych a skuteczność ich działania zależy od zastosowanego stężenia.
2. Najbardziej skutecznymi w hamowaniu wzrostu wybranych drobnoustrojów okazały się tymol i karwakrol.
3. Połączenie związków fenolowych w mieszaniny dwuskładnikowe w proporcjach 1:1 skutkowało silniejszym hamowaniem wzrostu w najwyższym badanym stężeniu (4,0 mg/cm²) wobec *S. aureus* i *E. coli* wyłącznie dla mieszaniny tymol/karwakrol.
4. Materiały kolagenowe z wbudowanymi związkami fenolowymi wykazują działanie bakteriobójcze wobec szczepów wzorcowych a siła ich działania zależy od stężenia i rodzaju zastosowanego fenolu.
5. Tymol, karwakrol i ich mieszanina wprowadzone do matryc hamują aktywność dehydrogenaz i syntezę ATP w komórkach *S. aureus* i *E. coli*.
6. Fenole wprowadzone do matrycy kolagenowej wpływają na właściwości fizykochemiczne otrzymanych materiałów. Materiały z tymolem, charakteryzowały się zmianami we właściwościach fizykochemicznych, które zmieniały się wraz ze zmianą stężenia tymolu. W przypadku materiałów z karwakrolem i mieszaniną tymol/karwakrol nie zauważono wpływu stężenia na zmianę właściwości fizykochemicznych.
7. Otrzymane materiały kolagen/tymol są przepuszczalne dla par i gazów.

8. Tymol nie hamował działania kolagenazy, a materiały z jego dodatkiem degradowały pod wpływem działania tego enzymu.
9. Tymol hamuje powstawanie biofilmu bakteryjnego tworzonego przez *S. aureus*. Na jego działanie wpływa nie tylko stężenie tymolu, ale także czas działania.
10. Najlepszymi właściwościami zarówno biologicznymi i fizykochemicznymi charakteryzowały się materiały z 0,25-0,50 mg/cm² tymolu, które powinny zostać wybrane do dalszego etapu prac.

6. LITERATURA

Abdelraof M., Hasanin M.S., El –Saied H., Ecofriendly green conversion of potato peel wastes to high productivity bacterial cellulose, *Carbohydrate Polymers*, 211 (2019) pp. 75-83.

Abu-Al-Basal M.A., Healing potential of *Rosmarinus officinalis* L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice, *Journal of Ethnopharmacology* 131:2 (2010), pp. 443-450.

Agyare C., Dwobeng A.S., Agyepong N., Boakye Y.D., Mensah K.B., Ayande P.G., Adarkwa-Yiadom M., Antimicrobial, Antioxidant, and Wound Healing Properties of *Kigelia africana* (Lam.) Beneth. and *Strophanthus hispidus* DC., *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, (2013) ID: 692613.

Ahmad N., Ahmad F.J., Bedi S., Sharma S., S. Umar, Ansari M.A., A novel nanoformulation development of eugenol and their treatment in inflammation and periodontitis, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27: 6 (2019) pp. 778-790.

Ahmed R., Tariq M., Ali I., Asghar R., Khanam P.N., Augustine R., Hasan A., Novel electrospun chitosan/polyvinyl alcohol/zinc oxide nanofibrous mats with antibacterial and antioxidant properties for diabetic wound healing, *International Journal of Biological Macromolecules*, 120 (2018) pp. 385-393.

Alharbi N.S., Screening of antibiotic-resistant staphylococci in the nasal cavity of patients and healthy individuals, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27 (2020) pp. 100-105.

Ali S., Khan M.R., Batool R., Maryam S., Majid M., Wound healing potential of oil extracted from *Parrotiopsis jacquemontiana* (Decne) Rehder, *Journal of Ethnopharmacology*, 236 (2019) pp. 354-365.

Altan A., Aytac Z., Uyar T., Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly(lactic acid) for active food packaging, *Food Hydrocolloids*, 81 (2018) pp. 48-59.

Altiok D., Altiok E., Tihminlioglu F., Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21:7 (2010) pp. 2227–2236.

Archana D., Singh B.K., Dutta J., Dutta P.K., Chitosan-PVP-nano silver oxide wound dressing: In vitro and in vivo evaluation, *International Journal of Biological Macromolecules*, 73 (2015) pp. 49-57.

Ardekani N.T., Khorram M., Zomorodian K., Yazdanpanah S., Veisi H., Veisi H., Evaluation of electrospun poly (vinyl alcohol)-based nanofiber mats incorporated with *Zataria multiflora* essential oil as potential wound dressing, *International Journal of Biological Macromolecules*, 125 (2019) pp. 743-750.

Arfa B.A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P., Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letter and Applied Microbiology* 43 (2006) pp. 149-154.

Arslan Y.E., Arslan T.S., Derkus B., Emregul E., Emregul K.C., Fabrication of human hair keratin/jellyfish collagen/eggshell-derived hydroxyapatite osteoinductive biocomposite scaffolds for bone tissue engineering: From waste to regenerative medicine products, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154 (2017) pp. 160-170.

Arumugam G.K.S., Sharma D., Balakrishnan R.M., Ettiyappan J.B.P., Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 9 (2018) pp. 19-26.

Atarés L., Bonilla J., Chiralt A., Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils, *Journal of Food Engineering*, 100:4 (2010) pp. 678-687.

Augustine R., Malik H.N., Singhal D.K., Mukherjee A., Malakar D., Kalarikkal N., Thomas S., Electrospun polycaprolactone/ZnO nanocomposite membranes as biomaterials with antibacterial and cell adhesion properties, *Journal of Polymer Research*, 21:3 (2014) pp. 1-17.

Avcu E., Baştan F.E., Abdullah H.Z., Rehman M.A.U., Avcu Y.Y., Boccaccini A.R., Electrophoretic deposition of chitosan-based composite coatings for biomedical applications: A review, *Progress in Materials Science*, 103 (2019) pp. 69-108.

Bajpai S.K., Pathak V., Soni B., Minocycline-loaded cellulose nano whiskers/poly(sodium acrylate) composite hydrogel films as wound dressing, *International Journal of Biological Macromolecules*, 79 (2015) pp. 76-85.

Banaś M., Pietrucha K., Typy I struktury białka kolagenowego, *Zeszyty naukowe Politechniki Łódzkiej, nr 1058 Chemia spożywcza i biotechnologia*, 73 (2009) pp. 93-103.

Bano I., Arshad M., Yasin T., Ghauri M.A., Younus M., Chitosan: A potential biopolymer for wound management, *International Journal of Biological Macromolecules*, 102 (2017) pp. 380-383.

Bazrafshan Z., Stylios G.K., Spinnability of collagen as a biomimetic material: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 129 (2019) pp. 693-705.

Bhagwat P.K., Dandge P.B., Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7 (2016) pp. 234-240.

Biranje S.S., Madiwale P.V., Patankar K.C., Chhabra R., Dandekar-Jain P., Adivarekar R.V., Hemostasis and anti-necrotic activity of wound-healing dressing containing chitosan nanoparticles, *International Journal of Biological Macromolecules*, 121 (2019) pp. 936-946.

Bonilla J., Poloni T., Lourenço R.V., Sobral P.J.A., Antioxidant potential of eugenol and ginger essential oils with gelatin/chitosan films, *Food Bioscience*, 23 (2018) pp. 107–114.

Broughton G., Janis J.E., Attinger C.E., A Brief History of Wound Care, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117 (2006) pp. 6-11.

Burt S., Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, *International Journal of Food Microbiology*, 94 (2004) pp. 223-253.

Cadena M.B., Preston G.M., van der Hoorn R.A.L., Flanagan N.A., Townley H.E., Thompson I.P., Enhancing cinnamon essential oil activity by nanoparticle encapsulation to control seed pathogens, *Industrial Crops and Products*, 124:15 (2018) pp. 755-764.

Cai R., Zhang M., Cui L., Yuan Y., Yang Y., Wang Z., Yue T., Antibacterial activity and mechanism of thymol against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells and spores, *LWT*, 105 (2019) pp.377–384.

Carnwath R., Graham E.M, Reynolds K., Pollo P.J. The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates, *The Veterinary Journal*, 99:1 (2013) pp. 110-114.

Chao S., Li Y., Zhao R., Zhang L., Li Y., Wang C., Li X., Synthesis and characterization of tigecycline-loaded sericin/poly(vinyl alcohol) composite fibers via electrospinning as antibacterial wound dressings, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 44 (2018) pp. 440-447.

Chaouche T.M., Haddouchi F., Atik-Bekara F., Ksouri R., Azzi R., Boucherit Z., Tefiani C., Larbat R., Antioxidant, haemolytic activities and HPLC–DAD–ESI–MSn characterization of phenolic compounds from root bark of *Juniperus oxycedrus* subsp. *Oxycedrus*, *Industrial Crops and Production*, 64 (2015) pp. 182-187.

