

POLIMERY

MIESIĘCZNIK POŚWIĘCONY CHEMII, TECHNOLOGII I PRZETWÓRSTWU POLIMERÓW

GRZEGORZ GORCZYCA^{1),*}, ROBERT TYLINGO²⁾

Biopolimery w konstrukcji nowoczesnych materiałów medycznych o aktywności antydrobnoustrojowej

Cz. II. METODY AKTYWACJI ANTYDROBNOUSTROJOWEJ MATERIAŁÓW MEDYCZNYCH^{**)}

Streszczenie — Artykuł stanowi Cz. II publikacji poświęconej konstrukcji nowoczesnych materiałów medycznych o aktywności antydrobnoustrojowej. Przedstawiono strategię nadawania właściwości antydrobnoustrojowych biopolimerowym materiałom medycznym. Omówiono wykorzystanie różnych, aktualnie stosowanych czynników antydrobnoustrojowych oraz mechanizmy odpowiadające za kontrolowane ich dostarczanie w miejscu zranienia. Szczególną uwagę poświęcono peptydom o aktywności antydrobnoustrojowej (tabela 1, rys. 1), jako nowej grupie czynników znajdujących się na etapie zaawansowanych badań klinicznych. Uzasadniono wybór chitozanu — jedyne, handlowo dostępne biopolimeru cechującego się aktywnością antydrobnoustrojową — jako potencjalnej matrycy w nowych zaawansowanych materiałach medycznych przeznaczonych do kontrolowanego uwalniania czynnika aktywnego.

Słowa kluczowe: biomateriały, chitozan, czynniki antydrobnoustrojowe, peptydy antydrobnoustrojowe, infekcje skórne.

NATURAL POLYMERS IN DESIGNING MODERN MEDICAL MATERIALS WITH ANTIMICROBIAL PROPERTIES. Part II. ANTIMICROBIAL ACTIVATION METHODS FOR MEDICAL MATERIALS

Summary — Strategies for imparting antibacterial activity to biopolymer medical materials have been presented. Various currently used antimicrobial agents and the mechanisms responsible for their controlled release at the site of wound were described. The emphasis was put on antimicrobial peptides as a new group of agents that are the subject of advanced clinical trials (Table 1, Fig. 1). The choice of chitosan — the only commercially available biopolymer with antimicrobial activity — as a possible matrix for advanced medical materials designed for the controlled delivery of active agent (Table 2), has been justified.

Keywords: biomaterials, chitosan, antimicrobial agents, antimicrobial peptides, skin infections.

¹⁾ Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Technologii Leków i Biochemii, ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk.

²⁾ Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności, ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk.

^{*}) Autor do korespondencji; e-mail: gregory.gorczyca@gmail.com

^{**)} Cz. I. *Polimery* 2011, 56, nr 10.

WPROWADZENIE

Dotychczas prowadzone badania poświęcone projektowaniu nowoczesnych materiałów o aktywności antydrobnoustrojowej obejmują przede wszystkim wykorzystanie różnego rodzaju czynników antydrobnoustrojowych [1]. Trwały kontakt czynnika aktywnego z uszkodzoną tkanką, konieczny do zahamowania infekcji i zachowania czystości mikrobiologicznej rany, jest zapewniany w wyniku unieruchomienia tego czynnika na powierzchni matrycy materiału bądź zapewnienia kontrolowanego profilu uwalniania substancji aktywnej z jego wnętrza. Miejscowe stosowanie czynników antydrobnoustrojowych ma ogromną przewagę nad zastosowaniami systemowymi ze względu na możliwość wykorzystania w takim przypadku dużo większych stężeń, precyzyjnie dostarczanych bezpośrednio w miejsce zranienia. Ma to znaczenie zwłaszcza w aspekcie kształtowania się mechanizmów oporności drobnoustrojów wystawionych na długotrwałe działanie użytego czynnika antydrobnoustrojowego.

Odmiennym sposobem aktywacji antydrobnoustrojowej różnego rodzaju materiałów jest wykorzystanie do ich produkcji substancji wykazujących antydrobnoustrojową aktywność. Ta metoda budzi jednak dużo mniejsze zainteresowanie, ze względu na bardzo niewielki wybór odpowiednich surowców, ograniczający się jedynie do chitozanu – biopolimeru, którego aktywność antydrobnoustrojowa jest uwarunkowana obecnością licznych sprotonowanych grup aminowych [2].

WYKORZYSTANIE CZYNNIKÓW O AKTYWNOŚCI ANTYDROBNOUSTROJOWEJ

Zdolność do tymczasowego podawania czynnika antydrobnoustrojowego, dostarczania go w ściśle określonym czasie bądź cyklicznie, w stałych dawkach jest pożądaną cechą materiałów stosowanych w różnego typu praktykach medycznych [3]. Wiedza na temat mechanizmów kontroli uwalniania unieruchomionego we wnętrzu matrycy związku jest więc niezbędna w projektowaniu odpowiedniego systemu. Uwalnianie związku z matrycy biodegradowalnego materiału jest kontrolowane przez procesy dyfuzyjne i/lub przez kinetykę degradacji samej matrycy. W praktyce oba te mechanizmy odgrywają istotną rolę. To, który będzie dominował, zależy od właściwości zarówno unieruchomionej cząsteczki, jak i nośnika oraz ich cech fizykochemicznych. Uwalnianie małych cząsteczek jest kontrolowane przede wszystkim na drodze procesów dyfuzyjnych. Natomiast profil uwalniania makrocząsteczek, takich jak peptydy i białka jest bardziej złożony i zależy w większości przypadków od szybkości degradacji matrycy [4].

Mechanizmy uwalniania czynnika aktywnego z polimerowych matryc

W systemach, w których profil uwalniania unieruchomionego związku zależy od procesów dyfuzyjnych, noś-

nik (polimerowa matryca) zachowuje zwykle integralność swojej struktury przez cały okres stosowania. W takich systemach szybkość dyfuzji jest kontrolowana poprzez następujące czynniki: rozpuszczalność czynnika aktywnego w otaczającym środowisku (zarówno w wodzie, jak i w roztworze polimeru tworzącego matrycę); gradient stężenia uwalnianego związku; ilość substancji aktywnej zawartej w matrycy; morfologię matrycy (porowatość, powierzchnię właściwą i kształt); hydrofilowość/hydrofobowość matrycy; oddziaływania chemiczne pomiędzy unieruchomionym związkiem a matrycą nośną; właściwości użytego polimeru tworzącego matrycę oraz zewnętrzne czynniki środowiskowe (pH, siła jonowa, aktywność termiczna i/lub enzymatyczna) [4]. Wielkość zarówno samej matrycy, jak i unieruchomionego czynnika jest jednym z najważniejszych parametrów wpływających na szybkość jego uwalniania. Szybkość dyfuzji z biodegradowalnych systemów o dużych wymiarach może być bardzo mała, natomiast z systemów, w których matrycę stanowi koloidalna zawiesina polimeru o bardzo dużej powierzchni właściwej – bardzo duża (dużo krótsza droga dyfuzji). Różnice w profilu uwalniania unieruchomionego czynnika aktywnego można więc uzyskać w wyniku modyfikacji powierzchni właściwej matrycy, np. mieszając ze sobą frakcje o różnym kształcie. Niezwykle ważna jest także zdolność i siła oddziaływania związku z polimerową matrycą. Ma to istotne znaczenie zwłaszcza w odniesieniu do oddziaływań jonowych z udziałem matryc zbudowanych z polimerów o licznych wolnych grupach karboksylowych. W przypadku związków o charakterze kwasowym bądź neutralnym może dojść do sytuacji, w której, w wyniku słabych oddziaływań jonowych z wolnymi grupami karboksylowymi, będzie miało miejsce strącenie w postaci kryształków unieruchomionego we wnętrzu matrycy związku [5]. Możliwość sterowania szybkością procesów dyfuzyjnych na drodze różnicowania ciężarów cząsteczkowych polimerów, z których jest wykonana matryca nośna, wykorzystuje się także w projektowanych systemach ze zmodyfikowanym profilem uwalniania. Zwykle występującą prawidłowością jest to, że zastosowanie polimeru o mniejszym ciężarze cząsteczkowym prowadzi do uzyskania materiału o większej porowatości i nieco gorszej wytrzymałości. Uwalnianie z takich systemów substancji aktywnych jest zazwyczaj gwałtowne, większość bowiem zawartego w nich związku uwalnia się już w pierwszych godzinach stosowania [4].

