

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

Łukasz Andrzej Ścibik

Funkcjonalizacja powierzchni rurki tracheostomijnej z poli(chlorku winylu) w kierunku zapobiegania wzrostu biofilmu bakteryjnego do zastosowań u pacjentów poddanych zabiegowi tracheotomii

Functionalization of the poly(vinyl chloride) tracheostomy tube surface to prevent the growth of bacterial biofilm for use in patients undergoing tracheostomy procedure

Praca doktorska

Promotor: **Prof. dr hab. Monika Brzywczy-Włoch**
Prof. dr hab. Andrzej Kotarba

Pracę wykonano w:

Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, Katedra Mikrobiologii,
Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. Magdalena Strus

Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Jagielloński

Kierownik jednostki: Prof. dr hab. Kinga Góra-Marek

Kraków, 2023



„Żaden sukces nie ma znaczenia, jeśli nie można go dzielić z kochającymi ludźmi. Żaden medal, dyplom czy premia świąteczna, nie ogrzeją serca w chłodną, zimową noc.”

~Dalajlama

Dziadkom, Mamie, Tacie, Patrycji i Wojtkowi

Dziękuję

Pani Promotor

Prof. dr hab. Monice Brzychczy-Włoch

„Nauczyciel ociera się o wieczność. Nigdy nie może stwierdzić, gdzie kończy się jego wpływ”

~Henry Adams

Panu Promotorowi

Prof. dr hab. Andrzejowi Kotarbie

„Gdy uczeń osiąga coś dzięki nauczycielowi, nauczyciel również czegoś się uczy”

~Paulo Coelho

Pani Kierownik Studiów Doktoranckich

dr hab. prof. IkiFP PAN Renacie Tokarz-Sobieraj

„Człowiek, który ginie z powodu braku pomocy obciąża sumienia pozostałych”

~Ludwik Hirszfeld

Prof. dr hab. Elżbiecie Pamule i zespołowi Wydziału Inżynierii

Materialowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej

„Najkrótszą drogą między ludźmi jest uśmiech”

~Miriam Collee

Kolegom i Koleżankom z Zakładu Molekularnej Mikrobiologii

Medycznej

*„Klimat Barcelony, stały, umiarkowany, wilgotny i przesycony solnymi wyziewami,
cieszy się zasłużoną sławą wśród wirusów i bakterii”*

~Eduardo Mendoza

Kolegom i Koleżankom z Grupy Chemii Powierzchni i Materiałów

„Niesamowite odkrycia chemiczne silnie wyrażają magię natury”

~Johann Wolfgang Goethe

Praca doktorska powstała w ramach Środowiskowych Studiów Doktoranckich „Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej” InterDokMed w ramach współpracy między Wydziałem Lekarskim Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Wydziałem Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Instytutem Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk

Autor pracy doktorskiej był kierownikiem własnego projektu naukowego pt. ”Funkcjonalizacja powierzchni biomateriałów polimerowych do dedykowanych zastosowań implantacyjnych” Grant dla młodych naukowców (SAP N41/DBS/000128)

Badania zostały zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, (KBET nr 1072.6120.153.2019)



Wydział Lekarski
Uniwersytetu
Jagiellońskiego
Collegium Medicum



Instytut Katalizy
i Fizykochemii
Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



Wydział Chemii
Uniwersytetu
Jagiellońskiego

Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej

1. Ścibik Ł, Ochońska D, Gołda-Cępa M, Brzywczy-Włoch M, Kotarba A. **Microbiological analysis of tracheostomy tube biofilms and antibiotic resistance profiles of potentially pathogenic microorganisms.** *Otolaryngol Pol.* 2022;76(5):1-13
doi:10.5604/01.3001.0015.8827
Punktacja MEiN 100
2. Ścibik Ł, Ochońska D, Gołda-Cępa M, Kwiecień K, Pamuła E, Kotarba A, Brzywczy-Włoch M. **Sonochemical deposition of gentamicin nanoparticles at the PCV tracheostomy tube surface limiting bacterial biofilm formation.** *Materials.* 2023;16(10): 3765
doi:10.3390/ma16103765
Punktacja MEiN 140, IF 3,87

Wykaz publikacji bezpośrednio związanych z tematyką rozprawy doktorskiej

1. Drożdż K, Ochońska D, Ścibik Ł, Gołda-Cępa M, Biegun K, Brzywczy-Włoch M. **The Frequency of Occurrence of Resistance and Genes Involved in the Process of Adhesion and Accumulation of Biofilm in Staphylococcus aureus Strains Isolated from Tracheostomy Tubes.** *Microorganisms.* 2022;10(6):1210. doi:10.3390/microorganisms10061210
2. Ochońska D, Ścibik Ł, Brzywczy-Włoch M. **Biofilm Formation of Clinical Klebsiella pneumoniae Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity.** *Pathogens.* 2021;10(10):1345. doi: 10.3390/pathogens10101345
3. Drożdż K, Ochońska D, Ścibik Ł, Brzywczy-Włoch M. **Ocena tworzenia biofilmu przez szczepy kliniczne Staphylococcus aureus wyizolowane od pacjentów z tracheostomią.** *Forum Zakazeń.* 2019;10(4):253-5

Inne publikacje

1. Biegun K, Ścibik Ł, Krawczyk A, Brzywczy-Włoch M. **The role of HPV CMV and EBV latent viruses of the development of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC).** *Pol Otorhino Rev.* 2022;11(3):24-9 doi: 10.5604/01.3001.0015.9788
2. Ścibik Ł, Dobosz P, Pabis D. **Endoscopic removal of inferior turbinate pleomorphic adenoma – case report.** *Pol Otorhino Rev.* 2021; 10 (3): 23-6. doi: 10.5604/01.3001.0014.4874

Aktywny udział w konferencjach i sympozjach:

- 1. IX Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, 2019 Kraków, Polska**
Wystąpienie ustne: Ścibik Ł, Ochońska D, Brzywczy-Włoch M.
Rurka tracheostomijna jako nośnik patogenów: profil drobnoustrojów i oporność bakterii na antybiotyki.
- 2. 8th International Biotechnology Weigl Conference: Human welfare and infectious diseases in a new microbiome research era. Microorganisms in industrial and medical biotechnology, 2019, Łódź, Polska**
Poster: Ścibik Ł, Ochońska D, Brzywczy-Włoch M.
Tracheostomy tube: Bacterial colonization profile and antibiotics resistance of pathogens.
- 3. Sympozjum naukowe: Medycyna kliniczna, ratunkowa i medycyna pola walki, 2019, Kraków, Polska**
Wystąpienie ustne: Ścibik Ł, Tylek M, Krokowski M.
Urazy twarzoczaszki, diagnostyka i postępowanie.
- 4. XLIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Otorynolaryngologów Chirurgów Głowy i Szyi, 2020, Kraków, Polska**
Poster: Ścibik Ł, Ochońska D, Gołda-Cępa M, Kotarba A, Brzywczy-Włoch M.
Biofilm poliwinylowej rurki tracheostomijnej - profil bakteryjny i jego obrazowanie w skaningowej mikroskopii elektronowej.

Wystąpienia ustne na posiedzeniach naukowych Polskiego Towarzystwa Otorynolaryngologów, Chirurgów Głowy i Szyi:

1. 2018, Kraków, Polska
Ścibik Ł. **Odźbowe zapalenia zatok szczękowych – laryngolog czy dentysta?**
2. 2019, Dubiecko, Polska
Ścibik Ł. **Urazy Głowy.**
3. 2019, Łódź, Polska
Ścibik Ł. **Interdyscyplinarne postępowanie laryngologiczno-stomatologiczne w odźbowych zapaleniach zatok przynosowych.**
4. 2021, Dubiecko, Polska
Ścibik Ł. **Aspekty mikrobiologiczne w praktyce laryngologicznej.**
5. 2023, Dubiecko, Polska
Ścibik Ł. **Leczenie chorych z guzami oczodołu.**

Staże zagraniczne:

1. **Palacký University Olomouc**, Klinika Otorynolaryngologii, Chirurgii Głowy i Szyi, 2022, Ołomuniec, Czechy
2. **Humanitas Research Hospital**, Klinika Otolaryngologii, Chirurgii Głowy i Szyi, 2023, Rzym, Włochy

Streszczenie

Motywacją do podjęcia badań, które zostały wykonane w ramach niniejszej pracy doktorskiej, były obserwacje własne autora pacjentów użytkujących rurki tracheostomijne z poli(chloroku winylu). U części pacjentów po zabiegu tracheostomii rozwijały się infekcje miejscowe i ogólnoustrojowe, które znacząco komplikowały proces leczenia. Źródłem tych infekcji były często drobnoustroje odporne na wiele antybiotyków. Dodatkowo materiał fizycznie ulegał uszkodzeniu poprzez utratę przezierności i przebarwiania się.

Celem przewodnim pracy doktorskiej było uzyskanie podstaw fizykochemicznych do opracowania sfunkcjonalizowanej powierzchni poli(chloroku winylu) w kierunku zapobiegania bądź spowalniania procesu tworzenia się biofilmu bakteryjnego. Materiałem jaki wybrano do badań był poli(chlorek winylu) jako najczęściej wykorzystywany materiał polimerowy do produkcji rurek tracheostomijnych. Postanowiono przeanalizować jakie procesy fizykochemiczne zachodzą na powierzchni biomateriału i jakim procesom degradacji ulega on podczas użytkowania i kontaktu z biofilmem bakteryjnym.

W zakresie mikrobiologicznym oceniono skład gatunkowy bakterii tworzących biofilm bakteryjny na powierzchniach rurek tracheostomijnych użytkowanych przez pacjentów. Eksperymentalnie sfunkcjonalizowany materiał został poddany analizie pod kątem adhezji bakterii oraz cytotoksyczności na liniach komórkowych. W zakresie fizykochemicznym oceniono zmiany strukturalne (TG/DTA) i powierzchniowe (kąta zwilżania, FTIR, SEM, AFM). Funkcjonalizację powierzchni wykonano przy użyciu plazmy tlenowej (wprowadzenie grup funkcyjnych) oraz metodą sonochemiczną (wbudowanie nanocząstek gentamycyny). Ocenę obecności grup funkcyjnych prowadzono monitorując zmianę kąta zwilżania wodą natomiast wielkość nanocząstek gentamycyny scharakteryzowano (NTA). Profil uwalniania leku z powierzchni poli(chloroku winylu) wyznaczono wykorzystując metodę OPA.

Uzyskane wyniki pozwoliły na opracowanie biozgodnej powierzchni poli(chloroku winylu) sfunkcjonalizowanej nanocząstkami gentamycyny, które hamowały adhezję bakterii i rozwój biofilmu. Wyniki takie mają zatem kluczowe znaczenie dla przeciwdziałania

tworzeniu się biofilmu bakteryjnego na powierzchniach rurek tracheostomijnych w pierwszych godzinach po zabiegu operacyjnym jakim jest tracheotomia.

Prace eksperymentalne prowadzone w niniejszej pracy charakteryzowały się wyjątkowo interdyscyplinarnym charakterem łącząc zagadnienia badawcze z zakresu inżynierii materiałowej, badań mikrobiologicznych i materiału klinicznego uzyskanego od pacjentów. Tak zaproponowana strategia badawcza wpisuje się w kierunek poszukiwania nowych i udoskonalanie już istniejących sposobów leczenia pacjentów po zabiegu tracheotomii.

Summary

The motivation for undertaking the research, which was carried out in this doctoral thesis, was the author's own observation of patients using poly (vinyl chloride) tracheostomy tubes. Some patients after tracheostomy developed local and systemic infections, which significantly complicated the treatment process. The source of these infections were often microorganisms resistant to many antibiotics. In addition, the material was physically damaged in the form of loss of translucency and discoloration.

The primary objective of the doctoral dissertation was to establish the physicochemical basis for the development of a functionalized polyvinyl chloride surface with the aim of preventing or slowing the formation of bacterial biofilms. The material chosen for the study was poly (vinyl chloride), which is the most commonly used polymeric material for the production of tracheostomy tubes. The purpose of this study was to investigate the physical and chemical properties of the biomaterial and the degradation processes it undergoes during use and contact with bacterial biofilm.

In terms of microbiology, it was determined what species of bacteria developed as bacterial biofilm on the tracheostomy tubes that patients were using. Screening for bacterial adhesion and cytotoxicity in cell lines was performed on the material which was previously experimentally functionalized. Structural (TG/DTA) and surface modifications (contact angle, FTIR, SEM, AFM) have been evaluated in the physicochemical scope. Oxygen plasma was used to introduce functional groups onto the surface, and gentamicin nanoparticles were incorporated using the sonochemical method. While the size of the gentamicin nanoparticles (NTA) was determined, the assessment of the presence of functional groups was carried out by observing the change in the water wetting angle. The OPA method was implemented to determine the drug release profile from the polyvinyl chloride surface.

The outcomes made it possible to achieve a biocompatible poly(vinyl chloride) surface functionalized with gentamicin nanoparticles that prevented the formation of

bacterial adhesion and biofilm. Therefore, these results are crucial for the first few hours following the surgical operation, which is a tracheotomy.

The experiments conducted in this study were distinguished by their highly interdisciplinary form, integrating inquiries in the disciplines of materials engineering, microbiological tests, and medical records derived from patient data. The research plan put forth in this manner is consistent with the goal of finding new and better ways to care for those who have had tracheostomies.

Spis treści

1. Wprowadzenie	1
1.1 Aspekty kliniczne w projektowaniu biomateriału	1
1.1.1. Historia zabiegu tracheotomii	1
1.1.2. Podział, wskazania i przeciwwskazania do tracheostomii.....	2
1.1.3. Rurka tracheostomijna	4
1.2. Aspekty mikrobiologiczne w projektowaniu biomateriału	4
1.2.1 Problematyka zakażeń związanych z użytkowaniem sprzętu medycznego	4
1.2.2. Biofilm bakteryjny	6
1.3. Aspekty fizykochemiczne w projektowaniu biomateriału.....	7
1.3.1. Nanomedycyna.....	7
1.3.2. Funkcjonalizacja powierzchni	8
1.3.3. Właściwości fizykochemiczne biomateriału, a jego biozgodność	9
2. Cele pracy doktorskiej	11
3. Techniki badawcze	12
3.1 Charakterystyka pacjentów	12
3.2. Materiały i odczynniki.....	12
3.2.1. Poli(chlorek winylu)	12
3.2.2. Siarczan gentamycyny	13
3.2.3. Szczepy wzorcowe do badań mikrobiologicznych.....	13
3.2.4. Linie komórkowe	14
3.2.5. Metoda barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD	14
3.2.6. Metoda utrwalenia preparatów komórkowych do obrazowania w skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)	14
3.3. Metody fizykochemiczne.....	15
3.3.1. Modyfikacja plazmą tlenową.....	15
3.3.2. Termogravimetria (TGA) i termiczna analiza różnicowa (DTA)	15
3.3.3. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR).....	16
3.3.4. Synteza nanocząstek gentamycyny i ich depozycja na powierzchni PVC.....	17
3.3.5. Pomiar rozkładu wielkości nanocząstek przy wykorzystaniu techniki NTA.....	17
3.3.6. Kinetyka uwalniania gentamycyny	18
3.3.7. Obrazowanie mikroskopowe techniką SEM i AFM.....	19
3.4. Metody mikrobiologiczne i biologii komórki	21
3.4.1. Technika izolacji i identyfikacji szczepów bakteryjnych z materiału biologicznego	21
3.4.2. Ocena lekooporności szczepów klinicznych	21

3.4.3. Ocena cytotoksyczności gentamycyny i sfunkcjonalizowanej powierzchni poli(chlorku winylu).....	22
3.4.4. Ocena wzrostu biofilmu bakteryjnego na sfunkcjonalizowanej powierzchni poli(chlorku winylu).....	23
4. Wyniki wraz z ich omówieniem.....	24
4.1. Wyniki analizy materiału zebranego od pacjentów.....	24
4.1.1. Wyniki mikrobiologiczne.....	24
4.1.2. Analiza objętościowa polimeru.....	26
4.1.3. Analiza powierzchni polimeru.....	28
4.2. Funkcjonalizacja powierzchni.....	31
4.2.1. Modyfikacja plazmą tlenową i określenie hydrofilowości powierzchni.....	31
4.2.2. Obrazowanie powierzchni poli(chlorku winylu).....	35
4.2.3. Synteza nanocząstek gentamycyny.....	37
4.2.4. Analiza spektroskopowa sfunkcjonalizowanej powierzchni poli(chlorku winylu).....	38
4.2.5. Ocena obecności gentamycyny na powierzchni PVC.....	40
4.3. Analiza biozgodności i efektu terapeutycznego.....	41
4.3.1. Cytotoksyczność nanocząstek.....	41
4.3.2. Cytotoksyczność powierzchni.....	44
4.3.3. Wzrost biofilmu na sfunkcjonalizowanej powierzchni.....	45
5. Wnioski.....	47
6. Podsumowanie.....	49
7. Spis tabel i rycin.....	51
8. Piśmiennictwo.....	53

1. Wprowadzenie

Obiektem badań w niniejszej pracy była rurka tracheostomijna wykonana z poli(chlorku winylu), jako typowy przykład biomateriału szeroko wykorzystywanego w medycynie klinicznej. Poddano ją szeregowi eksperymentów mających na celu nadanie jej właściwości hamujące rozwój biofilmu bakteryjnego.

Opracowanie każdego materiału niezależnie od jego składu chemicznego, struktury i funkcji jest procesem złożonym i wymaga wzięcia pod uwagę wielu czynników. Można je podzielić na 3 arbitralne klasy: związane z praktyką kliniczną, mikrobiologiczną i fizykochemiczną.

Wszystkie te aspekty są ze sobą ściśle skorelowane, dlatego nie da się prowadzić badań z zakresu inżynierii biomateriałowej niezależnie.

W procesie projektowania niezbędne jest zatem spojrzenie interdyscyplinarne, łączące wszystkie te konteksty. Chcąc przybliżyć je czytelnikowi, w następnym podrozdziałach pokrótce je omówiono.

1.1 Aspekty kliniczne w projektowaniu biomateriału

1.1.1. Historia zabiegu tracheotomii

Zabieg tracheotomii należy do jednych z najstarszych zabiegów chirurgicznych. Etymologia słowa tracheotomia wywodzi się od greckich słów tracheia (τραχεία tracheía) oznaczającego *tchawicę* i tome (τομή tomé) oznaczającego *ciąć*, a całe słowo można przetłumaczyć jako: *nacinać tchawicę*. Pierwsze wzmianki można znaleźć w zapiskach starożytnych Egipcjan sięgających 3600 lat przed naszą erą. Kolejne udokumentowane przez Aretaeusa i Galena wykonanie tracheotomii przypisuje się Asklepiadesowi około 100 lat przed naszą erą¹.

Informacje o zabiegu tracheotomii można znaleźć w zapiskach dotyczących arabskich lekarzy, których poziom wiedzy i umiejętności na temat ludzkiego ciała był zdecydowanie bardziej zaawansowany niż w przypadku Europejczyków, którzy to dodatkowo uważali, że przecięcie tchawicy stanowi karę za grzechy, podobnie jak

odcięcie głowy czy kończyn². Za ojca współczesnej techniki chirurgicznej uważa się Chevaliera Jacksona, który w sposób szczegółowy opisał aspekty techniczne zabiegu w 1909 roku na łamach czasopisma *Laryngoscope*³. Sam zabieg został mocno spopularyzowany podczas epidemii polio w 1952 roku⁴. Do technik wykonania zabiegu tracheostomii zaliczamy tracheotomię otwartą oraz opisaną w 1985 roku przez Ciaglia et al. tracheotomię przezskórną, która zrewolucjonizowała podejście do tego zabiegu i umożliwiła jego wykonywanie poza salą operacyjną⁵.

1.1.2. Podział, wskazania i przeciwwskazania do tracheostomii

W terminologii medycznej istnieją dwie nazwy, które często są mylone i używane zamiennie. Tracheotomia to termin dotyczący samej procedury zabiegu, a w literaturze anglojęzycznej odnosi się do wytworzenia tracheostomii czasowej. Drugim terminem jest tracheostomia, która odnosi się do wytworzonego otworu w trakcie zabiegu, a w literaturze anglojęzycznej odnosi się do zabiegu tracheostomii stałej⁶.

Zabieg tracheostomii tj. otwarcie przedniej ściany tchawicy wraz z wyłonieniem otworu tracheostomijnego może nastąpić z powodów urazowych, onkologicznych, laryngologicznych lub anestezyjologicznych. Zabieg ten najczęściej wykonuje się na wysokości 2-3 chrząstki tchawicy. Uzyskany otwór wszywa się w tkanki skóry (tracheostomia stała) lub pozostawia zagłębiony w okolicznych tkankach (tracheostomia czasowa). Decyzja co do wszycia lub pozostawienia chrząstek krtani najczęściej uzależniona jest od rokowań pacjenta co do dekaniulacji i zamknięcia otworu w przyszłości. Jeżeli pacjent nie rokuje podjęcia oddechu przez jamy nosa i gardła chirurg podejmuje decyzję o wykonaniu tracheostomii stałej. Wskazania do wykonania zabiegu pokazano w tabeli 1.

Ze względu na lokalizację tracheostomii wyróżniamy:

- 1) Tracheotomia superior – rozcięcie górne (powyżej gruczołu tarczowego)
- 2) Tracheotomia media – rozcięcie środkowe (na wysokości węziny tarczycy)
- 3) Tracheotomia inferior – rozcięcie dolne (poniżej gruczołu tarczowego)

Tab. 1. Wskazania do zabiegu tracheotomii w podziale na nagłe i planowe⁷.

Wskazania nagłe	Wskazania planowe
<ol style="list-style-type: none"> 1. Ostra niedrożność górnych dróg oddechowych z nieudaną intubacją dotchawiczą (ciało obce, obrzęk naczynioruchowy, infekcja, anafilaksja itp.) 2. Po konikotomii (krikotyreotomii)- po wykonaniu konikotomii należy ją skonwertować do tracheotomii 3. Penetrujący uraz krtani 4. Złamania twarzoczaszki (LeFort III) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Długotrwała respiratoroterapia 2. Profilaktyczna tracheostomia przed leczeniem nowotworów głowy i szyi 3. Obturacyjny bezdech senny oporny na inne metody leczenia 4. Przewlekła aspiracja płynów do dróg oddechowych 5. Choroby nerwowo-mięśniowe 6. Zwężenie podgłośniowe krtani

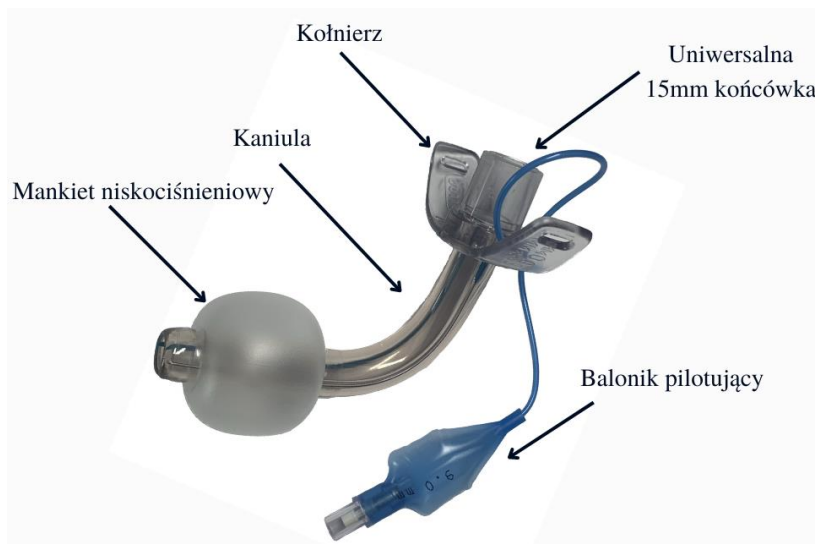
Nie występują przeciwwskazania bezwzględne do wykonania tego zabiegu, szczególnie jeżeli na szali jest życie pacjenta. Należy jednak zachować ostrożność u pacjentów z ostrymi zapaleniami skóry i tkanki podskórnej szyi. Również należy rozważyć zasadność procedury u pacjentów chorych terminalnie ważąc bilans korzyści i strat⁷. Więcej przeciwwskazań dotyczy metody przezskórnej która nie jest wskazana u pacjentów z guzami szyi, koagulopatią, wysokim dodatnim ciśnieniem końcowowydechowym (> 20cm słupa wody), koniecznością natychmiastowego udrożnienia dróg oddechowych lub u pacjentów pediatrycznych⁸. Powikłania po zabiegu tracheotomii przedstawiono w tabeli 2.

Tab. 2. Powikłania po zabiegu tracheotomii w podziale na 3 przedziały czasowe: okołozabiegowe, wczesne i późne⁹.

Okołozabiegowe	Wczesne	Późne
<ol style="list-style-type: none"> 1. Krwotok 2. Uszkodzenie struktur tchawicy 3. Niepowodzenie zabiegu 4. Aspiracja wydzielin do dróg oddechowych 5. Zgubienie światła tchawicy 6. Hipoksemia, hiperkapnia 7. Śmierć 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Krwotok 2. Infekcja tkanek okołostomijnych 3. Przemieszczenie i dekaniulacja rurki tracheostomijnej 4. Pneumothorax 5. Odma podskórna 6. Odma śródpiersia 7. Zapalenie i owrzodzenie żołądka 8. Dysfagia 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Zwężenie tchawicy 2. Powstawanie ziarniny zapalnej 3. Tracheomalacja 4. Zapalenie płuc 5. Aspiracja ciała obcego 6. Przetoka tchawiczo-naczyniowa 7. Przetoka tchawiczo-przłykowa 8. Przypadkowa dekaniulacja 9. Dysfagia

1.1.3. Rurka tracheostomijna

Do zabezpieczenia otworu tracheostomijnego przed jego zamykaniem służą rurki tracheostomijne. Najpopularniejsze rurki wykonane są z poli(chlorku winylu), a ich popularność wynika z niskiej ceny zakupu oraz samych właściwości polimeru m.in. odporność na działanie czynników stosowanych do dezynfekcji urządzeń medycznych i duża wytrzymałość mechaniczna. Rurka tracheostomijna zbudowana z plastyfikowanego PVC składa się z 3 głównych elementów: kołnierza, kaniuli i systemu niskociśnieniowego do uszczelniania rurki w tchawicy. Przykład rurki tracheostomijnej wykorzystanej w niniejszej pracy przedstawia rycina 1.



Ryc. 1. Przykładowa rurka tracheostomijna. Materiał własny.

1.2. Aspekty mikrobiologiczne w projektowaniu biomateriału

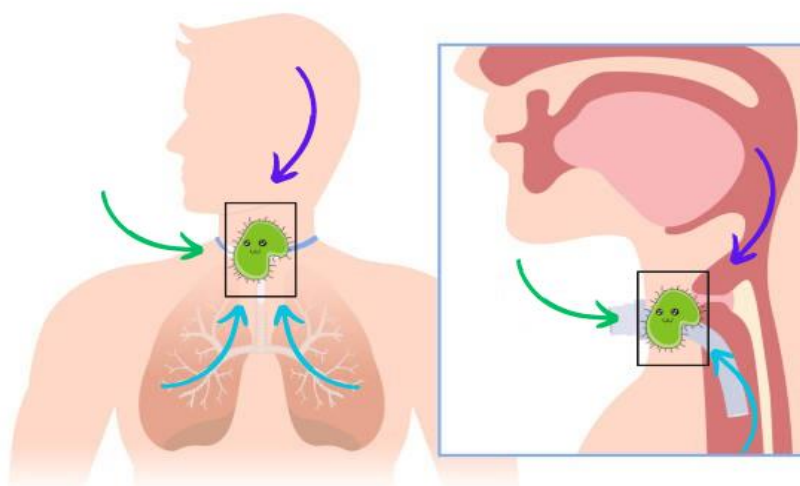
1.2.1 Problematyka zakażeń związanych z użytkowaniem sprzętu medycznego

Wprowadzenie biomateriałów do leczenia pacjentów zrewolucjonizowało nowoczesną medycynę i obecne standardy terapii chorego są nierozwalnie związane z użyciem sprzętu wykonanego z polimerów syntetycznych. Zastosowanie ich do powszechnego użytku medycznego spowodowało pojawienie się problemu zakażeń związanych z biomateriałami. Infekcje związane z użytkowaniem biomateriałów mogą dotyczyć wszystkich urządzeń stosowanych w medycynie m.in. soczewek kontaktowych, cewników do żył centralnych, mechanicznych zastawek serca, cewników do dializy otrzewnowej, protez stawów, rozruszników serca, cewników

moczowych, protez głosowych, rurek intubacyjnych czy wreszcie omawianych tu rurek tracheostomijnych^{10,11}.

Znajdująca się na granicy 3 faz – stałej (tkanka pacjenta), ciekłej (wydzieliny) oraz gazowej (powietrze atmosferyczne) rurka tracheostomijna stwarza środowisko do wzrostu bakterii szczególnie tlenowych (Ryc.2). Zaleganie wydzieliny w rurce tracheostomijnej (wysięk z rany, ślina pacjenta, wydzielina oskrzelowa) zapewnia bakteriom niezbędne warunki do rozwoju (wilgoć, składniki odżywcze). Problem infekcji wynikających z użytkowania biomateriału jakim jest rurka tracheostomijna mimo, że stanowi niewielki odsetek powikłań, jest poważnym problemem klinicznym pojawiającym się w ciągu 24 godzin po zabiegu i dotyczący około 5% zabiegów¹². W szczególności zakażenia tkanek okołostomijnych oraz zakażenia płuc w przebiegu mechanicznej wentylacji stanowią duże wyzwanie w terapii pacjentów. Zakażenia okołostomijne są odpowiedzialne m.in. za niepowodzenia w przeszczepianiu tkanek, czopowanie się dróg oddechowych ze względu na wysięk z rany, rozejście się rany pooperacyjnej w tym powstawanie przetok szyjno-przełykowych^{13,14}.

Biofilm jaki powstaje na powierzchni biomateriału może składać się z jednego lub kilku gatunków mikroorganizmów, a jest to zależne od typu urządzenia, jego miejsca zastosowania oraz czasu użytkowania. Na powierzchni rurki tracheostomijnej biofilm najczęściej utworzony jest przez bakterie tlenowe Gram-ujemne¹⁵.



Ryc. 2. Różne środowiska z jakimi rurka tracheostomijna ma kontakt podczas użytkowania przez pacjenta stwarzające warunki do rozwoju biofilmu bakteryjnego. Strzałki zielone – powietrze atmosferyczne, strzałki niebieskie – wydzielina drzewa oskrzelowego, strzałki fioletowe – ślina. Grafika własna na podstawie szablonów uzyskanych ze strony: <https://www.canva.com/>.

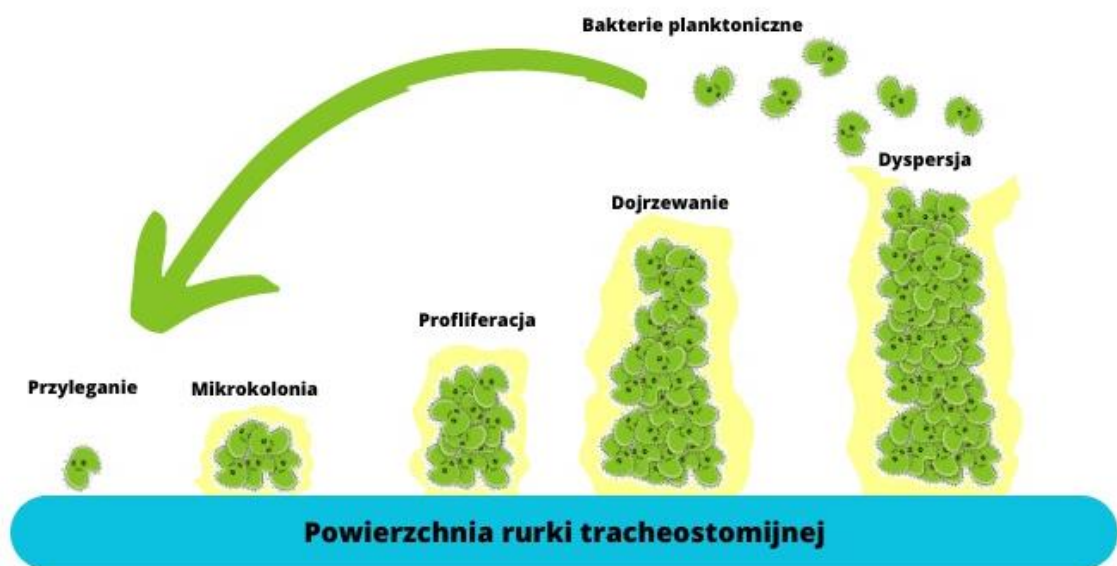
1.2.2. Biofilm bakteryjny

Biofilm to zorganizowane skupisko żywych mikroorganizmów w zewnątrzkomórkowej matrycy polimerowej, którą same wytwarzają i dzięki której przyczepiają się do powierzchni. Wytwarzane przez mikroorganizmy pozakomórkowe substancje polimerowe (ang. *extracellular polymeric substances* - EPS) inicjują etap adhezji biofilmu do powierzchni. Grubość matrycy EPS zwykle wynosi 0,2-1,0 nm nie przekraczając 10-30 nm. Mikroorganizmy stanowią 5-35% objętości biofilmu, a pozostałą objętość stanowi macierz zewnątrzkomórkowa. Główne substancje wchodzące w jej skład to białko (>2%), polisacharydy (1-2%), cząsteczki DNA i/lub RNA (<1%), jony związane i wolne oraz woda (97%)¹⁶.

Wyróżnia się 5 etapów powstawania biofilmu bakteryjnego: przyleganie do powierzchni, narastanie mikrokolonii, dwuetapowe dojrzewanie i dyspersja wytworzonego biofilmu (Ryc.3). Jednym z ważniejszych mechanizmów jaki zachodzi w biofilmie jest proces wzajemnej komunikacji drobnoustrojów tzw. *quorum sensing*. Jest to regulacja ekspresji genów w odpowiedzi na fluktuacje gęstości populacji komórek. Bakterie wytwarzają i uwalniają chemiczne cząsteczki sygnałowe zwane autoinduktorami, których ilość wrasta wraz z gęstością komórek. Dzięki tym cząsteczkom bakterie porozumiewają się między sobą i regulują swoją aktywność fizjologiczną taką jak: symbioza, zjadliwość, kompetencja, koniugacja, produkcja antybiotyków, ruchliwość, sporulacja i tworzenie biofilmu¹⁷.