Chellat M.F., Raguž L., Riedl R, Targeting Antibiotic Resistance, *Angewandte Chemie International Edition*, 55:23 (2016) pp. 6600–6626.

Cheng J., Wang H., Kang S., Xia L., Jiang S., Chen M., Jiang S., An active packaging film based on yam starch with eugenol and its application for pork preservation, *Food Hydrocolloids*, 96 (2019) pp. 546-554.

Childs, D.R., Murthy A., Overview of Wound Healing and Management. *Surgical Clinics of North America*, 97:1 (2017) pp. 189–207.

Chitrattha S., Phaechamud T., Porous poly(dl-lactic acid) matrix film with antimicrobial activities for wound dressing application, *Materials Science and Engineering: C*, 58 (2016) pp. 1122-1130.

Choi W.S., Singh S., Lee Y.S., Characterization of edible film containing essential oils in hydroxypropyl methylcellulose and its effect on quality attributes of 'Formosa' plum (*Prunus salicina* L.), *LWT - Food Science and Technology*, 70 (2016) pp. 213-222.

Churklam W., Chaturongakul S., Ngamwongsatit B., Aunpad R., The mechanisms of action of carvacrol and its synergism with nisin against *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage, *Food Control*, 108 (2020) ID: 106864.

Citterio B., Pasquaroli S., Mangiaterra G., Vignaroli C., Di Sante L., Leoni F., Chierichetti S., Ottaviani D., Rocchi M., Biavasco F., Venus clam (*Chamelea gallina*): A reservoir of multidrug-resistant enterococci, *Food Control*, 82 (2017) pp. 184-189.

Cohen I.K., Lessons from the history of wound healing, *Clinics in Dermatology*, 25:1 (2007) pp. 3-8.

Costeloe A., Vandjelovic N.D., Evans M.A., Saraiya S.S.. The use of honey in cochlear implant associated wounds in pediatric patients, *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 111 (2018) pp. 80-83.

Croisier F., Duwez A.S., Jérôme C., Léonard A.F., van der Werf K.O., Dijkstra P.J., Bennink M.L., Mechanical testing of electrospun PCL fibers, *Acta Biomaterialia*, 8:1 (2012) pp. 218-224.

Croisier F., Jérôme C., Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *European Polymer Journal*, Volume 49:4 (2013) pp. 780-792.

Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown R.M. Jr., Microbial cellulose—the natural power to heal wounds, *Biomaterials*, 27 (2006) pp. 145–151.

Czyżewska-Dors E., Dors A., Pomorska-Mól M., Właściwości biofilmu bakteryjnego warunkujące oporność na antybiotyki oraz metody jego zwalczania, *Życie Weterynaryjne*, 93:11 (2018) pp. 765-771.

Davoodi M., Kavosi G., Shakeri R., Preparation and characterization of potato starch-thymol dispersion and film as potential antioxidant and antibacterial materials, *International Journal of Biological Macromolecules*, 104 (2017) pp. 173-179.

de Souza Polli F., Gomes J.N., Ferreira H.S., Santana R.C., Fregoneze J.B., Inhibition of salt appetite in sodium-depleted rats by carvacrol: Involvement of noradrenergic and serotonergic pathways, *European Journal of Pharmacology*, 854 (2019) pp. 119-127.

Devi K.P., Nisha S.A., Sakthivel R., Pandian S.K., Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane, *Journal of Ethnopharmacology*, 130 (2010) pp. 107–115.

Dhivya S., Padma V.V., Santhini E., Wound dressings – a review, *Biomedicine (Taipei)*, 5:4 (2015) 22, doi 10.7603/s40681-015-0022-9.

Dias A.M.A., Rey-Rico A., Oliveira R.A., Marceneiro S., Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A., Júnior R.N.C., Braga M.E.M., de Sousa H.C., Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology, *The Journal of Supercritical Fluids*, 74 (2013) pp. 34-45.

Dimassi S., Tabary N., Chai F., Blanchemain N., Martel B., Sulfonated and sulfated chitosan derivatives for biomedical applications: A review, *Carbohydrate Polymers*, 202 (2018) pp. 382-396.

Doost A.S., Camp J.V., Dewettinck K., Van der Meeren P., Production of thymol nanoemulsions stabilized using Quillaja Saponin as a biosurfactant: Antioxidant activity enhancement, *Food Chemistry*, 293:30 (2019) pp. 134-143.

Edwards-Jones V., Buck R., Shawcross S.G., Dawson M.M., Dunn K., The effect of essential oils on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a dressing model, *Burns*, 30:8 (2004) pp. 772-777.

El Asbahani A., Miladi K., Badri W., Sala M., Aït Addi E.H., Casabianca H., El Mousadik A., Hartmann D., Jilale A., Renaud F.N.R., Elaissari A., Essential oils: From extraction to encapsulation, *International Journal of Pharmaceutics*, 483 (2015) pp. 220-243.

Elen K., Murariu M., Peeters R., Dubois P., Mullens J., Hardy A., Van Bael M.K., Towards high-performance biopackaging: barrier and mechanical properties of dual-action polycaprolactone/zinc oxide nanocomposites, *Polymers for Advanced Technologies*, 23 (2012) pp.1422–1428.

El-Malek F.F.A., Yousef A.S., El-Assar S.A., Hydrogel film loaded with new formula from manuka honey for treatment of chronic wound infections, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 11 (2017) pp. 171-176.

Engel B.J., Heckler C., Tondo E.C., Joner Daroit D., da Silva Malheiros P., Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel, *International Journal of Food Microbiology* 252:3 (2017) pp. 18-23.

Fahimirad S., Ajallouei F., Naturally-derived electrospun wound dressings for target delivery of bio-active agents, *International Journal of Pharmaceutics*, 566 (2019) pp. 307-328.

Farokhi M., Mottaghitalab F., Fatahi Y., Khademhosseini A., Kaplan D.L., Overview of Silk Fibroin use in Wound Dressings, *Trends in Biotechnology*, 36:9 (2018) pp. 907-922.

Ficms A.A., Wound healing and limb saving surgery, *Journal of Medical Science and Clinical Research*, 5:10 (2017) pp. 28681-28688.

Fijałkowski K., Drozd R., Rakoczy R., Junka A.F., Biomedyczne zastosowanie bakteryjnej celulozy, *Forum Zakazań-Materiały Zjazdowe*, 7:5 (2016) pp. 377–379.

Fonseca L.M., Cruxen C.E.S., Bruni G.P., Fiorentini Â.M., Zavareze E.R., Lim L.T., Dias A.R.G., Development of antimicrobial and antioxidant electrospun soluble potato starch nanofibers loaded with carvacrol, *International Journal of Biological Macromolecules*, 139 (2019) pp. 1182-1190.

Forrest R.D., Early history of wound treatment, *Journal of the Royal Society of Medicine*, 75 (1982) pp. 189-205.

Fyfe L., Okoro P., Paterson E., Coyle S., McDougall G.J., Compositional analysis of Scottish honeys with antimicrobial activity against antibiotic-resistant bacteria reveals novel antimicrobial components, *LWT - Food Science and Technology*, 79 (2017) pp. 52-59.

Ge L., Li Q., Wang M., Ouyang J., Li X., Xing M.M.Q., Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity, *International Journal of Nanomedicine*, 9 (2014) pp. 2399–2407.

Gentleman, M.M., Gentleman, E., The role of surface free energy in osteoblast–biomaterial interactions, *International Materials Reviews*, 59:8 (2014) pp. 417–429.

Gethin G., Cowman S., Bacteriological changes in sloughy venous leg ulcers treated with manuka honey or hydrogel: an RCT, *Journal of Wound Care*, 17:6 (2008) pp. 241–247.

Ghamrawi S., Bouchara J.P., Tarasyuk O., Rogalsky S., Lyoshina L., Bulko O., Bardeau J.F., Promising silicones modified with cationic biocides for the development of antimicrobial medical devices, *Materials Science and Engineering: C*, 75 (2017) pp. 969-979.

Gharibi R., Kazemi S., Yeganeh H., Tafakori V., Utilizing dextran to improve hemocompatibility of antimicrobial wound dressings with embedded quaternary ammonium salts, *International Journal of Biological Macromolecules*, 131 (2019) pp. 1044-1056.

Ghasemlou M., Aliheidari N., Fahmi R., Shojae-Aliabadi S., Keshavarz B., Cran M.J., Khaksar R., Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils, *Carbohydrate Polymers*, 98 (2013) pp. 1117-1126.