Procesy degradacji matrycy zbudowanej z polimerów naturalnych, a więc większości matryc biodegradowalnych, można podzielić na: procesy związane z jej rozpuszczaniem (erozją) oraz procesy degradacji przebiegające na skutek działania czynników zewnętrznych (głównie biodegradacji) [4]. Erozja powoduje bądź utratę masy, bądź wyjściowej struktury danego materiału. Biodegradacja natomiast prowadzi do chemicznego rozrywania wiązań, a więc do skracania długości łańcuchów polimerowych, w wyniku reakcji hydrolitycznych lub enzyma-



tycznych. Polimery biodegradowalne zwykle są podatne na trzy typy degradacji. Typ pierwszy to degradacja związana z rozpadem głównego łańcucha polimeru. Rozpad wiązań pomiędzy monomerami prowadzi do utraty ciągłości łańcucha. Temu rodzajowi degradacji ulega większość polimerów liniowych. Z kolei materiał nierozpuszczalny w wodzie, ale wytworzony na bazie rozpuszczalnego w wodzie polimeru, np. na drodze chemicznego bądź enzymatycznego sieciowania, może ulegać degradacji drugiego typu na skutek rozerwania tych sieciujących wiązań. Typ trzeci natomiast obejmuje zmiany w obrębie łańcuchów bocznych, jeśli takie występują. Degradacja materiałów otrzymanych na bazie polimerów naturalnych może być sterowana poprzez modyfikację następujących czynników: budowy chemicznej i składu polimerowej matrycy, ciężaru cząsteczkowego użytego polimeru, jego stężenia, hydrofobowości bądź hydrofilowości, właściwości morfologicznych matrycy (kształtu, wielkości i porowatości), obecności w układzie substancji pomocniczych, zewnętrznych czynników środowiskowych (np. pH, siły jonowej, temperatury), metody otrzymywania matrycy, warunków procesu sterylizacji wytworzonego materiału. W przypadku wykorzystania matryc biodegradowalnych, uwalnianie aktywnego składnika unieruchomionego w ich wnętrzu, następuje na drodze degradacji przebiegającej wg wyszczególnionych wyżej mechanizmów.

Czynniki antydrobnoustrojowe

W ostatnich latach na rynku wyrobów medycznych pojawiły się materiały opatrunkowe przystosowane do uwalniania czynnika antydrobnoustrojowego na powierzchni rany. Szerokie i niekontrolowane wręcz wykorzystywanie antybiotykoterapii doprowadziło do powszechnego występowania wielolekoopornych szczepów bakteryjnych, co zmusiło grupy badawcze do poszukiwania innego rodzaju aktywnych czynników, przeciwko którym prawdopodobieństwo wykształcenia oporności byłoby znacznie mniejsze [6–8]. W konsekwencji wzrosło zainteresowanie czynnikami, takimi jak srebro, preparaty jodu i miodu, a także nową grupą czynników antydrobnoustrojowych, mianowicie peptydami antydrobnoustrojowymi. W odróżnieniu od antybiotyków, mających zazwyczaj bardzo określone i specyficzne cele cząsteczkowe, wspomniane czynniki peptydowe wykazują zróżnicowane, złożone mechanizmy działania [9–15], utrudniające drobnoustrojom wykształcenie skutecznych mechanizmów obrony [16–18]. Dodatkowo cechy, takie jak: mała toksyczność, szerokie spektrum aktywności oraz stosunkowo niewielkie wartości MIC (minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów) wpłynęły na to, że większość z wymienionych czynników antydrobnoustrojowych jest handlowo dostępna w różnego rodzaju materiałach medycznych.

W przypadku materiałów zawierających srebro różnej postaci, uwalnianym czynnikiem antydrobnoustrojo-

wym są zawsze kationy srebra [19]. Uważa się je za bardzo efektywny czynnik antydrobnoustrojowy o szerokim spektrum działania [20, 21]. Co prawda, wieloletnie badania pozwoliły na wyszczególnienie różnych możliwych mechanizmów nabywania przez drobnoustroje specyficznej oporności na srebro [22–24], częstotliwość jej występowania była jednak sporadyczna [25, 26], uznano więc srebro za niezwykle obiecujący czynnik antydrobnoustrojowy.

Jodopowidon to obecnie najczęściej stosowany preparat jodu, wchodzący w skład wielu dostępnych opatrunków medycznych przeznaczonych do leczenia trudno gojących się infekcji skórnych. Jest to rozpuszczalny w wodzie kompleks jodu z poliwinylpirolidonem (PVP), o stężeniu jodu 9,0–12,0 %. Przykładem tego typu materiałów wykorzystywanych w praktyce medycznej są opatrunki z serii Inadine® (Johnsons & Johnsons Ltd.) otrzymywane na bazie glikolu polietylenowego [poli(tlenku etylenu)] impregnowane 10-proc. jodopowidonem.

Antybakteryjna aktywność miodu wynika z synergii działania nadtlenu wodoru, powstającego pod wpływem zawartej w miodzie oksydazy glukozy oraz metyloglioksalu [14, 27]. Na podstawie zawartości metyloglioksalu w danym preparacie miodu opracowano parametr UMF (Unikalny Czynniki Manuka), określający aktywność preparatu, a zatem przydatność w zastosowaniach medycznych. Miód oznaczony parametrem 1 UMF wykazuje aktywność antyseptyczną porównywalną z aktywnością 1-proc. roztworu fenolu. Dodatkową zaletą wykorzystania miodów jest bardzo duża zawartość w nich naturalnych związków przeciwutleniających [28, 29]. Czynniki te biorą udział, m.in. w neutralizowaniu wolnych rodników, które jak wykazano, spowalniają proces leczenia rany [30, 31]. Czołowym produktem z udziałem miodu na polskim rynku wyrobów medycznych jest alginianowy opatrunek hydrożelowy (Activion Monuka, Kickgel®) nasączony miodem Manuka (UMF 12–14). W kontakcie z wilgocią opatrunek przyjmuje formę miękkiego żelu, co stwarza wilgotne środowisko i ułatwia uwalnianie aktywnego składnika w miejscu zranienia. Materiały tego typu funkcjonują na rynku od niedawna, z tego względu dostępna jest niewielka liczba prac poświęconych efektywności ich działania. Dostępna literatura wskazuje jednak na bardzo duży potencjał miodu i opatrunków z jego udziałem w leczeniu trudno gojących się ran [32–36].