Mechanizm zwiększonej oporności bakterii tworzących biofilm na antybiotyki nie jest do końca poznany. Według pierwszej hipotezy powstawanie macierzy zewnątrzkomórkowej sprawia, że bakterie pokrywają się barierą nieprzepuszczalną dla antybiotyków oraz środków dezynfekcyjnych. Druga hipoteza zakłada, że bakterie, ze względu na ograniczoną podaż w składniki odżywcze i wyzwalaną z tego powodu reakcję stresową przechodzą w stan ograniczonego wzrostu (ang. *dormant cell*) ze zmniejszoną aktywnością metaboliczną. Dodatkowo macierz zewnątrzkomórkowa i powstała struktura biofilmu zabezpiecza komórki przed odpowiedzią układu immunologicznego gospodarza, czyniąc je niewidzialnymi dla komórek humoralnych¹⁸.

Ważnym mechanizmem nabywania oporności przez bakterie tworzące biofilm jest horyzontalny transfer genów (ang. *horizontal gene transfer* - HGT). Przyczynia się on do szybkiego rozprzestrzeniania genów oporności, które warunkują niewrażliwość na antybiotyki. Proces ten nie jest do końca poznany jednak wyróżnia się 3 główne drogi uwalniania genów: koniugację, transdukcję oraz uwalnianie zewnątrzkomórkowego DNA. Mechanizm HGT odpowiedzialny jest za tworzenie się „superbakterii” poprzez koncentrację wielu genów warunkujących oporność na antybiotyki. Znajomość tego zjawiska stanowi jedną z kluczowych strategii zapobiegania pojawianiu się mikroorganizmów wielolekoopornych w placówkach ochrony zdrowia¹⁹.



Ryc. 3. Etapy powstawania biofilmu bakteryjnego. Grafika własna na podstawie szablonów uzyskanych ze strony: <https://www.canva.com/>.

1.3. Aspekty fizykochemiczne w projektowaniu biomateriału

1.3.1. Nanomedycyna

Nanomedycyna to dziedzina nauki zajmująca się zastosowaniem nanotechnologii w celu osiągnięcia innowacji w opiece zdrowotnej. Bazuje ona na wykorzystaniu materiałów w skali nanometrycznej (10^{-9} m), które często różnią się pod względem fizycznym, chemicznym lub biologicznym od tego samego materiału w większej skali. Co więcej, rozmiar nanometryczny to także skala, w której zachodzi wiele istotnych procesów biologicznych w ludzkim ciele. Umożliwia to nanocząstkom

i nanomateriałom potencjalne przekraczanie naturalnych barier komórkowych w celu uzyskania dostępu do wnętrza komórki i interakcji z DNA lub innymi cząsteczkami na różnych poziomach szlaków metabolicznych²⁰.

W nanoskali stosunek powierzchni do objętości sprawia, że właściwości powierzchni stają się dominujące w kontekście potencjalnego działania nanocząstki lub materiału. Dzięki temu funkcjonalizacja powierzchni materiałów medycznych (nawet na wielu poziomach) staje się przydatna w celu zwiększenia biokompatybilności powierzchni i przyłączonych do niej cząstek. Funkcjonalizacja dodatkowo zwiększa czas krążenia cząsteczek we krwi, a także zapewnienia wysoce selektywne wiązanie z pożądanym celem²¹.

Nanomedycyna niesie ze sobą ogromny potencjał umożliwiający wczesne wykrywanie i zapobieganie oraz radykalną poprawę diagnostyki, leczenia i monitorowania wielu chorób. Obecnie setki produktów do zastosowań medycznych znajdują się w fazie badań klinicznych, obejmujących wszystkie główne choroby, w tym choroby sercowo-naczyniowe, neurodegeneracyjne, mięśniowo-szkieletowe i zapalne. Poprzez wsparcie technologii we wszystkich obszarach opieki zdrowotnej, nanomedycyna dostarcza produkty na rynek medyczny począwszy od środków farmaceutycznych po obrazowanie medyczne, diagnostykę i biomateriały²².

1.3.2. Funkcjonalizacja powierzchni

Funkcjonalizacja powierzchni obejmuje procesy, które mają na celu poprawę i/lub dodanie właściwości przydatnych do wykorzystania w zastosowaniach medycznych. Nanomateriały wykazują charakterystyczne właściwości chemiczne, a grupy funkcyjne wyeksponowane na ich powierzchni są wykorzystywane w procesie funkcjonalizacji²³.

Modyfikację powierzchni przy zastosowaniu nanocząsteczek można osiągnąć za pomocą dwóch różnych metod wykorzystujących różnego rodzaju wiązania do immobilizacji nanocząstek.: wiązania niekowalencyjne i kowalencyjne. Strategia

wiązań niekowalencyjnych opiera się na wykorzystaniu dużej liczby słabych oddziaływań takich jak: oddziaływania elektrostatyczne, jonowe, van der Waalsa i hydrofobowe, adsorpcja, wiązania wodorowe. W strategii wiązań kowalencyjnych wykorzystuje się użycie cząsteczek wiążących powierzchnię z nanocząsteczkami. Opiera się ona na zastosowaniu homo- lub hetero-bifunkcyjnych łączników sieciujących w celu dodania organicznej grupy funkcyjnej (R-NH₂, R-COOH itp.), przydatnej do wiązania cząsteczek biologicznych²⁴.

Oddziaływania niekowalencyjne są wykorzystywane do umieszczania nanocząstek, które mają zostać uwolnione w komórkach docelowych. Przykładem takiego wykorzystania są leki lub RNA. Wiązania kowalencyjne są wykorzystywane do wiązania ligandów przydatnych do osiągnięcia konkretnego celu i/lub zmniejszenia toksyczności cząstek biologicznych²⁵.

W niniejszej pracy do sfunkcjonalizowania powierzchni poli(chlorku winylu) zastosowano zarówno strategię wiązań kowalencyjnych, jak i niekowalencyjnych. Pierwsza została użyta do wygenerowania powierzchniowych grup funkcyjnych zawierających atomy tlenu (-COOH, -OH i -C=O). Druga posłużyła do zakotwiczenia nanocząstek gentamycyny na powierzchni polimeru. Połączenie tych obu metod było niezbędne do zapewnienia stabilności powierzchniowych grup funkcyjnych (wiązania kowalencyjne) oraz uwalniania cząsteczek leku z powierzchni materiału implantacyjnego (wiązania niekowalencyjne)²⁶.

1.3.3. Właściwości fizykochemiczne biomateriału, a jego biozgodność

Na wychwytywanie komórkowe nanocząstek wpływają ich właściwości fizykochemiczne, takie jak rozmiar, kształt, ładunek powierzchniowy, rodzaj powierzchni, na której są umieszczone i jej hydrofobowość/hydrofilowość. Kiedy nanocząsteczki wchodzi w interakcję z błoną komórkową, są one głównie wychwytywane przez komórki w drodze endocytozy: fagocytozy (makrofagi) i pinocytozy (wszystkie typy komórek)²⁷. Biozgodność to termin oznaczający odpowiednie właściwości biomateriału stosowanego w wyrobie medycznym, który jest kompatybilny z żywą tkanką. Materiały biozgodne nie wywołują reakcji toksycznej ani immunologicznej z tkankami lub płynami ustrojowymi. Ma to kluczowe znaczenie dla

uniknięcia procesu odrzucenia materiału przez organizm i wspierania harmonijnego funkcjonowania²⁸.

Wychwyty i biokompatybilność to dwie najważniejsze użyteczne cechy nanocząstki do zastosowań medycznych, a przewyższenie problemów związanych z tymi dwoma aspektami jest pierwszym etapem w ich otrzymywaniu. Z tego powodu badanie toksyczności i wychwyty komórkowego jest pierwszym krokiem podczas biologicznej oceny nanocząsteczek²³.

Biomateriały przed wprowadzeniem na rynek muszą być przetestowane pod wieloma względami w celu oceny ich biozgodności. Przeprowadza się między innymi testy na cytotoksyczność, genotoksyczność, rakotwórczość i toksyczność reprodukcyjną, immunotoksyczność, podrażnienie i uczulenie, hemokompatybilność, toksyczność ogólnoustrojową, pirogenność i implantację²⁹.

Ze względu na szeroką gamę nanomateriałów, różniących się składem chemicznym, rozmiarem, kształtem czy morfologią powierzchni trudno jest bezpośrednio określić związek między właściwościami fizykochemicznymi, a ich wpływem na układy biologiczne. Dodatkowymi trudnościami w znalezieniu funkcjonalnych korelacji są:

- duża liczba biologicznych systemów modelowych wykorzystywanych do badań wchodzących oraz złożone interakcje z różnymi nanomateriałami
- brak standaryzowanych protokołów (np. czas inkubacji, stężenia nanocząstek na które ekspozycja są badane komórki)
- złożoność procedur wykonania testów na modelach *in vivo*.

Wyzwania te ograniczają pełne zrozumienie efektów oddziaływania nanomateriałów na układy biologiczne oraz wykorzystanie w praktyce klinicznej³⁰.

2. Cele pracy doktorskiej

Zabieg tracheostomii stanowi nieodłączny element nowoczesnej medycyny. Szczególnie w ostatnich latach podczas pandemii COVID-19, kiedy na oddziałach intensywnej terapii liczba pacjentów wymagająca tego zabiegu wzrosła z 16% przed pandemią do 61% w trakcie jej trwania³¹. Sam zabieg stanowi znaczne ułatwienie prowadzenia długoterminowej wentylacji mechanicznej, jak również przyspiesza dekaniulację pacjenta i powrót do jego własnego oddechu. Rosnące zapotrzebowanie na tę procedurę stawia klinicystów przed faktem konieczności poszukiwania nowych rozwiązań w prowadzeniu pacjentów z tracheostomią, a przede wszystkim poszukiwanie takiego, które ograniczy powikłania po tym zabiegu. Stanowi to główne przesłanki do podjęcia badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

Celem przewodnim niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie sfunkcjonalizowanej powierzchni poli(chloru winylu), z którego zbudowana jest rurka tracheostomijna, nanocząstkami antybiotyku – gentamycyny. Taka funkcjonalizacja ukierunkowana była na spowalnianie bądź zahamowanie procesu tworzenia się biofilmu bakteryjnego, a jednocześnie zachowanie dobrych parametrów użytkowych ze szczególnym uwzględnieniem biogodności w kontakcie z tkankami pacjenta.

Cele szczegółowe pracy doktorskiej podzielono na 3 wątki badawcze:

- 1) Określenie profilu bakterii tworzących biofilm na powierzchni rurek tracheostomijnych użytkowanych przez pacjentów poddanych zabiegowi tracheotomii wraz z oceną lekooporności wyizolowanych drobnoustrojów na antybiotyki.
- 2) Dwuetapowa funkcjonalizacja powierzchni poli(chloru winylu): wprowadzenie tlenowych grup funkcyjnych (wykorzystując plazmę tlenową), nanocząstek gentamycyny (stosując metodę sonochemiczną) oraz kompleksowa charakterystyka fizykochemiczna badanych układów.
- 3) Ocena skuteczności funkcjonalizacji powierzchni i jej wpływu na wzrost biofilmu bakteryjnego przy wykorzystaniu szczepów referencyjnych *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Ocena cytotoksyczności otrzymanych biomateriałów z wykorzystaniem linii komórkowej A549.

3. Techniki badawcze

Inżynieria materiałowa wykorzystuje strategie badawcze w celu oceny składu i struktury badanego biomateriału na różnych poziomach opisu. W pracy doktorskiej zastosowano techniki wykorzystujące skalę molekularną, nanometryczną oraz makrometryczną. Zatem warsztat badawczy rozprawy łączy w sobie rozwiązywania wykorzystywane w naukach technicznych, chemicznych, biologicznych i medycznych. Poniższe podrozdziały po krótko opisują zastosowaną metodykę w pracy doktorskiej. Wszystkie eksperymenty zostały samodzielnie wykonane przez doktoranta przy wsparciu merytorycznym promotorów.

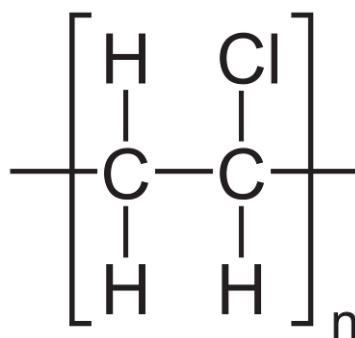
3.1 Charakterystyka pacjentów

Materiał kliniczny w postaci rurek tracheostomijnych pozyskiwano od pacjentów hospitalizowanych w 5 Wojskowym Szpitalu Klinicznym z Polikliniką w Krakowie. 35 pacjentów było hospitalizowanych w Klinice Otolaryngologii i Chirurgii Onkologicznej Głowy i Szyi. 10 pacjentów było hospitalizowanych w Klinice Anestezjologii i Intensywnej terapii. Łącznie do badania włączono 45 pacjentów po zabiegu tracheostomii (35 mężczyzn i 10 kobiet) w wieku 36-94 lata (średnia 75 lat). Charakterystykę pacjentów oraz szczegółowy proces preparatyki opisano w publikacji nr I.

3.2. Materiały i odczynniki

3.2.1. Poli(chlorek winylu)

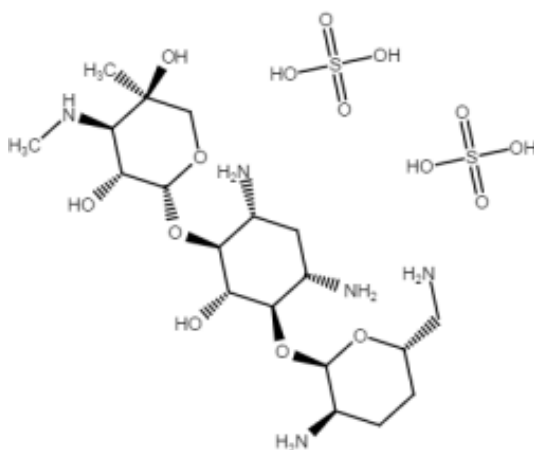
Materiał do badań eksperymentalnych uzyskano od producenta rurek tracheostomijnych (firma SUMI, Sulejówek, Polska). Producent dostarczył sterylnie zapakowane krążki o wymiarach 15 mm średnicy i 2 mm grubości, wycięte z tego samego materiału z jakiego wykonywane są rurki tracheostomijne z poli(chlorku winylu). Krążki pakowane były po 50 sztuk.



Ryc. 4. Wzór chemiczny monomeru chlorku winylu. Grafika własna na podstawie szablonów uzyskanych ze strony internetowej <https://www.canva.com/>.

3.2.2. Siarczan gentamycyny

Do badania użyto siarczan gentamycyny (Biological Industries (Izrael)/SARTORIUS) o wzorze sumarycznym C₆₀H₁₂₇N₁₅O₂₆S i masie cząsteczkowej 575,67 pakowany w zamkniętych opakowaniach po 5 g.



Ryc. 5. Wzór chemiczny siarczanu gentamycyny. Grafika pozyskana ze strony internetowej dystrybutora odczynników <https://pol-aura.pl/>.

3.2.3. Szczepy wzorcowe do badań mikrobiologicznych

W badaniu wykorzystano dwa szczepy referencyjne (wskaźnikowe), w tym przedstawiciela bakterii Gram-dodatnich – gatunek *Staphylococcus aureus* ATCC25923 oraz przedstawiciela bakterii Gram-ujemnych – gatunek *Escherichia coli* ATCC25922. Szczepy pochodziły z American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, Wirginia, USA. Do obserwacji kolonii bakteryjnych od mikroskopem optycznym użyto standardowego zestawu do barwienia metodą Grama (Merck, Poland).

3.2.4. Linie komórkowe

Do badania cytotoksyczności użyto model gruczolaka ludzkiej linii komórek podstawnych nabłonka pęcherzyków płucnych A549 ATCC CCL185. Komórki hodowano w pożywce DMEM z -L-glutaminą uzupełnioną 10% FBS i 1% ZellShield (MB Minerva Biolabs) w 5% CO₂ i 37°C z L-alanylo-L-glutaminą (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Komórki zawarte w 1 ml zawiesiny zliczono i rozcieńczono uzyskując 1×10^4 komórek na próbkę.

Do oceny cytotoksyczności nanocząstek gentamycyny użyto standardowego testu do wzrostu komórek MTT (MTT Cell Growth Assay, Sigma-Aldrich)³².

3.2.5. Metoda barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD

Zastosowanie metody podwójnego barwienia przy użyciu zestawu LIVE/DEAD (Live/Dead Cell Double Staining Kit, Molecular Probes). pozwala w łatwy i szybki sposób określić żywotność komórek w populacji w oparciu o integralność błony komórkowej. Barwnik diocetan fluoresceiny dzięki małej masie cząsteczkowej jest w stanie wnikać do wnętrza komórki o zachowanych błonach cytoplazmatycznych. Drugi barwnik jodek propidyny – PI (ang. propidium iodide) posiadający dużą masę cząsteczkową wnika tylko do komórek posiadających uszkodzenia w błonie cytoplazmatycznej. Tak zastosowane barwniki dzięki analizie obrazów uzyskanych przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego BX63 (Olympus) umożliwiają podział komórek na żywe (kolor zielony) oraz martwe (kolor czerwony).

3.2.6. Metoda utrwalenia preparatów komórkowych do obrazowania w skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)

Protokół do utrwalania próbek biologicznych do obserwacji SEM zaczerpnięto z innych publikacji³³. Próbki na szklanym podłożu utrwalano w 3% buforowanym aldehydzie glutarowym przez 24 godziny, a następnie ostrożnie przemyto dwukrotnie solą fizjologiczną buforowaną fosforanami (DPBS, Dulbecco). Następnie odwadniano je w roztworach wodno-alkoholowych ze stopniowo rosnącym stężeniem etanolu (50,

60, 70, 80, 90, 96 i 100%) przez 10 min każdy. Na koniec próbki suszono w punkcie krytycznym z użyciem heksametylodisilazanu (HMDS, Sigma Aldrich). Przygotowane próbki mocowano na uchwycie SEM za pomocą samoprzylepnej taśmy węglowej. Przed rozpoczęciem obserwacji próbki pokryto cienką warstwą złota (około 15 nm) za pomocą napylacza katodowego (Quorum Q150T S).

3.3. Metody fizykochemiczne

3.3.1. Modyfikacja plazmą tlenową

Do wytworzenia grup funkcyjnych zawierających w swojej budowie atomy tlenu wykorzystano plazmę tlenową (system FEMTO, Diener Electronics). Przeprowadzono optymalizację parametrów ekspozycji próbek poli(chlorku winylu) stosując zmienne ciśnienie tlenu oraz moc urządzenia. Analizę stopnia funkcjonalizacji powierzchni plazmą tlenową sprawdzano oceniając wzrost hydrofilności badanej powierzchni monitorując zmianę kąta zwilżania.

Pomiary kąta zwilżania wykonano przy użyciu goniometru (Surftens Universal Instrument, OEG GmbH, Frankfurt, Germany). Statyczne obrazy były mierzone przy pomocy dostarczonego oprogramowania (Surftens 4.3). Każdy pomiar kropli (2 μ l) był powtarzany 5 –krotnie, a uzyskane wyniki uśrednione.

3.3.2. Termogravimetria (TGA) i termiczna analiza różnicowa (DTA)

Do badania zmian objętościowych badanego materiału wykorzystano aparaturę TGA/DTA Mettler-Toledo. Próbkę poli(chlorku winylu) o masie 10 g umieszczono w aluminiowym tyglu ogrzewano z prędkością 10 st./min w zakresie temperatur 30-800°C w obojętnej atmosferze argonowej (przepływ argonu 50 cm³/min).



Ryc. 6. Aparat do pomiarów termograwimetrycznych TGA/DTA Mettler-Toledo. Zdjęcie z katalogu producenta.

3.3.3. Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)

Do oceny zmian na powierzchni PVC użyto próbek wielkości 1x1cm o grubości 2mm. Pomiary wykonywane były na aparaturze Nicolet 6700 Thermo Scientific w zakresie widma 4000-650 nm. Zasada działania spektrometru FTIR polega na analizie interferencji dwóch wiązek promieniowania i pomiarze różnicy ich drogi optycznej. Dzięki pomiarowi odległości i częstotliwości powstaje interferogram z widmem odpowiadającym składowi molekularnemu analizowanej próbki³⁴.



Ryc. 7. Spektrometr do analizy widm w podczerwieni Nicolet 6700 Thermo Scientific. Zdjęcie z katalogu producenta.

3.3.4. Synteza nanocząstek gentamycyny i ich depozycja na powierzchni PVC

Eksperyment wykonano w jednoetapowym procesie na zmodyfikowanym plazmą tlenową krążku PVC. Do eksperymentu wykorzystano rozwór siarczuanu gentamycyny w wodzie destylowanej o stężeniu 50 mg/ml. Depozycję nanocząstek przeprowadzono przy pomocy homogenizatora (Sonics Vibracell CV18). Parametry procesu: częstotliwość 20 kHz, amplituda 30%, czas 6 min. Do zwiększenia wydajności syntezy nanocząstek do przygotowanego 3 ml roztworu gentamycyny dodano 0.5 ml etanolu (Avantor Performance Materials). Nadmiar płynu z powierzchni odsączano i pozostawiano krążki do wyschnięcia.



Ryc. 8. Homogenizator Sonics Vibracell CV18. Zdjęcie własne.

3.3.5. Pomiar rozkładu wielkości nanocząstek przy wykorzystaniu techniki NTA

Rozkład wielkości sonochemicznie wytworzonych nanocząstek gentamycyny (ang. *Nanoparticle Tracking Analysis* - NTA) określano za pomocą instrumentu LM10 Nanosight (Malvern Instruments Ltd.) wyposażonego w kamerę sCMOS (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japonia) przy użyciu niebieskiego lasera o długości fali 450 nm. Analizę danych wykonano przy użyciu oprogramowania NTA (3.1 Build 3.1.45). Parametry pomiaru: poziom kamery 15, migawka 1206, wzmocnienie 366. W skład pojedynczego pomiaru wchodziły trzy 30 sekundowe klipy wideo nagrywane z szybkością 25 klatek/sekundę. Połączona z mikroskopem kamera rejestruje

powstające rozbłyski światła rozpraszane uzyskane przez poruszające się w roztworze nanocząstki oświetlane promieniem lasera. Oprogramowanie NTA na podstawie uzyskanego klipu wideo śledzi tory ruchów nanocząstek wyznaczając z nich współczynniki dyfuzji, które następnie służą do obliczenia średnic hydrodynamicznych i wyznaczenia ich wielkości.



Ryc. 9. A - aparatura wykorzystywana w obrazowaniu NTA. B - obraz spod aparatury NTA ukazujący otrzymane nanocząstki gentamycyny. Zdjęcia własne.

3.3.6. Kinetyka uwalniania gentamycyny

Każdy z badanych krążków został umieszczony w fiolkach wraz z 20 ml buforu PBS na 7 dni i stale mieszany z szybkością 100 obr./min w temperaturze 37°C. Aby porównać wyniki, eksperyment wykonano dla krążków poli(chlorku winylu) przed i po traktowaniu plazmą tlenową. Przez pierwsze 12 godzin eksperymentu w odstępach 2-godzinnych, w 24 godzinie i kolejno co 24 godziny przez 5 dni pobierano 2 ml PBS z fiolek, umieszczano pobrany płyn w probówkach typu Eppendorf i uzupełniano fiołki świeżym roztworem PBS. Ilość uwolnionego leku określono ilościowo przy użyciu testu OPA. W tym celu 30 mg OPA rozpuszczono w 0.5 ml metanolu i 0.1 ml merkaptoetanolu, a następnie roztwór dodano do 50 ml buforu boranowego (pH = 10.4). Tak otrzymany odczynnik mieszało z 50 µl pobranej próbki w ustalonym odstępie czasu w stosunku objętościowym 1:1 i inkubowano w ciemności przez 10 min w czarnej płytce 96-dołkowej. Po tym czasie mierzono fluorescencję - długość fali wzbudzenia w zakresie 340–310 nm i długość fali emisji 460 nm (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Niemcy). Metodę zaczerpnięto z publikacji Kwiecień et al.³⁵.

3.3.7. Obrazowanie mikroskopowe techniką SEM i AFM

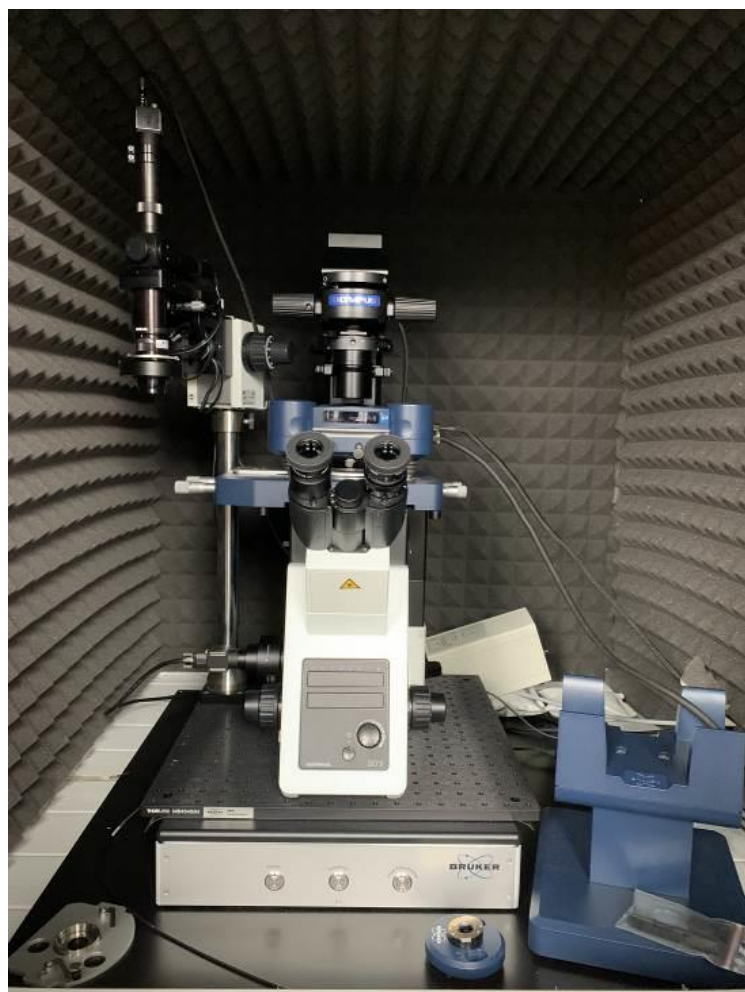
Badane próbki PVC były obrazowane przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (ang. *scanning electron microscopy* - SEM) (FE-SEM, Hitachi S-4700). Biofilmy bakteryjne były utrwalane przy użyciu 2,5% aldehydu glutarowego (Sigma-Aldrich) w 0,1 M buforze PBS (DPBS, Lonza) inkubowane w OsO₄ i odwadniane w szeregu alkoholowym. Próbki zostały przytwierdzone do holdera i pokryte ~ 15nm warstwą złota (Quorum Q150T S) i rozpoczęto analizę obrazów.



Ryc. 10. Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) FE-SEM, Hitachi S-4700. Zdjęcie z katalogu producenta.

Powierzchnie próbek PVC przed i po traktowaniu plazmą tlenową obrazowano przy użyciu metody mikroskopii sił atomowych (ang. *atomic force microscopy* - AFM) za pomocą NanoWizard® 4XP (Bruker) wyposażonego w sondy SCANASYST-AIR (Bruker). Obrazy (20 x 20 μm , 256 x 256 px) uzyskiwano przy parametrach: wartość

zadana 9.252 nN, długość Z 650 nm, prędkość Z 79.11 $\mu\text{m/s}$ i czas px 20.54 ms. Analizę przeprowadzono za pomocą oprogramowania JPK Data Processing (wersja 7.0.153).



Ryc. 11. Mikroskop sił atomowych (AFM) NanoWizard® 4XP Bruker. Zdjęcie własne.

Morfologia powierzchni polimeru wpływa na zwilżalność, a jednocześnie jej struktura znacząco przyczynia się na możliwość zastosowania w medycynie. Chropowatość oraz skład powierzchni determinują naturę materiału w kierunku hydrofobowości lub hydrofilowości w odniesieniu do powierzchni płaskiej. Obrazowanie polimeru można przeprowadzić przy wykorzystaniu metod mikroskopowych takich jak skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) oraz mikroskopia sił atomowych (AFM). AFM przekazuje informacje o topografii (np. chropowatość) oraz właściwościach mechanicznych (np. sztywność powierzchni)³⁶. Obrazowanie SEM wykorzystuje interakcję wiązki elektronów z atomami na różnych głębokościach badanej próbki. Obrazy charakteryzują się dużą głębią ostrości oraz trójwymiarowym wyglądem badanej powierzchni⁶³.

3.4. Metody mikrobiologiczne i biologii komórki

3.4.1. Technika izolacji i identyfikacji szczepów bakteryjnych z materiału biologicznego

Rurki tracheostomijne pobrane od pacjentów były umieszczane w wysterylizowanych rękawach papierowo-foliowych (Matopat) i natychmiastowo transportowane do laboratorium mikrobiologicznego. W warunkach sterylnych odcinano kołnierz, a kaniulę umieszczano w sterylnych probówkach typu Falcon 50 ml (Biospace). Do próbki wlewano 15 ml bulionu tryptozowo-sojowego (9TSB) i za pomocą wytrząsarki odrywano biofilm z powierzchni rurki tracheostomijnej i poddawano dalszej analizie. Hodowle drobnoustrojów przeprowadzano na różnych podłożach izolacyjnych: Columbia LAB-AGAR+5%KB (BIOCORP, Polska), Chocolate LAB-AGAR™ (CH+PV, BIOCORP, Polska), MacConkey LAB-AGAR™ (BIOCORP, Polska), agar z solą mannitolową (MSA) (Oxoid, Wielka Brytania) i agar Mueller-Hinton (MHA) (BD, USA). Podłoża inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych. Z każdego podłoża izolowano czyste kolonie bakteryjne, które następnie mrożono do temp -80°C w Microbank™-Dry (Pro-Lab Diagnostics, Birkenhead, Wielka Brytania). Przeprowadzano klasyczne metody identyfikacji mikrobiologicznej wyizolowanych szczepów bakteryjnych (ocena morfologii kolonii, barwienie metodą Grama, obrazowanie w mikroskopii świetlnej, testy biochemiczne). Do identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Staphylococcus* użyto test API Staph (bioMérieux, France), do *Streptococcus* API 20 Strep (bioMérieux, France) i automatyczny miniAPI system (bioMérieux, France). Gram-ujemne pałeczki były identyfikowane za pomocą API 20E oraz API 20 NE (bioMérieux, France).

3.4.2. Ocena lekooporności szczepów klinicznych

Wyizolowane bakterie i ich oporność na antybiotyki została przeprowadzona za pomocą metody z gradientem antybiotyku z użyciem pasków Liofilchem® MIC Test Strips (Liofilchem, Italy). Oceniono minimalne stężenie hamujące dla antybiotyków zgodnie z wytycznymi Europejskiego Komitetu ds. Przeciwdrobnoustrojowych, wytyczne dotyczące badania wrażliwości (EUCAST, wersja 10.0, 2020). Izolaty wielolekooporne zostały zakwalifikowane do odpowiedniej kategorii oporności na antybiotyki:

- MDR (ang. *multidrug-resistance*) – wielolekooporność

Drobnoustrój wykazuje niewrażliwość na co najmniej jeden antybiotyk z trzech lub więcej grup leków przeciwbakteryjnych.

- XDR (ang. *extensively drug resistance*) – rozszerzona oporność.

Drobnoustrój wykazuje niewrażliwość na co najmniej jeden antybiotyk ze wszystkich z wyjątkiem dwóch lub mniej grup antybiotyków.

- PDR (ang. *pandrug-resistance*) – całkowita oporność

Drobnoustrój wykazuje niewrażliwość na wszystkie dostępne, mające rejestrację antybiotyki, we wszystkich grupach stosowanych wobec danego gatunku drobnoustroju³⁷.

3.4.3. Ocena cytotoksyczności gentamycyny i sfunkcjonalizowanej powierzchni poli(chlorku winylu)

Do badania cytotoksyczności gentamycyny wykorzystano linię komórkową gruczolakoraka ludzkich komórek nabłonka podstawnego pęcherzyków płucnych (ang. adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells) A549 ATCC CCL185 przygotowaną jak w punkcie 3.2.4.

Badanie cytotoksyczności gentamycyny prowadzono w płytkach 96-dołkowych z przesianymi hodowlami komórkowymi. Do hodowli komórkowych do-dano 200 µl roztworu z gentamycyną w stężeniu 0-10 mg. Do oznaczenia aktywności metabolicznej komórek wykorzystano test MTT. Wyniki odczytywano na czytniku mikropłytkowym (Infinite M Nano, Tecan) przy długości fali 563 nm po upływie 1 i 24 godzin inkubacji.

Ocenę cytotoksyczności na krążkach PVC przed i po funkcjonalizacji wykonano w płytkach 24-dołkowych, które inkubowano z przesianą linią komórkową przez 24 godziny. Następnie zastosowano podwójne barwienie na badanych powierzchniach wykorzystując zestaw LIVE/DEAD® jak w punkcie 3.2.5.

3.4.4. Ocena wzrostu biofilmu bakteryjnego na sfunkcjonalizowanej powierzchni poli(chlorku winylu)

Ze szczepów wzorcowych bakterii *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™) oraz *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) po 18-godzinnej inkubacji otrzymywano zawiesiny o stężeniu 0,5 McF w Tryptic Soy Broth (TSB). Krążki z poli(chlorku winylu) po funkcjonalizacji i kontrolne umieszczono w polistyrenowych, sterylnych 24-dółkowych płytkach mikrotitracyjnych (Costar® Corning) i dodano po 1 ml inokulum bakteryjnego. Płytki inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C, następnie 3-krotnie przepłukano buforem PBS. W celu oderwania bakterii z powierzchni materiału za pomocą silnego strumienia buforu PBS odrywano przytwierdzone kolonie bakteryjne do biomateriału. Otrzymaną zawiesinę bakteryjną wysiewano po 100 µl na podłoże wzrostowe tryptozowo-sojowe TSA (ang. Tryptic Soy Agar, Becton Dickinson) w seryjnych dziesięciokrotnych rozcieńczeniach. Po 24 godzinnej inkubacji w 37°C odczytywano wynik i przeliczano go w jtk/ml (CFU/ml).