Ghodrati M., Farahpour M.R., Hamishehkar H., Encapsulation of Peppermint essential oil in nanostructured lipid carriers: In-vitro antibacterial activity and accelerative effect on infected wound healing, *Colloids and Surfaces A*, 564 (2019) pp. 161-169.

Ghosal K., Agatemor C., Špitálský Z., Thomas S., Kny E., Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposites, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 358 (2019) pp. 1262-1278.

Gliński Z., Kostro K., Mikrobiom –charakterystyka i znaczenie, *Życie Weterynaryjne*, 90:7 (2015) pp. 446-450.

Golińska P., Wypij M., Rathod D., Tikar S., Dahm H., Rai M., Synthesis of silver nanoparticles from two acidophilic strains of *Pilimelia columellifera* subsp. *pallida* and their antibacterial activities, 56:5 (2016) pp. 541-556.

Gorczyca G., Tylingo R., Biopolimery w konstrukcji nowoczesnych materiałów medycznych o aktywności antydrobnoustrojowej, *Polimery*, 10 (2011a) pp. 707—788.

Gorczyca G., Tylingo R., Biopolimery w konstrukcji nowoczesnych materiałów medycznych o aktywności antydrobnoustrojowej, Cz. II. Metody aktywacji antydrobnoustrojowej materiałów medycznych, *Polimery*, 11:12 (2011b) pp. 789—904.

Gorczyca G., Tylingo R., Szweda P., Augustin E., Sadowska M., Milewski S., Preparation and characterization of genipin cross-linked porous chitosan–collagen–gelatin scaffolds using chitosan–CO₂ solution, *Carbohydrate Polymers*, 102 (2014) pp. 901-911.

Gristina A., Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration, *Science*, 237:4822 (1987) pp. 1588–1595.

Gritsch L., Lovell C., Goldmann W.H., Boccaccini A.R., Fabrication and characterization of copper(II)-chitosan complexes as antibiotic-free antibacterial biomaterial, *Carbohydrate Polymers*, 179 (2018) pp. 370-378.

Guarda A., Rubilar J. F., Miltz J., Galotto M.J., The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol, *International Journal of Food Microbiology*, 146 (2011) pp. 144-150.

Güneş S., Tihminlioğlu F., *Hypericum perforatum* incorporated chitosan films as potential bioactive wound dressing material, *International Journal of Biological Macromolecules*, 102 (2017) pp. 933-943.

Gupta P.D., Birdi T.J., Development of botanicals to combat antibiotic resistance, *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 8:4 (2017) pp. 266-275.

Han X., Parker T.L., Biological activity of vetiver (*Vetiveria zizanioides*) essential oil in human dermal fibroblasts, *Cogent Medicine*, 4 (2017a) ID: 1298176.

Han X., Parker T.L., Lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) essential oil demonstrated anti-inflammatory effect in pre-inflamed human dermal fibroblasts, *Biochimie Open*, 4 (2017b) pp. 107-111.

Hasan N., Cao J., Lee J., Naeem M., Hlaing S.P., Kim J., Jung Y., Lee B.L., Yoo J.W., PEI/NONOates-doped PLGA nanoparticles for eradicating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm in diabetic wounds via binding to the biofilm matrix, *Materials Science and Engineering: C*, 103 (2019) ID: 109741.

He J., Liang Y., Shi M., Guo B., Anti-oxidant electroactive and antibacterial nanofibrous wound dressings based on poly(ϵ -caprolactone)/quaternized chitosan-graft-polyaniline for full-thickness skin wound healing, *Chemical Engineering Journal*, 385 (2020) ID: 123464.

Hershberg R., Antibiotic-Independent adaptive effects of antibiotic resistance mutations, *Trends in Genetics*, 33 (2017) pp. 521-528.

Holm-Hansen O., Karl D.M., Biomass and adenylate energy charge determination in microbial cell extracts and environmental samples, *Methods in Enzymology*, 57 (1978) pp.73–85.

Hosseini S.F., Rezaei M., Zandi M., Farahmandghavi F., Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil, *Industrial Crops and Products*, 67 (2015) pp. 403–413.

Houshyar S., Kumar G.S., Rifai A., Trand N., Nayak R., Shanks R.A., Padhye R., Fox K., Bhattacharyya A., Nanodiamond/poly- ϵ -caprolactone nanofibrous scaffold for wound management, *Materials Science and Engineering: C*, 100 (2019) pp. 378-387.

Hsin Y.H., Chen C.F., Huang S., Shih T.S., Lai P.S., Chueh P.J., The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells, *Toxicology Letters* 178 (2008) pp. 130–139.

Hu S., Cai X., Qu X., Yu B., Yan C., Yang J., Li F., Zheng Y., Shi X., Preparation of biocompatible wound dressings with long-term antimicrobial activity through covalent bonding of antibiotic agents to natural polymers, *International Journal of Biological Macromolecules*, 123 (2019) pp. 1320-1330.

İnal M., Mülazımoğlu G., Production and characterization of bactericidal wound dressing material based on gelatin nanofiber, *International Journal of Biological Macromolecules*, 137 (2019) pp. 392-404.

Inoue N., Omata Y., Yonemasu K., Claveria F.G., Igarashi I., Saito A., Suzuki N., Collagen cross-reactive antigen of *Sarcocystis cruzi*, *Veterinary Parasitology*, 63 (1996) pp. 17-23.

Jabłoński A., Zębek S., Mokrzycka A., Wybrane mechanizmy oporności bakterii na chemioterapeutyki, *Medycyna Weterynaryjna*, 66:7 (2010) pp. 449-452.

Jatoi A.W., Ogasawara H., Kim I.S., Ni Q.Q., Polyvinyl alcohol nanofiber based three phase wound dressings for sustained wound healing applications, *Materials Letters*, 241 (2019) pp. 168-171.

Jesudasan J.S., Wahab P.U.A., Sekhar M.M.R., Effectiveness of 0.2% chlorhexidine gel and a eugenol-based paste on postoperative alveolar osteitis in patients having third molars extracted: a randomised controlled clinical trial, *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 53 (2015) pp. 826–830.

Jiji S., Udhayakumar S., Rose C., Muralidharan C., Kadirvelu K., Thymol enriched bacterial cellulose hydrogel as effective material for third degree burn wound repair, *International Journal of Biological Macromolecules*, 122 (2019) pp. 452-460.

Joorabloo A., Khorasani M.T., Adeli H., Mansoori-Moghadam Z., Moghaddam A., Fabrication of heparinized nano ZnO/poly(vinylalcohol)/carboxymethyl cellulose bionanocomposite hydrogels using artificial neural network for wound dressing application, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 70 (2019) pp. 253-263.

Jull A., Walker N., Parag V., Molan P., Rodgers A., Randomized clinical trial of honey-impregnated dressings for venous leg ulcers, *British Journal of Surgery*, 95:2 (2008) pp. 175-182.

Jurzak M., Goździalska A., Jaśkiewicz J., Bezpieczne stosowanie współczesnych kosmetyków (2012), Goździalska A., (red.) *Stan skóry wykładnikiem stanu zdrowia* Oficyna Wydawnicza AFM, pp. 121-150.

Kaczmarek B., Sionkowska A., Kozłowska J., Osyczka A.M., New composite materials prepared by calcium phosphate precipitation in chitosan/collagen/hyaluronic acid sponge cross-linked by EDC/NHS, *International Journal of Biological Macromolecules*, 107 (2018a) pp. 247-253.

Kaczmarek B., Sionkowska A., Skopinska-Wisniewska J., Influence of glycosaminoglycans on the properties of thin films based on chitosan/collagen blends, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 80 (2018) pp. 189-193.

Kamel N.A., El-messieh S.L.A., Saleh N.M., Chitosan/banana peel powder nanocomposites for wound dressing application: Preparation and characterization, *Materials Science and Engineering: C*, 72 (2017) pp. 543-550.

Kamoun E.A., Chen X., Eldin M.S.M., Kenawy E.R.S., Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers, *Arabian Journal of Chemistry*, 8:1 (2015) pp. 1-14.

Kamoun E.A., Kenawy E.R.S., Chen X., A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings, *Journal of Advanced Research*, 8:3 (2017) pp. 217-233.

Kanmani P., Rhim J.W., Properties and characterization of bionanocomposite films prepared with various biopolymers and ZnO nanoparticles, *Carbohydrate Polymer*, 106 (2014) pp. 190-199.

Karl D.M., Total Microbial biomass Estimation Derived from the Measurment of Particulate Adenosine-5'-Triphosphate, (1993) Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. (red.), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, Lewis Publishers, Chapter 41.