Obecnie jedną z najnowszych a zarazem najbardziej interesujących grup czynników antydrobnoustrojowych są peptydy antydrobnoustrojowe (AMP – *antimicrobial peptides*). Występują one u bardzo wielu gatunków drobnoustrojów, roślin, grzybów i zwierząt, stanowiąc ważny składnik odporności wrodzonej organizmów wyższych [37–40], bądź element antagonistycznego oddziaływania mikroorganizmów (bakteriocyny) [41]. Tabela 1 przedstawia najciekawsze i jednocześnie dobrze przebadane peptydy antydrobnoustrojowe, zarówno te

T a b e l a 1. Charakterystyka peptydów o aktywności antydrobnoustrojowej (MW – ciężar cząsteczkowy, LA – liczba reszt aminokwasowych, NC – ładunek wypadkowy w środowisku o pH 7)

T a b l e 1. Characteristics of antimicrobial peptides (MW – molecular weight, LA – number of amino acid residues, NC – net charge at pH 7,0)

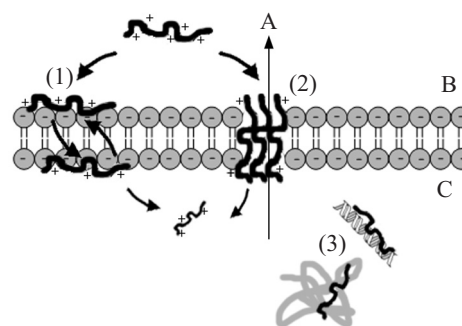
Charakterystyka peptydu	Producent, zastosowanie, status badań klinicznych
<p>Nizyna A [42] (<i>Lactococcus lactis</i>) Typ: bakteriocyna MW: 3 500; NC: +5 Aktywność: Gram⁺</p>	<p>Biosynexus, U.S.A., www.biosynexus.com – czynnik antyinfekcyjny ran skórnych (zastosowanie miejscowe), badania przedkliniczne (<i>in vivo</i>) ImmuCell, U.S.A., www.immu-cell.com – Wipe Out® chusteczki o działaniu profilaktycznym przeciw mastitis, dostępne na rynku – E234 dodatek do żywności (substancja konserwująca), dostępna na rynku</p>
<p>Lizostafyna [43] (<i>Staphylococcus simulans</i>) Typ: bakteriocyna Aktywność: Gram⁺ MW: 26 900; NC: +11</p>	<p>Biosynexus, U.S.A., www.biosynexus.com – czynnik przeciwinfekcyjny ran skórnych (zastosowanie miejscowe), badania przedkliniczne (<i>in vivo</i>)</p>
<p>Laktoferyna B (<i>Homo sapiens, Bos taurus</i>) MW: 8 600; LA: 691; NC: +8,7 Dodatkowe znaczenie: – udział w transporcie jonów żelaza, – aktywność przeciwutleniająca</p> <p>Laktoferycyna B [44–48] (<i>Homo sapiens, Bos taurus</i>) MW: 3 130; LA: 25; NC: +7,9 Aktywność: Gram⁺, Gram⁻, grzyby, wirusy, pasożyty, komórki nowotworowe</p>	<p>Pet King Brands, U.S.A., www.petkingbrands.com – składnik leczniczych produktów weterynaryjnych o działaniu przeciwinfekcyjnym do zastosowań miejscowych, dostępny na rynku AM-Pharma, Holandia, www.am-pharma.com – Human lactoferricin – (czynnik przeciwinfekcyjny ran skórnych), badania przedkliniczne (<i>in vivo</i>) PATER Laboratorium, Polska, www.pater-lab.com – VIVO-DENTAL – żel nawilżający, przeciwbakteryjny do jamy ustnej</p>
<p>Plectasin [49] (<i>Pseudoplectania nigrella</i>) Typ: defensyna Aktywność: Gram⁺ MW: 4 400; LA: 40; NC: +1 – +3</p>	<p>Novozymes, Dania, www.novozymes.com – czynnik przeciwinfekcyjny (zastosowanie miejscowe), badania przedkliniczne (<i>in vivo</i>)</p>
<p>Pexiganan (MSI-78) [50, 51] Typ: syntetyczny Typ: analog meganiny 2 Aktywność: Gram⁺, Gram⁻ MW: 2 480; LA: 22; NC: +10</p>	<p>Genaera Corporation, Wielka Brytania, www.genaera.com – Locilex 1 % – krem przeciwinfekcyjny (zastosowanie miejscowe), badania kliniczne: Faza III (brak zgody FDA, konieczne dalsze badania)</p>
<p>Psoriazyna (S100A7) [52, 53] (<i>Homo sapiens</i>) Aktywność: Gram⁻, Gram⁺, komórki nowotworowe MW: 11 070; LA: 100 Dodatkowe znaczenie: – główny składnik naturalnej ochrony skóry, – właściwości chemotaktyczne wobec komórek T i neutrofilii</p>	<p>Uniwersytet Christiana-Albrechta w Kilonii, Niemcy, www.uni-kiel.de/SFB617 – badania przedkliniczne peptydów z rodziny S100 (<i>in vitro, in vivo</i>)</p>
<p>Lizozym [54, 55] (<i>Gallus domesticus</i>) Aktywność: Gram⁺, Gram⁻, wirusy MW: 14 400; LA: 130; NC: +6,1</p>	<p>Neova Technologies Inc, Kanada, www.neovatech.com – Inovapure (lizozym) – w postaci proszku, granulatu lub roztworu wodnego do różnych zastosowań, dostępny na rynku PATER Laboratorium, Polska, www.pater-lab.com – VIVO-DENTAL – żel nawilżający, przeciwbakteryjny do jamy ustnej, dostępny na rynku – E 1105 – (substancja konserwująca), dostępna na rynku</p>