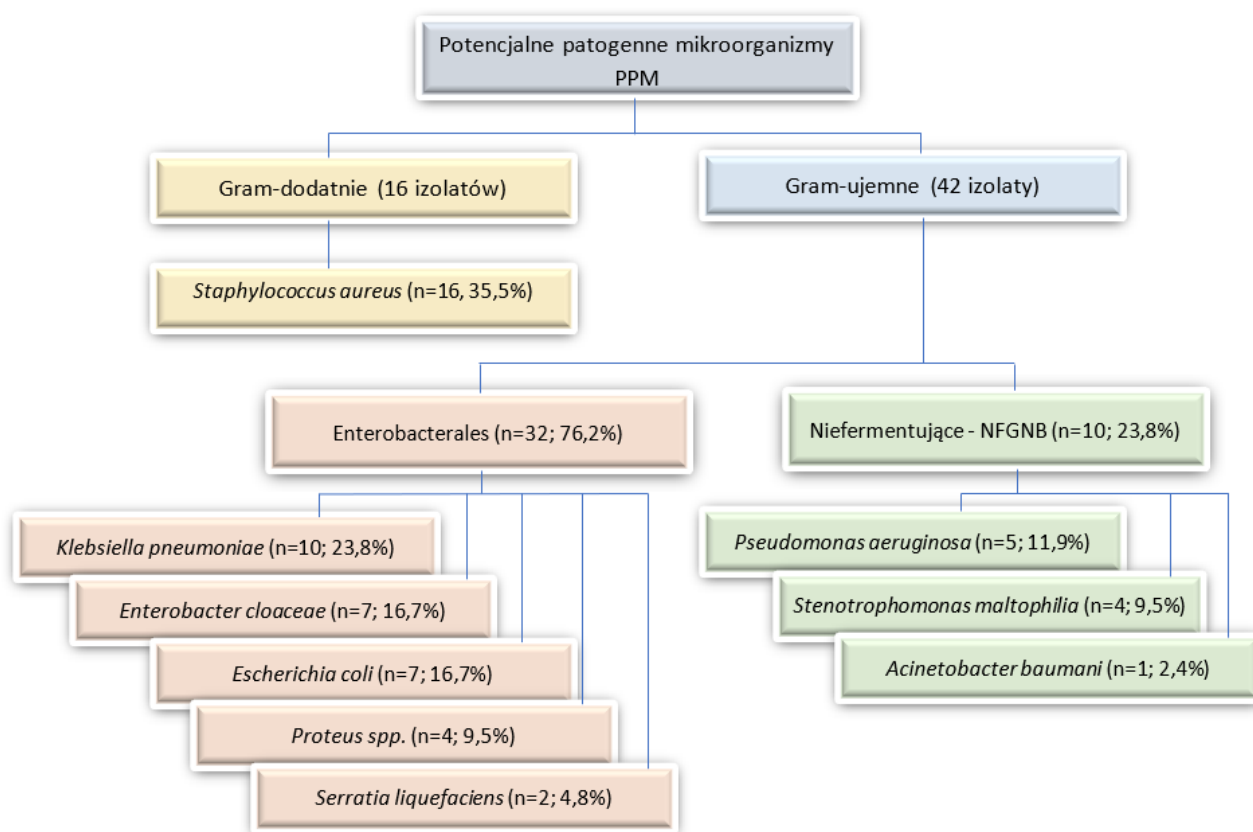
4. Wyniki wraz z ich omówieniem

4.1. Wyniki analizy materiału zebranego od pacjentów

4.1.1. Wyniki mikrobiologiczne

Wszystkie rurki tracheostomijne uzyskane od pacjentów były dodatnie w posiewach. Łącznie wyizolowano i zidentyfikowano 58 izolatów (10 gatunków). Na 37 rurek tracheostomijnych zidentyfikowano 2 i więcej mikroorganizmów. Szczegółowe dane co do zidentyfikowanych gatunków zawarte są w tabeli 2 publikacji I cyklu doktorskiego.

W niniejszej pracy do dalszej analizy włączono bakterie z grupy PPM (ang. *Potentialy pathogenic microorganisms*) natomiast wyłączono bakterie powszechnie uznane za mikrobiotę fizjologiczną. Wśród Gram-dodatnich PPM badaniom poddano 16 izolatów z gatunku *Staphylococcus aureus* (zidentyfikowane u 35,5% pacjentów). W przypadku Gram-ujemnych PPM wyizolowano łącznie 9 różnych gatunków (42 izolaty), przy czym aż 76,2% (32 izolaty) zidentyfikowanych bakterii to przedstawiciele z rzędu Enterobacterales (rodzina Enterobacteriaceae), a następnie niefermentujące Gram-ujemne bakterie (ang. *Non-fermenting Gram-negative bacteria* - NFGNB), w tym *Pseudomonas aeruginosa* (n=5, zidentyfikowane w 11,9%), *Stenotrophomonas maltophilia* (n=4, u 9,5% pacjentów) i *Acinetobacter baumani* (n=1, u 2,4%), które stanowiły pozostałe 23,8% badanych izolatów (Ryc. 12). Wśród Enterobacterales, *Klebsiella pneumoniae* była najczęściej wykrywaną bakterią (n=10, zidentyfikowana w 23,8% pacjentów), a następnie *Enterobacter cloacae* (n=7, u 16,7% pacjentów); *Escherichia coli* (n=7, u 16,7% pacjentów), *Proteus spp.* (n=4, u 9,5% pacjentów); *Serratia marcescens* (n=2, u 4,8% pacjentów) i *Serratia liquefaciens* (n=2, u 4,8% pacjentów).



Ryc. 12. Wyizolowane potencjalnie patogenne bakterie (PPM) z badanych rurek tracheostomijnych.

Większość dostępnych badań nad biofilmem pochodzącym z rurek tracheostomijnych i blisko z nimi związanych rurek intubacyjnych skupia się na biofilmotwórczym i chorobotwórczym wpływem bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Gatunek ten zgodnie z literaturą odpowiedzialny jest za większość infekcji związanych z biofilmem na powierzchni tych urządzeń, przy czym szczególną uwagę zwraca się na zapalenia płuc związane z respiratoroterapią (ang. *ventilator-associated pneumonia* - VAP)^{38,39,40}. Równoległe badania skupiały się na innych gatunkach bakterii izolowanych z rurek tracheostomijnych, a w szczególności *Klebsiella pneumoniae*⁴¹ oraz *Staphylococcus aureus*⁴².

Dominację flory bakteryjnej Gram-ujemnej raportują w swoich badaniach Patil⁴³ czy Khatun⁴⁴. Należy jednak podkreślić, że w ich przypadku byli to pacjenci oddziałów intensywnej terapii na wentylacji mechanicznej, co może mieć wpływ na rodzaj bakterii kolonizujących drogi oddechowe pacjenta. Warto również przytoczyć przegląd literaturowy dotyczący tracheostomii u dzieci autorstwa Barros⁴⁵ do którego włączono 19 publikacji (publikacje z lat 2009-2018 z 13 krajów, łącznie 4472 dzieci). Autor

podkreśla dominującą rolę *Pseudomonas aeruginosa*, a kolejne miejsca zajmują: *Staphylococcus aureus* (63,1%), *Klebsiella pneumoniae* (57,8%), *Streptococcus pneumoniae* (47,3%) i *Stenotrophomonas maltophilia* (47,3%). Przegląd jest o tyle istotny, że poza pacjentami przebywającymi na oddziale intensywnej terapii pediatrycznej, włączone zostały dzieci użytkujące tracheostomię przez dłuższy czas. Tłumaczyłoby to wysoki odsetek bakterii *Staphylococcus aureus*, które fizjologicznie kolonizują naszą skórę i mogą być obecne na wygojonych tkankach tracheostomijnych.

W naszym materiale klinicznym wśród zidentyfikowanych gatunków bakterii 50% okazało się bakteriami wielolekoopornymi – z czego fenotyp XDR stanowiło 5 izolatów (8.6%), a PDR 3 izolaty (5.2%). W badaniach Singhai et al.⁴⁶ oznaczył duży odsetek wielolekoopornych Gram-ujemnych drobnoustrojów (93.8%) oraz izolatów *Staphylococcus aureus* (60%). Nasze badania nie wykazały żadnego szczepu *S. aureus* o fenotypie MDR, a z bakterii Gram-ujemnych *Klebsiella pneumoniae* mechanizm oporności ESβL wykazywało tylko 4.9% izolatów. Te różnice mogą wynikać z takich czynników jak zmienność w mikrobiocie populacji zamieszkującej określony obszar czy szczepów szpitalnych występujących w danym ośrodku. Te zmienne najlepiej prezentują się w raporcie Najwyższej Izby Kontroli dotyczącej zakażeń w podmiotach leczniczych w latach 2015-2017 (I półrocze). Liczba pacjentów hospitalizowanych z powodu infekcji *Klebsiella pneumoniae* NDM (+) w województwie mazowieckim wynosiła 2757, a w województwie małopolskim 7⁴⁷.

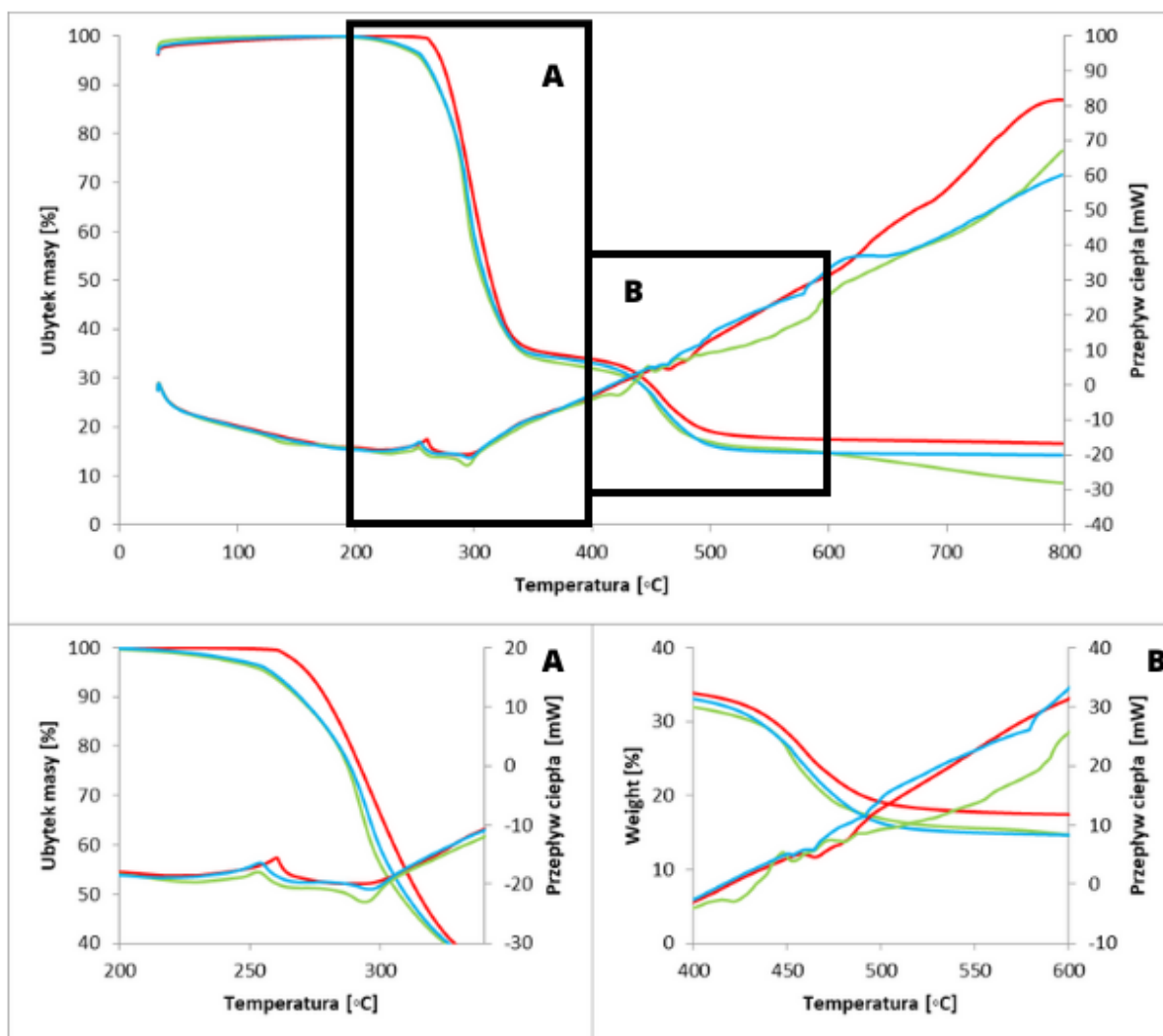
4.1.2. Analiza objętościowa polimeru

Metoda termogravimetryczna (TGA) stanowi jedną ze standardowych metod do analizy i charakterystyki właściwości objętościowych polimerów. Zmiana masy próbki jest monitorowana jako funkcja temperatury lub czasu podczas kontrolowanego podgrzewania próbki w określonej atmosferze⁴⁸.

Do analizy objętościowej użyto rurki tracheostomijne po 28 dniach użytkowania. Jako próbę referencyjną użyto materiał sterylny, fabrycznie nowy. Próbki o masie 10 +/- 1 mg użyte do badania zostały pobrane z części dystalnej i mezjalnej rurki tracheostomijnej (Ryc. 13). W wyniku analizy otrzymano krzywe termogravimetryczne zmiany masy oraz przepływu ciepła. Na wykresach kolorem czerwonym zaznaczona

jest próbka referencyjna nowego, sterylne PVC. Widoczny jest charakterystyczny dwuetapowy rozpad polimeru PVC podczas ogrzewania. Pierwszy etap zachodzi w zakresie temperatur 265-340 °C i związany jest z endotermicznym procesem uwalniania atomów chloru (dehydrochlorynacja) oraz tworzeniem się wiązań podwójnych pomiędzy atomami węgla. Drugi etap rozpoczyna się w zakresie temperatur 340-550 °C i związany jest z dalszą degradacją polimeru, jego pyrolizą oraz uwalnianiem się cząsteczek węglowodorowych, głównie o krótkich łańcuchach węglowych. Pozostałość po procesie pyrolizy stanowi polienowa struktura z układami cis i trans. Cały proces rozpadu łańcucha polimerowego PVC został szczegółowo opisany przez Zhu et al.⁴⁹

W rurkach użytkowanych w odniesieniu do referencji widoczne jest przesunięcie krzywych niebieskiej (odcinek mezjalny) i zielonej (odcinek dystalny) w lewo, a więc temperatura początku ubytku masy dla próbek była niższa w odniesieniu do próbki referencyjnej. Ponadto masa pozostałości po pirolizie z użytkowanych rurek jest nieco niższa niż w przypadku próbki referencyjnej. Świadczy to o tym, że pyroliza użytkowanych rurek tracheostomijnych zaczyna się w niższej temperaturze i zachodzi w większym stopniu w odniesieniu do referencji. Porównując odcinek mezjalny (krzywa niebieska) z odcinkiem dystalnym (krzywa zielona) można zauważyć, że część rurki, która znajduje się głębiej w tkankach pacjenta rozpoczyna I i II etap degradacji polimeru o 5-10 stopni szybciej w odniesieniu do części znajdującej się przy otworze tracheostomijnym. Świadczy to o tym, że procesy biologiczne i uszkodzenia polimeru w części dystalnej są większe w odniesieniu do części mezjalnej.



Ryc. 13. Krzywe termogravimetryczne dla PVC pozyskanego od pacjentów w odniesieniu do próby referencyjnej. A – I etap degradacji PVC, B- II etap degradacji PVC. Krzywa czerwona – PVC, krzywa niebieska – część mezialna po 28 dniach użytkowania, krzywa zielona – część dystalna po 28 dniach użytkowania.

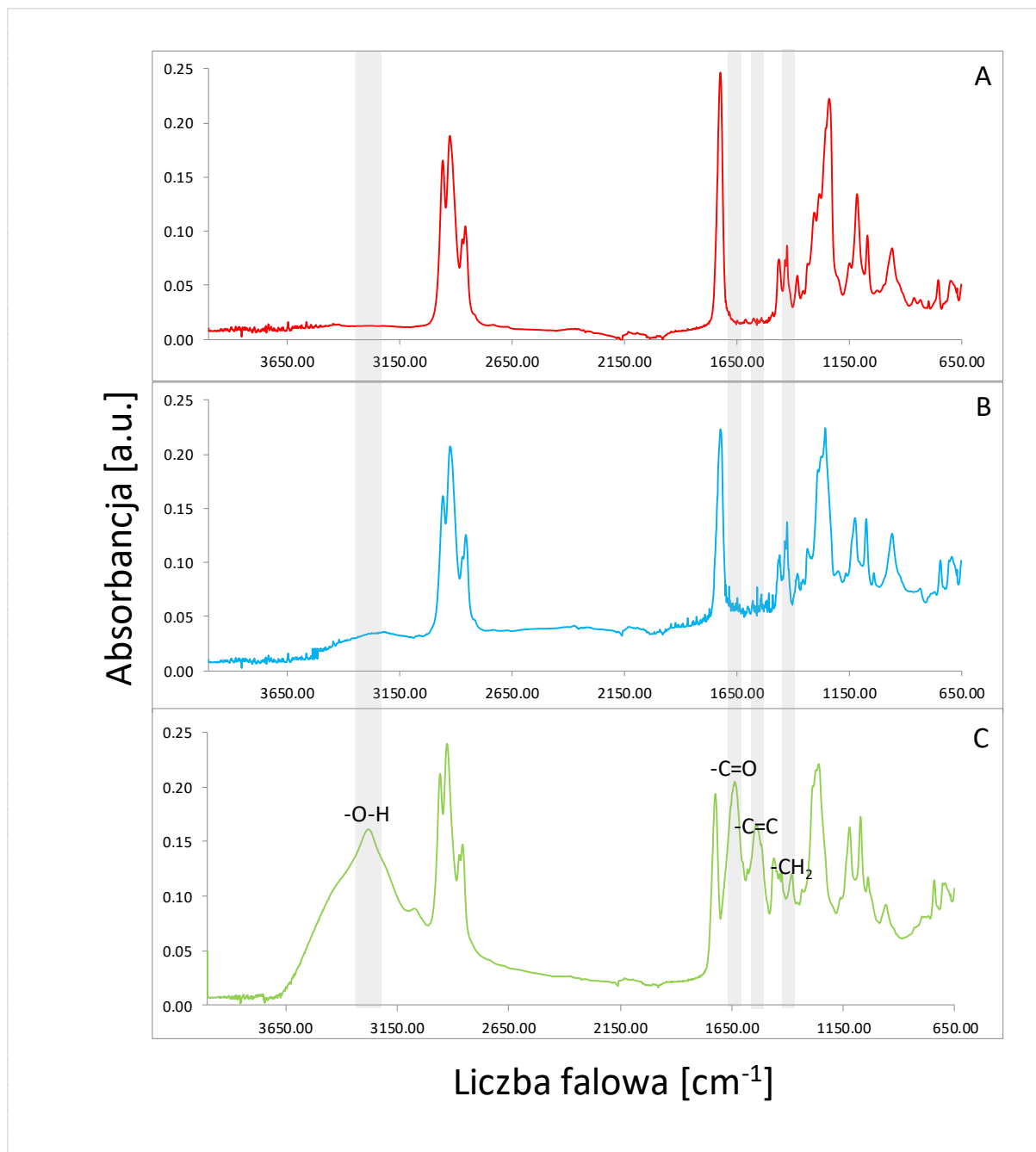
4.1.3. Analiza powierzchni polimeru

Powierzchnia PVC podczas użytkowania przez pacjenta wystawiona jest na działanie szeregu procesów biologicznych. Jednym z nich jest produkcja zewnątrzkomórkowych enzymów bakteryjnych, które adsorbując się na powierzchni polimeru rozpoczynają proces hydrolizy do krótkich polimerowych związków pośrednich (oligomerów i monomerów), które to z kolei przyswajane są przez drobnoustroje jako źródło węgla w celu uwolnienia CO_2 i H_2O . Obecnie znamy ponad 90 mikroorganizmów wykorzystujących ten proces do degradacji polimerów

syntetycznych w tym często izolowane z powierzchni rurek tracheostomijnych bakterie z gatunku *Pseudomonas* spp⁵⁰.

Kolejnym procesem mającym wpływ na degradację powierzchni polimeru jest utlenianie. Zachodzi ono na skutek reakcji z rodnikami tlenowymi na skutek ekspozycji polimeru na powietrze atmosferyczne. W degradacji oksydacyjnej makrocząsteczki są najczęściej rozszczepiane w procesach rozszczepienia β na fragmenty z końcowymi grupami aldehydowymi, ketonowymi i winylowymi. Do zobrazowania tego procesu stosuje się technikę spektroskopii w podczerwieni i poszukuje charakterystycznych grup karbonylowych (widma w zakresie około 1700 cm^{-1})⁵¹.

Do badań włączono próbki pobrane z odcinka dystalnego i mezjalnego rurki tracheostomijnej użytkowanej przez 28 dni. Jako próbkę referencyjną użyto fabrycznie nowy sterylny fragment PVC. Rycina 14 prezentuje zapis widm otrzymanych po analizie. W odniesieniu do próby referencyjnej największe zmiany na powierzchni PVC zaszły na odcinku dystalnym. Fakt ten tłumaczy głębsze położenie rurki w tkankach pacjenta i większe narażenie na procesy degradacyjne. Zaobserwowano charakterystyczne grupy hydroksylowe (w zakresie widma $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$), karbonylowe (1630 cm^{-1}), podwójne wiązania między atomami węgla (1535 cm^{-1}) oraz zmniejszenie absorbancji dla wiązań węgiel-wodór (1424 cm^{-1}). Powstawanie dodatkowych grup funkcyjnych oraz wiązań, które nie występują na nowym PVC świadczą jednoznacznie o zmianach w strukturze całego polimeru i są dowodem na jego degradację. W badaniach nad biofilmem *P. aeruginosa* Solero et al⁵² zaznacza, że powstawanie takich wiązań jest związane m.in. z aktywnością enzymatyczną bakterii na biomolekułach. Fakt ten szerzej opisuje Wilkes, zwracając szczególną uwagę na wpływ produkowanych przez bakterie enzymów na proces biodegradacji polimerów syntetycznych⁵³.

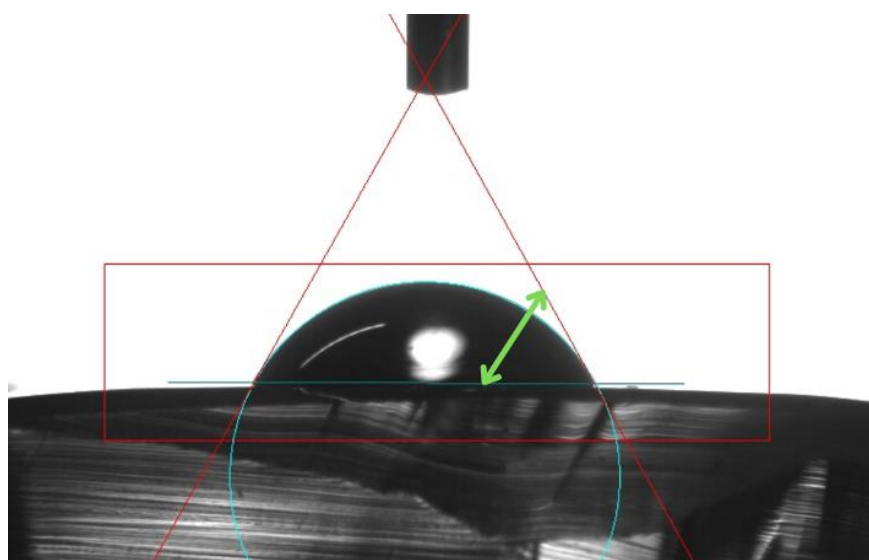


Ryc. 14. Widma FTIR dla próbki kontrolnej z PVC (A); dla rurek tracheostomijnych z PVC użytkowanych przez 28 dni – odcinek mezjalny (B); dla rurek tracheostomijnych z PVC użytkowanych przez 28 dni – odcinek dystalny (C). Szare kolumny wyznaczają zmiany widma na skutek użytkowania rurki tracheostomijnej i charakterystyczne dla nich wiązania.

4.2. Funkcjonalizacja powierzchni

4.2.1. Modyfikacja plazmą tlenową i określenie hydrofilowości powierzchni

Poza składem chemicznym czy strukturą powierzchni wpływ na kolonizację bakteryjną ma również zjawisko zwilżalności. Atomy znajdujące się na powierzchni rurki tracheostomijnej podlegają innemu układowi sił niż atomy znajdujące się wewnątrz polimeru. Atomy na powierzchni rurki są przyciągane przez atomy leżące w głębszych warstwach polimeru oraz przez atomy z fazy sąsiadującej. Znajdują się one w asymetrycznym polu sił. Bilans równowagi sił wynika z równania Younga, dzięki któremu możemy wyznaczyć równowagowy kąt zwilżania. Gdy kąt wynosi 0 stopni mówimy o zwilżalności zupełnej. Kąt 90 stopni oznacza równowagę sił. Wartości poniżej 90 stopni mówią o dobrej zwilżalności, a powyżej o złym zwilżaniu⁵⁴. Należy podkreślić, że w przyrodzie nie istnieje przypadek całkowitego braku zwilżalności. Zatem powierzchnia hydrofobowa to taka, która jest słabo zwilżalna przez wodę w odróżnieniu od powierzchni hydrofilowej. Metodą zastosowaną do wyznaczenia kąta zwilżania w niniejszej pracy jest metoda siedzącej kropli. Kąt ten wyznaczany jest za pomocą goniometru, rejestrowany przez system optyczny, powiększany i przenoszony do komputera, gdzie podlega analizie. Przykładowy obraz pokazuje rycina 15.

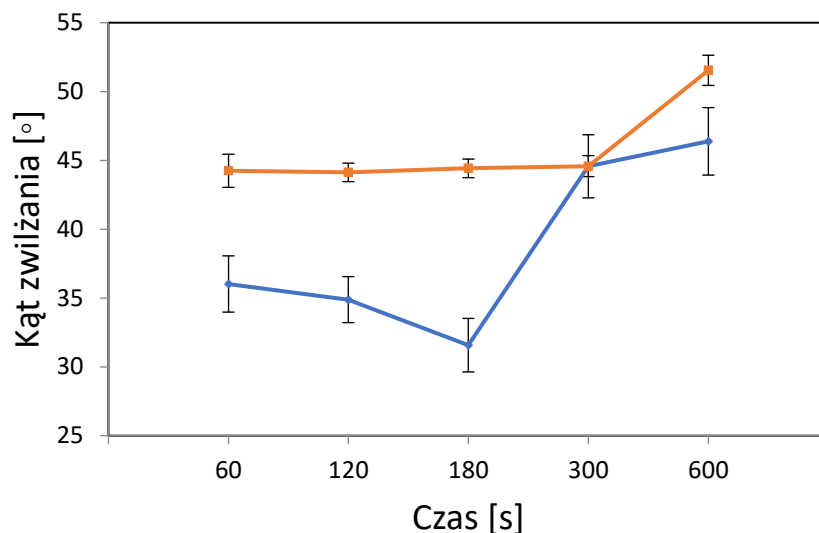


Ryc. 15. Wyznaczanie kąta zwilżania powierzchni. Zieloną strzałką zaznaczono wyznaczany kąt.

PVC przed modyfikacją posiada kąt zwilżania 86 ± 2 stopnia. Zwilżalność stanowi jeden z kluczowych czynników mających wpływ na adhezję bakterii. Krasowska⁵⁵ wyciąga ogólny wniosek, że bakterie o hydrofobowych powierzchniach komórek preferują powierzchnie materiałów hydrofobowych, podczas gdy te o hydrofilowych powierzchniach komórek preferują powierzchnie materiałów hydrofilowych. Wassmann⁵⁶ w badaniach nad implantami dentystycznymi, również podkreśla, że głównym czynnikiem mającym wpływ na adhezję bakteryjną jest nie szorstkość czy zwilżalność powierzchni, lecz gatunek bakterii zasiedlający jej powierzchnię. W publikacji Zhang et al.⁵⁷ podkreśla, że dla powierzchni PVC hamowanie adhezji i proliferacji komórek jest skuteczniejsze na powierzchni hydrofilowej niż hydrofobowej. Optymalny kąt zwilżania dla biomateriałów wykorzystywanych w medycynie powinien wynosić mniej niż 65 stopni⁵⁸. Istotne zatem jest osiągnięcie kąta zwilżania poniżej tej krytycznej wartości, aby opóźnić proces adhezji bakterii.

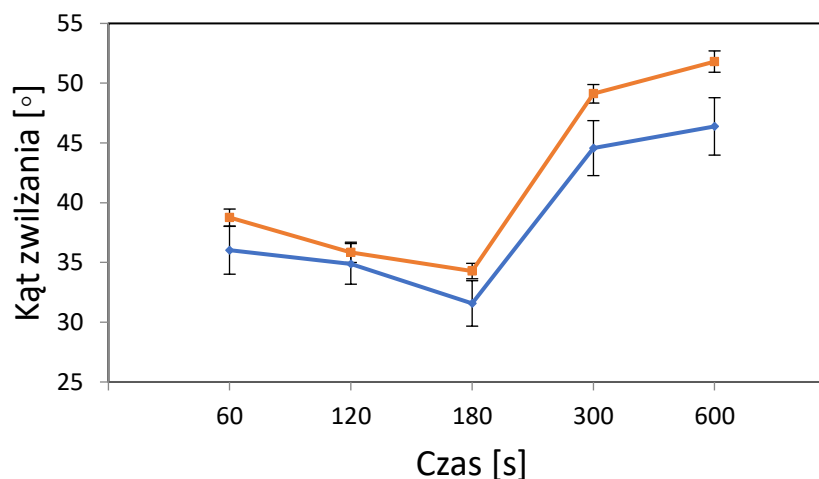
Zmiany wywołane działaniem plazmy tlenowej na powierzchni poli(chlorku winylu) obserwowano śledząc kąt zwilżania. Parametry plazmy takie jak: ciśnienie parcjale tlenu, moc generatora i czas modyfikacji optymalizowano, aby otrzymać jak najbardziej hydrofilową powierzchnię.

Rycina 16 przedstawia zmianę kąta zwilżania PVC przy zwiększaniu ciśnienia parcjale tlenu w komorze plazmy tlenowej. Porównując profile zmian kąta zwilżania jako funkcji czasu działania plazmy wykazano, że większą zwilżalność uzyskano dla niższych wartości ciśnienia parcjale tlenu.



Ryc. 16. Zmiana kąta zwilżania w zależności od użytego ciśnienia parcjalnego tlenu. Krzywa niebieska pokazuje wartości kąta uzyskane dla ciśnienia tlenu 0.2 mbar. Krzywa pomarańczowa odnosi się do wartości kąta zwilżania przy użyciu ciśnienia tlenu 0.5 mbar.

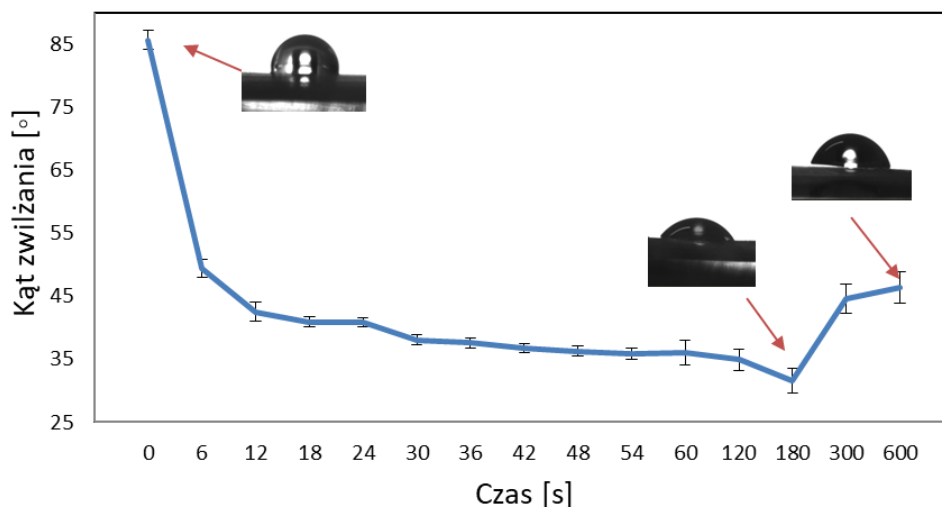
Kolejną analizie poddano zmianę mocy generatora. Na rycinie 17 najniższy kąt zwilżania uzyskano po 180 sekundach i mocy urządzenia 50 W. Efekt zmiany mocy generatora ma jednak mniejsze znaczenie niż ciśnienie parcjalne tlenu w komorze.



Ryc. 17. Zmiana kąta zwilżania w zależności od użytej mocy generatora. Krzywa niebieska pokazuje wartości kąta uzyskane dla mocy 50 W. Krzywa pomarańczowa odnosi się do wartości kąta zwilżania przy użyciu mocy 100 W.