Karpiński R., Górniak B., Maksymiuk J., Biomedyczne zastosowania polimerów – materiały opatrunkowe (2015), Olszówka M., Maciąg K., (red.) Nowoczesne trendy w medycynie, Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, pp. 18-32.

Keawchaon L., Yoksan R., Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84 (2011) pp. 163-171.

Khan I., Bhardwaj M., Shukla S., Min S.H., Choi D.K., Bajpai V.K., Huh Y.S., Kang S.C., Carvacrol inhibits cytochrome P450 and protects against binge alcohol-induced liver toxicity, *Food and Chemical Toxicology*, 131 (2019) pp. 110582.

Khan M.A., Mujahid M., A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings, *International Journal of Biological Macromolecules*, 124 (2019) pp. 138-147.

Khorasani M.T., Joorabloo A., Moghaddam A., Shamsi H., Mansoori-Moghadam Z., Incorporation of ZnO nanoparticles into heparinised polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels for wound dressing application, *International Journal of Biological Macromolecules*, 114 (2018) pp. 1203-1215.

Kim H., Yang G.H., Choi C.H., Cho Y.S., Kim G.H., Gelatin/PVA scaffolds fabricated using a 3D-printing process employed with a low-temperature plate for hard tissue regeneration: Fabrication and characterizations, *International Journal of Biological Macromolecules*, 120 (2018) pp. 119-127.

Kim J.I., Pant H.R., Sim H.J., Lee K.M., Kim K.S., Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications, *Materials Science and Engineering C*, 44 (2014) pp. 52-57.

Kisling A., Lust R.M., Katwa L.C., What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease?, *Life Sciences*, 228 (2019) pp. 30-34.

Koehler J., Brandl F.P., Goepferich A.M., Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds, *European Polymer Journal*, 100 (2018) pp. 1-11.

Kohlert C., Schindler G., März R.W., Abel G., Brinkhaus B., Derendorf H., Gräfe E.U., Veit M., Systemic Availability and Pharmacokinetics of Thymol in Humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42:7 (2002) pp. 731–737.

Koosehbol S., Ebrahimian-Hosseiniabadi M., Alizadeh M., Zamanian A., Preparation and characterization of in situ chitosan/polyethylene glycol fumarate/thymol hydrogel as an effective wound dressing, *Materials Science and Engineering: C*, 79 (2017) pp. 66-75.

Kozłowska J., Stachowiak N., Prus W., Stability studies of collagen-based microspheres with *Calendula officinalis* flower extract, *Polymer Degradation and Stability*, 163 (2019b) pp. 214-219.

Kozłowska J., Stachowiak N., Sionkowska A., Preparation and characterization of collagen/chitosan poly (ethylene glycol)/nanohydroxyapatite composite scaffolds, *Polymers for Advanced Technologies*, 30:3 (2019a) pp. 799-803.

Kramer B., Wunderlich J., Muranyi P., ATP-synthesis capacity of pulsed light-exposed bacteria, *Systematic and Applied Microbiology*, 40 (2017) pp. 383–387.

Kruk A., Gadomska-Gajadur A., Sebai A., Ruśkowski P., Rusztowania komórkowe w inżynierii tkankowej, *Urządzenie i Technologie-Wyroby Medyczne*, 4 (2017) pp. 31-35.

Kucera J., Sojka M., Pavlik V., Szuszkiewicz K., Velebny V., Klein P., Multispecies biofilm in an artificial wound bed—A novel model for in vitro assessment of solid antimicrobial dressings, *Journal of Microbiological Methods*, 103 (2014) pp. 18-24.

Kumar A., Ryparová P., Hosseinpourpia R., Adamopoulos S., Prošek Z., Žigon J., Petrič M., Hydrophobicity and resistance against microorganisms of heat and chemically crosslinked poly(vinyl alcohol) nanofibrous membranes, *Chemical Engineering Journal*, 360 (2019) pp. 788-796.

Kumar M.S., Kirubanandan S., Sripriya R., Sehgal P.K., Triphala Incorporated Collagen Sponge—A Smart Biomaterial for Infected Dermal Wound Healing, *Journal of Surgical Research*, 158:1 (2010) pp. 162-170.

Kumar S.S.D., Rajendran N.K., Houreld N.N., Abrahams H., Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 115 (2018) pp. 165-175.

Kunicki-Goldfinger W.J.H., *Życie bakterii*, Wydawnictwo naukowe PWN, 2006

Lai-Cheong J.E., McGrath J.A., Structure and function of skin, hair and nails, *Medicine*, 45:6 (2017) pp. 347-351.

Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.J.E., A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *Journal of Applied Microbiology*, 91 (2001) pp. 453-462.

Lewandowska K., Sionkowska A., Grabska S., Kaczmarek B., Michalska M., The miscibility of collagen/hyaluronic acid/chitosan blends investigated in dilute solutions and solids, *Journal of Molecular Liquids*, 220 (2016) pp. 726–730.

Lewandowska K., Sionkowska A., *Polimery w kosmetykach*, (2019), Sionkowska A. (red.) *Chemia Kosmetyczna-Wybrane zagadnienia*, pp. 379-464.

Lewandowska K., Surface studies of microcrystalline chitosan/poly(vinyl alcohol) mixtures, *Applied Surface Science*, 263:15 (2012) pp. 115-123.

Leyva-Jimenez F.J., Lozano-Sanchez J., Borrás-Linares I., de la Luz Cadiz-Gurrea M., Mahmoodi-Khaledi E., Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds

against Gram positive and Gram negative bacteria, *LWT- Food Science and Technology*, 101 (2019) pp. 236-245.

Li B., Webster T.J., Bacteria antibiotic resistance: New challenges and for implant-associated orthopaedic infections, *Journal of Orthopaedic Research*, 36:1 (2018) pp. 22–32.

Li J., Chen J., Kirsner R., Pathophysiology of acute wound healing, *Clinics in Dermatology*, 25:1 (2007) pp. 9-18.

Li S., Liu W.C., Chang Y.H., Liu X., Chang C.L., Lin C., Chung R.J., Preparation and in vivo investigation of oligomeric proanthocyanidins cross-linked collagen serving as synthesized tissue regeneration membrane, *Materials Science and Engineering: C*, 101 (2019) pp. 640-649.

Liber-Kneć A., Łagan S., Zastosowanie pomiarów kąta zwilżania i swobodnej energii powierzchniowej do charakterystyki powierzchni polimerów wykorzystywanych w medycynie, *Polimers in Medicine*, 44 (2014) pp. 29–37.

Lin K., Zhang D., Macedo M., Cui W., Sarmiento B., Shen G., Advanced Collagen-Based Biomaterials for Regenerative Biomedicine, *Advanced Functional Materials*, 29:3 (2019) ID: 1804943.

Lin W.C., Lien C.C., Yeh H.J., Yu C.M., Hsu S., Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications, *Carbohydrate Polymers*, 94 (2013) pp. 603–611.

Lipka D., Boratyński J., Metaloproteinazy MMP. Struktura i funkcja, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 62 (2008) pp. 328-336.

Liu H., Lepoittevin B., Roddier C.,Guerineau V., Bech L., Herry J.M., Bellon-Fontaine M.N., Philippe Roger, Facile synthesis and promising antibacterial properties of a new guaiacol-based polymer, *Polymer*, 52:9 (2011) pp. 1908-1916.

Liu X., Zheng C., Luo X., Wang X., Jiang H., Recent advances of collagen-based biomaterials: Multi-hierarchical structure, modification and biomedical applications, *Materials Science and Engineering: C*, 99 (2019) pp. 1509-1522.

Liu Y., He L., Mustapha A., Li H., Hu Z.Q., Lin M., Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7, *Journal of Applied Microbiology*, 107 (2009) pp. 1193-1201.

Liyaskina E., Revin V., Paramonova E., Nazarkina M., Pestov N., Revina N., Kolesnikova S., Nanomaterials from bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing., *Journal of Physics: Conference Series*, 784 (2017) ID: 3012034.

Lohr G.D., Hollabaugh B., Waters P., Tiwana P.S., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and antibiotic use in septorhinoplasty: case report and review of literature, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 123:6 (2017) pp. 177-181.

López-Iglesias C., Barros J., Ardao I., Monteiro F.J., Alvarez-Lorenzo C., Gómez-Amoza J.L., García-González C.A., Vancomycin-loaded chitosan aerogel particles for chronic wound applications, *Carbohydrate Polymers*, 204 (2019) pp. 223-231.

Lumbreras-Aguayo A., Meléndez-Ortiz H.I., Puente-Urbina B., Alvarado-Canché C., Ledezma A., Romero-García J., Betancourt-Galindo R., Poly(methacrylic acid)-modified medical cotton gauzes with antimicrobial and drug delivery properties for their use as wound dressings, *Carbohydrate Polymers*, 205 (2019) pp. 203-210.