Charakterystyka peptydu	Producent, zastosowanie, status badań klinicznych
Dermicydyna 1 (DCD-1) [56, 57] (<i>Homo sapiens</i>) Typ: defensyna Aktywność: Gram ⁻ , Gram ⁺ , grzyby MW: 4 830; LA: 47; NC: -5 Dodatkowe znaczenie: – główny składnik przeciwbakteryjny w pocie ludzkim	Uniwersytet Eberharda Karola w Tybindze, Niemcy, www.uni-tuebingen.de – badania przedkliniczne (<i>in vitro</i> , <i>in vivo</i>)
Human β-defensin 3 (hBD-3) [58–63] (<i>Homo sapiens</i>) Typ: defensyna Aktywność: Gram ⁺ , Gram ⁻ , grzyby MW: 5 170; LA: 45; NC: +11 Dodatkowe znaczenie: – główny składnik naturalnej ochrony skóry – właściwości chemotaktyczne wobec komórek T, monocytów i komórek dendrytycznych	Harvard Medical School, U.S.A., hms.harvard.edu Uniwersytet w Hokkaido, Japonia, www.hokudai.ac.jp – badania nad wykorzystaniem hBD-3 w terapii infekcji ran skórnych
Daptomicin [64, 65] (<i>Streptomyces roseosporus</i>) Typ: antybiotyk lipopeptydowy Aktywność: Gram ⁺ MW: 1 640; LA: 14; NC: -3	Cubist Pharmaceuticals, U.S.A., www.cubicin.com – CUBICIN – roztwór do infuzji (różnego typu infekcje skórne; bakteriemia), dostępny na rynku
Kolistyna (Polimyksyna E) [66, 67] (<i>Bacillus colistinus</i>) Typ: antybiotyk lipopeptydowy Aktywność: Gram ⁻ MW: 1 160; LA: 12; NC: +5	Polfa Tarchomin S.A., Polska – COLISTIN TZF – antybiotyk (zastosowanie miejscowe, domięśniowe, doustne, dożylnie), dostępny na rynku (produkt leczniczy generyczny)
Omiganan (MBI 226) [68, 69] Typ: syntetyczny analog indolicydyny Aktywność: Gram ⁺ , Gram ⁻ , grzyby MW: 1 780; LA: 12; NC: +5	MIGENIX Inc., Kanada, www.migenix.com – Omigard TM – 1 % żel przeciwinfekcyjny (zastosowanie miejscowe), badania kliniczne: Faza III
Iseganan (IB-367) [70–74] Typ: syntetyczny analog protegryny-1 Aktywność: Gram ⁺ , Gram ⁻ MW: 1 900; LA: 17; NC: +4,8	IntraBiotics Pharmaceuticals, U.S.A., www.intrabiotics.com – składnik płynu przeciwinfekcyjnego (zapalenie błony śluzowej jamy ustnej), badania kliniczne: Faza III
P-113 [75, 76] Typ: syntetyczny analog histatyny Aktywność: grzyby; Gram ⁺ , Gram ⁻ MW: 1 560; LA: 12; NC: +6,3	Demegen, U.S.A., www.demegen.com – składnik płynu przeciwinfekcyjnego (zapalenie błony śluzowej jamy ustnej; kandydoza), badania kliniczne: Faza II

o dużym potencjale aplikacyjnym, jak i te już znajdujące się na etapie badań klinicznych.

Mechanizmy działania wszystkich znanych AMP nie zostały dotychczas zbadane [77]. Spośród wielu proponowanych modeli zaakceptowano ten, w którym podstawowym mechanizmem jest permeabilizacja błony komórkowej patogennej komórki [78]. Do pierwszego kontaktu pomiędzy peptydem a komórką wrażliwą dochodzi w wyniku oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy dodatnio naładowanym, hydrofobowym fragmentem peptydu a ujemnie naładowanymi fosfolipidami znajdującymi się w błonie komórkowej [rys. 1 (1)].

Zaproponowany mechanizm polega na tworzeniu przejściowych kompleksów poracyjnych oraz kanałów jonowych w błonie komórkowej, czego następstwem jest bierny wypływ jonów fosforanowych i potasowych, a także aminokwasów i ATP [rys. 1 (2)]. Mała zawartość



Rys. 1. Mechanizm działania kationowych peptydów antydnobnoustrojowych (A – wypływ jonów, ATP i składników odżywczych; B – środowisko zewnętrzne; C – przestrzeń wewnątrzkomórkowa)

Fig. 1. Mechanism of action of cationic antimicrobial peptides. (A – outflow of ions, ATP and nutrients; B – external environment; C – intracellular space)

ATP w komórce oraz niedobór jonów i kofaktorów hamuje syntezę makrocząsteczek, takich jak: DNA, RNA, polisacharydy i białka. Niemożliwym staje się aktywny transport składników odżywczych, w konsekwencji komórki nie mogą się rozwijać i umierają [79]. W zależności od sekwencji aminokwasowej danego peptydu obserwuje się różnice w bezpośrednim oddziaływaniu z błoną komórkową. Innym mechanizmem działania charakteryzują się, tzw. peptydy penetrujące, które wnikają do wnętrza komórek i są zdolne do ich inaktywacji w wyniku interakcji z różnymi celami wewnątrzkomórkowymi [rys. 1 (3)] [80, 81]. Konsekwencją takich oddziaływań może być, np. zahamowanie aktywności enzymów kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Inne możliwości to wiązanie z DNA lub RNA gospodarza, jak również indukcja apoptozy [82–84]. Obydwa przedstawione mechanizmy wnikania peptydu do wnętrza komórki obejmują zarówno wykorzystanie utworzonych przejściowych kompleksów poracyjnych, jak i mechanizm flip-flop [rys. 1 (1)]. Ten ostatni jest oparty na zdolności flipaz do przetrzucania fosfolipidów między warstwami błony komórkowej [85].

Pomimo ogromnego sukcesu w zastosowaniach peptydów antydrobnoustrojowych w przemyśle spożywczym jako naturalnych konserwantów żywności bądź składników opakowań bioaktywnych oraz w praktykach weterynaryjnych (nizyna) [86, 87], można znaleźć tylko nieliczne doniesienia na temat ich użycia w charakterze składników bioaktywnych materiałów opatrunkowych [88–90]. Niemniej jednak, wiele z nich znajduje się w zaawansowanej fazie badań klinicznych (por. tabela 1), co w najbliższej przyszłości powinno skutkować pojawieniem się materiałów medycznych impregnowanych peptydami antydrobnoustrojowymi.

CHITIZAN W MATERIAŁACH O AKTYWNOŚCI ANTYDROBNOUSTROJOWEJ

Chitozan jest kationowym polimerem uzyskiwanym z chityny na drodze jej częściowej *N*-deacetylacji, zbudowanym z podjednostek *D*-glukozaminy i *N*-acetylo-*D*-glukozaminy połączonych wiązaniami $\beta(1 \rightarrow 4)$ glikozydowymi [91]. W przyrodzie chitozan występuje rzadko; jest np. składnikiem ściany komórkowej grzybów *Mucor rouxii*. Chityna natomiast, to powszechnie występujący naturalny polisacharyd, stanowiący budulec egzoszkieletu skorupiaków i owadów, znajdujący się także w ścianie komórkowej wielu gatunków grzybów. Ze względu na swoje interesujące właściwości, chitozan został doceniony zarówno w zastosowaniach inżynierii tkankowej, jak i w systemach dostarczania leków [92–94]. Liczne badania dowiodły biodegradowalności, biokompatybilności, braku właściwości antygenowych, braku toksyczności a także biofunkcjonalności materiałów wykonanych z chitozanu [95]. Dawka LD₅₀ (dawka śmiertelna dla 50 % badanych osobników), przy doustnym podawaniu myszom, wynosiła 16 g/dzień na kg

masy ciała, co przewyższa dawkę określoną dla sacharozy [96]. Swoje unikatowe właściwości chitozan zawdzięcza liniowej strukturze polimeru o dużej gęstości ładunku dodatniego oraz niezwykłym możliwościom międzycząsteczkowego oddziaływania z innymi strukturami.