Ostatnim parametrem, jaki podlegał analizie był czas traktowania plazmą tlenową. Jako warunki niezmiennie użyto wcześniej wyznaczonego ciśnienia oraz mocy urządzenia. Czas funkcjonalizacji mieścił się w zakresie 6-600 sekund. Najniższy kąt zwilżania uzyskano po 180 sekundach. Przedłużony czas ekspozycji >180 sekund

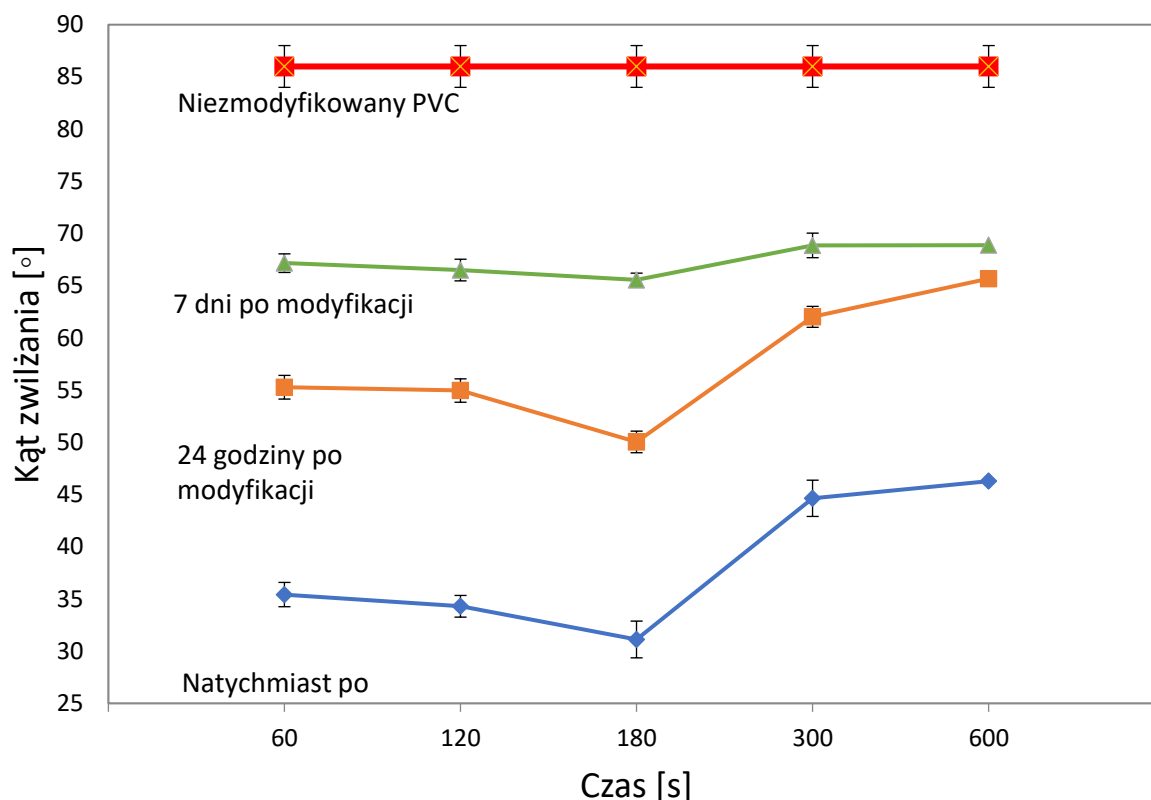
powodował wzrost kąta zwilżania. Należy zauważyć, że największy spadek kąta zwilżania następuje w pierwszych kilkudziesięciu sekundach (Rycina 18).



Ryc. 18. Zmiana kąta zwilżania dla wybranych parametrów (50 W, 0,2 mbar) w przedziale czasowym 0-600 s. Najmniejszy kąt zwilżania uzyskano po 180 sekundach działania plazmy tlenowej.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń ustalono, że optymalne parametry do modyfikacji powierzchni PVC plazmą tlenową to: 50 W oraz 0,2 mbar 180 sek. Najniższy kąt zwilżania przy wybranych parametrach wynosił 32 ± 2 stopnie. Podobne wyniki można znaleźć u innych autorów. Ghoranneviss uzyskał kąt zwilżania po traktowaniu plazmą tlenową w zakresie 27-35 stopni⁵⁹, a Bormashenko 30 ± 0.5 stopnia⁶⁰.

Pisząc o polimerach i plazmie tlenowej należy wspomnieć o zjawisku zwanym rekombinacją grup funkcyjnych na powierzchni polimeru, które stanowi jedno z ograniczeń stosowania techniki traktowania plazmą tlenową. Utrata hydrofilowości traktowanych plazmą powierzchni polimerowych nosi nazwę regeneracji hydrofobowej. Ten efekt związany jest głównie z dyfuzją do wewnątrz, rekombinacją i desorpcją wytworzonych grup funkcyjnych na powierzchni. Zachodzi reorientacja polimeru i kowalencyjne grupy polarne zostają „zakopane” pod zewnętrzną powierzchnią⁶¹. Trwałość modyfikacji plazmą i proces starzenia się polimeru przedstawiono na rycinie 19.



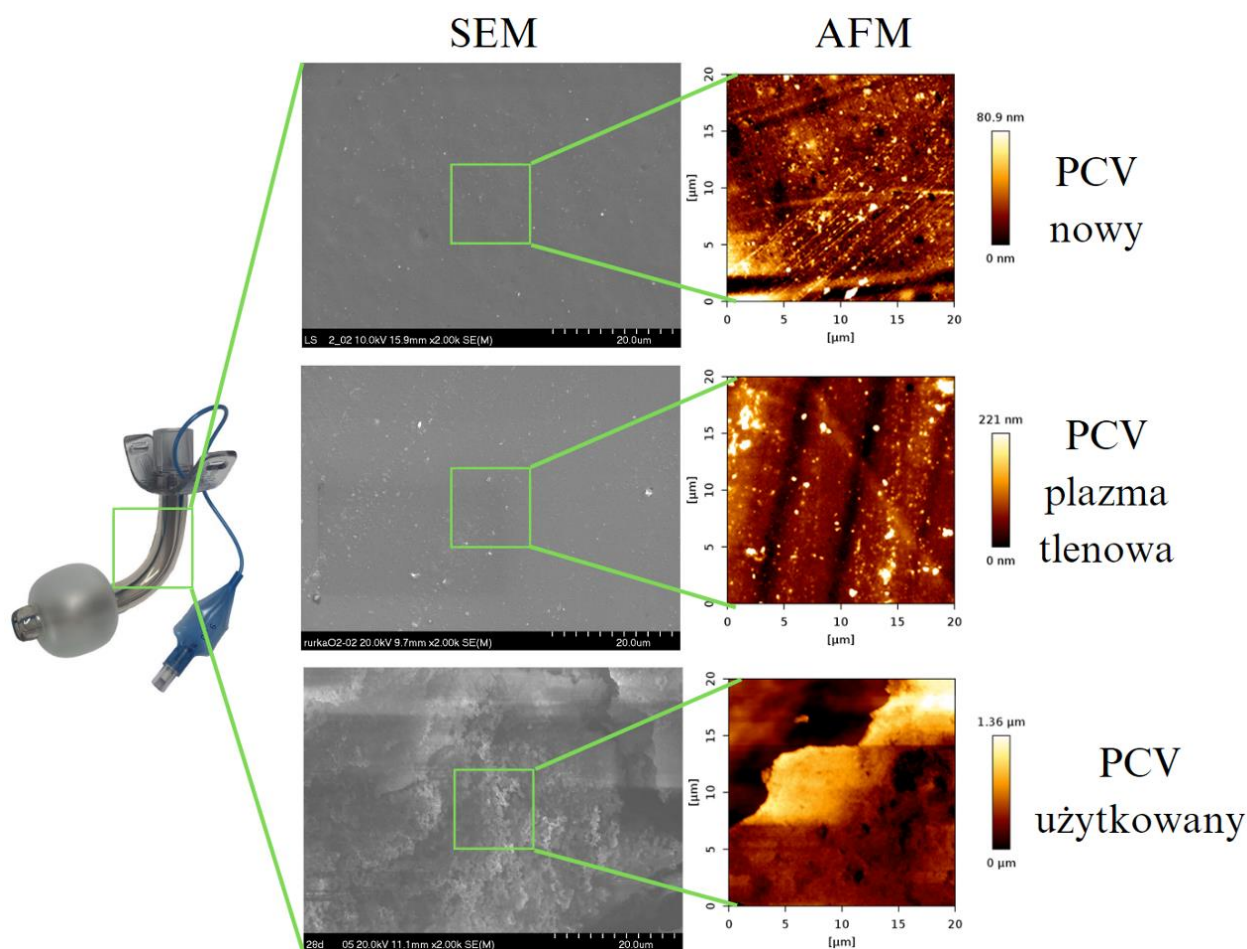
Ryc. 19. Zmiana kąta zwilżenia w czasie po modyfikacji w zależności od zastosowanych parametrów plazmy (50 W, 0,2 mbar). Legenda: krzywa niebieska - obrazuje pomiar natychmiast po funkcjonalizacji; krzywa pomarańczowa - obrazuje pomiar po 24 godzinach od funkcjonalizacji; krzywa zielona - odnosi się do pomiarów po 7 dniach od funkcjonalizacji. Czerwoną linią zaznaczono pomiar kąta zwilżenia dla niezmodyfikowanego PVC ($86 \pm 2^\circ$).

4.2.2. Obrazowanie powierzchni poli(chlorku winylu)

Do oceny morfologii powierzchni rurki tracheostomijnej wykorzystano nowy PVC, poddany traktowaniu plazmą tlenową oraz użytkowany 28 dni przez pacjenta (Ryc. 20).

Uzyskano obrazy dla typowych materiałów polimerowych z charakterystycznymi postprodukcyjnymi żłobieniami. Dla próbek przed i po procesie funkcjonalizacji nie obserwuje się zmian w topografii powierzchni. Zmiana w kącie zwilżenia (pkt 4.2.1.) nie wynika zatem ze zmiany topograficznej, lecz z generowanych grup funkcyjnych poprzez łagodną obróbkę plazmą tlenową. Taki efekt był wcześniej opisywany dla innych materiałów polimerowych⁶².

Ciekawe obrazy zostały uzyskane dla próbek użytkowanych przez pacjenta. Na rycinie 18 widoczne są głębokie uszkodzenia polimeru zarówno w obrazowaniu SEM jak i AFM dla PVC użytkowanego. Potwierdza to zatem wcześniejsze wnioski uzyskane przy zastosowaniu metod TGA i FTIR – na skutek użytkowania rurek tracheostomijnych dochodzi do znacznych uszkodzeń łańcucha polimeru.



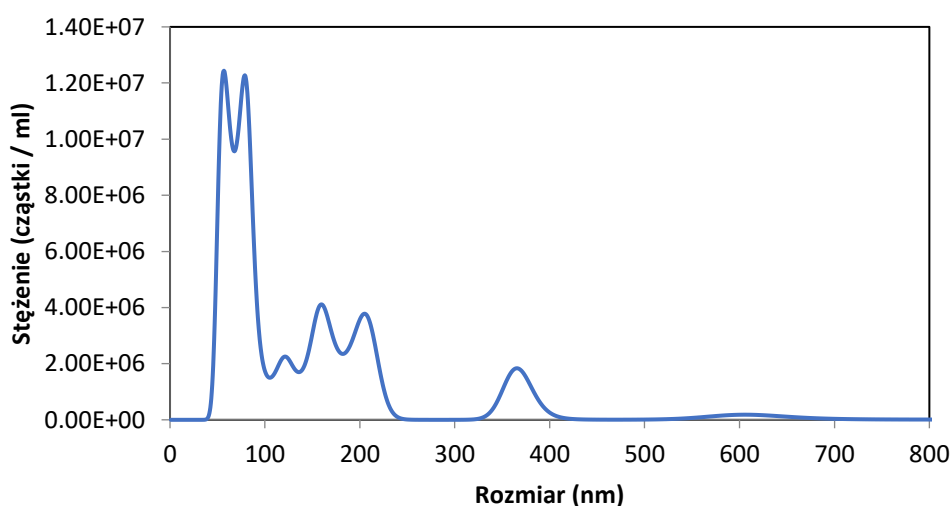
Ryc. 20. Porównanie obrazów z SEM i AFM dla nowego PVC, po traktowaniu plazmą tlenową oraz użytkowanego 28 dni przez pacjenta.

4.2.3. Synteza nanocząstek gentamycyny

W obliczu rosnącej oporności na antybiotyki pierwszego rzutu i wzrostu zakażeń powodowanych głównie przez organizmy odporne na wiele leków, naukowcy podejmują wysiłki w celu opracowania alternatywnych podejść terapeutycznych. Zastosowanie nanocząstek leku wydaje się realnym rozwiązaniem ze względu na charakterystyczne właściwości nanomateriałów. Lokalne uwalnianie cząsteczek antybiotyku z nanocząstek zakotwiczonych na powierzchni biomateriału może przełamać mechanizmy oporności bakterii, które są niewrażliwe na ich klasyczną formę podawania.⁶³

Jednoetapową syntezę nanocząstek gentamycyny i ich depozycję na powierzchni PVC przeprowadzono zgodnie ze znanymi schematami opracowanymi przez Grupę Chemii Powierzchni UJ i opisanych wcześniej⁶⁴.

Na rycinie 21 można wyróżnić kilka maksimum w przedziale 50-350 nm. Pierwsze przy 50 nm oraz 75 nm, są ostre i wysokie, a pozostałe maksima są szersze i niższe. Tłumaczy to fakt zdolności nanocząstek do aglomeracji.

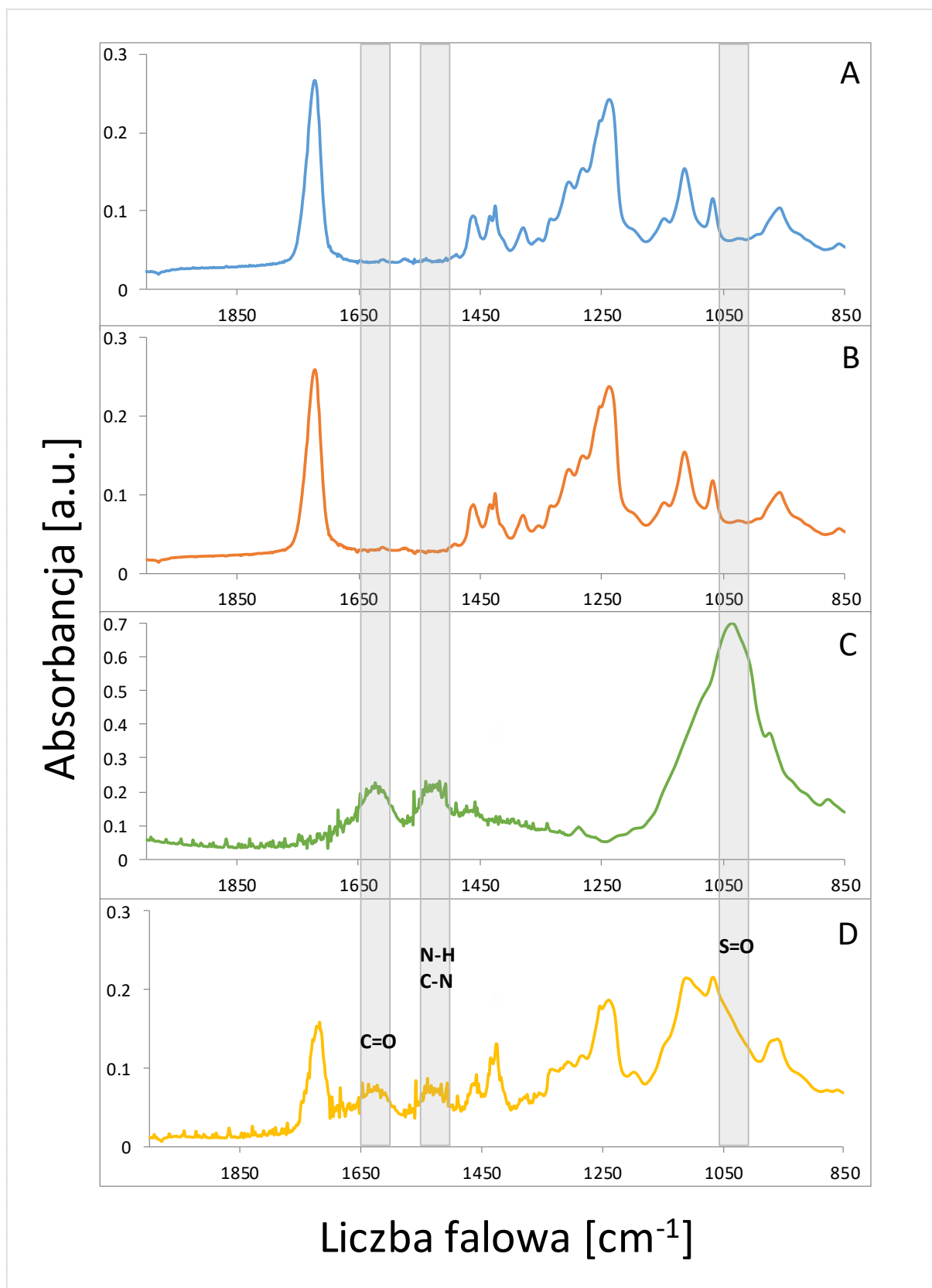


Ryc. 21. Obrazowanie NTA - rozkład wielkości nanocząstek gentamycyny otrzymanych przy zastosowaniu metody sonochemicznej.

4.2.4. Analiza spektroskopowa sfunkcjonalizowanej powierzchni poli(chlorku winylu)

Otrzymane powierzchnie poddano analizie spektroskopowej w podczerwieni z transformacją Fouriera w celu poszukiwania wiązań charakterystycznych dla gentamycyny.

Analiza widm wykazała brak wpływu plazmy tlenowej na strukturę PVC (Ryc. 22). Widmo wykazuje typowe pasma absorpcyjne przy 1616, 1558 i 1456 cm^{-1} należące do wiązań amidowych I, amidowych II i amidowych gentamycyny. Pik położony przy 1075 cm^{-1} jest związany z grupą HSO_4^{-1} . Badanie potwierdziło obecność gentamycyny na powierzchni PVC. Przypisanie grup funkcyjnych do poszczególnych pasm absorpcyjnych zrobiono na podstawie charakterystycznych wartości dostępnych w literaturze^{65,66}.

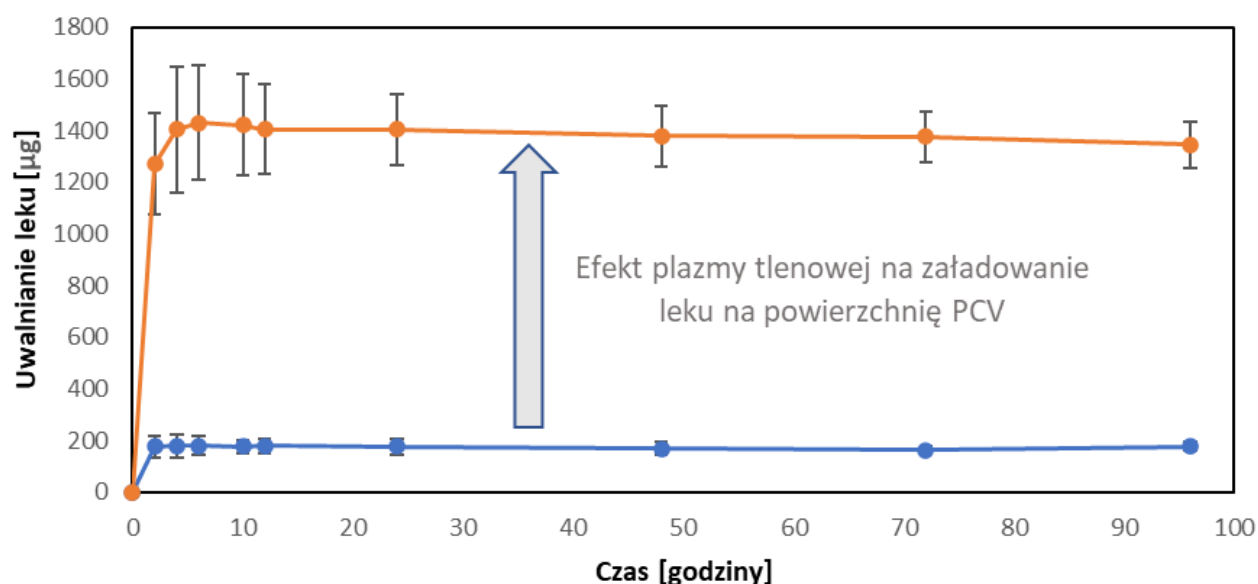


Ryc. 22. Widma FTIR dla PVC (A), PVC modyfikowanego plazmą tlenową (B), siarczanu gentamycyny (C) oraz PVC po sonochemicznym wbudowaniu nanocząstek gentamycyny (D). Szare kolumny wyznaczają charakterystyczne regiony dla siarczanu gentamycyny.

4.2.5. Ocena obecności gentamycyny na powierzchni PVC

Wpływ na kinetykę uwalniania ma wiele czynników m.in. obecność matrycy w jakiej są zawieszone nanocząstki, ich geometria, sposób otrzymywania i miejsce uwalniania, rozpuszczalność, dawka, masa cząsteczkowa⁶⁷. Idealny system dostarczania leku i jego uwalnianie powinno zachodzić w tempie dostosowanym do potrzeb pacjenta podczas całego procesu leczenia. Dzięki temu można osiągnąć większą skuteczność terapeutyczną⁶⁸. Najczęściej projektowane systemy dla gentamycyny polegają na jej zawieszeniu w polimerze biodegradowalnym. Przykładem może być dostarczanie gentamycyny na nanocząstkach polidopaminy (PDA)⁶⁹ czy kwasie polimlekowym (PLA)^{70,71}.

W niniejszej pracy postanowiono sprawdzić obecność wbudowanej gentamycyny na powierzchni PVC przy użyciu testu OPA (o-ftaldehyd). Zastosowanie tego testu polega na oznaczeniu wolnych grup aminowych w obecności składnika tiolowego. Wyniki przedstawiono na rycinie 23.



Ryc. 23. Profile uwalniania nanocząstek gentamycyny z powierzchni PVC.

Profile uwalniania pokazują ośmiokrotny wzrost ilości gentamycyny dla próbki z powierzchniowymi grupami tlenu (krzywa pomarańczowa) w stosunku do próbki nietraktowanej plazmą tlenową (krzywa niebieska). Można zatem wnioskować, że wygenerowane grupy powierzchniowe prowadzą do powstania miejsc adsorpcji dla efektywnego niekwalencyjnego wiązania cząsteczek gentamycyny z powierzchnią PVC. Tak spektakularny efekt zwiększenia ilości leku na PVC ma istotne znaczenie praktyczne. ~1,5 mg gentamycyny na polimerowej powierzchni biomateriału ~2 cm² mieści się w terapeutycznym oknie uwalniania miejscowego i stanowi podobną ilość, jaką można znaleźć na innych produktach medycznych, np. gąbki nasączone gentamycyną, gąbka Garamycin (EUSA Pharma, Polska)⁷².

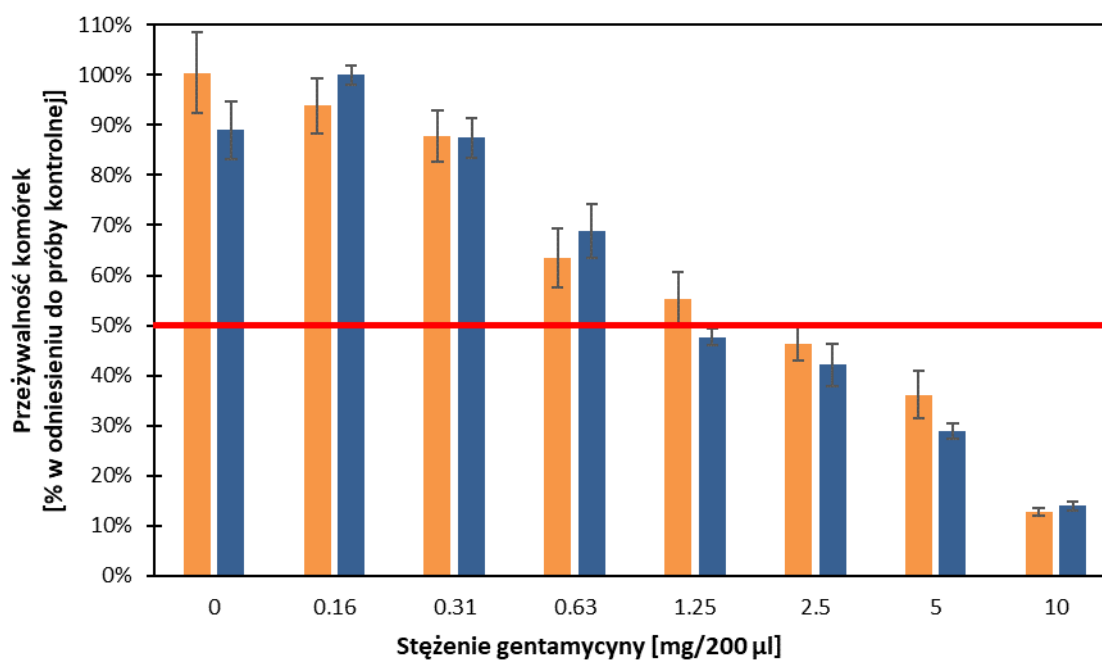
4.3. Analiza biogodności i efektu terapeutycznego

4.3.1. Cytotoksyczność nanocząstek

Nanocząstki po kontakcie z tkankami organizmu pacjenta mogą wchodzić w silne interakcje z białkami, błonami komórkowymi czy DNA komórkowym i mogą być przyczyną niekorzystnych bioprocessów takich jak: pęknięcie błony komórkowej, stres oksydacyjny, apoptoza, indukcja procesu zapalnego, autofagia. Niekorzystny wpływ nanocząstek na organizm człowieka jest odpowiedzialny za zjawisko cytotoksyczności indukowanej nanocząstkami^{73,74}. Interakcja pomiędzy nanocząstkami a organizmem człowieka jest determinowana przez chemię powierzchni. Zmiana powierzchni może regulować właściwości fizykochemiczne nanocząstek i ostatecznie wpływać na ich różne działania. Przykładem może być wprowadzenie hydrofobowych ligandów co powoduje zwiększenie wychwytu nanocząstek przez komórki⁷⁵. W publikacji Sun et al. zauważono, że w przypadku nanocząstek o różnych rozmiarach i kształtach zachodzące procesy biologiczne są czasami niespójne i mogą się różnić w zależności od badanej linii komórkowej⁷⁶. Zatem mechanizm interakcji nanocząstek z tkankami człowieka jest procesem skomplikowanym począwszy od wpływu na wiązanie białek, przez szlaki komórkowe i interakcję z komórkowym DNA.

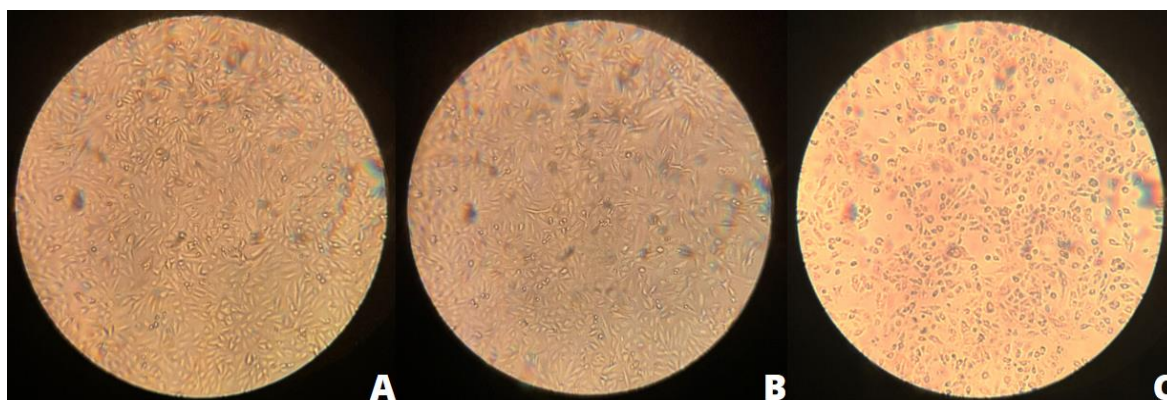
Do oceny cytotoksyczności nanocząstek gentamycyny wykorzystano linię komórkową A549, wykorzystywaną m.in. do badań nad patogennością *Pseudomonas aeruginosa*⁷⁷, *Staphylococcus aureus*⁷⁸ czy *Escherichia coli*⁷⁹. Te gatunki bakterii w niniejszej pracy były identyfikowane u pacjentów z tracheostomią. Dodatkowo linia komórkowa A549 pochodzi z gruczolakoraka płuc, a więc z tkanki sąsiedniej do tkanek tchawicy.

Aby zbadać efekt wpływu nanocząstek gentamycyny na linię komórkową A549 i ich przeżywalność wykonano test kolorymetryczny MTT celem wyznaczenia połowy maksymalnego stężenia hamującego po ekspozycji na gentamycynę. IC-50 oceniono w 2 interwałach czasowych (1 i 24-godzinnym) ustalając jego wartość na poziomie 1,25 mg/200 μ l (6,25 mg/1 ml). Największy spadek żywych komórek zaobserwowano po przekroczeniu stężenia 0,31/200 μ l (1,55 mg/1 ml) z 95% do 60% przy stężeniu 0,63 mg/200 μ l (3,15 mg/1 ml). Nie zaobserwowano zwiększonej cytotoksyczności wraz z upływem czasu ekspozycji na antybiotyki (Ryc. 24).



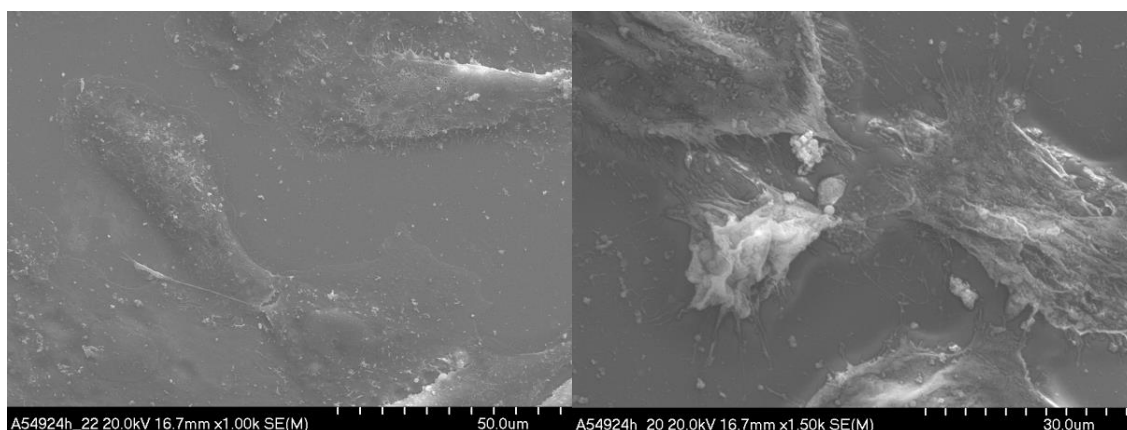
Ryc. 24. Ocena cytotoksyczności (w odniesieniu do kontroli) różnych stężeń gentamycyny wobec linii komórkowej A549 po 1 godzinie (kolor pomarańczowy) i 24 godzinach (kolor niebieski) inkubacji przy użyciu testu kolorymetrycznego MTT. Wyniki odczytano przy użyciu czytnika TECAN przy długości fali 563 nm. Zahamowanie wzrostu badanej populacji komórek o 50% oznaczono poziomą linią w kolorze czerwonym.

Efekt cytotoksyczny nanocząstek gentamycyny na linii komórkowej A549 obserwowano pod mikroskopem optycznym oraz SEM. Obrazy spod mikroskopu optycznego przedstawia rycina 25.



Ryc. 25. Obrazy hodowli komórkowych z nanocząstkami gentamycyny spod mikroskopu optycznego. A – obraz po godzinnej inkubacji; B - obraz po 24-godzinnej inkubacji, C - efekt cytotoksyczny po godzinnej inkubacji w stężeniu gentamycyny 50 mg/ml.

W przypadku zastosowania obrazowania SEM konieczne jest, aby badana próbka była całkowicie sucha. W komorze mikroskopu panuje wysoka próżnia, która wyciągając wodę uszkadzałaby mechanicznie preparat. Dla żywych komórek i tkanek konieczne jest chemiczne utwienie i ustabilizowanie struktury. Przeprowadza się je przy użyciu aldehydu glutarowego i tetratlenku osmu. Tak przygotowana tkanka następnie podlega procesowi odwodnienia w szeregu alkoholowym i podlega suszeniu w tzw. punkcie krytycznym. Obrazowanie efektu cytotoksycznego przedstawia Rycina 26.

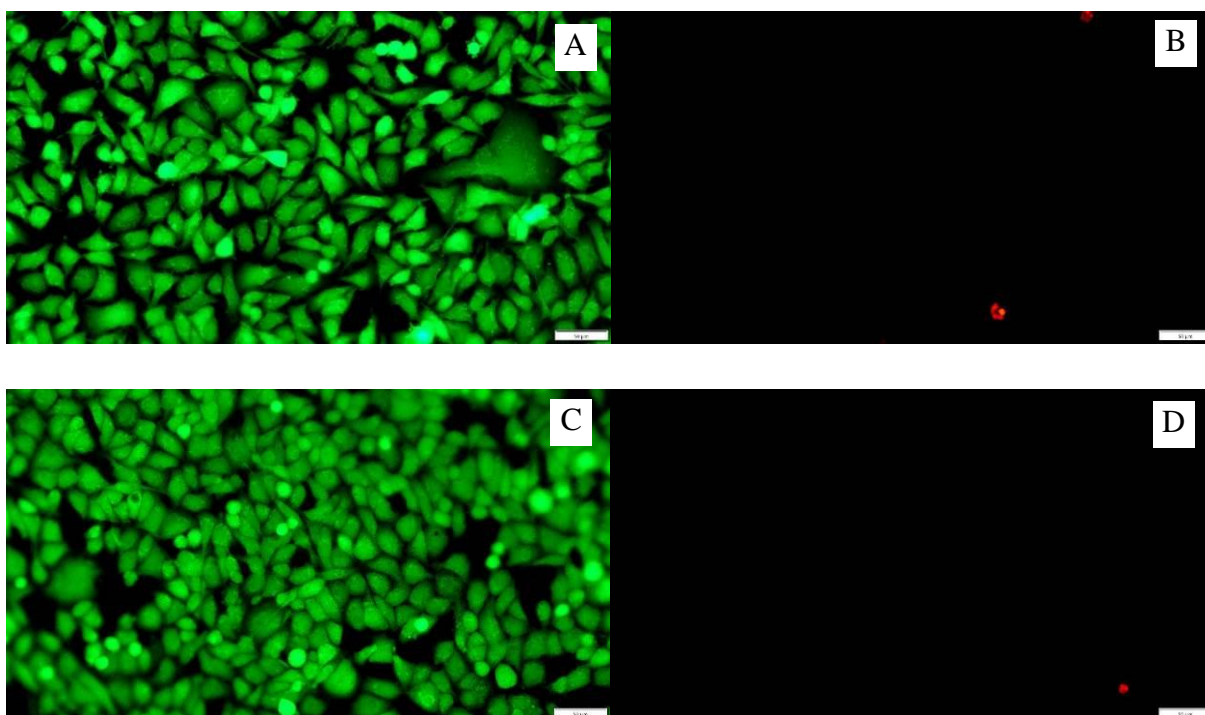


Ryc. 26. Obrazowanie SEM efektu cytotoksycznego na linii A549. Obraz po lewej – prawidłowe komórki. Po stronie prawej widoczne uszkodzone komórki z rozerwaną błoną cytoplazmatyczną i brakiem jąder komórkowych. Obrazy wykonano na mikroskopie skaningowym FE-SEM, Hitachi S-4700.