Majzner K., Wróbel T., Barańska M., Zastosowanie Mikrospektroskopii absorbcyjnej w podczerwieni oraz modelu regresji liniowej do analizy *ex vivo* struktur drugorzędowych białek tkanek zwierzęcych, *Studia i Materiały Informatyki Stosowanej*, 5: 10 (2013) pp. 29-36.

Manikandan A., Mani M.P., Jaganathan S.K., Rajasekar R., Jagannath M., Formation of functional nanofibrous electrospun polyurethane and murivenna oil with improved haemocompatibility for wound healing, *Polymer Testing*, 61 (2017) pp. 106-113.

Marchese A., Orhan I.E., Daglia M., Barbieri R., Di Lorenzo A., Nabavi S.F., Gortzi O., Izadi M., Nabavi S.M., Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature, *Food Chemistry*, 210 (2016) pp. 402-414.

Marinelli L., Fornasari E., Eusepi P., Ciulla M., Genovese S., Epifano F., Fiorito S., Turkez H., Örtücü S., Mingoia M., Simoni S., Pugnali A., Di Stefano A., Cacciatore I., Carvacrol prodrugs as novel antimicrobial agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 17 (2019) pp. 515-529.

Masood N., Ahmed R., Tariq M., Ahmed Z., Masoud M.S., Ali I., Asghar R., Andleeb A., Hasan A., Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits, *International Journal of Pharmaceutics*, 559 (2019) pp. 23-36.

Mayer A., Slezak V., Takac P., Olejnik J., Majtan J., Treatment of non-healing leg ulcers with honeydew honey, *The Journal of Tissue Viability*, 23 (2014) pp. 94-97.

McLoone P., Warnock M., Fyfe L., Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49:2 (2016) pp. 161-167.

Mehrabani M.G., Karimian R., Mehramouz B., Rahimi M., Kafil H.S., Preparation of biocompatible and biodegradable silk fibroin/chitin/silver nanoparticles 3D scaffolds as a bandage for antimicrobial wound dressing, *International Journal of Biological Macromolecules*, 114 (2018) pp. 961-971.

Meo S.A., Al-Asiri S.A., Mahesar A.L., Ansari M.J., Role of honey in modern medicine, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24:5 (2017) pp. 975-978.

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*, 22:2 (2001) pp. 165-173.

Michalska-Sionkowska M., Kaczmarek B., Walczak M., Sionkowska A, Antimicrobial activity of new materials based on the blends of collagen/chitosan/hyaluronic acid with gentamicin sulfate addition, *Materials Science and Engineering: C*, 86 (2018) pp. 103-108.

Michalska-Sionkowska M., Walczak M., Sionkowska A., Antimicrobial activity of collagen material with thymol addition for potential application as wound dressing, *Polymer Testing*, 63 (2017) pp. 360-366.

Miguel S.P., Figueira D.R., Simões D., Ribeiro M.P., Coutinho P., Ferreira P., Correia I.J., Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 169 (2018) pp. 60-71.

Miguel S.P., Moreira A.F., Correia I.J., Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 127 (2019) pp. 460-475.

Miladi H., Zmantar T., Kouidhi B., Chaabouni Y., Mahdouani K., Bakhrouf A., Chaieb K., Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid, *Microbial Pathogenesis*, 104 (2017) pp. 56-63.

Milovanovic S., Markovic D., Mrakovic A., Kuska R., Zizovic I., Frerich S., Ivanovic J., Supercritical CO₂ - assisted production of PLA and PLGA foams for controlled thymol release, *Materials Science and Engineering: C*, 99 (2019) pp. 394-404.

Morgado P.I., Aguiar-Ricardo A., Correia I.J., Asymmetric membranes as ideal wound dressings: An overview on production methods, structure, properties and performance relationship, *Journal of Membrane Science*, 490 (2015) pp. 139-151.

Moritz S., Wiegand C., Wesarg F., Hessler N., Müller F.A., Kralisch D., Fischer D., Active wound dressings based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine. *International Journal of Pharmaceutics*, 471 (2014) pp. 45–55.

Mosquera J.E., Goñi M.L., Martini R.E., Gañán N.A., Supercritical carbon dioxide assisted impregnation of eugenol into polyamide fibers for application as a dental floss, *Journal of CO₂ Utilization*, 32 (2019) pp. 259-268.

Mouès C.M., Heule F., Legerstee R., Hovius S.E.R., Five Millennia of Wound Care Products, What is New? A Literature Review, *Wound Management & Prevention*, 55:3 (2009) pp. 16-18.

Moura L.I.F., Dias A.M.A., Suesca E., Casadiegos S., Leal E.C., Fontanilla M.R., Carvalho L., de Sousa H.C., Carvalho E., Neurotensin-loaded collagen dressings reduce inflammation and improve wound healing in diabetic mice, *Molecular Basis of Disease*, 1842 (2014) pp. 32–43.

Muthukumar T., Prabu P., Ghosh K., Sastry T.P., Fish scale collagen sponge incorporated with *Macrotyloma uniflorum* plant extract as a possible wound/burn dressing material, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113 (2014) pp. 207-212.

Muwaffak Z., Goyanes A., Clark V., Basit A.W., Hilton S.T., Gaisford S., Patient-specific 3D scanned and 3D printed antimicrobial polycaprolactone wound dressings, *International Journal of Pharmaceutics*, 527:1–2 (2017) pp. 161-170.

Namviriyachote N., Lipipun V., Akkhawattanangkul Y., Charoonrut P., Ritthidej G.C., Development of polyurethane foam dressing containing silver and asiaticoside for healing of dermal wound, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14:1 (2019) pp. 63-77.

Nanasombat S., Wimuttigosol P., Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils, *Food Sci. Biotechnology*, 20 (2011) pp. 45-53.

Napavichayanun S., Amornsudthiwat P., Pienpinijtham P., Aramwit P., Interaction and effectiveness of antimicrobials along with healing-promoting agents in a novel biocellulose wound dressing, *Materials Science and Engineering: C*, 55 (2015) pp. 95-104.

Nasuti C., Gabbianelli R., Falcioni G., Cantalamessa F., Antioxidative and gastroprotective activities of anti-inflammatory formulations derived from chestnut honey in rats, *Food and Nutrition Research*, 26 (2006) pp. 130–137.

Natarajan D., Kiran M.S., Fabrication of juglone functionalized silver nanoparticle stabilized collagen scaffolds for pro-wound healing activities, *International Journal of Biological Macromolecules*, 124 (2019) pp. 1002-1015.

Natarajan D., Sakkara S., Meghwal M., Reddy N., Crosslinked chitosan films with controllable properties for commercial applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 120 (2018) pp. 1256-1264.

Nicholas B.D., Bhargave G., Hatipoglu A., Heffelfinger R., Rosen M., Pribitkin E.A., Preoperative prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization in patients undergoing intranasal surgery, *Medical Science Monitor*, 16:8 (2010) pp. 365-368.

Niyazbekova Z.T., Nagmetova G.Z., Kurmanbayev A.A., An Overview of Bacterial Cellulose Applications, *Euroasian Journal of Applied Biotechnology*, UDC 579.6, DOI: 10.11134/btp.2.2018.3.

Nostro A., Blanco A.R., Cannatelli M.A., Enea V., Flamini G., Morelli I., Roccaro A.S., Alonzo V., Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol, *FEMS Microbiology Letters*, 230:2 (2004) pp. 191-195.

O'Neill J. (red), (2016), Review on Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. London, England: Wellcome Trust, HM Government, pp.4-8.

Oh G.W., Ko S.C., Je J.Y., Kim Y.M., Oh J.H., Jung W.K., Fabrication, characterization and determination of biological activities of poly(ϵ -caprolactone)/chitosan-caffeic acid composite fibrous mat for wound dressing application, *International Journal of Biological Macromolecules*, 93 (2016) pp. 1549-1558.

Oryan A., Alemzadeh E., Moshiri A., Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis, *Journal of Tissue Viability*, 25:2 (2016) pp. 98-118.

Oryan A., Jalili M., Kamali A., Nikahval B., The concurrent use of probiotic microorganism and collagen hydrogel/scaffold enhances burn wound healing: An in vivo evaluation, *Burns*, 44:7 (2018) pp. 1775-1786.

Osés S.M., Pascual-Maté A., de la Fuente D., de Pablo A., Fernández-Muino M.A., Sancho M.T., Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against *Staphylococcus aureus*, *NJAS- Wageningen Journal of Life Sciences.*, 78 (2016) pp. 29–33.