Właściwością szczególnie przydatną w projektowaniu systemów kontrolowanego uwalniania czynników unieruchomionych we wnętrzu polimerowego materiału jest zdolność chitozanu do ulegania biodegradacji [97]. Chitozan jest podatny na degradację enzymatyczną katalizowaną przez lizozymy, chitynazy, celulazy, hemicelulazy, proteazy, lipazy oraz β -1,3-1,4-glukanazy [98–100]. Ulega także hydrolizie pod działaniem specyficznej grupy enzymów zaliczanych do chitozanaz, a nieaktywnych względem chityny [101, 102]. Podatność na biodegradację oraz dobrane odpowiednie parametry fizykochemiczne chitozanu są uwzględniane w projektowaniu systemów o kontrolowanym profilu uwalniania czynnika aktywnego.

Właściwości chitozanu są modyfikowane, m.in. na drodze kowalencyjnego sieciowania. Najczęściej używanymi do tego celu czynnikami są związki z grupy dialdehydów, takie jak glioksal [103] i aldehyd glutarowy [104]. W wyniku reakcji wolnych grup aminowych z grupami aldehydowymi czynnika sieciującego powstaje silne wiązanie kowalencyjne (wiązanie iminowe). Użycie wspomnianych dialdehydów pozwala na sieciowanie w łagodnych warunkach roztworów wodnych. Zwiększa się jednak liczba różnych doniesień literaturowych dotyczących spadku biokompatybilności materiałów usieciowanych za pomocą dialdehydów, dlatego też prowadzi się badania nad rynkowym zastosowaniem naturalnych czynników sieciujących o znacznie zmniejszonej toksyczności, takich jak, np. genipina [105].

Najnowsze kierunki badań chitozanu skupiają się na jego unikatowej aktywności antydrobnoustrojowej [106–109]. Zainteresowanie tego rodzaju właściwościami wynika z rosnącej potrzeby racjonalizacji wykorzystywania środków chemicznych w przemyśle spożywczym oraz farmaceutycznym. Skuteczność chitozanu, jako środka przeciwdrobnoustrojowego, wykazano, m.in. w czasie trwającego 28 dni testu, w szeregu formuacji farmaceutycznych. Wykazano także synergistyczne oddziaływanie chitozanu z powszechnie używanymi środkami konserwującymi, takimi jak: alkohol fenylowy lub kwas benzoowy [110]. Spektrum aktywności antydrobnoustrojowej chitozanu obejmuje grzyby, drożdżaki oraz bakterie, przy czym większą aktywność stwierdzono wobec bakterii Gramdodatnich niż wobec Gramujemnych [99, 108, 111]. Wykazano także, iż antibakteryjna aktywność chitozanu przejawia się w bardziej bakteriostatycznym niż bakteriobójczym działaniu [110]. Ze względu na ogromną liczbę zmiennych parametrów oraz brak standaryzowanych protokołów, bardzo trudne, a czasem niemożliwe jest porównanie wyników uzyskanych przez różne grupy badawcze, zajmujące się antibakteryjnymi właściwościami chitozanu. Szereg publika-

cji poświęcono ocenie wpływu ciężaru cząsteczkowego chitozanu na jego aktywność antydrobnoustrojową. Część z nich wykazuje prawidłowość, zgodnie z którą im mniejszy stopień polimeryzacji chitozanu, czyli im mniejszy jego ciężar cząsteczkowy, tym większa jest jego aktywność [108, 111]. Inne prace dokumentują większą aktywność materiałów wykonanych z chitozanu o wyższym stopniu deacetylacji w porównaniu do aktywności tych wytworzonych z chitozanu o niższym stopniu deacetylacji [112, 113]. Inne badania skupiają się na zależności aktywności chitozanu od rodzaju kwasu użytego do jego rozpuszczenia oraz pH, temperatury i siły jonowej środowiska, w jakim jest przeprowadzany test antydrobnoustrojowy [108, 114, 115]. Wykazano również, że ze względu na tworzenie się kompleksów koordynacyjnych grup aminowych z jonami metali dwuwartościowych, obecność tych ostatnich w istotny sposób zmniejsza aktywność biologiczną preparatów chitozanu [114, 116]. Jak dotąd, pomimo wielu przeprowadzonych badań, właściwy mechanizm antydrobnoustrojowego działania chitozanu nie został poznany. Zdjęcia komórek wystawionych na działanie chitozanu, uzyskane za pomocą mikroskopii elektronowej wskazują, iż główny cel cząsteczkowy chitozanu stanowi powierzchnia patogennej komórki [107, 109, 117]. Powszechnie uznano zatem, że polikationowa budowa chitozanu może być odpowiedzialna za oddziaływanie z obdarzoną ujemnym ładunkiem powierzchnią komórki. Oddziaływanie to powoduje lokalne zmiany w jej strukturze, prowadząc do wycieku substancji wewnątrzkomórkowych [118–120]. Zaproponowany mechanizm został poparty szeregiem argumentów zebranych i przedstawionych w publikacji przeglądowej na temat antybakteryjnej aktywności chitozanu [110], mianowicie: chitozan w środowisku o pH > 7.0 traci swoją aktywność antydrobnoustrojową [113, 121], zależność pomiędzy stopniem deacetylacji chitozanu a aktywnością antydrobnoustrojową jest proporcjo-

nalna [113, 122], aktywność grzybobójcza oligomerów chitozanu ustaje po jego *N*-acetylacji [123], mutanty *Salmonella typhimurium* ze znacznie zmniejszoną gęstością ładunku ujemnego na powierzchni zewnątrzkomórkowej wykazują zwiększoną oporność na chitozan [118]. Ogólny mechanizm działania chitozanu jest zatem zbliżony do mechanizmu działania innych kationowych czynników antydrobnoustrojowych, takich jak jony srebra bądź peptydy antydrobnoustrojowe. W przypadku aktywności bakteriostatycznej, prawdopodobnie jednak nie decydują o niej niespecyficzne oddziaływania z ujemnie naładowanymi fosfolipidami błony komórkowej, lecz bardziej specyficzne oddziaływania elektrostatyczne z ujemnie naładowanymi fragmentami kwasu tejchojowego [117]. Hipotezę tę ma potwierdzać dużo niższa aktywność chitozanu wobec bakterii Gramujemnych oraz symulacje zachowania liposomów w kontakcie z polikationowymi makrocząsteczkami chitozanu [116]. W symulacjach nie obserwowano wycieku zamkniętego we wnętrzu liposomów małowartościowego markera pod wpływem działania chitozanu, co wyklucza możliwość tworzenia kanałów oraz kompleksów poracyjnych błony komórkowej komórek patogenów, a potwierdza możliwość oddziaływania z innymi strukturami naładowanymi ujemnie.