Obrazy spod mikroskopu optycznego oraz mikroskopu skaningowego pokazały efekt wpływu nanocząstek gentamycyny na linię komórkową A549 zbadany testem kalorymetrycznym MTT. Porównywano obrazy dla stężeń 0,63 mg/200 μ l (3,15 mg/1 ml) oraz 10 mg/200 μ l (50 mg/1 ml), aby wykazać różnice w obrazowaniu efektu cytotoksycznego. Rathbone et al., którzy oceniali wpływ różnych antybiotyków, w tym gentamycyny, na żywotność osteoblastów, wykazali spadek liczby komórek (>75%) przy wyższych dawkach gentamycyny (>2 mg/ml), co koreluje z wynikami w niniejszej pracy⁸⁰.

4.3.2. Cytotoksyczność powierzchni

Jak wcześniej wspomniano cytotoksyczność stanowi nieodzowną kategorię stosowaną w celu zapewnienia bezpieczeństwa pacjentom podczas użytkowania urządzeń medycznych. Cytotoksyczność może wynikać nie tylko z reakcji z nanocząstkami na powierzchni, ale również samo urządzenie może się przyczyniać do niekorzystnych efektów na komórki pacjenta wpływając na hamowanie ich wzrostu lub śmierć. Po potwierdzeniu obecności nanocząstek gentamycyny na powierzchni kolejnym etapem było zobrazowanie wpływu sfunkcjonalizowanej powierzchni na linię komórkową A549. Badanie przeprowadzono przy pomocy podwójnego barwienia LIVE/DEAD i wykorzystaniu mikroskopii fluorescencyjnej. W przeprowadzonym badaniu oceny cytotoksyczności na linii komórkowej A549 nie zaobserwowano znacznego wpływu sfunkcjonalizowanych powierzchni na śmiertelność komórek (Ryc. 23 A/B) w odniesieniu do grupy kontrolnej (Ryc. 23 C/D), co świadczy o jego biokompatybilności.



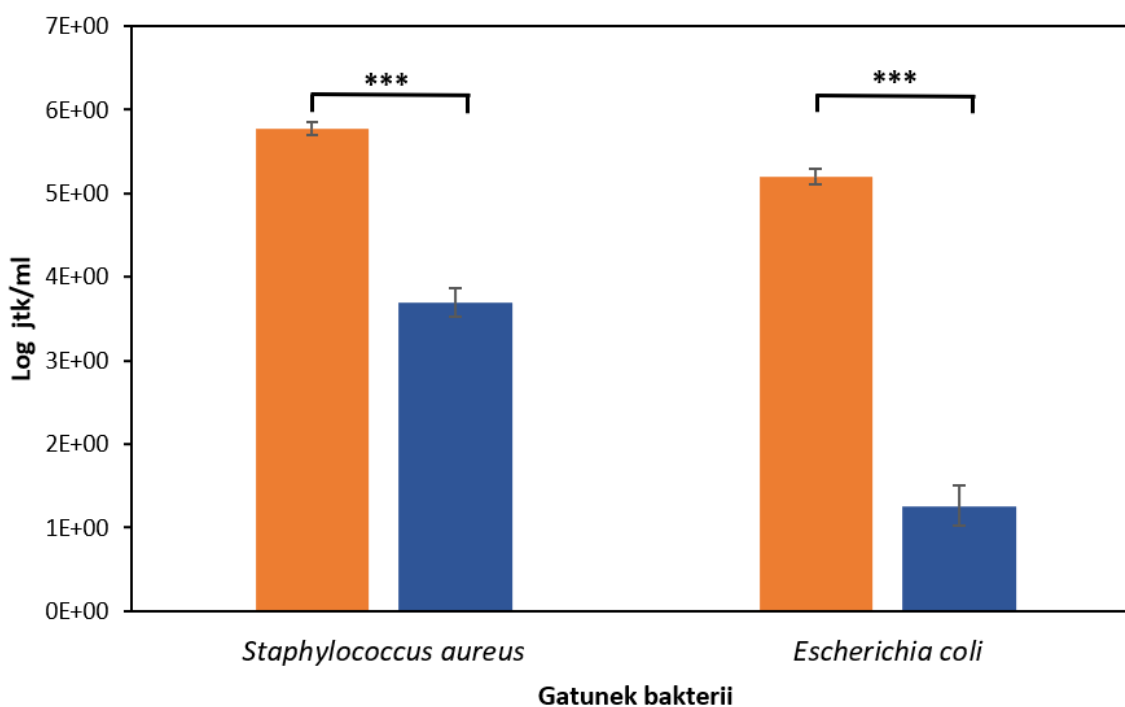
Ryc. 27. Komórki linii A549 widziane pod mikroskopem fluorescencyjnym po 24-godzinnej inkubacji na krążkach PVC bez modyfikacji (A, B) oraz z nanocząstkami gentamycyny (C, D). Do zobrazowania komórek wykorzystano metodę LIVE/DEAD. Na kolor zielony wybarwiają się komórki żywe, na kolor czerwony komórki martwe. Białe prostokąty wyznaczają rozdzielczość na 50 μm . Obrazy uzyskano przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego BX63 (Olympus).

Dostępnych jest wiele różnych rodzajów testów do pomiaru gromadzenia się martwych komórek w hodowli, a znalezienie najlepszej metody zależy od kilku czynników: systemu modelu komórki, pożądanej przepustowości, kosztu odczynników i dostępności oprzyrządowania. Istotne jest, aby barwniki użyte w metodyce były nietoksyczne dla linii komórkowej bez względu na czas trwania eksperymentu⁸¹. Wybór tej metody barwienia podyktowany był zastosowaniem jej w innych publikacjach⁸².

4.3.3. Wzrost biofilmu na sfunkcjonalizowanej powierzchni

Po potwierdzeniu braku cytotoksycznego efektu na liniach komórkowych A549 sfunkcjonalizowanych powierzchni PVC nanocząstkami gentamycyny ostatnim celem badawczym było sprawdzenie powierzchni pod kątem adhezji bakterii. Do badania użyto wzorcowe szczepy *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (przedstawiciel bakterii Gram-dodatnich) oraz *Escherichia coli* ATCC25922 (przedstawiciel bakterii Gram-ujemnych).

Na podstawie badania oceniono wpływ powierzchni poli(chlorku winylu) z naniesionymi nanocząstkami gentamycyny na adhezję bakterii (grupa badana) w odniesieniu do grupy kontrolnej, jaką stanowił krążek niepoddany funkcjonalizacji. Wyznaczono średnią jtk/ml dla badanych szczepów bakteryjnych *S. aureus* i *E. coli*. Wykazano właściwość antibakteryjną spadek liczby bakterii z $6 \cdot 10^5$ jtk/ml do $5 \cdot 10^3$ jtk/ml PVC modyfikowanego nanocząstkami gentamycyny (GMNPs) względem *S. aureus* ATCC25923 ($p < 0.05$). Wykazano właściwość antibakteryjną spadek liczby bakterii z $1,65 \cdot 10^5$ jtk/ml do $2 \cdot 10^1$ jtk/ml PVC modyfikowanego nanocząstkami gentamycyny (GMNPs) względem *E. coli* ATCC25922 ($p < 0.05$). Potwierdzono istotnie statystycznie hamujący wpływ nanocząstek na adhezję do poli(chlorku winylu) (Rycina 28).



Ryc. 28. Logarytm z jtk/ml po inkubacji zawiesiny bakteryjnej o stężeniu 0,5 McF na powierzchni kontroli z PVC (wykres pomarańczowy) oraz na powierzchni PVC z naniesionymi nanocząstkami gentamycyny (wykres niebieski) przez 2 godziny dla *S. aureus* i *E. coli* (***)wyniki istotne statystycznie między wskazanymi powierzchniami, $p < 0,001$, test t-Studenta).

5. Wnioski

Analiza mikrobiologiczna rurek tracheostomijnych pozyskanych od pacjentów z tracheostomią wykazała, że rurki stanowią źródło potencjalnie patogennych mikroorganizmów i stanowią realne zagrożenie dla pacjentów je użytkujących.

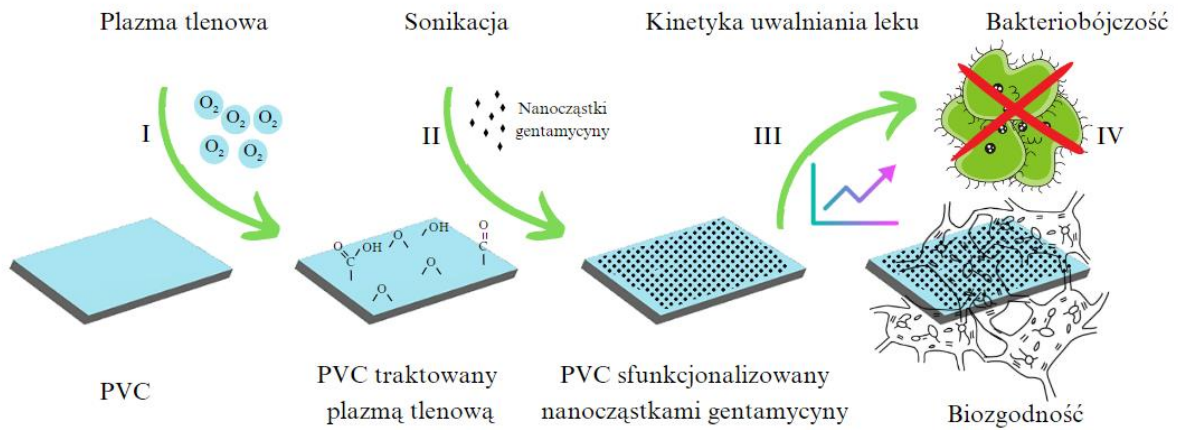
Badania fizykochemiczne pokazały, że struktura polimeru podczas użytkowania ulega znacznemu uszkodzeniu, co dodatkowo tworzy nisze do rozwoju biofilmu bakteryjnego.

W niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano szereg eksperymentów z zakresu chemii powierzchni i mikrobiologii, aby poprawić właściwości powierzchni PVC do stosowań u pacjentów z tracheostomią. Wybrane metody pozwoliły na opracowanie nowatorskiej sfunkcjonalizowanej powierzchni PVC o właściwościach biozgodnych z tkankami oraz wykazującej właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Badania przeprowadzono zgodnie z zasadami „green chemistry” – metody mają być proste, bardziej opłacalne ekonomicznie, a przede wszystkim przyjazne dla środowiska.

Podsumowanie przeprowadzonych badań doświadczalnych schematycznie przedstawiono na rycinie 29, gdzie pokazano kolejne etapy funkcjonalizacji oraz działania opracowanej powierzchni rurki tracheostomijnej. W etapie I następuje wygenerowanie powierzchniowych grup funkcyjnych - efekt ten uzyskiwano przy zastosowaniu plazmy tlenowej. Etap II to zakotwiczenie na powierzchni nanocząstek gentamycyny z wykorzystaniem metody sonochemicznej. Etap III to określenie profilu uwalniania leku z powierzchni określającego możliwość uzyskania dawki terapeutycznej przy zastosowanej funkcjonalizacji.

Zastosowanie plazmy tlenowej i sonochemii pozwoliło na klinicznie istotne załadowanie leku, którego działanie przeciwdrobnoustrojowe potwierdzono na referencyjnych szczepach bakteryjnych *S. aureus* i *E. coli*.

Biozgodność materiału potwierdzona za pomocą testów oceniających cytotoksyczność wytworzonej powierzchni potwierdziła brak negatywnego efektu na linię komórkową A549. Ocena cytotoksyczności oraz właściwości antibakteryjnych otrzymanej powierzchni stanowiła etap IV badań.



Ryc. 29. Kolejne etapy funkcjonalizacji powierzchni PVC. I – traktowanie plazmą tlenową; II – sonikacyjne wbudowanie nanocząstek gentamycyny; III – określenie profilu uwalniania leku; IV – ocena cytotoksyczności i właściwości antibakteryjnych otrzymanej powierzchni.

Zaprojektowana metodologia może w przyszłości posłużyć do wytworzenia nowej rurki tracheostomijnej dla pacjentów, która będzie hamować rozwój biofilmu bakteryjnego, a przez to będzie zdecydowanie bezpieczniejsza w użytkowaniu, szczególnie u pacjentów, którzy nie są w stanie dbać o prawidłową toaletę tracheostomii.

6. Podsumowanie

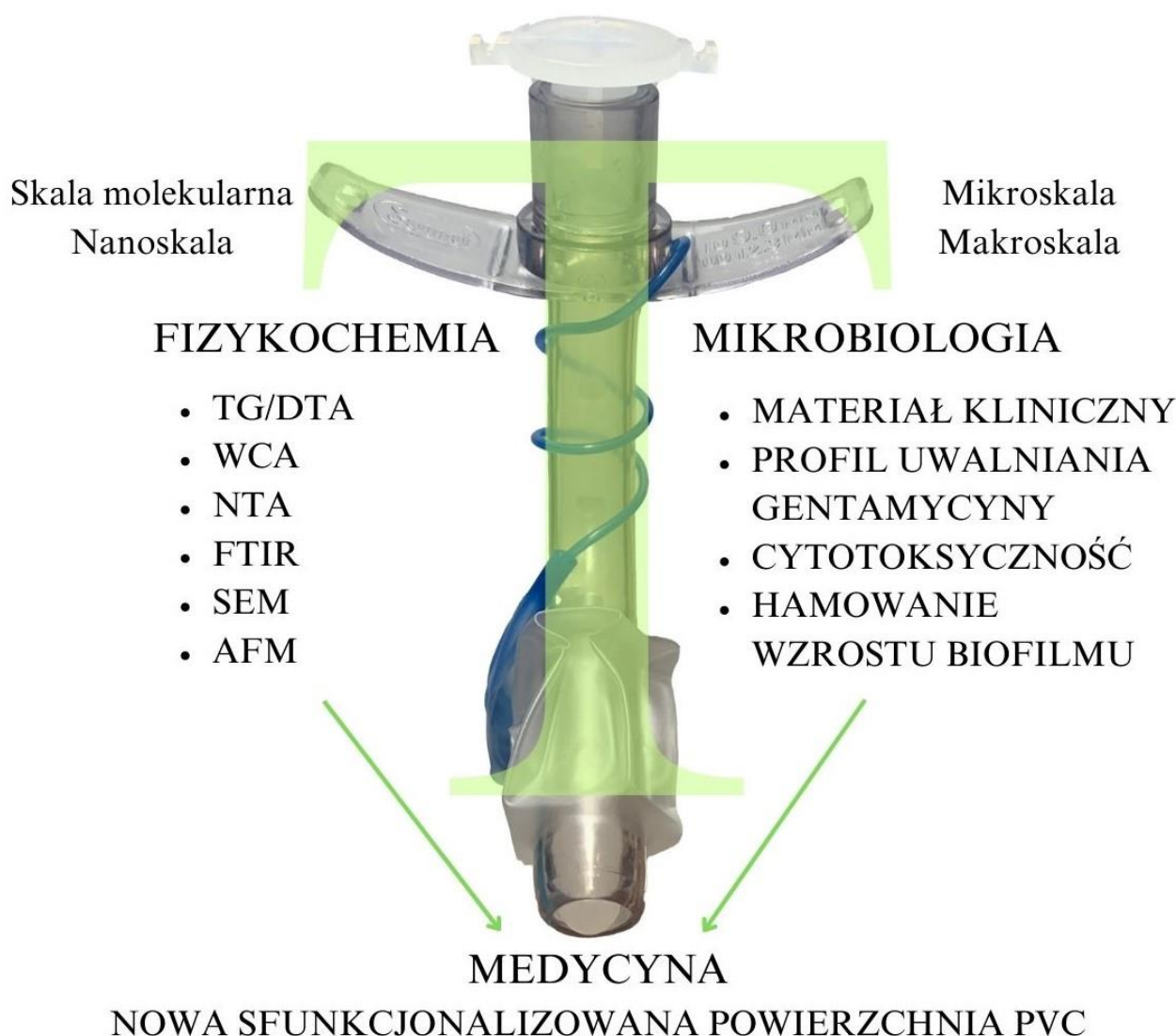
Nanotechnologia z obecnego punktu widzenia stanowi jedną z nauk podstawowych, a jej możliwości z roku na rok są coraz lepiej poznawane. Te niewielkie materiały wprowadzane do układu biologicznego umożliwiają ich wykorzystanie jako wektorów do dostarczania leków, diagnostyki, obrazowania i terapii. Nanotechnologia otwiera drogę do opracowania różnych struktur i materiałów, które zapewniają coraz bardziej wydajne i skuteczne prowadzenie terapii chorych. Należy jednak pamiętać, aby taki materiał poprawiał regenerację tkanek, jednocześnie zapobiegając infekcjom i zmniejszając reakcję immunologiczną.

Nanomateriały wykazują swoje unikalne właściwości fizyczne, optyczne, katalityczne chemiczne i elektryczne zależne od ich wielkości (nanoskali), które można kontrolować. Jedną z istotnych cech aplikacyjnych nanotechnologii jest jej użyteczność w dziedzinie nanomedycyny, terapii i urządzeń medycznych. W dobie szybkiego rozwoju medycyny i rosnącego zapotrzebowania na urządzenia medyczne konieczne jest poszukiwanie rozwiązań, które z jednej strony będą je usprawniały, a z drugiej regulacje organizacji zewnętrznych (WHO, EU) kładą coraz większy nacisk na rozwiązania obniżające koszty produkcji i nie wpływające negatywnie na ekologię.

Badania interdyscyplinarne przyczyniają się do szybszego rozwoju klinicystów, zarówno poprzez rosnące wymagania co do personelu medycznego jak i kreowanie wśród lekarzy naukowej ciekawości, że odpowiedź na postawioną hipotezę badawczą może już częściowo istnieć w naukach podstawowych. Dzięki takiej postawie lekarz staje się pośrednikiem pomiędzy naukami podstawowymi, a praktyką kliniczną. Interdyscyplinarność niniejszej pracy spełnia wymagania stawiane przez nowoczesną medycynę dotyczącą projektowania urządzeń medycznych.

Niniejsza praca doktorska łączy nauki kliniczne z naukami podstawowymi jakimi jest chemia, biochemia, biotechnologia, inżynieria medyczna i mikrobiologia lekarska. Realizując różnorodne zadania badawcze autor miał możliwość szerszego spojrzenia na urządzenie medyczne w różnej skali (mikro, nano i molekularnej) oraz poznanie nowych, wcześniej nieznanymi autorowi, ścieżek badawczych. Zgodnie

z zasadami Browna dotyczącymi badań interdyscyplinarnych doktorant stał się „badaczem w kształcie litery T”⁸³ - dzięki realizacji pracy doktorskiej potrafi spojrzeć na problem kliniczny szerzej i poza swoją dziedzinę medycyny, w której się specjalizuje. Schematycznie konstatację tę przedstawiono na rycinie 30. Bez wątpienia zarówno przeprowadzone eksperymenty, techniki badawcze jak i współpraca z naukowcami z różnych dyscyplin naukowych stanowią uzupełnienie doświadczenia klinicznego i otwierają kolejne drzwi do rozwoju zawodowego i osobistego autora.



Ryc. 30. Grafika w kształcie litery T – graficzne podsumowanie badań zrealizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, Grafika własna. Schematycznie pokazano zarówno różne skale przeprowadzonych badań (od molekularnej do makrometrycznej) jak i zebrano wszystkie zastosowane w pracy metody badawcze, który złożyły się na profil badacza w kształcie litery T.

7. Spis tabel i rycin

Tab. 1. Wskazania do zabiegu tracheotomii w podziale na nagłe i planowe.	2
Tab. 2. Powikłania po zabiegu tracheotomii w podziale na 3 przedziały czasowe: okołozabiegowe, wczesne i późne.	3
Ryc. 1. Przykładowa rurka tracheostomijna. Materiał własny.	4
Ryc. 2. Różne środowiska z jakimi rurka tracheostomijna ma kontakt podczas użytkowania przez pacjenta stwarzające warunki do rozwoju biofilmu bakteryjnego. Strzałka zielona – powietrze atmosferyczne, strzałki niebieskie – wydzielina drzewa oskrzelowego, strzałka fioletowa – ślina. Grafika własna na podstawie szablonów uzyskanych ze strony internetowej https://www.canva.com/	5
Ryc. 3. Etapy powstawania biofilmu bakteryjnego. Grafika własna na podstawie szablonów uzyskanych ze strony internetowej https://www.canva.com/	7
Ryc. 4. Wzór chemiczny monomeru chlorku winylu. Grafika własna na podstawie szablonów uzyskanych ze strony internetowej https://www.canva.com/	13
Ryc. 5. Wzór chemiczny siarczanu gentamycyny. Grafika pozyskana ze strony internetowej dystrybutora odczynników https://pol-aura.pl/	13
Ryc. 6. Aparat do pomiarów termogravimetrycznych TGA/DTA Mettler-Toledo. Zdjęcie z katalogu producenta.	16
Ryc. 7. Spektrometr do analizy widm w podczerwieni Nicolet 6700 Thermo Scientific. Zdjęcie z katalogu producenta.	16
Ryc. 8. Homogenizator Sonics Vibracell CV18. Zdjęcie własne.	17
Ryc. 9. A - aparatura wykorzystywana w obrazowaniu NTA. B - obraz spod aparatury NTA ukazujący otrzymane nanocząstki gentamycyny. Zdjęcia własne.	18
Ryc. 10. Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) FE-SEM, Hitachi S-4700. Zdjęcie z katalogu producenta.	19
Ryc. 11. Mikroskop sił atomowych (AFM) NanoWizard® 4XP Bruker. Zdjęcie własne.	20
Ryc. 12. Wyizolowane potencjalnie patogenne bakterie (PPM) z badanych rurek tracheostomijnych.	25
Ryc. 13. Krzywe termogravimetryczne dla PVC pozyskanego od pacjentów w odniesieniu do próby referencyjnej. A – I etap degradacji PVC, B- II etap degradacji PVC. Krzywa czerwona – PVC, krzywa niebieska – część mezjalna po 28 dniach użytkowania, krzywa zielona – część dystalna po 28 dniach użytkowania.	28
Ryc. 14. Widma FTIR dla próbki kontrolnej z PVC (A); dla rurek tracheostomijnych z PVC użytkowanych przez 28 dni – odcinek mezjalny (B); dla rurek tracheostomijnych z PVC użytkowanych przez 28 dni – odcinek dystalny (C). Szare kolumny wyznaczają zmiany widma na skutek użytkowania rurki tracheostomijnej i charakterystyczne dla nich wiązania.	30
Ryc. 15. Wyznaczanie kąta zwilżania powierzchni. Zieloną strzałką zaznaczono wyznaczany kąt.	31
Ryc. 16. Zmiana kąta zwilżania w zależności od użytego ciśnienia parcjalnego tlenu. Krzywa niebieska pokazuje wartości kąta uzyskane dla ciśnienia tlenu 0.2 mbar. Krzywa pomarańczowa odnosi się do wartości kąta zwilżania przy użyciu ciśnienia tlenu 0.5 mbar.	33
Ryc. 17. Zmiana kąta zwilżania w zależności od użytej mocy generatora. Krzywa niebieska pokazuje wartości kąta uzyskane dla mocy 50 W. Krzywa pomarańczowa odnosi się do wartości kąta zwilżania przy użyciu mocy 100 W.	33
Ryc. 18. Zmiana kąta zwilżania dla wybranych parametrów (50 W, 0,2 mbar) w przedziale czasowym 0-600 s. Najmniejszy kąt zwilżania uzyskano po 180 sekundach działania plazmy tlenowej.	34

Ryc. 19. Zmiana kąta zwilżania w czasie po modyfikacji w zależności od zastosowanych parametrów plazmy (50 W, 0.2 mbar). Legenda: krzywa niebieska - obrazuje pomiar natychmiast po funkcjonalizacji; krzywa pomarańczowa - obrazuje pomiar po 24 godzinach od funkcjonalizacji; krzywa zielona - odnosi się do pomiarów po 7 dniach od funkcjonalizacji. Czerwoną linią zaznaczono pomiar kąta zwilżania dla niemodyfikowanego PVC ($86 \pm 2^\circ$).	35
Ryc. 20. Porównanie obrazów z SEM i AFM dla nowego PVC, po traktowaniu plazmą tlenową oraz użytkowanego 28 dni przez pacjenta.	36
Ryc. 21. Obrazowanie NTA - rozkład wielkości nanocząstek gentamycyny otrzymanych przy zastosowaniu metody sonochemicznej.....	37
Ryc. 22. Widma FTIR dla PVC (A), PVC modyfikowanego plazmą tlenową (B), siarczanu gentamycyny (C) oraz PVC po sonochemicznym wbudowaniu nanocząstek gentamycyny (D). Szare kolumny wyznaczają charakterystyczne regiony dla siarczanu gentamycyny.	39
Ryc. 23. Profile uwalniania nanocząstek gentamycyny z powierzchni PVC.....	40
Ryc. 24. Ocena cytotoksyczności (w odniesieniu do kontroli) różnych stężeń gentamycyny wobec linii komórkowej A549 po 1 godzinie (kolor pomarańczowy) i 24 godzinach (kolor niebieski) inkubacji przy użyciu testu kolorymetrycznego MTT. Wyniki odczytano przy użyciu czytnika TECAN przy długości fali 563 nm. Zahamowanie wzrostu badanej populacji komórek o 50% oznaczono poziomą linią w kolorze czerwonym.....	42
Ryc. 25. Obrazy hodowli komórkowych z nanocząstkami gentamycyny spod mikroskopu optycznego. A – obraz po godzinnej inkubacji; B - obraz po 24-godzinnej inkubacji, C - efekt cytotoksyczny po godzinnej inkubacji w stężeniu gentamycyny 50 mg/ml. ...	43
Ryc. 26. Obrazowanie SEM efektu cytotoksycznego na linii A549. Obraz po lewej – prawidłowe komórki. Po stronie prawej widoczne uszkodzone komórki z rozerwaną błoną cytoplazmatyczną i brakiem jąder komórkowych. Obrazy wykonano na mikroskopie skaningowym FE-SEM, Hitachi S-4700.	43
Ryc. 27. Komórki linii A549 widziane pod mikroskopem fluorescencyjnym po 24-godzinnej inkubacji na krążkach PVC bez modyfikacji (A, B) oraz z nanocząstkami gentamycyny (C, D). Do zobrazowania komórek wykorzystano metodę LIVE/DEAD. Na kolor zielony wybarwiają się komórki żywe, na kolor czerwony komórki martwe. Białe prostokąty wyznaczają rozdzielczość na 50 μm . Obrazy uzyskano przy wykorzystaniu mikroskopu fluorescencyjnego BX63 (Olympus).	45
Ryc. 28. Logarytm z jtk/ml po inkubacji zawiesiny bakteryjnej o stężeniu 0,5 McF na powierzchni kontroli z PVC (wykres pomarańczowy) oraz na powierzchni PVC z naniesionymi nanocząstkami gentamycyny (wykres niebieski) przez 2 godziny dla <i>S. aureus</i> i <i>E. coli</i> (***)wyniki istotne statystycznie między wskazanymi powierzchniami, $p < 0,001$, test t-Studenta).	46
Ryc. 29. Kolejne etapy funkcjonalizacji powierzchni PVC. I – traktowanie plazmą tlenową; II – sonikacyjne wbudowanie nanocząstek gentamycyny; III – określenie profilu uwalniania leku; IV – ocena cytotoksyczności i właściwości antybakteryjnych otrzymanej powierzchni.....	48
Ryc. 30. Grafika w kształcie litery T – graficzne podsumowanie badań zrealizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, Grafika własna. Schematycznie pokazano zarówno różne skale przeprowadzonych badań (od molekularnej do makrometrycznej) jak i zebrano wszystkie zastosowane w pracy metody badawcze, który złożyły się na profil badacza w kształcie litery T.	50

8. Piśmiennictw

- ¹ Olszewski J, Miłośński J. Historia tracheotomii [History of tracheotomy]. *Otolaryngol Pol.* 2007;61(3):349-52. doi:10.1016/S0030-6657(07)70442-0
- ² Golzari SE, Khan ZH, Ghabili K, et al. Contributions of Medieval Islamic physicians to the history of tracheostomy. *Anesth Analg* 2013;116(5):1123-32.
- ³ Jackson C. Tracheotomy. *Laryngoscope* 1909;19:285-90.
- ⁴ Lassen HC. A preliminary report on the 1952 epidemic of poliomyelitis in Copenhagen with special reference to the treatment of acute respiratory insufficiency. *Lancet* 1953;1(6749):37-41.
- ⁵ Ciaglia P, Firsching R, Syniec C. Elective percutaneous dilatational tracheostomy. A new simple bedside procedure; preliminary report. *Chest.* 1985;87(6):715-9. doi:10.1378/chest.87.6.715
- ⁶ Cheung NH, Napolitano LM. Tracheostomy: epidemiology, indications, timing, technique, and outcomes. *Respir Care.* 2014;59(6):895-919. doi:10.4187/respcare.02971
- ⁷ Raimonde AJ, Westhoven N, Winters R. Tracheostomy. In: *StatPearls* [Internet]. 2022. [Dostęp 02.03.2023] Dostępny w: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559124/>
- ⁸ Botti C, Menichetti M, Marchese C, et al. The role of tracheotomy in patients with moderate to severe impairment of the lower airways. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2022;42:73-8. doi:10.14639/0392-100X-suppl.1-42-2022-08
- ⁹ Lewith H, Athanassoglou V. Update on management of tracheostomy. *BJA Educ.* 2019;19(11):370-76. doi:10.1016/j.bjae.2019.08.002
- ¹⁰ Percival SL, Suleman L, Vuotto C, et al. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol.* 2015;64(Pt 4):323-34. doi:10.1099/jmm.0.000032
- ¹¹ Pavithra D, Doble M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants--issues and prevention. *Biomed Mater.* 2008;3(3):034003. doi:10.1088/1748-6041/3/3/034003
- ¹² Pelaez-Fernandez J, Asensio Martin MJ, Jimenez Lendinez M. Percutaneous versus standard tracheostomy. *Surgery.* 1997;121(1):112-3. doi:10.1016/s0039-6060(97)90192-6

-
- ¹³ Bolca C, Păvăloiu V, Fotache G, et al. Postintubation Tracheoesophageal Fistula - Diagnosis, Treatment and Prognosis. *Chirurgia (Bucur)*. 2017;112(6):696-704. doi:10.21614/chirurgia.112.6.696
- ¹⁴ Sussman S, Philips R, Renslo B, et al. Effects of Prior Tracheostomy on Total Laryngectomy Outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2022;1945998221116761. doi:10.1177/01945998221116761
- ¹⁵ Raveendra, N, Rathnakara, SH, Haswani, N, et al. Bacterial Biofilms on Tracheostomy Tubes. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2022;74:3:4995-9. doi:10.1007/s12070-021-02598-6
- ¹⁶ Di Perri G, Ferlazzo G. Biofilm Development and Approaches to Biofilm Inhibition by Exopolysaccharides. *New Microbiol*. 2022;45(4):227-36.
- ¹⁷ Li Z, Nair SK. Quorum sensing: how bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals?. *Protein Sci*. 2012;21(10):1403-17. doi:10.1002/pro.2132
- ¹⁸ Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol*. 2002;292(2):107-13. doi:10.1078/1438-4221-00196
- ¹⁹ Lermينياux NA, Cameron ADS. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol*. 2019;65(1):34-44. doi:10.1139/cjm-2018-0275
- ²⁰ Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J*. 2005;19(3):311-30. doi:10.1096/fj.04-2747rev
- ²¹ Boles MA, Ling D, Hyeon T, et al. The surface science of nanocrystals. *Nat Mater*. 2016;15(2):141-53. doi:10.1038/nmat4526
- ²² Soares S, Sousa J, Pais A, et al. Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. *Front Chem*. 2018;6:360. doi:10.3389/fchem.2018.00360
- ²³ Rossi F, van Griensven M. Polymer functionalization as a powerful tool to improve scaffold performances. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(15-16):2043-51. doi:10.1089/ten.tea.2013.0367
- ²⁴ Chen F, Nielsen S, Zenobi R. Understanding chemical reactivity for homo- and heterobifunctional protein cross-linking agents. *J. Mass Spectrom.*, 2013;48: 807-812. doi:10.1002/jms.3224
- ²⁵ Sanità G, Carrese B, Lamberti A. Nanoparticle Surface Functionalization: How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization. *Front Mol Biosci*. 2020;7:587012. Published 2020 Nov 26. doi:10.3389/fmolb.2020.587012