Otterço A.N., Andrade A.L., Brassolatti P., Pinto K.N.Z., Araújo H.S.S., Parizotto N.A., Photobiomodulation mechanisms in the kinetics of the wound healing process in rats, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 183 (2018) pp. 22-29.

Padiyara P., Inoue H., Sprenger M., Governance G., Mechanisms to Address Antimicrobial Resistance, *Infectious Diseases: Research and Treatment*, 11 (2018) pp.1-4.

Park B.S., Choi W.S., Kim J.H., Kim K.H., Lee S.E., Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents, *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21:1 (2005) pp. 80-83.

Patrúlea V., Ostafe V., Borchard G., Jordan O., Chitosan as a starting material for wound healing applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97 (2015) pp. 417-426.

Paul S., Jayan A., Sasikumar C.S., Physical, chemical and biological studies of gelatin/chitosan based transdermal films with embedded silver nanoparticles, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5 (2015) pp. 975-986.

Pei R., Zhou F., Ji B., Xu J., Evaluation of Combined Antibacterial Effects of Eugenol, Cinnamaldehyde, Thymol, and Carvacrol against *E. coli* with an Improved Method, *Journal of Food Science*, 74:7 (2009) pp. M379-M383.

Pérez-Recalde M., Ruiz Arias I.E., Hermida É.B., Could essential oils enhance biopolymers performance for wound healing? A systematic review, *Phytomedicine*, 38 (2018) pp. 57-65.

Pieszko C., Grabowska J., Jurek N., Pieszko C., Grabowska J., Jurek N., Oznaczenie polifenoli i wybranych pierwiastków w kawie, herbacie i miodach, *Bromatologii i Chemii Toksykologiczna*, XLVIII:4 (2015) pp. 653 – 659.

Pinheiro P.F., Menini L.A.P., Bernardes P.C., Saraiva S.H., Carneiro J.W.M., Costa A.V., Alvarenga E.S., Lage M.R., Martins Gonçalves P., de Oliveira Bernardes C., Alvarenga E.S., Menini L., Semisynthetic Phenol Derivatives Obtained from Natural Phenols: Antimicrobial Activity and Molecular Properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (2017) pp. 323–330.

Pires A.L.R., Motta L.A., Dias A.M.A., de Sousa H.C., Moraes Â.M., Braga M.E.M., Towards wound dressings with improved properties: Effects of poly(dimethylsiloxane) on chitosan-alginate films loaded with thymol and beta-carotene, *Material Science and Engineering: C*, 93 (2018) pp. 595-605.

Poon V.K.M., Burd A., In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care, *Burns*, 30 (2004) pp. 140–147.

Promega, Technical Bulletin BacTiter-glo™ Microbial Cell Viability Assay, 2016

Qian W., Hu X., He W., Zhan R., Liu M., Zhou D., Huang Y., Hu X., Wang Z., Fei G., Wu J., Xing M., Xi H., Luo G., Polydimethylsiloxane incorporated with reduced graphene oxide (rGO) sheets for wound dressing application: Preparation and characterization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 166 (2018) pp. 61-71.

Qiao H., Guo T., Zheng Y., Zhao L., Sun Y., Liu Y., Xie Y., A novel microporous oxidized bacterial cellulose/arginine composite and its effect on behavior of fibroblast/endothelial cell, *Carbohydrate Polymers*, 184 (2018) pp. 323-332.

Qin Y. Antimicrobial textile dressings to manage wound infection (2019), Rajendran S. (red.) *Advanced Textiles for Wound Care*, Woodhead Publishing, pp. 193–210.

Queen D., Gaylor J.D., Evans J., Courtney J., Reid W., The preclinical evaluation of the water vapor transmission rate through burn wound dressings, *Biomaterials* 8 (1987a) pp. 367–371.

Queen D., Gaylor J.D.S., Evans J.H., Courtney J.M., Reid W.H., Evaluation of gaseous transmission (O₂ and CO₂) through burn wound dressings, *Burns*, 13:5 (1987b) pp. 357-364.

Raafat A.I., El-Sawy N.M., Badawy N.A., Mousa E.A., Mohamed A.M., Radiation fabrication of Xanthan-based wound dressing hydrogels embedded ZnO nanoparticles: In vitro evaluation, *International Journal of Biological Macromolecules*, 118 (2018) pp. 1892-1902.

Rahimi M., Ahmadi R., Kafil H.S., Shafiei-Irannejad V., A novel bioactive quaternized chitosan and its silver-containing nanocomposites as a potent antimicrobial wound dressing: Structural and biological properties, *Materials Science and Engineering: C*, 101 (2019) pp. 360-369

Rajendran N.K., Kumar S.S.D., Houreld N.N., Abrahamse H., A review on nanoparticle based treatment for wound healing, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 44, (2018) pp. 421-430.

Ramadass S.K., Nazir L.S., Thangam R., Perumal R.K., Manjubala I., Madhan B., Seetharaman S., Type I collagen peptides and nitric oxide releasing electrospun silk fibroin scaffold: A multifunctional approach for the treatment of ischemic chronic wounds, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175 (2019) pp. 636-643.

Ramanathan G., Thyagarajan S., Sivagnanam U.T., Accelerated wound healing and its promoting effects of biomimetic collagen matrices with siderophore loaded gelatin microspheres in tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 93 (2018) pp. 455-464.

Ramsay E.I., Rao S., Madathil L., Hegde S.K., Baliga-Rao M.P., George T., Baliga M.S., Honey in oral health and care: A mini review, *Journal of Oral Biosciences*, 61:1 (2019) pp. 32-36.

Ranghar S., Sirohi P., Verma P., Agarwal V., Nanoparticle-based drug delivery systems: promising approaches against infections, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57:2 (2013) pp. 209-222.

Raut J.S., Karuppayil S.M., A status review on the medicinal properties of essential oils, *Industrial Crops and Products*, 62 (2014) pp. 250-264.

Reichrath J., Saternus R., Vogt T., Endocrine actions of vitamin D in skin: Relevance for photocarcinogenesis of non-melanoma skin cancer, and beyond, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 453:15 (2017) pp. 96-102.

Reshmi C.R., Suja P.S., Manaf O., Sanu P.P., Sujith A., Nanochitosan enriched poly ϵ -caprolactone electrospun wound dressing membranes: A fine tuning of physicochemical properties, hemocompatibility and curcumin release profile, *International Journal of Biological Macromolecules*, 108 (2018) pp. 1261-1272.

Rethinam S., Parvathaleswara S.T., Nandhagobal G., Alagumuthu T., Robert B., Preparation of absorbable surgical suture: Novel approach in biomedical application, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47 (2018) pp. 454-460.

Revin V., Liyaskina E., Nazarkina M., Bogatyreva A., Shchankin M., Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products, *Brazilian Journal of Microbiology*, 49 (2018) pp. 151-159.

Riella K.R., Marinho R.R., Santos J.S., Pereira-Filho S.N., Cardoso J.C., Albuquerque-Junior R.L.C., Thomazzi S.M., Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents, *Journal of Ethnopharmacology*, 143:2 (2012) pp. 656-663.

Rivasa L., McDonnella M.J., Burgessa C.M., O'Brien M., Navarro-Villa A., Fanning S., Duffy G., Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol, *International Journal of Food Microbiology*, 139 (2010) pp. 70-78.

Rojas-Graü M.A., Avena-Bustillos R.J., Olsen C., Friedman M., Henika P.R., Martin-Belloso O., Pan Z., McHugh T.H., Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films, *Journal of Food Engineering*, 81 (2007) pp. 634–641.

Sabbatani S., Catena F., Neri F., Vallicelli C., Ansaloni L., Sartelli M., Coccolini F., Di Saverio S., Catena R., Lazzareschi D., Tarasconi A., Abongwa H.K., De Simone B., Pinna A., The Bolognese surgeon Giuseppe Ruggi: how and why the aseptic surgery was introduced in Bologna in the middle half of the XIX century, *Journal of Surgical Research*, 192:2 (2014) pp. 555-563.

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, *International Journal of Biological Macromolecules*, 42:1 (2008) pp. 6-9.

Sarheed O., Ahmed A., Shouqair D., Boateng J., Antimicrobial dressings for improving wound healing, (2016), Alexandrescu V.A. (red.), *Wound Healing-New insights into Ancient Challenges*, InTech, rozdział 17, DOI 10.5772/63961.

Sasikala L., Rathinamoorthy R., Dhurai B., Optimization of process conditions for chitosan-manuka honey film as wound contact layer for wound dressings, *Wound Medicine*, 23 (2018) pp. 11-21.

Schulz H., Özkan G., Baranska M., Krügera H., Özcan M., Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 39 (2005) pp. 249–256.