Wyszczególnione powyżej właściwości chitozanu, jak również jego zdolność do przyspieszenia procesu koagulacji krwi [124] sprawiły, że stał się materiałem często wykorzystywanym w projektowanych materiałach opatrunkowych [93]. Wang i współpracownicy, dzięki wprowadzeniu łańcuchów chitozanu pomiędzy włókna materiału zbudowanego z polipropylenu, kwasu akrylowego i poli(kwasu glutaminowego), nadali mu specyficzną aktywność antybakteryjną [125]. Wykazano także, że chitozan zwiększa aktywność polimorfonuklearnych leukocytów, makrofagów i fibroblastów w środowisku rany, co w rezultacie pozytywnie wpływa na proces odbudowy usz-

T a b e l a 2. Charakterystyka wybranych materiałów medycznych na bazie chitozanu przeznaczonych do kontrolowanego dostarczenia peptydów, białek i genów, w różnych zastosowaniach inżynierii tkankowej

T a b l e 2. Characteristics of selected chitosan-based medical materials for controlled delivery of peptides, proteins and genes in various tissue engineering applications

Struktura (typ materiału)	Rodzaj unieruchomionej białeczki/komórki	Zastosowanie (miejsce)	Model zwierzęcy	Źródło
Chitozan (hydrożel)	hEGF (human epidermal growth factor)	skóra (oparzenia)	szczur	[126]
Chitozan (gąbka)	PDGF (platelet-derived growth factor)	kość	szczur	[127]
Chitozan/chityna (struktura w kształcie tabularnym)	EGF (epidermal growth factor)/mysie nerwowe komórki macierzyste	regeneracja nerwów	—	[128]
Chitozan (hydrożel)	FGF-2 (fibroblast growth factor-2)	skóra	mysz	[129]
Chitozan/kolagen (gąbka)	TGF-β1 plazmid (transforming growth factor-β1)/ludzkie komórki więzadła przyzębia	kość przyzębia	mysz	[133]
Chitozan (mikrosfery immobilizowane w chitozanowej gąbce)	TGF-β1 (transforming growth factor-β1)/chondrocyty	chrząstka	—	[134]
Chitozan/heparyna (hydrożel do iniekcji)	FGF-2 (fibroblast growth factor-2) HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells)	naczynia krwionośne	mysz	[135]



kodzonej tkanki skórnej [126]. Z licznych doniesień literaturowych wiadomo, że rany opatrywane materiałem na bazie chitozanu goiły się szybciej niż w próbie kontrolnej [126–128]. W tabeli 2 zestawiono niektóre ważne zastosowania materiałów na bazie chitozanu w inżynierii tkankowej i do kontrolowanego dostarczania szerokiego spektrum czynników aktywnych. Na uwagę zasługują bardzo korzystne parametry kontrolowanego uwalniania czynników wzrostu unieruchomionych w matrycy hydrożelu chitozanowego [119, 130]. Szczegółowe informacje dotyczące chemii chitozanu, mechanizmów jego aktywności antybakteryjnej oraz materiałów medycznych wytwarzanych z jego udziałem można znaleźć w publikacjach przeglądowych [110, 131, 132].

PODSUMOWANIE

Siłą napędową rozwoju badań w dziedzinie projektowania nowych funkcjonalnych wyrobów medycznych jest obecnie obawa przed brakiem odpowiednich narzędzi do walki z wielolekoopornymi szczepami mikroorganizmów. Wiadomo, że większość zakażeń prowadzi do zatrzymania procesu gojenia rany a w najgorszym razie do śmierci pacjenta, stąd też zapewnienie czystości mikrobiologicznej jest najważniejszym aspektem w leczeniu każdego typu rany. Do tego celu są wykorzystywane różnego rodzaju czynniki antyinfekcyjne, które immobilizowane na powierzchni, bądź wewnątrz matrycy materiału medycznego zapewniają skuteczną ochronę przed kolonizacją patogennych mikroorganizmów. Większość z omówionych czynników cechuje się niespecyficznymi mechanizmami działania, co zmniejsza szansę wykształcenia mechanizmów oporności wśród drobnoustrojów. Ważne jednak jest unikanie nadużywania i niewłaściwego stosowania aktywnych substancji, by nie zostały powtórzone błędy popełnione we wczesnej fazie rozwoju antybiotykoterapii. Nadal prowadzi się systematyczne badania zarówno nad nowymi czynnikami antydrobnoustrojowymi (peptydy antydrobnoustrojowe), jak i nad wykorzystaniem chitozanu w konstrukcji materiałów medycznych, co daje nadzieję na skuteczną walkę z patogennymi mikroorganizmami.

Publikacja jest częścią projektu realizowanego w ramach programu VENTURES Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.

LITERATURA

[1] Stashak T. S., Farstvedt E., Othick A.: *Clin. Tech. Eq. Pract.* 2004, **3**, 148. [2] Drury J., Mooney D.: *Biomaterials* 2003, **24**, 4337. [3] Wise D. L.: „Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology”, Marcel Dekker, Inc. New York 2000. [4] Li X., Jastui B. R.: „Design of controlled release drug delivery system”, The McGraw-Hill

Companies, Inc. Chemical Engineering, New York 2006. [5] Makoto M. A., Jun'ichi K., Akira O., Masaru I.: *Int. J. Pharm.* 1998, **169**, 255. [6] Levy S. B.: „The Antibiotic Paradox: How the Misuse of Antibiotics Destroys Their Curative Powers”, Perseus Publishing, Cambridge 2002. [7] Mellon M., Benbrook C., Benbrook K. L.: „Hogging it: estimates of antimicrobial abuse in livestock”, UCS Publications, Cambridge 2001. [8] Barza M., Gorbach S. L.: *Clin. Infect. Dis.* 2002, **34**, 71. [9] Rai M., Yadav A., Gade A.: *Biotechnol. Adv.* 2009, **27**, 76. [10] Lansdown A. B.: *J. Wound Care* 2002, **11**, 125.

[11] Kaye E. T.: *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2000, **14**, 321. [12] Larson E. L.: *Am. J. Infect. Control.* 1995, **23**, 251. [13] LaRocca R., Ansell J.: „Proceedings of the international symposium on povidon”, Lexington College of Pharmacy, University of Kentucky 1983, str. 101–106. [14] Molan P. C.: *Bee World* 1992, **73**, 59. [15] Toke O.: *Pept. Sci.* 2005, **80**, 717. [16] Russell A. D., Hugo W. B.: *Prog. Med. Chem.* 1994, **31**, 351. [17] Lansdown A. B. G., Sampson B., Laupattarakasem P., Vuttivirojana A.: *Br. J. Dermatol.* 1997, **137**, 728. [18] Khan M. N., Naqvi A. H.: *J. Tissue Viability* 2006, **16**, 6. [19] Percival S. L., Bowler P. G., Russell D.: *J. Hosp. Infect.* 2005, **60**, 1. [20] Russell A. D., Hugo W. B.: *Prog. Med. Chem.* 1994, **31**, 351.

[21] Lansdown A. B. G., Sampson B., Laupattarakasem P., Vuttivirojana A.: *Br. J. Dermatol.* 1997, **137**, 728. [22] Deshpande L. M., Chopade B. A.: *Biomaterials* 1994, **7**, 49. [23] Silver S.: *FEMS Microbiol. Rev.* 2003, **27**, 341. [24] Gupta A., Kazuaki M., Lo J. F., Silver S.: *Nat. Med.* 1999, **5**, 183. [25] Loh J. V., Percival S. L., Woods E. J., Williams N. J., Cochrane C. A.: *Int. Wound J.* 2009, **6**, 32. [26] Silver S., Phung L. T., Silver G.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006, **33**, 627. [27] Tonks A. J., Dudley E., Porter N. G., Parton J., Brazier J., Smith E. L.: *J. Leukoc. Biol.* 2007, **82**, 1147. [28] Ferreira I. C. F. R., Aires E., Barreira J. C. M., Estevinho L. M.: *Food Chem.* 2009, **114**, 1438. [29] Gheldof N., Wang X. H., Engeseth N. J.: *J. Agr. Food. Chem.* 2002, **50**, 5870. [30] Martin A.: *Dermatol. Surg.* 1996, **22**, 156.