-
- ²⁶ Vesel A, Zaplotnik R, Mozetic M, Primc G. Surface modification of PS polymer by oxygen-atom treatment from remote plasma: Initial kinetics of functional groups formation. *App Surf Sci.* 2021;561:150058. doi:10.1016/j.apsusc.2021.150058.
- ²⁷ Sabourian P, Yazdani G, Ashraf SS, et al. Effect of Physico-Chemical Properties of Nanoparticles on Their Intracellular Uptake. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8019. doi:10.3390/ijms21218019
- ²⁸ Zafar M, Ullah R, Qamar Z, et al. Properties of dental biomaterials. *Adv Den Biomat.* 2019. doi:10.1016/B978-0-08-102476-8.00002-5.
- ²⁹ Rodríguez-Ibarra C, Déciga-Alcaraz A, Ispanixtlahuatl-Meráz O, et al. International landscape of limits and recommendations for occupational exposure to engineered nanomaterials. *Toxicol. Lett.* 2020;322:111–9. doi:10.1016/j.toxlet.2020.01.016
- ³⁰ Kyriakides TR, Raj A, Tseng TH, et al. Biocompatibility of nanomaterials and their immunological properties. *Biomed Mater.* 2021;16(4). doi:10.1088/1748-605X/abe5fa
- ³¹ Williams T, McGrath, BA. Tracheostomy for COVID-19: evolving best practice. *Crit Care.* 2021;25:316. doi:10.1186/s13054-021-03674-7
- ³² Hunter RJ, Fujii H, Wakame K, et al. In vitro and in vivo evaluation of active hexose correlated compound (AHCC) in combination with pegylated liposomal doxorubicin for treatment of ovarian cancer. *J Appl Res Nat Prod.* 2011;4(3):6-14. doi:
- ³³ Fischer ER, Hansen BT, Nair V, et al. Scanning electron microscopy, *Current Protocols in Microbiology.* 2012;2:2. doi:10.1002/9780471729259.mc02b02s25.
- ³⁴ Stuart B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications.* ACOL Series, Wiley, Chichester, UK 2004.
- ³⁵ Kwiecień K, Pudelko I, Knap K. et al. Insight in Superiority of the Hydrophobized Gentamycin in Terms of Antibiotics Delivery to Bone Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:12077. doi:10.3390/ijms232012077
- ³⁶ Booth J-P, Mozetič M, Nikiforov A, et al. Foundations of plasma surface functionalization of polymers for industrial and biological applications. *Plasma Sources Sci. Technol.* 2022;31:103001. doi: 10.1088/1361-6595/ac70f9
- ³⁷ Bartoszewicz. *Biuletyn NPOA* 3/2012; 2014, [Dostęp 1.03.2023]. Dostępny w: https://antybiotyki.edu.pl/wp-content/uploads/Biuletyn/biuletyn-npoa-2012_3.pdf
- ³⁸ Guillon A, Fouquenet D, Morello E, et al. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Present in Endotracheal Tubes by Poly-l-Lysine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(11):e00564-18. doi:10.1128/AAC.00564-18

-
- ³⁹ Danin PE, Girou E, Legrand P, et al. Description and microbiology of endotracheal tube biofilm in mechanically ventilated subjects. *Respir Care*. 2015;60(1):21-9. doi:10.4187/respcare.02722
- ⁴⁰ Russell CJ, Simon TD, Mamey MR, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and post-tracheotomy bacterial respiratory tract infection readmissions. *Pediatr Pulmonol*. 2017;52(9):1212-18. doi:10.1002/ppul.23716
- ⁴¹ Ochońska D, Ścibik Ł, Brzywczy-Włoch M. Biofilm Formation of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity. *Pathogens*. 2021; 10(10):1345. doi:10.3390/pathogens10101345
- ⁴² Drożdż K, Ochońska D, Ścibik Ł, et al. The Frequency of Occurrence of Resistance and Genes Involved in the Process of Adhesion and Accumulation of Biofilm in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes. *Microorganisms*. 2022; 10(6):1210. doi:10.3390/microorganisms10061210
- ⁴³ Patil T. The Study of the organisms colonizing trachea in mechanically ventilated patients admitted in the intensive care unit (ICU). *Int J Med Sci Educ* 2014;1(1):39-48.
- ⁴⁴ Khatun MN, Shamsuzzaman SM, Fardows J, et al. Identification of Bacterial Isolates from Endotracheal Aspirate of Patients in Intensive Care Unit and Their Antimicrobial Susceptibility Pattern. *J Enam Med Coll* 2018;8(2):67-73. doi:10.3329/jemc.v8i2.36728.
- ⁴⁵ Espíndola de Barros C, Afonso de Almeida J, E Silva MH, et al. Pediatric tracheostomy: epidemiology and characterization of tracheal secretion - a literature review. *Rev Assoc Med. Bras* 2019;65(12):1502-07. doi:10.1590/1806-9282.65.12.1502.
- ⁴⁶ Singhai M, Malik A, Shahid M, et al. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. *J Global Infect Dis*. 2012;4(4):193-8. doi:10.4103/0974-777X.103896.
- ⁴⁷ Najwyższa Izba Kontroli, (2018). Zakażenia w podmiotach leczniczych [online]. [Dostęp 1.03.2023]. Dostępny w: <https://www.nik.gov.pl/plik/id,16720,vp,19276.pdf>
- ⁴⁸ Sina Ebnesajjad, Surface and Material Characterization Techniques, In *Plastics Design Library, Handbook of Adhesives and Surface Preparation*, William Andrew Publishing, 2011, Pages 31-48, doi:10.1016/B978-1-4377-4461-3.10004-5
- ⁴⁹ Zhu H, Jiang X, Yan J, et al. TG-FTIR analysis of PVC thermal degradation and HCl removal. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 2008;82:1-9. Doi:10.1016/j.jaap.2007.11.011
- ⁵⁰ Jumaah OS. Screening of plastic degrading bacteria from dumped soil area. *IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol*. 2017;11:93-8. doi: 10.9790/2402-1105029398

-
- ⁵¹ Vohlídal, J. Polymer degradation: a short review. *Chemistry Teacher International* 2021;3(2):213-20. doi:10.1515/cti-2020-0015
- ⁵² Soler-Arango J, Figoli C, Muraca G, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix and cells are drastically impacted by gas discharge plasma treatment: A comprehensive model explaining plasma-mediated biofilm eradication.. *PLOS ONE*. 2019;14(6):e0216817. doi:10.1371/journal.pone.0216817
- ⁵³ Wilkes RA, Aristilde L. Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *J Appl Microbiol*. 2017;123(3):582-93. doi:10.1111/jam.13472
- ⁵⁴ Elhaj MA, Enamul Hossain M, Imtiaz SA, Naterer GF. Hysteresis of wettability in porous media: a review. *J Pet Explor Prod Technol*. 2020;10(5):1897-905. doi:10.1007/s13202-020-00872-x
- ⁵⁵ Krasowska A, Sigler K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front Cell Infect Microbiol*.2014;4:112. doi:10.3389/fcimb.2014.00112
- ⁵⁶ Wassmann T, Kreis S, Behr M, et al. The influence of surface texture and wettability on initial bacterial adhesion on titanium and zirconium oxide dental implants. *Int J Implant Dent*. 2017;3(1):32. doi:10.1186/s40729-017-0093-3
- ⁵⁷ Zhang Y, Yuan Z, Qin Y et al. (2018). Comparative Studies on Hydrophilic and Hydrophobic Segments Grafted Poly(vinyl chloride). *Chinese Journal of Polymer Science*, 36, 604-611. doi: 10.1007/s10118-018-2034-x
- ⁵⁸ Vogler E.A. Water and the Acute Biological Response to Surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed*. 1999;10:1015–45. doi: 10.1163/156856299X00667
- ⁵⁹ Ghoranneviss M, Shahidi S, Wiener J. Surface modification of poly vinyl chloride (PVC) using low pressure argon and oxygen plasma. *Plasma Science and Technology*, 2010;12(2):204. doi:10.1088/1009-0630/12/2/14
- ⁶⁰ Bormashenko E, Legchenkova I, Navon-Venezia S, et al. Investigation of the Impact of Cold Plasma Treatment on the Chemical Composition and Wettability of Medical Grade Polyvinylchloride. *Applied Sciences*. 2021;11(1):300. doi:10.3390/app11010300
- ⁶¹ Pankaj SK, Bueno-Ferrera C, Misra NN. et al. Applications of coldplasma technology in food packaging. *Trends Food Sci. Technol*. 2014;35:5-17. doi:10.1016/j.tifs.2013.10.009.

-
- ⁶² Golda-Cepa M, Brzychczy-Wloch M, Engvall K, et al. Microbiological investigations of oxygen plasma treated parylene C surfaces for metal implant coating, , *Mater Sci Eng C*. 2015;52:273-81. doi:10.1016/j.msec.2015.03.060.
- ⁶³ Lee NY, Ko WC, Hsueh PR. Nanoparticles in the Treatment of Infections Caused by Multidrug-Resistant Organisms. *Front Pharmacol*. 2019;10:1153. doi:10.3389/fphar.2019.01153
- ⁶⁴ Golda-Cepa M, Chytrosz P, Chorylek A, et al. One-step sonochemical fabrication and embedding of gentamicin nanoparticles into parylene C implant coating: towards controlled drug delivery. *Nanomedicine*. 2018;14(3):941-50. doi:10.1016/j.nano.2018.01.012
- ⁶⁵ Dwivedi C, Pandey H, Pandey A, et al. Fabrication and assessment of gentamicin loaded electrospun nanofibrous scaffolds as a quick wound healing dressing material. *Curr. Nanosci*. 2015;11; 22228. doi:10.2174/1573413710666141003221954
- ⁶⁶ Łosiewicz B, Stróż A, Osak P, et al. Production, Characterization and Application of Oxide Nanotubes on Ti–6Al–7Nb Alloy as a Potential Drug Carrier. *Materials*. 2021; 14(20):6142. doi:10.3390/ma14206142
- ⁶⁷ Kalam, MA, Humayun, M, Parvez, N, et al. Release kinetics of modified pharmaceutical dosage forms. A review. *Cont. J. Pharm. Sci*. 2007;1:30–5.
- ⁶⁸ Paarakh MP, PA Jose, CM Setty, et.al., Release kinetics—concepts and applications. *Int. J. Pharm. Res. Technol* 2018;8:1:12-20. doi:10.31838/ijprt/08.01.02
- ⁶⁹ Batul R, Khaliq A, Alafnan A, et al. Investigation of Gentamicin Release from Polydopamine Nanoparticles. *Appl. Sci*. 2022;12:6319. doi:10.3390/app12136319
- ⁷⁰ Trang TTT, Mariatti M, Badrul HY, et al. Drug Release Profile Study of Gentamicin Encapsulated Poly(lactic Acid) Microspheres for Drug Delivery, *Materials Today: Proceedings*, 2019;17(3):836-45. doi:10.1016/j.matpr.2019.06.370.
- ⁷¹ Posadowska U, Brzychczy-Włoch M, Pamuła E. Gentamicin loaded PLGA nanoparticles as local drug delivery system for the osteomyelitis treatment. *Acta Bioeng Biomech*. 2015;17(3):41-8. doi:10.5277/ABB-00188-2014-02
- ⁷² Maczynska B, Secewicz A, Smutnicka D, et al. In vitro efficacy of gentamicin released from collagen sponge in eradication of bacterial biofilm preformed on hydroxyapatite surface. *PLoS One*. 2019;14(6):e0217769. doi:10.1371/journal.pone.0217769
- ⁷³ Lesniak A, Salvati A, Santos-Martinez MJ, et al. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *J. Am. Chem. Soc*. 2013;135:1438–44. doi: 10.1021/ja309812z

-
- ⁷⁴ Xie J, Wang N, Dong X, et al. Graphdiyne nanoparticles with high free radical scavenging activity for radiation protection. *Acs Appl. Mater. Interfaces* 2019;11:2579–90. doi:10.1021/acsami.8b00949
- ⁷⁵ Li S, Zhai S, Liu, et al. Experimental modulation and computational model of nano-hydrophobicity. *Biomaterials* 2015;52:312–7. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.02.043
- ⁷⁶ Sun H, Jiang C, Wu L, et al. Cytotoxicity-Related Bioeffects Induced by Nanoparticles: The Role of Surface Chemistry. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:414. doi:10.3389/fbioe.2019.00414
- ⁷⁷ Carterson AJ, Höner zu Bentrup K, Ott CM, et al. A549 lung epithelial cells grown as three-dimensional aggregates: alternative tissue culture model for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun.* 2005;73(2):1129-40. doi:10.1128/IAI.73.2.1129-1140.2005
- ⁷⁸ Truong-Bolduc QC, Khan NS, Vyas JM, et al. Tet38 Efflux Pump Affects *Staphylococcus aureus* Internalization by Epithelial Cells through Interaction with CD36 and Contributes to Bacterial Escape from Acidic and Nonacidic Phagolysosomes. *Infect Immun.* 2017;85(2):e00862-16. doi:10.1128/IAI.00862-16
- ⁷⁹ Grubwieser P, Hoffmann A, Hilbe R, et al. Airway Epithelial Cells Differentially Adapt Their Iron Metabolism to Infection With *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* In Vitro. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:875543. doi:10.3389/fcimb.2022.875543
- ⁸⁰ Rathbone CR, Cross JD, Brown KV, et al. Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity. *J Orthop Res.* 2011;29(7):1070-74. doi:10.1002/jor.21343
- ⁸¹ Riss T, Niles A, Moravec R, et al. In Vitro Methods to Measure Dead Cells. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., eds. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2019.
- ⁸² Chota A, George BP, Abrahamse H. In Vitro Cell Death Mechanisms Induced by *Dicoma anomala* Root Extract in Combination with ZnPcS4 Mediated-Photodynamic Therapy in A549 Lung Cancer Cells. *Cells.* 2022; 11(20):3288. <https://doi.org/10.3390/cells11203288>
- ⁸³ Gummenson E, Gustavsson B, Edvardsson B. *Service quality: Multidisciplinary and multinational perspectives*. Lexington Books, 1991.



ANEKS



PUBLIKACJA I

Microbiological analysis of tracheostomy tube biofilms and antibiotic resistance profiles of potentially pathogenic microorganisms

Authors' Contribution:
A – Study Design
B – Data Collection
C – Statistical Analysis
D – Data Interpretation
E – Manuscript Preparation
F – Literature Search
G – Funds Collection

Łukasz Ścibik^{1,2,3ABCEF}, Dorota Ochońska^{1DEF}, Monika Gołda-Cępa^{2A}, Andrzej Kotarba^{2A},
Monika Brzychczy-Włoch^{1ADE}

¹Department of Molecular Medical Microbiology, Chair of Microbiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland; Head: prof. Monika Brzychczy-Włoch MD PhD

²Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Krakow, Poland

³Department of Otolaryngology and Oncological Surgery of the Head and Neck, 5th Military Hospital with Polyclinic in Krakow, Krakow, Poland; Head: col. Paweł Dobosz MD PhD

Article history: Received: 11.05.2022 Accepted: 21.06.2022 Published: 22.06.2022

ABSTRACT:

Introduction: In hospitalized patients, tracheostomy tubes (TTs) are susceptible to colonization by biofilm-producing potentially pathogenic microorganisms (PPMs). Contact with TTs, which are situated in a critical region of the body with enormous microbial exposure, may lead to the emergence of resistant respiratory infections.

Objective: Our study aimed to isolate and identify Gram-positive and Gram-negative PPMs, mark their antibiotic resistance and determine the bacteriological pattern of the biofilm colonizing the TTs.

Methods: The study was conducted on 45 tracheostomy tubes obtained from 45 hospitalized adult patients with tracheostomy with intubation periods ranging from 1 to 28 days. Tracheal aspirates (TA) obtained from polyvinyl chloride (PVC) TTs were used for the analysis. Bacteria in biofilms were identified by standard microbiological techniques, tested for antibiotic resistance and phenotypic resistance according to the EUCAST guidelines and visualized by SEM.

Results: Out of 45 TTs, 100% were found to be positive in bacterial cultures with 58 PPM isolates (10 species) correlating well with the SEM findings. Overall, 72% of isolates were Gram-negative bacilli, followed by Gram-positive cocci (28%). *Staphylococcus aureus* was the predominant bacterium (identified in 35.5% of patients), followed by *Klebsiella pneumoniae* (identified in 23.8%). Among the Gram-negative PPMs, 50% of isolates were identified as multidrug-resistant (MDR), 8.6% as extremely drug-resistant (XDR) and 5.2% were pandrug-resistant (PDR).

Conclusions: Our study showed a rapid colonization of the TT surface by biofilm-producing PPMs. Patients with tracheostomies, also those with non-infectious conditions, were mainly colonized with highly resistant bacteria.

KEYWORDS:

antibiotic resistance, biofilm, potentially pathogenic microorganisms, tracheostomy tube

ABBREVIATIONS

AMC – Amoxicillin-clavulanic acid
BAIs – Biomaterial-Associated Infections
CAZ – ceftazidime
CIP – ciprofloxacin
CN – gentamycin
COPD – chronic obstructive pulmonary disease
cPPMs – community potentially pathogenic microorganisms
CRO – ceftriaxone
CRTH – radical chemoradiotherapy
CT – colistin
CXM – cefuroxime
DA – clindamycin
DDST – double-disc synergy tests
DRI – device-related infections
ENT – Ear, Nose and Throat
ESβL – extended-spectrum β-lactamase

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
hPPMs – hospital potentially pathogenic microorganisms
ICU – intensive care unit
IMP – imipenem
LEV – levofloxacin
MDR – multidrug-resistant
MEM – meropenem
MHA – Mueller-Hinton agar
MIC – Minimum Inhibitory Concentration
MLSB – macrolide, lincosamide and streptogramin B
MRSA – methicillin-resistant *S. aureus*
MSA – mannitol salt agar
MSSA – methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*
MTZ – metronidazole
NFGNB – non-fermenting Gram-negative bacteria
NR – natural resistance

ORL – Department of Otolaryngology and Oncological Surgery of the Head and Neck

PDR – pandrug-resistant

PPMs – potentially pathogenic microorganisms

PVC – polyvinyl chloride

RTH – radiotherapy

SAM – ampicillin-sulbactam

SEM – scanning electron microscopy

TA – tracheal aspirates

TIA – transient ischemic attack

TSB – Tryptic Soy Broth

TTs – tracheostomy tubes

TZP – piperacillin-tazobactam

VA – vancomycin

VAP – ventilator-associated pneumonia

XDR – extensively drug-resistant

INTRODUCTION

Tracheostomy is one of the most common life-saving procedures that has been performed for many years in adults and children. Especially now, during the pandemic of covid-19, we are facing unique challenges for tracheostomy care [1, 2]. This operative method of unblocking the airway involves cutting the front wall of the trachea to form an opening called a tracheostomy, and then inserting a tracheostomy tube to keep the airway open and allow gas exchange [3]. Timing is a key criterion for performing tracheostomy (many clinicians use a specific time window) and patients who receive it, require a large amount of health care resources; however, proactive planning can optimize patient care. The use of the tracheostomy procedure has recently increased significantly [3].

In Poland, the percentage of patients admitted to intensive care units and requiring replacement ventilation is 74%, of which approximately 41% require tracheostomy due to prolonged ventilation [4]. In recent years, due to the growing number of patients operated on for head and neck cancers, and hence requiring tracheostomy, the number of these procedures performed in Ear, Nose and Throat (ENT) departments has increased [5].

The tracheostomy technique can be done with indications for emergency or planned surgery [6]. Planned tracheostomy is currently a commonly performed surgical intervention in critically ill patients in intensive care units, where it is inextricably linked with the performance of mechanical ventilation [7–10]. Although tracheostomy is described as a safe method, it is not devoid of early and late complications [6]. Bleeding may appear intraoperatively as well as difficulties in tracheal intubation and even retention circulation. As for early postoperative complications, the following are classified: early bleeding, peristomal infections, pneumothorax and displacement or a prolapsed tracheostomy tube. Early bleeding is caused by improper vascular supply during the procedure [6]. Other early complications also include peristomal infections, pneumothorax, incorrect site of tracheostomy tube insertion [9]. Late complications include late bleeding, development of a tracheo-esophageal fistula, strictures of the larynx and trachea [6].

Patients with tracheostomies are at particularly high risk for microbial colonization and subsequent pneumonia because of disrupted local clearance mechanisms, underlying immunosuppression, the frequency of invasive procedures, the wide use of respiratory therapy equipment and location in an intensive care environment with exposure to numerous nosocomial pathogens [7]. Moreover, the commonly used TTs are significant in patient care as they are situated in a critical region of the body subject to enormous microbial exposure, which may lead to the emergence of resistant device-related infections (DRI) and could be the source of serious TT-associated respiratory infections including ventilator-associated pneumonia (VAP). An episode of VAP may be due to a single pathogenic microorganism or have polymicrobial origin [9].

The bacterial etiology of VAP is highly varied and distinct patterns have been identified according to the duration of intubation. Early-onset VAP, developing within the first 2 to 5 days after intubation, has a better prognosis and is more likely caused by antibiotic-sensitive pathogens such as methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). Later occurring VAP, developing 5 or more days after the start of mechanical ventilation, has been associated with a higher morbidity and mortality and frequently involves antibiotic-resistant pathogens like methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* [11]. The variety of microbiological factors associated with the pathogenesis of VAP makes it extremely difficult to develop effective preventive strategies to counteract them [7, 12, 13]. It was proved that regular screening of tracheal aspirates (TA) facilitates early identification of the microorganisms linked to VAP and has been shown to have impact on patient treatment and survival [9–10, 14].

One of the main mechanisms of TT colonization by potentially pathogenic microorganisms (PPMs) is biofilm formation. Biofilms are present on more than 90% of TTs within 7 days of insertion, and standard cleaning methods do not completely remove the bacteria [12]. Biofilms are associated with an increased risk of upper respiratory infections, facilitate bacterial contamination of the lower respiratory tract, TT occlusion and wound infections, among other complications. On the other hand, in intubated patients, the clinical distinction between bacterial colonization and pulmonary infection is often difficult to assess [14]. Bacteriological examination of TA is often misleading, due to the formation of these biofilms. Therefore, characterizing biofilms and identifying the bacterial species residing on the surface of TTs are of major importance.

AIM

Due to the above reasons, the aim of our study was to isolate and identify the most common Gram-positive and Gram-negative PPMs with determination of bacteriological profiles of the biofilm colonizing TTs and mark their related antibiotic resistance. In addition, bacterial biofilm structures on the surface of TTs were visualized by scanning electron microscopy (SEM).

Tab. 1. Clinical characteristics of civil patients of the 5th Polish Military Hospital with Polyclinic in Krakow (Poland) on admission to the ORL (n = 35) and ICU (n = 10).

PATIENT NO. TTSID	AGE/SEX	WARD	REASON FOR INTUBATION	DURATION OF INTUBATION	COMORBIDITIES	ANTIBIOTICS AT ICU, ORL ADMISSION	SMOKING (PER DAY)	CRTH/RTH
TT_1	72/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Atherosclerosis, hypertension, hypercholesterolemia	AMC	20	—
TT_2	65/M	ORL	Larynx cancer	1 d		AMC	15	
TT_4	62/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Diabetes, bronchiectasis	AMC	20	CRTH
TT_5	74/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Hypertension, hypercholesterolemia	AMC		
TT_6	66/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Hypothyroidism, thrombocytopenia	AMC	20	RTH
TT_7	81/K	ICU	Respiratory failure	3 d	Diabetes, hypertension	AMC, CN, TZP		
TT_8	89/K	ICU	Respiratory failure	6 d		SAM, CIP, CN, MEM		
TT_9	61/K	ORL	Tonsil cancer	1 d		AMC		RTH
TT_10	36/M	ICU	Respiratory failure	10 d		SAM, CAZ, CIP, CT, VA		
TT_11	87/K	ICU	Respiratory failure	12 d	Diabetes, hypertension, ischemic cardiac disease	SAM, DA, MTZ, TZP, VA		
TT_12	86/M	ORL	Larynx cancer	1 d		AMC		
TT_13	72/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Hypertension	AMC	4	
TT_14	87/M	ORL	Larynx cancer	1 d		AMC		
TT_15	68/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Depression, hypertension	AMC	20	
TT_16	61/M	ORL	Larynx cancer	1 d		AMC	20	RTH
TT_17	75/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Hypertension	AMC	20	
TT_18	56/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Atrial fibrillation, cardiomyopathy	AMC		RTH
TT_19	81/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Cardiac Ischemia, hypertension	AMC	20	
TT_20	55/M	ORL	Larynx cancer	1 d		AMC	20	
TT_21	71/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Cardiac Ischemia, diabetes, hypertension, peptic ulcer disease	AMC		
TT_22	77/M	ORL	Larynx cancer	1 d		AMC		
TT_23	85/K	ICU	Respiratory failure	28 d	Atrial fibrillation, diabetes, hypertension, ischemic heart disease	CT, IMP, VA		
TT_24	50/M	ORL	Larynx cancer	1 d		AMC		
TT_25	67/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Arrhythmia, diabetes, hypertension	AMC	40	
TT_26	49/M	ORL	Larynx cancer	1 d		AMC	30	

Tab. 1. cd. Clinical characteristics of civil patients of the 5th Polish Military Hospital with Polyclinic in Krakow (Poland) on admission to the ORL (n = 35) and ICU (n = 10).

PATIENT NO. TTIS ID	AGE/SEX	WARD	REASON FOR INTUBATION	DURATION OF INTUBATION	COMORBIDITIES	ANTIBIOTICS AT ICU, ORL ADMISSION	SMOKING (PER DAY)	CRTH/RTH
TT_27	71/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Choroba niedokrwienna serca	AMC	10	
TT_28	69/M	ORL	Larynx cancer	1 d		AMC	15	
TT_29	69/K	ORL	Larynx cancer	1 d		AMC	20	CRTH
TT_30	64/M	ORL	Larynx cancer	1 d		AMC	20	
TT_31	84/M	ICU	Respiratory failure	14 d	Arrhythmia, atrial fibrillation, diabetes, hypertension, ischemic heart disease	CXM, CIP, MEM		
TT_32	85/K	ICU	Respiratory failure	12 d	Atrial fibrillation, atherosclerosis, hypertension, hypothyroidism, TIA, valve defect (mitral tricuspid)			
TT_33	62/K	ORL	Larynx cancer	1 d	Atherosclerosis, diabetes, hypothyroidism, ischemic heart disease		20	
TT_34	81/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Hypertension	AMC		RTH
TT_35	57/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Atrial fibrillation, cardiomyopathy, ischemic heart disease	AMC		
TT_36	65/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Hypertension	AMC	40	
TT_37	62/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Diabetes	AMC	20	
TT_38	69/K	ICU	Respiratory failure	11 d	Alcoholism, COPD, diabetes, ischemic heart disease, hypertension, liver damage, psychotic disorders	CRO, CXM, LEV	20	
TT_39	68/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Hyperparathyroidism, hypertension, ischemic heart disease, renal failure			
TT_40	71/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Atherosclerosis, hypertension, peptic ulcer disease	AMC		
TT_41	64/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Atherosclerosis, epilepsy	AMC	40	RTH
TT_42	70/M	ORL	Larynx cancer	1 d		AMC	10	
TT_43	63/M	ORL	Larynx cancer	1 d	Ischemic heart disease	AMC	20	
TT_44	83/K	ICU	Respiratory failure	11 d	Atherosclerosis, atrial fibrillation, valve defect (mitral, aortal)			
TT_45	68/M	ICU	Respiratory failure	9 d	Atrial fibrillation, hypertension			

Abbreviations: COPD – chronic obstructive pulmonary disease, CRTH – radical chemoradiotherapy, ICU – intensive care unit, F – female, M – male, ORL – Department of Otolaryngology and Oncological Surgery of the Head and Neck, RTH – radiotherapy, TIA – transient ischemic attack, TTIS – tracheostomy tubes, VAP – ventilator-associated pneumonia.

Antibiotic shortcuts: AMC – Amoxicillin-clavulanic acid, CN – gentamycin, CAZ – ceftazidime, CIP – ciprofloxacin, CRO – ceftriaxone, CT – colistin, CXM – cefuroxime, DA – dclindamycin, IMP – imipenem, LEV – levofloxacin, MEM – meropenem, MTZ – metronidazole, SAM – ampicillin-sulbactam, TZP – piperacillin-tazobactam, VA – vancomycin.

MATERIALS AND METHODS

Ethics

The study was approved by the Bioethics Committee of the Jagiellonian University in Krakow, Poland (KBET No. 1072.6120.153.2019).

Study design and patient characteristics

The present work was conducted in a 28-bedded Department of Otolaryngology and Oncological Surgery of the Head and Neck (ORL) and an 11-bedded Intensive Care Unit (ICU). The study included 45 patients (35 males/10 females), aged 36–94 years (mean: 75), of whom 35 were admitted to the ORL and 10 were admitted to the ICU during the study period (from October 2018 to February 2020). Some clinical data of patients are presented in Tab. I. All patients underwent intubation or tracheostomy due to impaired respiratory or lung function, laryngeal cancer or tonsil cancer and were intubated for at least 1 day. TTs were collected upon extubation of patients. Each TT was placed in a sterile specimen bag (Biohazard) and immediately frozen at -80°C until processing for bacterial culture. From the central region of each tube, a 5-cm section was cut and transferred to 15 ml of Tryptic Soy Broth (TSB). The buffer was then heated to 37°C for 30 minutes. TA was removed from the tube by repeated cycles (3x) of vortexing. Each time, 1 ml of the resulting cell suspension was used for cultivation. In total, 45 clinical samples (TA) from ventilated patients were analyzed. All were investigated by culture-dependent techniques.

Microbiological Methods

Isolation and Identification Techniques

Microbial cultures were inoculated on different isolation media: Columbia LAB-AGAR+5%KB (BIOCORP, Poland), Chocolate LAB-AGAR™ (CH+PV) (BIOCORP, Poland), MacConkey LAB-AGAR™ (BIOCORP, Poland), mannitol salt agar (MSA) (Oxoid, UK) and Mueller-Hinton agar (MHA) (BD, USA) and incubated at 37°C for 24 h. Pure microbial cultures were obtained from all isolation media and stored at -80°C using Microbank™-Dry vials (Pro-Lab Diagnostics, Birkenhead, UK). Conventional microbiological analyses (colony morphology, Gram staining characters, microscopic images, biochemical profiles, catalase and oxidase tests) were performed on all isolates using standard procedures [15].

- **Gram-positive PPMs.** β -hemolytic, Gram-positive, catalase-positive cocci were tested for the presence of coagulase enzyme (IBSS BIOMED S.A., Poland). All staphylococci were inoculated on an API® Staph strip (bioMérieux, France) according to the manufacturer's instructions, to confirm the species *S. aureus*. On the other hand, β -hemolytic, Gram-positive, catalase-negative and oxidase-negative (BD BBL™ DrySlide™, USA) streptococci were identified by API 20 Strep (bioMérieux, France) and the automated miniAPI system (bioMérieux, France). Lancefield grouping was conducted on cards using the rapid latex agglutination test: The Oxoid Dryspot Streptococcal Grouping Kit (Oxoid Ltd., UK). *Streptococcus faecalis* of group D (GDS, n = 1) was correctly grouped by using these reagents.

- **Gram-negative PPMs.** Gram-negative, oxidase-negative bacilli were identified by API 20E (bioMérieux, France). Isolates producing a greenish pigment were considered to be *Pseudomonas* species. These strains were inoculated on Mueller Hinton 2 LAB-AGAR™ (BIOCORP, Poland) plates that were incubated overnight at 37°C . The initial identification was confirmed by analyzing a selection of isolates by API 20 NE (bioMérieux, France). The remaining oxidase-positive, non-fermenting Gram-negative bacteria (NFGNB) were identified by API 20 NE (bioMérieux, France) and the automated miniAPI system (bioMérieux, France).
- **Potentially pathogenic microorganisms.** Microorganisms recognized as causing respiratory infections are referred to as potentially pathogenic microorganisms (PPMs). Additionally, PPMs were classified into predominantly community (cPPMs) or hospital (hPPMs) and non-PPMs, according to the definitions proposed by Drakulovic et al. followed by further researchers [8]. On the basis of these criteria, commensal flora (coagulase-negative *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Neisseria* spp., *Micrococcus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Propionibacterium* acnes and viridans group streptococci) were classified as non-PPMs and were excluded from antibiotic resistance studies. Furthermore, the above study did not include anaerobic bacteria or fungi.
- **Antibiotic Resistance.** Antibiotic resistance tests of the isolated PPMs were performed by the E-test method using the Liofilchem™ MIC Test Strips (Liofilchem, Italy) to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 31 antibiotics as per the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, v. 10.0, 2020) guidelines [15]. Defining isolates as multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) and pandrug-resistant (PDR) was done according to the standardized international document [16].

Phenotypic screening of antibiotic resistance mechanisms among Gram-positive PPMs

- **Detection of methicillin resistance.** Methicillin resistance in the *S. aureus* isolates was checked by the cefoxitin disc (30 μg).
- **Testing for macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLS_B) resistance.** Detection of the macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLS_B) resistance mechanism was performed using the disc diffusion method with erythromycin (15 μg) and clindamycin (2 μg) discs (Oxoid, UK) and according to the EUCAST guidelines.

Phenotypic screening of antibiotic resistance mechanisms among Gram-negative PPMs

- **Screening of ES β L, AmpC and carbapenemase producers.** Double-disc synergy tests (DDST) were carried out to confirm ES β L production. Hodge and imipenem-EDTA (EURX, Poland) double-disc synergy tests were used to screen for MBL production. The detection of KPC was assessed by the disc test with phenylboronic acid. The detection of OXA-48 was done as previously published [17]. Temocillin zone diameters were determined for all isolates using a 30- μg temocillin disc (Oxoid, UK). Initial screening for ES β L, AmpC, and carbapenemase

Tab. II. Bacterial profile of biofilms formed on tracheostomy tubes (TTs) collected from patients of the 5th Polish Military Hospital with Polyclinic in Krakow (Poland).