Sengottuvelan A., Balasubramanian P., Will J., Boccaccin A.R., Bioactivation of titanium dioxide scaffolds by ALP-functionalization, *Bioactive Materials*, 2:2 (2017) pp. 108-115.

Shah J.B., The History of Wound Care, *The Journal of the American College of Certified Wound Specialists*, 3:3 (2011) pp. 65–66.

Shah N., Ul-Islama M., Khattak W.A., Park J.K., Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material, *Carbohydrate Polymers*, 98 (2013) pp. 1585–1598.

Shanmugasundaram O.L., Ahmed K.S.Z., Sujatha K., Ponnmurugan P., Srivastava A., Ramesh R., Sukumar R., Elanithi K., Fabrication and characterization of chicken feather keratin/polysaccharides blended polymer coated nonwoven dressing materials for wound healing applications, *Material Science and Engineering: C*, 92 (2018) pp. 26-33.

Shao J., Wang B., Li J., Jansen J.A., Walboomers X.F., Yang F., Antibacterial effect and wound healing ability of silver nanoparticles incorporation into chitosan-based nanofibrous membranes, *Materials Science and Engineering: C*, 98 (2019) pp. 1053-1063.

Shao W., Liu H., Wang S.X., Wu J.M., Huang M., Min H.H., Liu, X.F., Controlled release and antibacterial activity of tetracycline hydrochloride-loaded bacterial cellulose composite membranes, *Carbohydrate Polymers*, 145 (2016) pp. 114 –120.

Sharma G., Raturi K., Dang S., Gupta S., Gabrani R., Inhibitory effect of cinnamaldehyde alone and in combination with thymol, eugenol and thymoquinone against *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Herbal Medicine*, 9 (2017) pp. 68–73.

Shi R., Geng H., Gong M., Ye J., Wu C., Hu X., Zhang L., Long-acting and broad-spectrum antimicrobial electrospun poly (ϵ -caprolactone)/gelatin micro/nanofibers for wound dressing, *Journal of Colloid and Interface Science*, 509 (2018) pp. 275-284.

Shiyab S., Shatnawi M., Shibli R., Alzweiri M., Akash M.W., Aburjai T., Influence of developmental stage on yield and composition of *Origanum syriacum* L. oil by multivariate analysis, *Journal of Medicinal Plant Research*, 6:15 (2012) pp. 2985-2994.

Shojaee-Aliabadi S., Hosseini H., Mohammadifar M.A., Mohammadi A., Ghasemlou M., Ojagh S.M., Hosseini S.M., Khaksar R., Characterization of antioxidant-antimicrobial - carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil, *International Journal of Biological Macromolecules*, 52 (2013) pp. 116-124.

Sieber K.B., Bromley R.E., Hotopp J.C., Lateral gene transfer between prokaryotes and eukaryotes, *Experimental Cell Research*, 358 (2017) pp. 421-426.

Siemieniec J., Synteza nanocząstek srebra oraz złota metodami zielonej chemii, *Chemik*, 67:10 (2013) pp. 842–847.

Sikka M.P., Midha V.K., (2019) The role of biopolymers and biodegradable polymeric dressings in managing chronic wounds, Rajendran S. (red.) *Advanced Textiles for Wound Care*, pp. 463–488.

Silva M.A, de Carvalho Y.K.L., de Carvalho C.E.S., Feitosa M.L.T., de Moraes M.M.A., de Amorim Carvalho F.A., Neto B.C.V., Miglino M.A., Jozala A.F., de Carvalho M.A.M, Behavior and biocompatibility of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells with bacterial cellulose membrane, *Peer J.*, 6 (2018) ID: 4656.

- Silva N.H.C.S., Rodrigues A.F., Almeida I.F., Costa P.C., Rosado C., Neto C.P., Silvestre A.J.D., Freire C.S.R., Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: In vitro dissolution and permeation studies, *Carbohydrate Polymers*, 106 (2014) pp. 264-269.
- Simões D., Miguel S.P., Ribeiro M.P., Coutinho P., Mendonça A.G., Correia I.J., Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127 (2018) pp. 130–141.
- Simón M., Active Leptospermum Honey: A Strategy to Prevent Chronic Wounds, *The Journal for Nurse Practitioners*, 12:5 (2016) pp. 339–345.
- Singh B., Varshney L., Francis S., Rajneesh M., Designing sterile biocompatible moxifloxacin loaded tragacanth-PVA-alginate wound dressing by radiation crosslinking method, *Wound Medicine*, 17 (2017) pp. 11-17.
- Sionkowska A., Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review, *Progress in Polymer Science*, 36:9 (2011) pp. 1254-1276.
- Sionkowska A., Effects of solar radiation on collagen and chitosan films, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 82:1 (2006) pp. 9-15.
- Sionkowska A., Interaction of collagen and poly(vinyl pyrrolidone) in blends, *European Polymer Journal*, 39:11 (2003) pp. 2135-2140.
- Sionkowska A., Kozłowska J., Properties and modification of porous 3-D collagen/hydroxyapatite composites, *International Journal of Biological Macromolecules*, 52 (2013) pp. 250-259.
- Sionkowska A., Kozłowska J., Skorupska M., Michalska M., Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 80 (2015) pp. 605–609.
- Siripatrawan U., Kaewklin P., Fabrication and characterization of chitosan-titanium dioxide nanocomposite film as ethylene scavenging and antimicrobial active food packaging, *Food Hydrocolloids*, 84 (2018) pp. 125-134.
- Sirvio L.M., Grussing M.S.S.M., The effect of gas permeability of film dressings on wound environment and healing, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 93:4 (1989) pp. 528–531.
- Skopińska-Wiñniewska J., Sionkowska A., Kaminska A., Kaznica A., Jachimiak R., Drewa T., Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration, *Applied Surface Science*, 255:19 (2009) pp. 8286-8292.

Skopińska-Wiśniewska J., Kuderko J., Bajek A., Maj M., Sionkowska A., Ziegler-Borowska M., Collagen/elastin hydrogels cross-linked by squaric acid, *Materials Science and Engineering: C*, 60 (2016) pp. 100-108.

Song H.J., Lim H.Y., Chun W., Choi K.C., Sung J.H., Sung G.Y., Fabrication of a pumpless, microfluidic skin chip from different collagen sources, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 56:25 (2017) pp. 375-381.

Stone S.A., Gosavi P., Athauda T.J., Ozer R.R., In situ citric acid crosslinking of alginate/polyvinyl alcohol electrospun nanofibers, *Materials Letters*, 112 (2013) pp. 32-35.

Sulaeva I., Henniges U., Rosenau T., Potthast A., Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review, *Biotechnology Advances*, 33:8 (2015) pp. 1547-1571.

Sundaramurthi D., Krishnan U.M., Sethuraman S., Electrospun Nanofibers as Scaffolds for Skin Tissue Engineering, *Polymer Reviews*, 54:2 (2014) pp. 348–376.

Sybilski A.J., Skóra – najważniejszy narząd naszego ciała. dbajmy o nią!, *Pediatrics i Medycyna Rodzinna*, 8:4 (2012) pp. 375-379.

Szcześniak M., Grimling B., Meler J., Cynk-pierwiastek zdrowia, *Farmacja Polska*, 70:7 (2014) pp. 363-366.

Szycher M., Lee S.J., Modern Wound Dressings: A Systematic Approach to Wound Healing, *Journal of Biomaterials Applications*, 7 (1992) pp. 142-213.

Tabaai M.J., Emtiazi G., Transparent nontoxic antibacterial wound dressing based on silver nano particle/bacterial cellulose nano composite synthesized in the presence of tripolyphosphate, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 44 (2018) pp. 244-253.

Tallawi M., Rosellini E., Barbani N., Cascone M.G., Rai R., Saint-Pierre G., Boccaccini A.R., Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: a review, *Journal of the Royal Society Interface* 12:108 (2015) ID: 20150254.

Tan S.P., McLoughlin P., O'Sullivan L., Prieto M.L., Gardiner G.E., Lawlor P.G., Hughes H., Development of a novel antimicrobial seaweed extract-based hydrogel wound dressing, *International Journal of Pharmaceutics*, 456:1 (2013) pp.10-20.

Tang Y., Lan X., Liang C., Zhong Z., Xie R., Zhou Y., Miao X., Wang H., Wang W., Honey loaded alginate/PVA nanofibrous membrane as potential bioactive wound dressing, *Carbohydrate Polymers*, 219 (2019) pp. 113-120.

Tantiwatcharothai S., Prachayawarakorn J., Characterization of an antibacterial wound dressing from basil seed (*Ocimum basilicum* L.) mucilage-ZnO nanocomposite, *International Journal of Biological Macromolecules*, 135 (2019) pp. 133-140.