[31] Gomathi K., Gopinath D., Ahmed M. R., Jayakumar R.: *Biomaterials* 2003, **24**, 2767. [32] Visavadia B. G., Honeysett J., Danford M. H.: *Brit. J. Oral Max. Sur.* 2008, **46**, 55. [33] Lusby P. E., Coombes A., Wilkinson J. M.: *J. Wound. Ostomy Continence Nurs.* 2002, **29**, 295. [34] Natarajan S., Williamson D., Grey J., Harding K. G., Cooper R. A.: *J. Dermatol. Treat.* 2001, **2**, 33. [35] Cooper R. A., Molan P. C., Krishnamoorthy L., Harding K. G.: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2001, **20**, 758. [36] Tonks A. J., Cooper R. A., Jones K. P., Blair S., Parton J., Tonks A.: *Cytokine* 2003, **21**, 242. [37] Yeaman M. R., Yount N. Y.: *Pharmacol. Rev.* 2003, **50**, 27. [38] Boman H. G.: *Annu. Rev. Immunol.* 1995, **13**, 61. [39] Ganz T., Lehrer R. I.: *Curr. Opin. Immunol.* 1994, **6**, 584. [40] Guaní-Guerra E., Lugo-Reyes S. O., Terán L. M.: *Clin. Immunol.* 2010, **135**, 1.

[41] Gwiazdowska D., Trojanowska K.: *Biotechnologia* 2005, **68**, 114. [42] Gwiazdowska D., Vuyst L., Vandamme E. J.: „Bacteriocins of lactic acid bacteria”, Blackie Academic & Professional, London 1994, str. 151–221. [43]

- Szweda P., Kotłowski R., Kur J.: *Biotechnologia* 2005, **4**, 28.
- [44] Jameson G. B., Anderson B. F., Norris G. E., Thomas D. H., Baker E. N.: *Acta Crystallogr. D.* 1998, **54**, 1319. [45] Brock J. H.: *Mol. Immunol.* 2002, **40**, 395. [46] Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M.: *BBA-Protein Struct. M.* 1992, **1121**, 130. [47] Levay P. F., Viljoen M.: *Hematologica* 1995, **80**, 252. [48] Malaczewska J., Rotkiewicz Z.: *Medycyna Wet.* 2007, **63**, 136. [49] Mygind P. H., Fischer R. L., Schnorr K. M., Hansen M. T., Sonksen C. P. i in.: *Nature* 2005, **437**, 975. [50] Shanmugam G., Polavarapu P. L., Gopinath D., Jayakumar R.: *Biopolymers* 2005, **80**, 636.
- [51] Gottler L. M., Ramamoorthy A.: *BBA-Protein Struct. M.* 2009, **1788**, 1680. [52] Regenhard P., Leippe M., Schubert S., Podschun R., Kalm E., Gro J., Looft C.: *Vet. Microbiol.* 2009, **136**, 335. [53] Schroder J. M., Harder J.: *Drug Discovery Today* 2006, **3**, 93. [54] Szymański S., Pobożny E., Trojanowicz M., Wilk A., Garstecki P., Hołysz R.: *J. Phys. Chem.* 2007, **111**, 5503. [55] Dembczynski R., Biała W., Jankowski T.: *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2009, **66**, 5. [56] Schitteck B., Hipfel R., Sauer B., Bauer J., Kalbacher H. i in.: *Nat. Immunol.* 2001, **2**, 1133. [57] Rieg S., Seeber S., Steffen H., Humeny A., Kalbacher H. i in.: *J. Invest. Invest. Derm. Symp. P.* 2006, **126**, 354. [58] Bohling A., Hagge S. O., Roes S., Podschun R., Sahly H. i in.: *Biochemistry* 2006, **45**, 5663. [59] Sassa V., Paga U., Tossib A., Bierbaum G., Sahla H. G.: *Int. J. Med. Microbiol.* 2008, **298**, 619. [60] Harder J., Bartels J., Christophers E., Schroder J. M.: *J. Biol. Chem.* 2001, **276**, 5707.
- [61] Sawamura D., Shibaki A., Akiyama M., McMillan J. R., Abiko Y., Shimizu H.: *Gene Ther.* 2005, **12**, 857. [62] Sahly H., Schubert S., Harder J., Kleine M., Sandvang D., Ullmann U., Schroder J. M., Podschun R.: *J. Antimicrob. Chemoth.* 2006, **57**, 562. [63] Spielmann M., Zuhaili B., Fossum M., Metzger M., Koehler T. i in.: *J. Gene Med.* 2007, **11**, 220. [64] Micklefield J.: *Revealed Chem. Biol.* 2004, **11**, 887. [65] Nguyen K. T., Ritz D., Gu J. Q., Alexander D., Chu M., Miao V., Brian P., Baltz R. H.: *PNAS* 2006, **103**, 17 462. [66] Lewis J. R., Lewis S. A.: *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2004, **286**, 913. [67] Nasnas R., Saliba G., Hallak P.: *Pathol Biol.* 2009, **57**, 229. [68] Sader H. S., Fedler K. A., Rennie R. P., Stevens S., Jones R. N.: *Antimicrob. Agents Ch.* 2004, **48**, 3112. [69] Rubinchik E., Dugourd D., Algara T., Pasetka C., Friedland D.: *Int. J. Antymicrob. Ag.* 2009, **34**, 457. [70] Mosca D. A., Hurst M. A., So W., Viajar C., Fujii C. A., Falla T. J.: *Antimicrob. Agents Ch.* 2000, **44**, 1803.
- [71] Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Mocchegiani F., Viticchi C., Orlando F., D'Amato G., Del Prete M. S., Kamysz W., Lukasiak J., Saba V., Scalise G.: *Peptides* 2003, **24**, 1747. [72] Landa A., Iiménez L., Willms K., Jiménez-García L. F., Lara-Martínez R. i in.: *Mol. Biochem. Parasit.* 2009, **164**, 126. [73] Loury D. J., Embree J. R., Steinberg D. A., Sonis S. T., Fiddes J. C.: *Oral. Surg. Oral Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* 1999, **87**, 544. [74] Obrecht D., Robinson J. A., Bisang C., DeMarco S. J., Moehle K., Gombert F. O.: *Curr. Med. Chem.* 2009, **16**, 42. [75] Rothsstein D. M., Spacciopoli P., Tran L. T., Xu T., Roberts F. D. i in.: *Antimicrob. Agents Ch.* 2001, **45**, 1367. [76] Sajjan U. S., Tran L. T., Sole N., Rovaldi C., Akiyama A., Friden P. M., Forstner J. F., Rothstein D. M.: *Antimicrob. Agents Ch.* 2001, **45**, 3437. [77] Palffy R., Gardlik R., Behuliak M., Kadasi L., Turna J., Celec P.: *Mol. Med.* 2009, **15**, 51. [78] Toke O.: *Pept. Sci.* 2005, **80**, 717. [79] Netz D. J. A., Bastos M. C. F., Sal H. G.: *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, **68**, 5274. [80] Henriques S. T., Melo M. N., Castanho M. A. R. B.: *Biochem. J.* 2006, **399**, 1.
- [81] Foerg C., Merkle H. P.: *J. Pharm. Sci.* 2008, **97**, 144. [82] Carlsson A., Engstrom P., Palva E. T., Bennich H.: *Infect. Immun.* 1991, **59**, 3040. [83] Héchard Y., Sahl H. G.: *Biochimie* 2002, **84**, 545. [84] Moll G. N., Roberts G. C.: *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 1996, **69**, 185. [85] Hancock R. E. W., Chapple D. S.: *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1999, **43**, 1317. [86] Cotter P. D.: *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, **3**, 777. [87] Cao L. T., Wu J. Q., Xie F., Hu S. H., Mo Y.: *J. Dairy. Sci.* 2007, **90**, 3980. [88] Lansdown A. B. G., Sampson B., Luppattarakasem P., Vuttivirojana A.: *Br. J. Dermatol.* 1997, **137**, 728. [89] Hancock Sahl H. G.: *Nat. Biotechnol.* 2006, **24**, 1551. [90] Tylingo R., Mazur-Sandomierska A., Sadowska M.: *Polimery* 2008, **53**, 576.
- [91] Struszczyk M. H.: *Polimery* 2002, **47**, 316. [92] Bodek K. H.: *Polimery* 2004, **49**, 29. [93] Struszczyk M. H.: *Polimery* 2002, **47**, 396. [94] Bodek K. H.: *Polimery* 2000, **45**, 11. [95] Khor E., Lim L. Y.: *Biomaterials* 2003, **24**, 2339. [96] Singla A. K., Chawla M.: *J. Pharm. Pharmacol.* 2001, **53**, 1047. [97] Struszczyk M. H.: *Polimery* 2002, **47**, 619. [98] Vírum K. M., Myhr M. M., Hjerde R. J. N., Smidsrod O.: *Carbohydr. Res.* 1997, **299**, 99. [99] Rhoades J., Roller S.: *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, **66**, 80. [100] Kumar A. B. V., Varadaraj M. C., Gowda L. R., Tharanathan R. N.: *Biochem. J.* 2005, **391**, 167.
- [101] Rivas L. A., Parro V., Moreno-Paz M., Mellado R. P.: *Microbiology* 2000, **146**, 2929. [102] Kimoto H., Kusaoke H., Yamamoto I., Fujii Y., Onodera T., Taketo A.: *J. Biol. Chem.* 2002, **277**, 14695. [103] Patel V. R., Amiji M. M.: *Pharm. Res.* 1996, **13**, 588. [104] Malafaya P. B., Pedro A., Peterbauer A., Gabriel C., Redl H., Reis R.: *J. Mater. Sci., Mater. Med.* 2005, **16**, 1077. [105] Chen S. C., Wu Y. C., Mi F. L., Lin Y. H., Yu L. C., Sung H. W.: *J. Control. Release* 2004, **96**, 285. [106] Rabea E. I., Badawy M. E. T., Stevens C. V., Smagghe G., Steurbaut W.: *Biomacromolecules* 2003, **4**, 1457. [107] Muzzarelli R., Tarsi R., Filippini O., Giovanetti E., Biagini G., Varaldo P. E.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990, **34**, 2019. [108] No H. K., Park N. Y., Lee S. H., Meyers S. P.: *Int. J. Food Microbiol.* 2002, **74**, 65. [109] Savard T., Beaulieu C., Boucher I., Champagne C. P.: *J. Food Prot.* 2002, **65**, 828. [110] Raafat D., Sahl H. G.: *Microbiol. Biotechnol.* 2009, **2**, 186.
- [111] Jeon Y. J., Park P.-J., Kim S.-K.: *Carbohydr. Polym.* 2001, **44**, 71. [112] Shigemasa Y., Minami S.: *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 1995, **13**, 383. [113] Liu X. F., Guan Y. L., Yang D. Z., Li Z., De Yao K.: *J. Appl. Polym. Sci.* 2001, **79**, 1324. [114] Tsai G. J., Su W. H.: *J. Food. Prot.* 1999, **62**, 239. [115] Jumaa M., Furkert F. H., Muller B. W.: *J. Pharm. Biopharm.* 2002, **53**, 115. [116] Bhatia S. C., Ravi N.: *Biomacro-*