TTS ID	% (N)	TYPE OF CO-COLONIZATION BACTERIAL SPECIES
100 (8) Monomicrobial (1 species)		
TT_27.28.34	37.5 (3)	<i>S. aureus</i>
TT_6.7	25 (2)	<i>E. coli</i>
TT_20	12.5 (1)	<i>S. marcescens</i>
TT_33	12.5 (1)	<i>E. cloacae</i>
TT_39	12.5 (1)	<i>K. pneumoniae</i>
100 (11) Bimicrobial (2 species)		
TT_3.24	18.2 (2)	<i>S. aureus</i> + <i>P. aeruginosa</i>
TT_1	9.1 (1)	<i>P. acnes</i> + <i>C. albicans</i>
TT_5	9.1 (1)	<i>C. macginleyi</i> + <i>S. epidermidis</i>
TT_10	9.1 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>E. cloacae</i>
TT_25	9.1 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>C. albicans</i>
TT_29	9.1 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i>
TT_30	9.1 (1)	<i>Corynebacterium spp.</i> + <i>C. albicans</i>
TT_36	9.1 (1)	<i>E. faecalis</i> + <i>K. pneumoniae</i>
TT_37	9.1 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>S. maltophilia</i>
TT_45	9.1 (1)	<i>S. viridans</i> + <i>C. albicans</i>
100 (14) Polymicrobial (3 species)		
TT_4	7.1 (1)	<i>C. macginleyi</i> + <i>S. aureus</i> + <i>P. aeruginosa</i>
TT_9	7.1 (1)	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. salivarius</i> + <i>C. albicans</i>
TT_12	7.1 (1)	<i>C. macginleyi</i> + <i>S. epidermidis</i> + <i>P. acnes</i>
TT_13	7.1 (1)	<i>Corynebacterium spp.</i> + <i>epidermidis</i> + <i>S. viridans</i>
TT_14	7.1 (1)	<i>S. agalactiae</i> + <i>S. viridans</i> + <i>M. catarrhalis</i>
TT_16	7.1 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>K. pneumoniae</i>
TT_17	7.1 (1)	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. viridans</i> + <i>E. coli</i>
TT_18	7.1 (1)	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. viridans</i> + <i>Neisseria spp.</i>
TT_26	7.1 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> + <i>C. albicans</i>
TT_31	7.1 (1)	<i>S. agalactiae</i> + <i>E. coli</i> + <i>K. pneumoniae</i>
TT_35	7.1 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i> + <i>Neisseria spp.</i>
TT_41	7.1 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>C. albicans</i>
TT_42	7.1 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>S. viridans</i> + <i>S. liquefaciens</i>
TT_43	7.1 (1)	<i>Proteus spp.</i> + <i>P. aeruginosa</i> + <i>C. albicans</i>
100 (6) Polymicrobial (4 species)		
TT_11	16.7 (1)	<i>E. cloacae</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>Proteus spp.</i> + <i>S. maltophilia</i>
TT_21	16.7 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i> + <i>S. viridans</i> + <i>K. pneumoniae</i>
TT_32	16.7 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i> + <i>S. haemolyticus</i> + <i>Micrococcus spp.</i>
TT_38	16.7 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>S. liquefaciens</i> + <i>C. albicans</i>

Tab. II. cd. Bacterial profile of biofilms formed on tracheostomy tubes (TTs) collected from patients of the 5th Polish Military Hospital with Polyclinic in Krakow (Poland).

TTS ID	% (N)	TYPE OF CO-COLONIZATION BACTERIAL SPECIE
TT_40	16.7 (1)	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. viridans</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>K. pneumoniae</i>
TT_44	16.7 (1)	<i>A. baumannii</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>Proteus spp.</i> + <i>C. albicans</i>
	100 (4)	Polymicrobial (5 species)
TT_8	25 (1)	<i>E. faecalis</i> + <i>E. coli</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>S. maltophilia</i> + <i>C. albicans</i>
TT_15	25 (1)	<i>S. epidermidis</i> + <i>S. viridans</i> + <i>Proteus spp.</i> + <i>P. aeruginosa</i> + <i>C. albicans</i>
TT_22	25 (1)	<i>Corynebacterium spp.</i> + <i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>K. pneumoniae</i>
TT_23	25 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + <i>S. maltophilia</i>
	100 (2)	Polymicrobial (6 species)
TT_2	50 (1)	<i>S. sciuri</i> + <i>K. pneumoniae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + <i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i> + <i>Sacharomyces spp.</i>
TT_19	50 (1)	<i>S. aureus</i> + <i>S. epidermidis</i> + <i>S. viridans</i> + <i>C. albicans</i> + <i>C. krusei</i> + <i>Sacharomyces spp.</i>

Abbreviations: TTs – tracheostomy tubes.

production was performed on the basis of the disc diffusion method using ceftazidime (30 µg), cefotaxime (30 µg), ceftriaxone (30 µg), ceftazidime (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) and ertapenem (10 µg) discs (Liofilchem® MIC Test Strips) according to the EUCAST v. 9.0, 2019, screening criteria for β-lactamase production.

• Scanning Electron Microscopy (SEM) observations.

The investigated TT biomaterials were characterized after microbiological analysis by the field-emission scanning electron microscope (FE-SEM, Hitachi S-4700). Bacteria in biofilms colonizing the inner surfaces of the tested TTs were fixed for the SEM observations following the protocols described elsewhere [18]. The tested polyvinyl chloride (PVC) TTs obtained from patients were cut into 2-mm-thick discs after 10 and 28 days of incubation. Briefly, TT samples were fixed in a 2.5% glutaraldehyde solution (Sigma-Aldrich, Germany) in 0.1 M Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (pH = 7.4) (DPBS, Lonza) for 4 hours, and then rinsed twice for 10 minutes with DPBS. Afterwards, TT samples were dehydrated by passing them through the following ethanol series (50%, 60%, 70%, 80%, 96% and 100% ethanol) for 10 minutes each. The prepared samples were attached to the SEM holder using an adhesive carbon tape and coated with gold particles (via sputter coating with a ~15-nm layer of gold, Quorum Q150T S). Finally, image analyses were started.

RESULTS

General findings

Out of the total of 45 TTs studied, 100% were found to be positive in bacterial culture. From the TA samples collected during the study period, 58 PPMs (10 species) were isolated and identified. Most of the clinical materials were from the ORL ward (77.8%, n = 35) and the remaining materials were obtained from patients of the ICU ward (22.2%, n = 10). Thirty-seven TTs (82%) were inhabited by 2 or more microorganisms (Tab. II).

Antibiotic resistance

- **Gram-positive PPMs.** Among Gram-positive PPMs, we found 16 isolates of *S. aureus* species (identified in 35.5% of the patients). In the case of the *S. aureus* strains examined, no MRSA isolates were detected. Three isolates (14.3%) were resistant to each individual fluoroquinolone (ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin and ofloxacin). Two strains (9.5%) were resistant to erythromycin and 2 (9.5%) to clindamycin. The phenotypic mechanism of MLSB resistance was demonstrated for 4 (25%) *S. aureus*, among which both mechanisms (cMLS_B and iMLS_B) were detected in 2 (9.5%) isolates. In addition, 3 (14.3%) strains were resistant to tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole (Tab. III).
- **Gram-negative PPMs.** In the cases of Gram-negative PPMs, we isolated a total of 9 different species (42 isolates), wherein up to 76.2% (32 isolates) of the bacteria identified are representatives of the order *Enterobacterales* (family *Enterobacteriaceae*), followed by non-fermenting Gram-negative bacteria (NFGNB) including *P. aeruginosa* (n = 5, identified in 11.9%), *Stenotrophomonas maltophilia* (n = 4, in 9.5% of patients) and *Acinetobacter baumannii* (n = 1, in 2.4%), which constituted the remaining 23.8% of the studied isolates (Tab. III). Among *Enterobacterales*, *Klebsiella pneumoniae* was the most frequently detected bacterium (n = 10, identified in 23.8% of the patients) followed by *Enterobacter cloacae* (n = 7, in 16.7% of patients); *Escherichia coli* was also frequent (n = 7, in 16.7% of patients), and subsequently *Proteus spp.* (n = 4, in 9.5% of patients); *Serratia marcescens* (n = 2, in 4.8% of patients) and *Serratia liquefaciens* (n = 2, in 4.8% of patients). Among the *K. pneumoniae* rods, 2 (20%) isolates were ESBL producers. Generally, *K. pneumoniae* isolates were highly resistant to penicillins and cephalosporins: 100% (n = 10) were resistant to ampicillin with sulbactam and ticarcillin with clavulanic acid; 90% (n = 9) to amoxicillin with clavulanic acid; 80% (n = 8) to ceftazidime; 70% (n = 7) to ceftriaxone and 20% (n = 2) to piperacillin and ceftipime, respectively. In addition, 40% (n = 4) of *K. pneumoniae* were resistant to ciprofloxacin; 30% (n = 3) to levofloxacin and ofloxacin; 20% (n = 2) to moxifloxacin. In

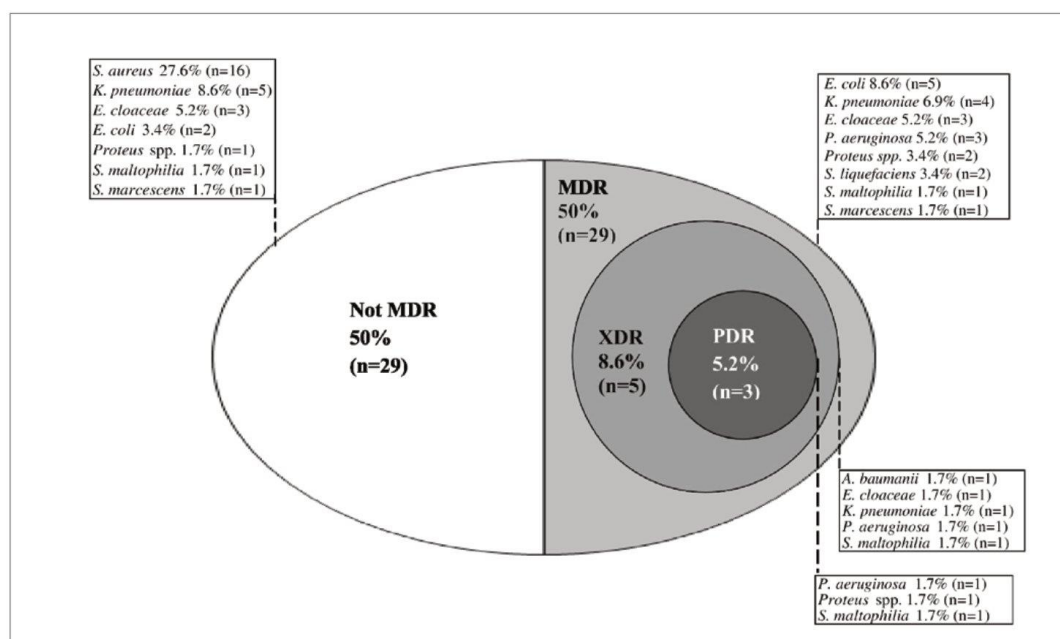


Fig.1.??

the group of aminoglycosides, 40% (n = 4) of isolates were resistant to amikacin, 20% (n = 2) to gentamicin and tobramycin, and 1 (10%) netilmicin-resistant isolate was also found. Whereas 20% (n = 2) of strains were resistant to aztreonam and 10% (n = 1) were resistant to trimethoprim with sulfamethoxazole. Among the detected isolates of *E. cloacae*, 100% (n = 7) of strains were resistant to piperacillin and ticarcillin with clavulanic acid; 85.7% (n = 6) to ceftazidime and ceftriaxone; 42.6% (n = 3) to cefotaxime, cefepime, aztreonam and ciprofloxacin; 28.6% (n = 2) to moxifloxacin, ofloxacin, netilmicin and tobramycin; three isolates were also found to be resistant to different agents (each 14.3%): doripenem, ertapenem and levofloxacin. Among the strains of *E. coli*, all isolates (100%, n = 7) were resistant to ampicillin, ampicillin with sulbactam, amoxicillin, and ticarcillin with clavulanic acid; 85.7% (n = 6) to amoxicillin with clavulanic acid, 28.6% (n = 2) to piperacillin and levofloxacin, 14.3% (n = 1) to ceftazidime, ceftriaxone, ciprofloxacin and ofloxacin. In the cases of 4 strains of *Proteus spp.*, 100% were resistant to all penicillins; 75% (n = 3) were resistant to ceftazidime and all analyzed fluoroquinolones and trimethoprim with sulfamethoxazole; 50% (n = 2) to cefotaxime, ceftriaxone, cefepime, doripenem, ertapenem, gentamicin and tobramycin; 25% (n = 1) to imipenem, meropenem, aztreonam, amikacin and netilmicin. Among the 2 strains of *S. liquefaciens*, 1 isolate (50%) was resistant to penicillin antibiotics, cephalosporins, fluoroquinolones, tobramycin and trimethoprim with sulfamethoxazole (Tab. III.). Among the 2 strains of *S. marcescens*, 100% of isolates were resistant to ampicillin with sulbactam, ticarcillin with clavulanic acid, ceftazidime and ceftriaxone; 50%

(n = 1) were resistant to piperacillin, cefotaxime, aztreonam, moxifloxacin, ofloxacin, netilmicin and tobramycin. The most frequently identified pathogenic NFGNBs were *P. aeruginosa* followed by *S. maltophilia* and *A. baumannii*. The obtained results showed, among the isolated *P. aeruginosa*, the highest percentage (100%, n = 5) of strains resistant to piperacillin and cefepime; 80% (n = 4) of isolates were resistant to netilmicin; 60% (n = 3) were resistant to ceftazidime, ciprofloxacin and levofloxacin; 40% (n = 2) were resistant to doripenem, imipenem, meropenem, aztreonam and tobramycin. Among the 4 isolates of *S. maltophilia*, 100% were resistant to ticarcillin with clavulanic acid; 1 strain (25%) resistant to ciprofloxacin and 1 strain (25%) resistant to trimethoprim with sulfamethoxazole were reported. To sum up, the less frequently detected bacterium was *A. baumannii* and, moreover, this isolate was resistant to all antibiotics used, except tobramycin. Tab. III. presents the compilations of the most frequently detected Gram-positive and Gram-negative PPMs and associated antibiotic resistance. According to the criteria by Magiorakos et al., 29 MDR (50%) isolates were detected, including 5 XDR (8.6%) represented by different species and 3 strains (*P. aeruginosa*, *Proteus spp.*, *S. maltophilia*) qualified to the PDR category, which accounted for 5.2% of the total pool of antibiotic-resistant pathogens (Fig. 1.).

Biofilm observation by SEM

SEM observations of the biofilms formed on the surface of the TT samples revealed a consistent and sustainable network of cellular

Tab. III. Most frequently detected Gram-positive and Gram-negative PPMs and related antibiotic resistance.

Antibiotics	STAPHYLOCOCCUS SPP	ENTEROBACTERIALES						NON-FERMENTING GRAM-NEGATIVE BACTERIA (NFGNB)		
	<i>S. aureus</i> n = 16	<i>K. pneumoniae</i> n = 10	<i>E. cloacae</i> n = 7	<i>E. coli</i> n = 7	<i>Proteus</i> spp. n = 4	<i>S. liquefaciens</i> n = 2	<i>S. marcescens</i> n = 2	<i>P. aeruginosa</i> n = 5	<i>S. maltophilia</i> n = 4	<i>A. baumannii</i> n = 1
Number of resistant isolates (%)										
Penicillins										
Ampicillin		ON	ON	7 (100)	4 (100)	ON	ON	ON	ON	ON
Ampicillin-sulbactam		10 (100)	0 (0)	7 (100)	4 (100)	1 (50)	2 (100)	ON	ON	1 (100)
Amoxicillin		ON	ON	7 (100)	4 (100)	ON	ON	ON	ON	ON
Amoxicillin-clavulanic acid		9 (90)	ON	6 (85.7)	4 (100)	ON	ON			ON
Piperacillin		2 (20)	7 (100)	2 (28.6)	4 (100)	1 (50)	1 (50)	5 (100)	ON	1 (100)
Ticarcillin-clavulanic acid		10 (100)	7 (100)	7 (100)	4 (100)	1 (50)	2 (100)		4 (100)	1 (100)
Cephalosporins										
								ON		
Ceftazidime		8 (80)	6 (85.7)	1 (14.3)	3 (75)	1 (50)	2 (100)	3 (60)	ON	1 (100)
Cefotaxime		1 (10)	3 (42.6)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	1 (50)	ON	ON	ON
Ceftriaxone		7 (70)	6 (85.7)	1 (14.3)	2 (50)	1 (50)	2 (100)	ON	ON	ON
Cefepime		2 (20)	3 (42.6)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	5 (100)	ON	1 (100)
Cefoxitin		0 (0)								
Carbapenems										
Doripenem		0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	2 (40)	ON	1 (100)
Ertapenem		0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	ON	ON	ON
Imipenem		0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	2 (40)	ON	1 (100)
Meropenem		0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	2 (40)	ON	1 (100)
Monobactams										
Aztreonam		1 (10)	3 (42.6)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	1 (50)	2 (40)	ON	1 (100)
Fluoroquinolones										
Ciprofloxacin		3 (14.3)	4 (40)	3 (42.6)	1 (14.3)	3 (75)	0 (0)	0 (0)	3 (60)	1 (25)
Levofloxacin		3 (14.3)	3 (30)	1 (14.3)	2 (28.6)	3 (75)	1 (50)	0 (0)	3 (60)	ON
Moxifloxacin		3 (14.3)	2 (20)	2 (28.6)	0 (0)	3 (75)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	ON
Ofloxacin		3 (14.3)	3 (30)	2 (28.6)	1 (14.3)	3 (75)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	ON
Aminoglycosides										
Amikacin		0 (0)	4 (40)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ON
Gentamycin		0 (0)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ON
Netylmicin		0 (0)	2 (20)	2 (28.6)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	1 (50)	4 (80)	ON
Tobramycin		0 (0)	1 (10)	2 (28.6)	0 (0)	2 (50)	1 (50)	1 (50)	2 (40)	ON
Tetracyclines										
Tetracycline		3 (14.3)								
Oxazolidinones										

Tab. III. cd. Most frequently detected Gram-positive and Gram-negative PPMs and related antibiotic resistance.

Antibiotics	STAPHYLOCOCCUS SPP	ENTEROBACTERIALES						NON-FERMENTING GRAM-NEGATIVE BACTERIA (NFGNB)		
	<i>S. aureus</i> n = 16	<i>K. pneumoniae</i> n = 10	<i>E. cloacae</i> n = 7	<i>E. coli</i> n = 7	<i>Proteus</i> spp. n = 4	<i>S. liquefaciens</i> n = 2	<i>S. marcescens</i> n = 2	<i>P. aeruginosa</i> n = 5	<i>S. maltophilia</i> n = 4	<i>A. baumannii</i> n = 1
Linezolid	0 (0)									
Macrolides, Lincosamides and Streptogramins										
Erythromycin	4 (25)									
Clindamycin	2 (9.5)									
iMLS _B	2 (9.5)									
cMLS _B	2 (9.5)									
Miscellaneous agents										
Chloramphenicol	9 (56.2)									
Rifampicin	0 (0)									
Trimethoprim-sulfamethoxazole	3 (14.3)	1 (10)	1 (14.3)	0 (0)	3 (75)	0 (0)	1 (100)	1 (25)	1 (100)	

Abbreviations: NFGNB – non-fermenting Gram-negative bacteria, NR – natural resistance, PPMs – potentially pathogenic microorganisms.

multilayers, being compositions from different bacterial species (Fig. 2A.–D.), surrounded and encircled by a protective biofilm matrix. The presented SEM images illustrate a typical bacterial biofilm, a complex multicellular structure of microorganisms encompassed by a layer of organic and inorganic substances produced by these organisms and showing adhesion to the abiotic surface, i.e. the biomaterial of the TTs. SEM images show that the identified isolated bacterial species gladly developed compatible and strong associations with other species and formed agglomerates on the TT surfaces. Toughened biofilm that is difficult to remove may pose a microbiological hazard.

DISCUSSION

The bacterial biofilm formed on the surface of the tracheostomy tube is a major problem in modern medicine [19]. It is now known that over 99% of bacteria in the natural environment are present in the form of biofilm. The formation of biofilm by pathogens is considered to be the main factor of virulence, protecting against the targeted action of antimicrobials, the host's immune response mechanisms and unfavorable environmental conditions [19]. Biofilm can arise on the surface of living cells because its formation is a natural feature of all bacteria that make up the microflora of the skin and mucous membranes. Also, pathogenic bacteria entering the body in the form of plankton, after the initial stage of adhesion to the host cells, create a biofilm in the gate of infection [11–13]. In addition, biofilm-forming bacteria are also able to permanently and effectively colonize abiotic surfaces, including biomaterials more and more commonly used in medicine for the production of endotracheal tubes and tracheostomy tubes [11–13]. The dynamic development in the field of biomaterials significantly contributed to the improvement of the quality of life of patients, but at the same time, it became the cause of an increased risk of developing infections associated with

biofilm (Biomaterial-Associated Infections; BAIs) [12–14, 20–22]. It is currently shown that BAIs are responsible for approximately 65–80% of all infections in humans and animals. Similarly, according to the literature, the frequency of bacterial colonization in intubated and mechanically ventilated people may reach 80% [10].

Patients with tracheostomy constitute a special group of people constantly colonized with a diverse bacterial flora, most often environmental, with the dominant role of *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* species [20, 23–25]. Several different species of Gram-negative and Gram-positive bacteria, including anaerobes and fungi, are most often isolated from tracheal aspirates from these patients, which makes it difficult to determine their role in infection [8–10, 20]. Almost all pathogenic organisms, including the above-mentioned ones and mycobacteria, have the ability to form biofilms on the surface of TTs and to cause BAIs [12–14, 21, 22]. It should be remembered that massive colonization of the tracheostomy tube along with improper care of the patient may lead to the displacement of microorganisms to the lower parts of the respiratory tract and initiation of the inflammatory process [7, 9, 10]. The need for mechanical ventilation is related to endotracheal intubation or tracheostomy and even when this invasive procedure is not combined with ventilation, there is a risk of infection due to the bypassing and impairment of the physiological pathway of this part of the respiratory system. Respiratory tract infections manifested by VAP (ventilator-associated pneumonia) are a serious group in terms of their frequency of occurrence [13].

The aim of this study was to learn about the bacteriological pattern of Gram-positive and Gram-negative PPMs colonizing tracheostomy tubes of civilian patients who underwent tracheotomy and were hospitalized in one of the hospitals in south-eastern Poland. The detailed objectives of the conducted analysis were the identification of the isolated Gram-positive and Gram-negative

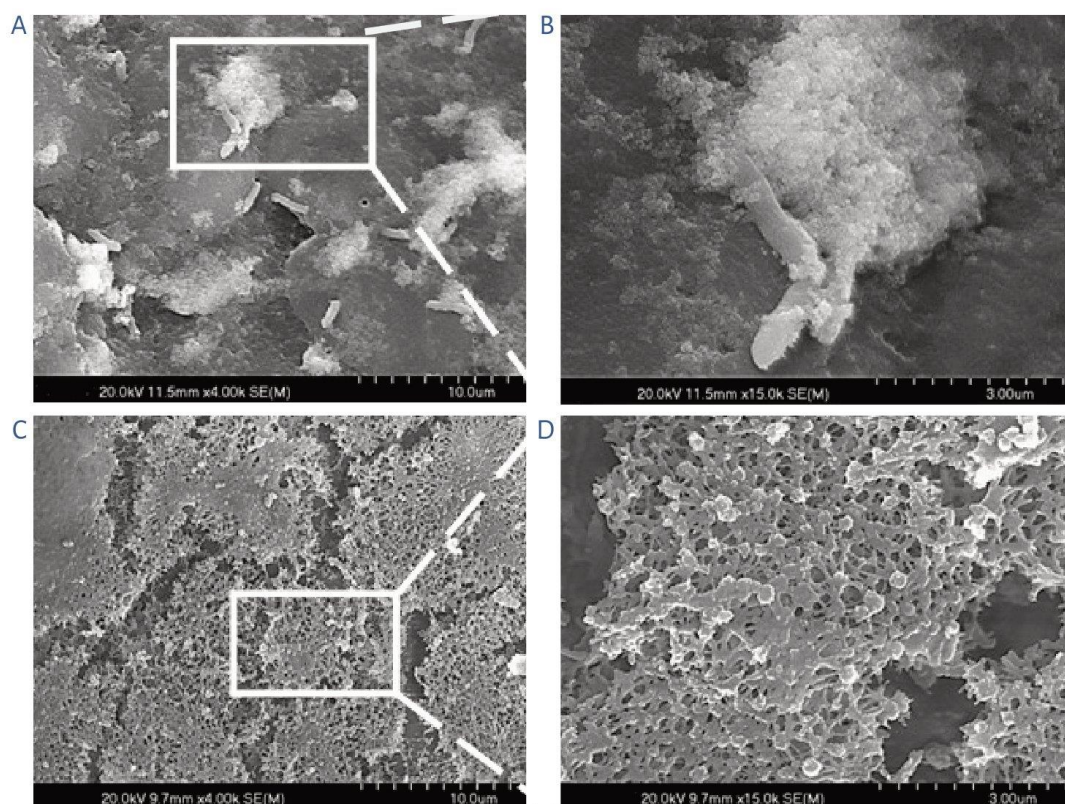


Fig. 2. (A-B) Low (A) and (B) high magnification SEM images of the bacterial biofilms formed on polyvinyl chloride (PVC) tracheostomy tubes obtained from patients 10 days after intubation; (C-D) low (C) and (D) high magnification SEM images of the bacterial biofilms formed on polyvinyl chloride (PVC) tracheostomy tubes obtained from patients 28 days after intubation.

PPMs and the determination of their antibiotic resistance profiles. Additionally, imaging of the resulting bacterial biofilm on the biomaterial of the tracheostomy tube was performed using scanning electron microscopy (SEM).

The present preliminary results constitute the starting point for further work on the modification of the surface of the tracheostomy tube biomaterial, which is aimed at reducing the risk of bacterial biofilm formation and delaying microbial colonization, implemented under the project entitled "Functionalization of the surface of polymeric biomaterials for dedicated implantation applications". In the analysis performed, all TTs collected (100%) were positive for the presence of microorganisms. The strains identified in the case of 9 tubes, in accordance with the assumptions adopted, were classified as non-PPMs due to their common occurrence in the environment and the fact that they constitute the physiological flora of the skin and mucous membranes. Therefore, they were treated as non-pathogenic and determination of their drug resistance profiles was abandoned [2, 9, 24]. It should be remembered that, as opportunistic microorganisms inhabiting the upper respiratory tract and forming biofilms on the biomaterials of the

tracheostomy tube, they can cause a number of infections including corneal ulcer, urinary tract infection, intravenous catheter-related infection, valvular endocarditis and septicemia in immunosuppressed patients [23, 24]. An example of such a microorganism may be the species *P. acnes* usually known as nonpathogenic and a part of the normal microbiota of the skin, oral cavity, gastrointestinal and genitourinary tracts [23]. This species of bacteria has been frequently reported to cause endogenous BAIs associated with the use of biomaterials employed in treatment, including tracheostomy tubes [23]. These infections are most often the result of colonization of the biomaterial at the time of its implantation or as a result of transient bacteremia [12].

In this study, rapid bacterial colonization of the TT biomaterial with the leading species, i.e. *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, occurring within 1 day, was observed in 97.1% of patients of the ORL department. In 2021, research by Baidya et al. confirmed the bacterial colonization of TTs in 78.6% of mechanically ventilated patients with the leading culprits being *Pseudomonas aeruginosa* (31.0%) followed by *Acinetobacter calcoaceticus baumannii* complex (16.9%), *Klebsiella pneumoniae* (16.9%) [21].

In the above study, 72% of the most frequently isolated PPMs from tracheal aspirates were Gram-negative rods, while Gram-positive bacteria accounted for 28%. Similar results of such analyses were obtained by other authors. Namely, Patil et al. showed the dominance of Gram-negative organisms (80.6%) in relation to Gram-positive organisms (19.4%) [9], Khatun et al. Gram-negative 83%, Gram-positive 17% [14]. Overall, 58 PPMs of isolates (10 species) were identified with a predominance of *S. aureus* (35.5%) among Gram-positive bacteria and *K. pneumoniae* (23.8%) among Gram-negative bacteria. Among the Gram-negative PPMs, the most frequently isolated species were: *E. cloacae* (16.7%), *E. coli* (16.7%), *P. aeruginosa* (11.9%), *Proteus* spp. (9.5%), *S. maltophilia* (9.5%), *S. liquefaciens* (4.8%), *S. marcescens* (4.8%) and *A. baumannii* (2.4%). The results of a parallel study conducted by Shrestha et al. in 2021 showed the dominance of the following species among Gram-negative microorganisms colonizing ETTs in 188 patients of the ICU department: *Acinetobacter* spp. (51.82%), *K. pneumoniae* (19.7%), *P. aeruginosa* (16.78%), and *E. coli* (3.64%), while among Gram-positive microorganisms, it was *S. aureus* (4.37%) [25]. For comparison, in their publication, Scholte et al. presented the following data for individual species: *S. aureus* (8–19%), *K. pneumoniae* (7–12%), *P. aeruginosa* (17–33%), *Proteus* spp. (3–7%), and *S. maltophilia* (2–12%) [8]. In a study of bacterial biofilm on tracheostomy tubes by Raveendra et al., the following species were distinguished: *K. pneumoniae* (60%), *A. baumannii* (45%), *P. aeruginosa* (43.3%), *S. aureus* (28.3%), and *E. coli* (28.3%) [20].

Among the 45 tubes analyzed, 17.8% were monomicrobial tubes from which a single bacterial isolate was isolated, 24.4% were bimicrobial tubes with two species of bacteria, and from the remaining 57.8% of tubes three or more species of microorganisms were isolated. In the comparison proposed by Singhai et al., there were 83.3% of monomicrobial tubes and 16.7% of bimicrobial tubes, with polymicrobial tubes not tested [12].

We detected the presence of a high percentage of MDR (50%), XDR (8.6%) and PDR (5.2%) phenotypes in Gram-negative isolates. Singhai et al. (2012) confirmed a large amount (93.8%) of multidrug-resistant Gram-negative microorganisms causing DRI and a high percentage of ESβL producers (81.3%) in representatives of *K. pneumoniae* [12]. Contrarily, only 4.9% of ESβL-producing *K. pneumoniae* were detected in our study. The same research team noted a high percentage (60%) of multidrug-resistant *S. aureus* isolates [12]. In our study, no strains with the MDR phenotype were identified among the isolated *S. aureus*. Isolation of multidrug-resistant strains (MDR, XDR, PDR) from the tracheostomy tube is most often associated with prior hospitalization and nosocomial infection. In addition, the complex structure of the biofilm and the different physiological characteristics of the microorganisms that make it up partly explain their high resistance to various bactericidal agents, including resistance to antibiotics [8].

REFERENCES

- Moser C.H., Freeman-Sanderson A., Keeven E., et al.: Tracheostomy care and communication during COVID-19: Global interprofessional perspectives. *Am J Otolaryngol.*, 2022; 43(2): 103354. doi: 10.1016/j.amjoto.2021.103354.
- Ji Y., Fang Y., Cheng B., Li L., et al.: Tracheostomy timing and clinical outcomes in ventilated COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care.*, 2022; 26(1): 40. doi: 10.1186/s13054-022-03904-6.

Novel, rational methods of reducing the amount of bacterial biofilm on the surface of tracheostomy tubes are still being looked for. It is very important to develop new biomaterials or to modify the already existing ones that are used for the production of TTs to increase their resistance to microbial adhesion, colonization and biofilm formation. The surface properties of biomaterials can be chemically modified by applying anti-adhesive coatings, changing the surface charge, structure, roughness, chemical activity, as well as hydrophilic and hydrophobic properties [26]. A promising strategy used in the fight against infections associated with the use of biomaterials is the construction of coatings with bactericidal/bacteriostatic properties made of noble metals or other antimicrobial materials [27]. An alternative solution to combat bacterial biofilm is coating TTs with antibiotics, including gentamicin, tobramycin, cephalothin sodium, amoxicillin or vancomycin hydrochloride [28]. It should be remembered that the activity of a number of the available antimicrobial agents on biofilm is significantly limited compared to the activity of these substances on free-flowing cells of the same microbial strains. This is mainly due to the layered structure of the biofilm and the presence of a polysaccharide matrix, which makes it difficult for a number of antimicrobial compounds to penetrate into its structure. In addition, the change in gene expression and the metabolism of microbial cells located in the deeper layers of the biofilm structure lead to a reduced sensitivity to many antimicrobial substances.

Currently, despite continuous research, an ongoing challenge for medicine, microbiology and chemistry is the search for novelty technologies to limit the formation of bacterial biofilms on the surface of TTs or the modification of these surfaces in order to prevent this phenomenon. Scientific literature emphasizes that systemic administration of antibiotics does not prevent bacterial colonization of the tracheostomy tube. Hence, it is necessary to functionalize the tubes with e.g., targeted antibiotics, in order to act on microorganisms directly at the colonization site.

ACKNOWLEDGMENTS

Taking the SEM images was possible thanks to the kindness and friendly support of the Institute of Geological Sciences of the Jagiellonian University in Krakow. The authors would like to special acknowledge Ms. Katarzyna Gasiór-Kulasiak for English language editing.

FUNDING

The research was financially supported by the Jagiellonian University Medical College (Project No. SAP N41/DBS/000128). Lukasz Scibik acknowledges the support of InterDokMed project no. POWR.03.02.00-00-1013/16.