Tavakoli J., Tang Y., Honey/PVA hybrid wound dressings with controlled release of antibiotics: Structural, physico-mechanical and in-vitro biomedical studies, *Material Science and Engineering C*, 77 (2017) pp. 318-325.

Tavoukjian V., Faecal microbiota transplantation for the decolonization of antibiotic-resistant bacteria in the gut: a systematic review and meta-analysis, *Journal of Hospital Infection*, 102:2 (2019) pp. 174-188.

Teodorescu M., Bercea M., Morariu S., Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: Perspectives and challenges, *Biotechnology Advances*, 37:1 (2019) pp. 109-131.

Thanh T.N., Minh H.H., Phuong T.M., Thuan D.B.T., Nguyen T.T.H., Phuoc T.V., Thai M.D., Hai D.N., Van Toi V., Hiep T.N., Optimization and characterization of electrospun polycaprolactone coated with gelatin-silver nanoparticles for wound healing application, *Materials Science and Engineering: C*, 91 (2018) pp. 318-329.

Tippayatum P., Chonhenchob V., Antibacterial Activities of Thymol, Eugenol and Nisin Against Some Food Spoilage Bacteria, *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 41 (2007) pp. 319 - 323.

Tomankova K., Horakova J., Harvanova M., Malina L., Soukupova J., Hradilova S., Kejllova K., Malohlava J., Licman L., Dvorakova M., Jirova D., Kolarova H., Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles in vitro, *Food and Chemical Toxicology*, 82 (2015) pp. 106-115.

Torgbo S., Sukyai P., Bacterial cellulose-based scaffold materials for bone tissue engineering, *Applied Materials Today*, 11 (2018) pp. 34-49.

Torres-Giner S., Hilliou L., Melendez-Rodriguez B., Figueroa-Lopez K. J., Madalena D., Cabedo L., Covas A.A., Vicente Lagaron J. M., Melt processability, characterization, and antibacterial activity of compression-molded green composite sheets made of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) reinforced with coconut fibers impregnated with oregano essential oil, *Food Packaging and Shelf Life*, 17 (2018) pp. 39–49.

Trojanek N., Metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej i ich tkankowe inhibitory, *Postępy Biochemii* 58:3 (2012) pp. 353-362.

Trovatti E., Freire C.S., Pinto P.C., Almeida I.F., Costa P., Silvestre A.J., Neto C.P., Rosado C., Bacterial cellulose membranes applied in topical and transdermal delivery of lidocaine hydrochloride and ibuprofen: in vitro diffusion studies, *International Journal of Pharmaceutics*, 435:1 (2012) pp. 83-87.

Truszczyński M., Posyniak A., Pejsak Z., Mechanizmy powstawania oporności bakterii na działanie antybiotyków i środków dezynfekujących, *Medycyna Weterynaryjna*, 63:3 (2013) pp. 131-135.

Turki A., Oudiani A.E., Msahli S., Sakli F., Infrared spectra for alfa fibers treated with thymol, *Journal of Glycobiology*, 7:1 (2018) ID: 1000130.

Vakiliana S., Norouzia M., Soufi-Zomorrod M., Shabani I., Hosseinzadeh S., Soleimani M. *L.inermis*-loaded nanofibrous scaffolds for wound dressing applications, *Tissue and Cell*, 51 (2018) pp. 32–38.

Vandamme L., Heyneman A., Hoeksema H., Verbelen J., Monstrey S., Honey in modern wound care: A systematic review, *Burns*, 39 (2013) pp. 1514-1525.

Vázquez-Sánchez D., Antunes J., Rodrigues G.M., Micotti M.E., Oetterer G.M., Control of *Staphylococcus aureus* biofilms by the application of single and combined treatments based in plant essential oils, *International Journal of Food Microbiology*, 286 (2018) pp. 128-138.

Veras H.N.H., Rodrigues F.F.G., Colares A.V., Menezes I.R.A., Coutinho H.D.M., Botelho M.A., Costa J.G.M., Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol, *Fitoterapia*, 83 (2012) pp. 508-512.

Vowden K., Vowden P., Wound dressings: principles and practice, *Surgery (Oxford)*, 35:9 (2017) pp. 489-494.

Walczak M., Michalska-Sionkowska M., Kaczmarek B., Sionkowska A., Surface and antibacterial properties of thin films based on collagen and thymol, 22 (2020) ID: 100949.

Wang L., Zhao X., Zhu C., Xia X., Qin W., Li M., Wang T., Chen S., Xu Y., Hang B., Sun Y., Jiang J., Richard L.P., Lei L., Zhang G., Hu J., Thymol kills bacteria, reduces biofilm formation, and protects mice against a fatal infection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strain L20, *Veterinary Microbiology*, 203 (2017) pp. 202-210.

Warnke P.H., Becker S.T., Podschun R., Sivananthan S., Springer I.N., Russo P.A.J., Wiltfang J., Fickenscher H., Sherry E., The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections, *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 37:7 (2009) pp. 392-397.

Wattanasatcha A., Rengpipat S., Wanichwecharungruang S., Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent, *International Journal of Pharmaceutics*, 434 (2012) pp. 360-365.

Wedmore I., McManus J.G., Pusateri A.E., Holcomb J.B., A Special Report on the Chitosan-based Hemostatic, Dressing: Experience in Current Combat Operations, *The Journal of Trauma*, 60 (2006) pp. 655– 658.

Wiegand C., Abel M., Ruth P., Hipler U.C., Superabsorbent polymer-containing wound dressings have a beneficial effect on wound healing by reducing PMN elastase concentration and inhibiting microbial growth, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22:11 (2011) pp. 2583–2590.

Wiegand C., Heinze T., Hipler U.C., Comparative in vitro study on cytotoxicity, antimicrobial activity, and binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds of alginate and silver-containing alginate, *The International Journal of Tissue Repair and Regeneration*, 17:4 (2009) pp. 511-521.

Wiśniewski M., Sionkowska A., Kaczmarek H., Lazare S., Tokarev V., Wpływ promieniowania laserowego na cienkie błony kolagenowe, *POLIMERY*, 52 (2007) pp. 571-578.

Yang J.M., Yang J.H., Tsou S.C., Ding C.H., Hsu C.C., Yang K.C., Yang C.C., Chen K.S., Chen S.W., Wang J.S., Cell proliferation on PVA/sodium alginate and PVA/poly(γ -glutamic acid) electrospun fiber, *Materials Science and Engineering: C*, 66 (2016) pp. 170-177.

Ye J., Zheng S., Zhang Z., Yang F., Ma K., Feng Y., Zheng J., Mao D., Yang X., Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* ATCC 23767 using tobacco waste extract as culture medium, *Bioresource Technology*, 274 (2019) pp. 518-524.

Ye S., Jiang L., Wu J.M., Su C., Huang C.B., Liu X.F., Shao, W., Flexible amoxicillin-grafted bacterial cellulose sponges for wound dressing: vitro and in vivo evaluation, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10 (2018) pp. 5862 – 5870.

Yu L., Ren J.X., Nan H.M., Liu, B.F., Identification of antibacterial and antioxidant constituents of the essential oils of *Cynanchum chinense* and *Ligustrum compactum*, *Natural Product Research*, 29:18 (2015) pp. 1779–1782.

Zamani Z., Alipour D., Moghimi H.R., Mortazavi S.A.R., Saffary M., Development and Evaluation of Thymol Microparticles Using Cellulose Derivatives as Controlled Release Dosage Form, *Iranian journal of pharmaceutical research (IJPR)* 14:4 (2015) pp. 1031–1040

Zhang D., Hu S., Sun J., Zhang L., Dong H., Feng W., Lei J., Dong Y., Antibiotic consumption versus the prevalence of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria at a tertiary hospital in China from 2011 to 2017, *Journal of Infection and Public Health*, 12:2 (2019a) pp. 195-199.

Zhang Y., Jiang M., Zhang Y., Cao Q., Wang X., Han Y., Sun G., Li Y., Zhou J., Novel lignin–chitosan–PVA composite hydrogel for wound dressing, *Materials Science and Engineering: C*, 104 (2019b) ID: 110002.

Zhang Y., Zhang C., Liu K., Zhu X., Liu F., Ge X., Biologically synthesized titanium oxide nanostructures combined with morphogenetic protein as wound healing agent in the femoral fracture after surgery, *Journal of Photochemistry and Photobiology. B*, 182 (2018) pp. 35-41.

Zych I., Krzepińko A., Pomiar całkowitej zdolności antyoksydacyjnej wybranych antyoksydantów i naparów metodą redukcji rodnika DPPH, *Metrologia*, 15:1 (2010) pp. 51-54.

Żenkiewicz M., Methods for the calculation of surface free energy of solids, *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, 24 (2014) pp. 137-145.