- molecules* 2003, **4**, 723. [117] Raafat D., von Bargen K., Haas A., Sahl H. G.: *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, **74**, 3764. [118] Helander I. M., Nurmiaho-Lassila E. L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S.: *Int. J. Food. Microbiol.* 2001, **71**, 235. [119] Je J. Y., Kim S. K.: *J. Agric. Food. Chem.* 2006, **54**, 6629. [120] Zakrzewska A., Boorsma A., Brul S., Hellingwerf K. J., Klis F. M.: *Eukaryotic Cell* 2005, **4**, 703.
- [121] Sudarshan N. R., Hoover D. G., Knor R. D.: *Food. Biotechnol.* 1992, **6**, 257. [122] Park P. J., Je J. Y., Byun H. G., Moon S. H., Kim S. K.: *J. Microbiol. Biotechnol.* 2004, **14**, 317. [123] Torr K. M., Chittenden C., Franich R. A., Kreber B.: *Holzforschung* 2005, **59**, 559. [124] Okamoto Y., Yano R., Miyatake K., Tomohiro I., Shigemasa Y., Minami S.: *Carbohydr. Polym.* 2003, **53**, 337. [125] Wang C. C., Su C. H., Chen J. P., Chen C. C.: *Mater. Sci. Eng. C* 2009, **29**, 1715. [126] Alemdaroglu C., Degim Z., Celebi N., Zor F., Ozturk S., Erdogan D.: *Burns* 2006, **32**, 319. [127] Lee J. Y., Nam S. H., Im S. Y., Park Y. J., Lee Y. M., Seol Y. J., Chung C. P., Lee S. J.: *J. Control. Release* 2002, **78**, 187. [128] Goraltchouk A., Scanga V., Morshead C. M., Shoichet M. S.: *J. Control. Release* 2006, **110**, 400. [129] Obara K., Ishihara M., Ishizuka T., Fujita M., Ozeki Y. i in.: *Biomaterials* 2003, **24**, 3437. [130] Obara K., Ishihara M., Fujita M., Kanatani Y., Hattori H. i in.: *Wound Repair Regen.* 2005, **13**, 390.
- [131] Friess W.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998, **45**, 113. [132] Bhattarai N., Gunn J., Zhang M.: *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2010, **62**, 83. [133] Zhang Y., Wang Y., Shi B., Cheng X.: *Biomaterials* 2007, **28**, 1515. [134] Kim S. E., Park J. H., Cho Y. W., Chung H., Jeong S. Y., Lee E. B., Kwon I. C.: *J. Control. Release* 2003, **91**, 365. [135] Fujita M., Ishihara M., Simizu M., Obara K., Ishizuka T. i in.: *Biomaterials* 2004, **25**, 699.

Otrzymano 11 II 2011 r.