5. Kissin F, Rysz M, Budziszewski M, et al.: Comparison of criteria for elective tracheostomy in head and neck cancer surgery. *Pol J Otolaryngol*, 2021; 75(4): 20–26. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0014.8690>.
6. Raimonde A.J., Westhoven N., Winters R.: Tracheostomy. *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL); 2022; PMID: 32644550.
7. Ferro A., Kotecha S., Auizinger G., et al.: Systematic review and meta-analysis of tracheostomy outcomes in COVID-19 patients. *Br J Oral Maxillofac Surg.*, 2021; 59(9): 1013–1023. doi: 10.1016/j.bjoms.2021.05.011.
8. Scholte J.B.J., Duong H.L., Linssen C. et al.: Empirical antibiotic therapy for pneumonia in intensive care units : a multicentre, retrospective analysis of potentially pathogenic microorganisms identified by endotracheal aspirates cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015; 34: 2295–2305. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2482-y>.
9. Patil T.: The Study of the organisms colonizing trachea in mechanically ventilated patients admitted in the intensive care unit (ICU). *Int J Med Sci Educ*, 2014; 1(1): 39–48.
10. Kumarasinghe D., Wong E., Duvnjak M. et al.: Risk factors associated with microbial colonisation and infection of tracheostomy tubes. *Am J Otolaryngol.*, 2020; 41(4): 102495. doi: 10.1016/j.amjoto.2020.102495.
11. Thorarinsdottir H.R., Kander T., Holmberg A., et al.: Biofilm formation on three different endotracheal tubes: a prospective clinical trial. *Crit Care.*, 2020; 24(1): 382. doi: 10.1186/s13054-020-03092-1.
12. Singhai M., Malik A., Shahid M., et al.: A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. *J Global Infect Dis*, 2012; 4(4): 193–198. doi: <https://doi.org/10.4103/0974-777X.103896>.
13. Badal D., Jayarani A.V., Kollaran M.A., et al.: Pseudomonas aeruginosa biofilm formation on endotracheal tubes requires multiple two-component systems. *J Med Microbiol.*, 2020; 69(6): 906–919. doi: 10.1099/jmm.0.001199.
14. Khatun M.N., Shamsuzzaman S.M., Fardows J., et al.: Identification of Bacterial Isolates from Endotracheal Aspirate of Patients in Intensive Care Unit and Their Antimicrobial Susceptibility Pattern. *J Enam Med Coll*, 2018; 8(2): 67–73. doi: <http://doi.org/10.3329/jemc.v8i2.36728>.
15. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 10.0, Valid from 2020-01-01. Available online: <http://www.eucast.org> (Accessed on: 1 January 2020).
16. Kadri S.S., Adjemian J., Lai Y.L. et al.: Difficult-to-Treat Resistance in Gram-negative Bacteremia at 173 US Hospitals: Retrospective Cohort Analysis of Prevalence, Predictors, and Outcome of Resistance to All First-line Agents. *Clin Infect Dis.*, 2018; 67(12): 1803–1814. doi: 10.1093/cid/ciy378.
17. Ochońska D., Ścibik L., Brzychczy-Włoch M.: Biofilm Formation of Clinical Klebsiella pneumoniae Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity. *Pathogens*, 2021; 10(10): 1345. doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens10101345>.
18. Relucanti M., Familiari G., Donfrancesco O. et al.: Microscopy Methods for Biofilm Imaging: Focus on SEM and VP-SEM Pros and Cons. *Biology (Basel).*, 2021; 10(1): 51. doi: 10.3390/biology10010051.
19. Vestby L.K., Grønseth T., Simm R., et al.: Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel).*, 2020; 9(2): 59. doi: 10.3390/antibiotics9020059.
20. Raveendra N., Rathnakara S.H., Haswani N., et al.: Bacterial Biofilms on Tracheostomy Tubes. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surgery*, 2021; 1–5. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12070-021-25598-6>. Online ahead of print.
21. Baidya S., Sharma S., Mishra S.K. et al.: Biofilm Formation by Pathogens Causing Ventilator-Associated Pneumonia at Intensive Care Units in a Tertiary Care Hospital: An Armor for Refuge. *Biomed Res Int.*, 2021; 2021: 8817700. doi: 10.1155/2021/8817700.
22. de Oliveira Ferreira T., Yoshio Koto R., Fialkovitz da Costa Leite G. et al.: Microbial investigation of biofilms recovered from endotracheal tubes using sonication in intensive care unit pediatric patients. *Braz J Infect Dis*, 2016; 20(5): 468–475. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.07.003>.
23. Achermann Y., Goldstein E.J.C., Coenye T., et al.: Propionibacterium acnes: From Commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 2014; 27(3): 419–440. doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00092-13>.
24. Weyand N.J.: Neisseria models of infections and persistence in the upper respiratory tract. *Pathogens and Disease*, 2017; 75: ftx031. doi: <https://doi.org/doi:10.1093/femspd/ftx031>.
25. Shrestha R., Nayak N., Bhatta D.R. et al.: Antibiogram Profile of Bacteria Colonizing the Endotracheal Tubes (ETs) of Patients Admitted to Intensive Care Units (ICUs) in a Tertiary Care Hospital of Nepal. *Nepal Med Coll J*, 2021; 23(3): 241–246. doi: <https://doi.org/10.2147/IDR.S159764>.
26. Pajerski W., Duch J., Ochońska D.: Bacterial attachment to oxygen-functionalized graphenic surfaces. *Mater Sci Eng C*, 2020; 113: 110972. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110972>.
27. Chen X., Ling X., Liu G., et al.: Antimicrobial Coating: Tracheal Tube Application. *Int J Nanomedicine.*, 2022; 17: 1483–1494. doi: 10.2147/IJN.S353071.
28. Ahmed W., Zhai Z., Gao C.: Adaptive antibacterial biomaterial surfaces and their applications. *Materials Today Bio*, 2019; 2: 100017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2019.100017>.

Table of content: <https://otolaryngologypl.com/resources/html/articlesList?issueId=0> Tables: 3 Figures: 2 References: 28

Copyright: Some right reserved: Polish Society of Otorhinolaryngologists Head and Neck Surgeons. Published by Index Copernicus Sp. z o.o.

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.



The content of the journal „Polish Society of Otorhinolaryngologists Head and Neck Surgeons“ is circulated on the basis of the Open Access which means free and limitless access to scientific data.



This material is available under the Creative Commons – Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0). The full terms of this license are available on: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

Corresponding author: Łukasz Ścibik; Department of Molecular Medical Microbiology, Chair of Microbiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College; 18 Czysza Street, 31-121 Krakow, Poland; e-mail: lukas.scibik@gmail.com / lscibik@swzsk.com.pl

Cite this article as: Scibik L., Ochońska D., Golda-Cepa M., Andrzej Kotarba A., Brzychczy-Włoch M.: Microbiological analysis of tracheostomy tube biofilms and antibiotic resistance profiles of potentially pathogenic microorganisms; *Otolaryngol Pol* 2022; 76(5): 1-14; DOI: 10.5604/01.3001.0015.8827



PUBLIKACJA II

Article

Sonochemical Deposition of Gentamicin Nanoparticles at the PCV Tracheostomy Tube Surface Limiting Bacterial Biofilm Formation

Łukasz Ścibik ^{1,2,3,*}, Dorota Ochońska ¹, Monika Golda-Cępa ², Konrad Kwiecień ⁴, Elżbieta Pamuła ⁴, Andrzej Kotarba ² and Monika Brzychczy-Włoch ^{1,*}

¹ Department of Molecular Medical Microbiology, Chair of Microbiology, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, 18 Czysza Street, 31-121 Krakow, Poland

² Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, 2 Gronostajowa Street, 30-387 Krakow, Poland; mm-golda@uj.edu.pl (M.G.-C.); kotarba@chemia.uj.edu.pl (A.K.)

³ Department of Otolaryngology and Oncological Surgery of the Head and Neck, 5th Military Hospital with Polyclinic in Krakow, 1-3 Wroclawska Street, 30-901 Krakow, Poland

⁴ Department of Biomaterials and Composites, Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology, Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, Poland

* Correspondence: lukasz.scibik@uj.edu.pl (Ł.Ś.); mbrzych@cm-uj.krakow.pl (M.B.-W.)

Abstract: Background: The use of nanotechnology in the production of medical equipment has opened new possibilities to fight bacterial biofilm developing on their surfaces, which can cause infectious complications. In this study, we decided to use gentamicin nanoparticles. An ultrasonic technique was used for their synthesis and immediate deposition onto the surface of tracheostomy tubes, and their effect on bacterial biofilm formation was evaluated. Methods: Polyvinyl chloride was functionalized using oxygen plasma followed by sonochemical formation and the embedment of gentamicin nanoparticles. The resulting surfaces were characterized with the use of AFM, WCA, NTA, FTIR and evaluated for cytotoxicity with the use of A549 cell line and for bacterial adhesion using reference strains of *S. aureus* (ATCC[®] 25923[™]) and *E. coli* (ATCC[®] 25922[™]). Results: The use of gentamicin nanoparticles significantly reduced the adhesion of bacterial colonies on the surface of the tracheostomy tube for *S. aureus* from 6×10^5 CFU/mL to 5×10^3 CFU/mL and for *E. coli* from 1.655×10^5 CFU/mL to 2×10^1 CFU/mL, and the functionalized surfaces did not show a cytotoxic effect on A549 cells (ATCC CCL 185). Conclusions: The use of gentamicin nanoparticles on the polyvinyl chloride surface may be an additional supporting method for patients after tracheostomy in order to prevent the colonization of the biomaterial by potentially pathogenic microorganisms.

Keywords: tracheostomy tube; gentamicin nanoparticles; surface functionalization; bacterial adhesion



Citation: Ścibik, Ł.; Ochońska, D.; Golda-Cępa, M.; Kwiecień, K.; Pamuła, E.; Kotarba, A.; Brzychczy-Włoch, M. Sonochemical Deposition of Gentamicin Nanoparticles at the PCV Tracheostomy Tube Surface Limiting Bacterial Biofilm Formation. *Materials* **2023**, *16*, 3765. <https://doi.org/10.3390/ma16103765>

Academic Editors: Prabir Patra, Ziyad S. Haidar and Dominique de Caro

Received: 11 March 2023

Revised: 5 May 2023

Accepted: 11 May 2023

Published: 16 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Tracheotomy is the most often performed procedure in patients in cases of upper airway obstruction or prolonged mechanical ventilation. Of all patients hospitalized in intensive care units, 12–20% require this treatment [1,2]. Tracheotomy became an object of interest of scientists in March 2020, when WHO announced the COVID-19 pandemic, and gained importance among patients requiring long-term ventilator therapy [3]. This procedure can be performed surgically or percutaneously using dedicated tools. Both techniques are characterized by a minimal risk of complications and can be used in hospitalized patients after considering the contraindications to a given technique [4].

Each medical device that encounters the patient's tissues is exposed to potential contact with pathogenic microorganisms. The tracheostomy tube, due to its application and contact with three different environments—the patient's tissue, air, and secretions—is particularly exposed to the rapid development of bacterial biofilm, and is thus a source of

nosocomial infections [5]. Among the complications of the tracheostomy procedure are local and generalized infections, most often infections associated with long-term mechanical ventilation [6]. For this reason, it is important to develop alternative effective methods of combating emerging biofilm on the surface of medical devices.

In the times of modern medicine, the use of various polymers for dedicated implant applications has become a permanent part of the standards of patient treatment. Polymeric biomaterials are used in each field of medicine to produce external equipment (syringes, catheters, bags, etc.) as well as implants permanently placed inside the human body (vascular stents, breast implants, hip prostheses, etc.) [7]. The dynamic development of nanomaterials and nanopolymers has further consolidated the position of biomaterials in the field of medical science. They have been used, for example, in drug-releasing systems (including drugs used in cancer therapies), anticorrosion coatings of metal implants, or antibacterial membranes used in wound treatment [8]. Among the most popular polymers, polyvinyl chloride is widely used. About 32% of medical devices in hospitals are made of this material [9]. That is the reason why PVC is still extensively investigated to improve its properties and therapeutic functions.

The formation of a biofilm on the surface of biomaterials, including PVC, is one of the biggest problems with recurrent infections. The term bacterial biofilm refers to clusters of bacterial colonies attached to surfaces or to each other and surrounded by a self-created bacterial matrix. The matrix is a mixture of various biochemical substances such as proteins, polysaccharides, and genetic material derived from bacterial colonies. These molecules form a natural protective barrier, the crossing of which is a major challenge in the treatment of biofilm-associated infections. Bacterial colonies suspended in a biofilm are characterized by increased resistance to antibiotics, becoming invisible to the host's immune system and showing greater tolerance to an anaerobic environment with reduced access to nutrients. All these features mean that infections associated with biofilms are usually chronic, and the only effective method to stop them is the removal of the biomaterial and surgical intervention for the inflamed tissue [9,10].

Gentamicin belongs to the aminoglycoside group of antibiotics isolated from *Micromonospora purpurea*. It was discovered in 1963 and introduced for medical use in 1971. Its activity is associated with binding to the 30S subunit of the ribosome, which disrupts the translation process in the bacterial cell. Thanks to its antibacterial properties, it is applied in the treatment of bacterial infections in orthopedics, cardiology, pulmonology, neurology, and laryngology. Unfortunately, it also has several side effects: nephrotoxicity, ototoxicity, or neurotoxicity. Hence, it is important to limit its systemic impact, e.g., by local delivery and action [11]. Its use in the form of nanoparticles acting directly at the place of implantation of the tracheostomy tube may be an alternative to its oral administration, which can substantially reduce its side effects.

In this study, it was decided to synthesize and immediately deposit gentamicin nanoparticles onto the PVC surface using the ultrasonic technique. The use of ultrasounds to produce nanoparticles of controlled size and morphology has proven to be an effective method for various chemical substances including bioactive molecules. When solutions are exposed to ultrasounds (in the range of 20 kHz–1 MHz) the phenomenon of acoustic cavitation leads to bubbles' formation and growth. If the molecules of interest are present in the solution, some population of them is located at the bubble–liquid interface. On reaching a critical volume, the bubbles implode and the dissolved substance located at the interface forms nanoparticles. The molecular mechanism of this phenomenon was recently described elsewhere [12].

Nowadays, nanomedicine has become one of the branches of dynamic research and is mainly focused on the development of new methods of preventing and treating diseases. The use of nanomedicines allows the drug doses used in prevention to be controlled compared to their classic versions [13]. One of the promising research directions in nanomedicine is the use of targeted therapies and drug release in cancer treatment regimens [14]. The main advantage of drugs used in nanomedicine is the possibility of

using lower doses of antibiotics to obtain the same therapeutic effects. This reduces the risk of developing multidrug resistant strains. Nanomedicine can not only reduce the dose of the antibiotic, but also increase its activity. One excellent example of increasing activity while reducing the drug dose is the use of encapsulated vancomycin in hybrid magnetic nanoparticles conjugated to a cell-penetrating peptide to fight against *S. aureus* and *E. coli* strains [15].

The main objective of the work was to functionalize the surface of typical tracheostomy tubes made of polyvinyl chloride (PVC) using oxygen plasma with the sonochemical incorporation of gentamicin nanoparticles. Such a functionalization allows for local antibiotic delivery and the prevention of infections, the most common complication after tracheostomy. The materials were biologically tested in terms of their cytotoxicity (A549 ATCC[®] CCL185) and risk of bacterial adhesion (*Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25923[™], *Escherichia coli* ATCC[®] 25922[™]).

2. Materials and Methods

2.1. Biomaterial Characteristics

In this study, polyvinyl chloride biomaterials supplied by the producer of tracheostomy tubes (SUMI, Sulejów, Poland) were used in the form of cut discs 15 mm in diameter and 2 mm thick, supplied in packages of 50 pieces in sterile conditions.

2.2. Oxygen Plasma Modification

Oxygen plasma (FEMTO system, Diener Electronics, Ebhausen, Germany) was used to generate surface functional groups containing oxygen atoms. Optimization of the plasma modification parameters of polyvinyl chloride samples was carried out using variable oxygen pressure, generator power, and treatment time. The effect of surface functionalization was carried out by monitoring the changes in water contact angle. The measurements were performed using a goniometer (Surftens Universal Instrument, OEG GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany). The images were analyzed using the Surftens 4.3 software (OEG GmbH). For each sample, 5 measurements (droplet volume 2 μ L) were taken and the obtained values were averaged.

2.3. Preparation of Gentamicin Nanoparticles and Their Instant Deposition on PVC Surface

To deposit the antibiotic on the PVC surface, nanoparticles were produced from an aqueous solution of pure gentamicin by sonication, after prior treatment of the surface with oxygen plasma.

The synthesis of gentamicin nanoparticles and their deposition was performed in a single-stage process on a PVC disc with a diameter of 15 mm, modified with oxygen plasma, supplied by the manufacturer of tracheostomy tubes. A solution of gentamicin sulfate in distilled water at a concentration of 50 mg/mL was used for the experiments. The deposition of nanoparticles was carried out using a homogenizer (Vibracell CV18, Sonics & Materials Inc., Newtown, CT, USA). Process parameters: frequency, 20 kHz; amplitude, 30%; time, 6 min. To increase the efficiency of the synthesis of nanoparticles, 0.5 mL of ethanol (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poland) was added to the prepared 3 mL solution of gentamicin. After sonication, the material was dried on adsorptive nonwoven cloth to remove excess solution from the surface [16].

Nanoparticle Tracking Analyses (NTA)

The size distribution of the sonochemically produced gentamicin nanoparticles was determined using an LM10 Nanosight instrument (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) equipped with an sCMOS camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) using a non-blue 450 nm laser. Data analysis was performed using NTA software (3.1 Build 3.1.45). Measurement parameters: camera level, 15; shutter, 1206; gain, 366. A single measurement consisted of three 30 s video clips recorded at 25 frames/s.

2.4. Characterization of Functionalized Biomaterial

2.4.1. Fourier Transform Infrared Microscopy (FTIR)

To investigate the presence of gentamicin nanoparticles on the PVC surface, FTIR analysis was performed. Characteristic bindings for gentamicin were sought. The analysis of the surface was performed using a Nicolet 6700 Thermo Scientific in the range of 4000–650 cm^{-1} , and the resultant spectra were averaged across 64 scans. Spectra in the range of 850–2000 cm^{-1} were used for the analysis, in which the most important changes were observed.

2.4.2. Analysis of Drug Loading on the Biomaterial Surface

For the quantitative analysis of the gentamicin loading, the kinetic of drug release was monitored for parent and modified PVC surfaces. The release profile was studied using the OPA-based method. Each of the prepared discs was placed in a vial with 20 mL of PBS buffer for 5 days and continuously mixed at 100 rpm at 37 °C. To compare the results, an experiment was performed on polyvinyl chloride discs with gentamicin nanoparticles before and after oxygen plasma treatment. At fixed time intervals (2 h), 2 mL of PBS were taken from the vials, the collected liquid was placed in 2 mL Eppendorf tubes, and the vials were replenished with 2 mL of fresh PBS solution. The amount of drug released was quantified using an OPA assay, as described before [17]. Then, 30 mg of OPA (ortho-phthalaldehyde, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in 0.5 mL of methanol (Sigma-Aldrich) and 0.1 mL of mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), and the solution was added to 50 mL of borate buffer (pH = 10.4). The reagent thus obtained was mixed with 50 μL of the collected sample at a fixed time interval in a 1:1 volume ratio and incubated in the dark for 10 min in a black 96-well plate. After that, fluorescence was measured in an excitation wavelength of 340–310 nm and an emission wavelength of 460 nm (FLU-Ostar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

2.4.3. Atomic Force Microscopy (AFM)

The surfaces of PVC samples before and after the plasma treatment were investigated with the use of NanoWizard[®] 4XP (Bruker, Billerica, MA, USA) equipped with SCANASYST-AIR (Bruker) probes. The images (20 × 20 μm , 256 × 256 px) were collected with the set of the following parameters: setpoint, 9.252 nN; Z length, 650 nm; Z speed, 79.11 $\mu\text{m/s}$; px time, 20.54 ms. The analysis was performed with JPK Data Processing software (ver. 7.0.153).

2.5. Microbiological Tests

2.5.1. Bacterial Strains

Two reference (indicator) strains were used in the study, including a representative of the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and a representative of the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* ATCC25922. The strains were from the American Type Culture Collection, ATCC. The selection of strains was based on a previous study of clinical material from patients with a tracheostomy [18].

2.5.2. Quantification of Bacterial Adhesion on the Surface of Polyvinyl Chloride

From the reference bacterial strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* after an 18 h incubation, 0.5 McF suspensions were obtained in Tryptic Soy Broth (TSB). The functionalized and control discs were placed in sterile polystyrene 24-well microtiter plates (Costar[®] Corning) and 1 mL of bacterial inoculum was added. The plates were incubated for 2 h at 37 °C, and the attached bacterial colonies were detached from the biomaterial. The resulting bacterial suspension was plated at 100 μL on Tryptic Soy Agar (TSA, Becton Dickinson) growth medium in serial ten-fold dilutions. After 24 h of incubation at 37 °C, the result was read in CFU/mL.

2.5.3. Evaluation of the Cytotoxicity of Gentamicin (GMNPs) on the A549 Cell Line

The adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell line A549 was used to test the cytotoxicity of gentamicin. Cells were grown in DMEM medium with -L-glutamine supplemented with 10% FBS and 1% ZellShield (MB Minerva Biolabs, Berlin, Germany) at 5% CO₂ and 37 °C with L-alanyl-L-glutamine. Cells were harvested with 0.5% trypsin, suspended in 5 mL DMEM. The cells contained in 1 mL of the suspension were counted and diluted to give 1×10^4 cells per sample. The experiment was carried out in 96-well plates. Then, 200 µL of solution with a decreasing gentamicin concentration (10–0 mg) was added to the cell cultures. The MTT test was used to determine the metabolic activity of the cells. The results were read on an Infinite® M Nano (TECAN) microplate reader at 563 nm after 1 and 24 h of incubation [19].

2.5.4. Evaluation of the Effect of Polyvinyl Chloride Surface on the A549 Cell Line Using the LIVE/DEAD Method

The cell lines were prepared as in Section 2.5.3. PVC discs before and after functionalization were placed in 24-well plates, filled with cell suspension, and incubated for 24 h. Then, double staining was applied to the tested surfaces using the LIVE/DEAD® kit (Live/Dead Cell Double Staining Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The use of the double staining method using the LIVE/DEAD kit allows for an easy and quick determination of cell viability in a population based on the integrity of the cell membrane. Fluorescein diacetate, due to its low molecular weight, can penetrate inside the cell with preserved cytoplasmic membranes. The second dye, propidium iodide, PI, having a high molecular weight, penetrates only into cells with damage in the cytoplasmic membrane. The dyes used in a fluorescence microscope BX63 (Olympus, Tokyo, Japan) divide the cells into live (green fluorescence) and dead (red fluorescence) [20].

2.6. Statistic

All experiments were performed in triplicate on separate samples. The data were treated using the Statistica software 13.1 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA), applying parametric *t*-student tests, and a *p*-value < 0.05 was considered statistically significant. The error presented in the figures represents the standard deviation of the data.

3. Results

3.1. Optimization of Oxygen Plasma Parameters

The systematic water contact angle measurements were taken for PVC material treated with oxygen plasma with the use of the following sets of parameters: 50 W, 0.2 mbar, 6–600 s (Figure 1). The contact angle for PVC without surface modification by plasma was $86^\circ \pm 2^\circ$. The smallest contact angle of the surface was obtained after 180 s of plasma treatment with a power of 50 W and a pressure of 0.2 mbar of oxygen, and was equal to $32^\circ \pm 2^\circ$. From the profile in Figure 1, the contact angle decreased most rapidly for the first 12 s of plasma exposure, and then the curve flattened out and decreased after 180 s before increasing again.

Based on the results, it was found that the most optimal parameters for modifying the PVC surface with oxygen plasma were 180 s, 50 W, and 0.2 mbar.

The formation of reactive functional groups containing oxygen atoms increased the hydrophilicity of the surface. It is important that this process takes place without damaging the bulk properties of the surface, which were tested by the AFM observation described in the next section.

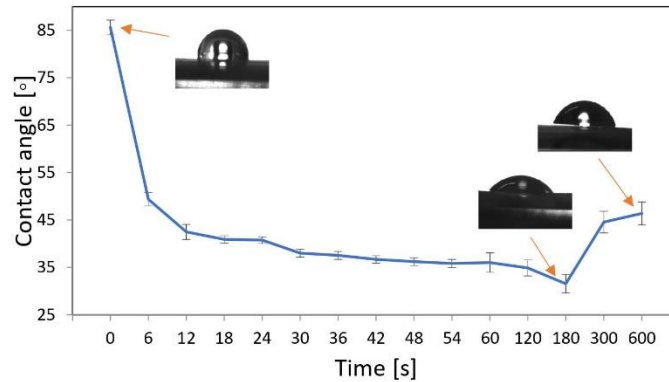


Figure 1. Changes in water contact angle as a function of oxygen plasma treatment time 0–600 s, 50 W, 0.2 mbar. The lowest contact angle was obtained for samples treated for 180 s.

3.2. AFM Imaging for Polymer Topography

The topography of the parent and oxygen-plasma-modified PVC surface was characterized by AFM. The comparison is shown in Figure 2. The surfaces represent typical polymeric materials with characteristic groves that originated from the production process. Additionally, some nanometric debris can be noted. In general, the same topography was essentially observed for both samples, indicating that the plasma treatment did not change it at the microscale. It is also worth mentioning that the changes in contact angle resulted from the polar functional groups generated by the applied mild plasma treatment, and not from the topographical changes. Such effects have been previously reported for other polymeric materials [21].

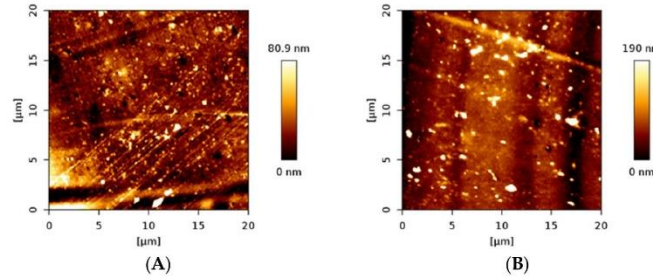


Figure 2. The AFM images of unmodified (A) and plasma (50 W, 0.2 mbar of O² and 180 s)-modified (B) PVC surfaces.

3.3. Analysis of Gentamicin Nanoparticles' Size

Figure 3 shows the size distribution of sonochemically prepared gentamicin nanoparticles. Several maxima in the range of 50–350 nm can be distinguished. The first ones, at 50 and 75 nm, were sharp and high, while the other maxima were wider and lower. For the design and manufacture of drug delivery systems, the size distribution of nanoparticles is crucial, and the use of the NTA technique provides this information in detail. The analysis took 90 s, which was enough time to observe the nanoparticles' agglomeration, so several successive peaks with lower maxima can be observed. The maxima representing individual nanoparticles were those with the highest intensity, i.e., 50 and 75 nm, and the numerous maxima at ~125, 150, 225, and 375 nm were multiplications associated with the aggregation process over time. The intensity of the last maxima increased with time.

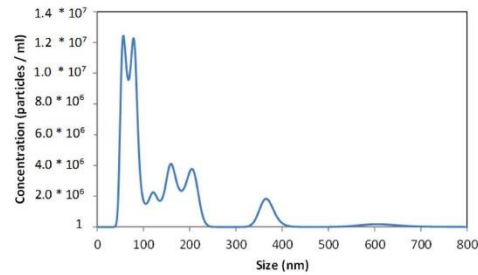


Figure 3. NTA imaging. Size distribution of gentamicin nanoparticles obtained sonochemically.

3.4. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The analysis of the IR spectra showed no effect of the oxygen plasma on the PVC structure (Figure 4). The spectrum for the gentamicin-loaded polymeric sample showed characteristic absorption bands at 1616, with 1558 cm^{-1} belonging to the amide I (C=O stretching mode), and amide II (N–H bending mode, and C–N stretching mode) present in gentamicin. The peak located at 1030 cm^{-1} was associated with the HSO_4^- group characteristic for the sulfate form of the drug [22]. In the $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ region, a broad maximum, observed for gentamicin functionalized PVC, was associated with hydrogen-bonded OH groups, indicating their involvement in the surface anchoring of the drug. The presence of these peaks confirms that gentamicin nanoparticles were successfully embedded into the PVC surface. No structural changes in the drug molecule or biomaterial bulk properties were observed after the functionalization (plasma and ultrasound treatments). These observations are essential for preserving the bioactivity of the antibiotic and providing a therapeutic function for the PVC material.

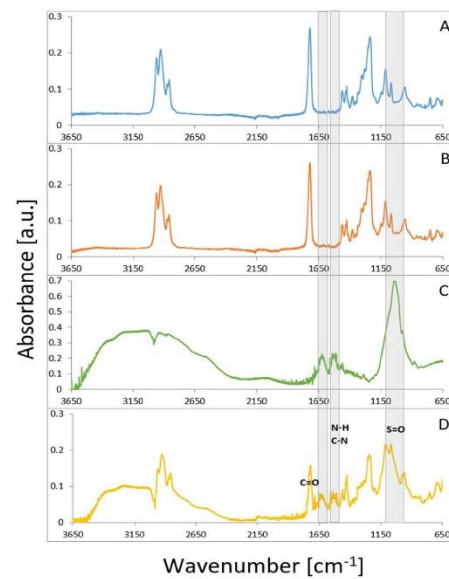


Figure 4. FTIR spectra of PVC (A), oxygen-plasma-modified PVC (B), gentamicin sulfate (C) and after sonochemical incorporation of gentamicin nanoparticles onto the PVC surface (D). Gray shadowing indicates characteristic regions for gentamicin sulfate.

3.5. Drug Loading on the Surface of PVC

The gentamicin release kinetics method was used to quantify the loading efficiency of gentamicin on the PVC surface and the effect of its plasma functionalization. As the concentration in the substrate solution was too high to assess the residual concentration of gentamicin after the sonification, the drug loading was estimated to be at the obtained concentration of the release study, when the amount of gentamicin in the buffer solution had not been rising anymore. All of the drug has been released from the surface of modified and unmodified samples in 8 h and 2 h, respectively. The comparison between the samples before and after oxygen plasma treatment is shown in Figure 5. The release profiles show an eight-fold increase in the amount of gentamicin for the sample with surface oxygen groups (orange curve) compared to the untreated sample (blue curve). It can thus be concluded that the generated surface groups led to the formation of adsorption sites for the effective non-covalent bonding of gentamicin molecules on the PVC surface. Such a spectacular effect of increasing the drug loading on the PVC has important practical implications. The ~1.5 mg of gentamicin on the polymeric biomaterial surface of ~2 cm² was within the therapeutic window for in-site release, e.g., gentamicin-loaded sponges, Garamycin Sponge (EUSA Pharma, Hertfordshire, UK) [23].

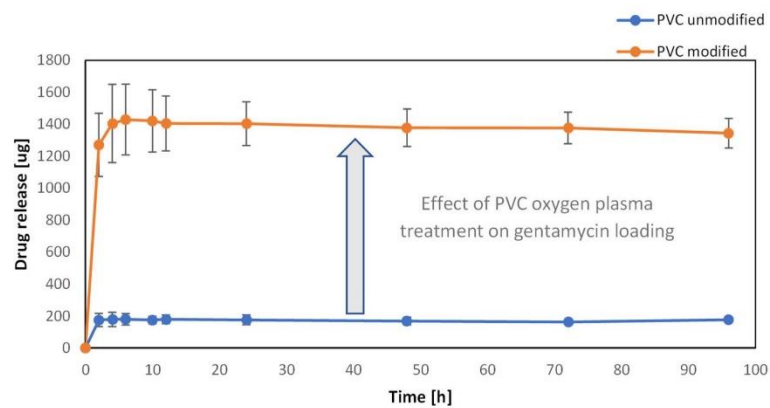


Figure 5. Kinetic curves of gentamicin release from the surface of PVC, functionalized (orange graph) and not functionalized (blue graph) with oxygen plasma (180 s, 50 W, 0.2 mbar).

3.6. Adhesion of Bacteria on the Surface of the Biomaterial

The study assessed the effect of the surface of polyvinyl chloride with gentamicin nanoparticles on the adhesion of bacteria (test group) in relation to the control group, which was a sterile, non-functionalized disc (Figure 6). The average CFU/mL from the tested samples of the tested bacterial strains of *S. aureus* and *E. coli* was determined. The antibacterial property was shown to decrease the number of bacteria from 5.77 log CFU/mL to 3.69 log CFU/mL of PVC modified with gentamicin nanoparticles (GMNPs) against *S. aureus* ATCC25923 ($p < 0.05$). The antibacterial property was demonstrated by a decrease in the number of bacteria from 5.2 log CFU/mL to 1.26 log CFU/mL PVC modified with gentamicin nanoparticles (GMNPs) against *E. coli* ATCC25922 ($p < 0.05$). A statistically significant inhibitory effect of nanoparticles on adhesion to polyvinyl chloride was confirmed.

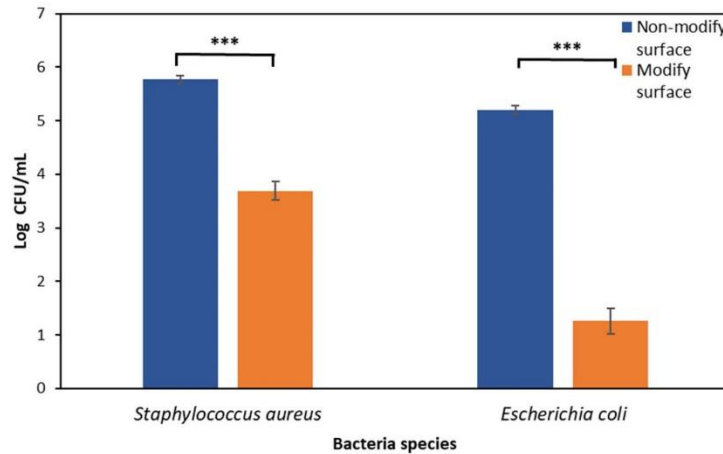


Figure 6. Logarithm of the CFU after incubation of the bacterial suspension at a concentration of 0.5 McF on the PVC surface (orange graph) and on the PVC surface with gentamicin nanoparticles (blue graph) for 2 h for *S. aureus* and *E. coli* (***) results statistically significant between the indicated surfaces, $p < 0.001$, Student's *t*-test).

3.7. Cytotoxic Effect of Gentamicin Nanoparticles on A549 Cell Line

To investigate the effect of gentamicin nanoparticles on the A549 cell line and their survival, the MTT colorimetric test was performed to determine half of the maximum inhibitory concentration after exposure to gentamicin (Figure 7). IC-50 was evaluated in 2-time intervals (1 and 24 h), setting its value at the level of 1.25 mg/200 μ L (6.25 mg/1 mL). The greatest decrease in viable cells was observed after exceeding the concentration of 0.31 mg/200 μ L (1.55 mg/1 mL) from 95% to 60% at a concentration of 0.63 mg/200 μ L (3.15 mg/1 mL). No increased cytotoxicity was observed with the time of exposure to the antibiotic.

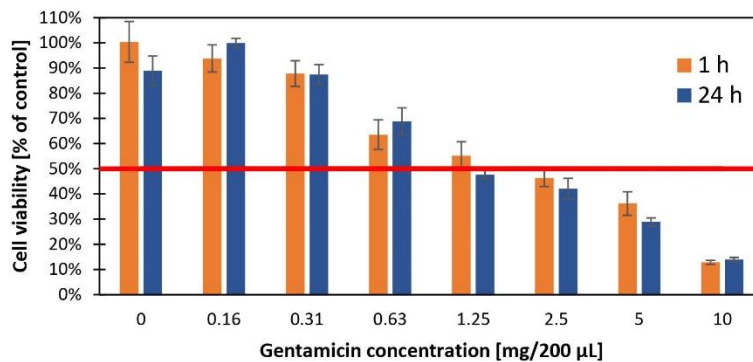


Figure 7. Evaluation of the cytotoxicity (relative to the control) of the gentamicin concentration against the A549 cell line after 1 h (orange) and 24 h (blue) incubation using the MTT colorimetric assay. The results were read using a TECAN reader at a wavelength of 563 nm. A 50% inhibition of growth of the cell population tested is indicated by a horizontal red line.

3.8. Cytotoxicity of the Tested Surfaces on the A549 Cell Line

In the cytotoxicity evaluation study on the A549 cell line, no significant effect of functionalized surfaces (Figure 8A,B) was observed in relation to the control group (Figure 8C,D)

on cell death, which proves its biocompatibility. The dyes used in a LIVE/DEAD method divided the cells under a fluorescence microscope into live (green fluorescence) and dead (red fluorescence), which can be seen in the figure below.

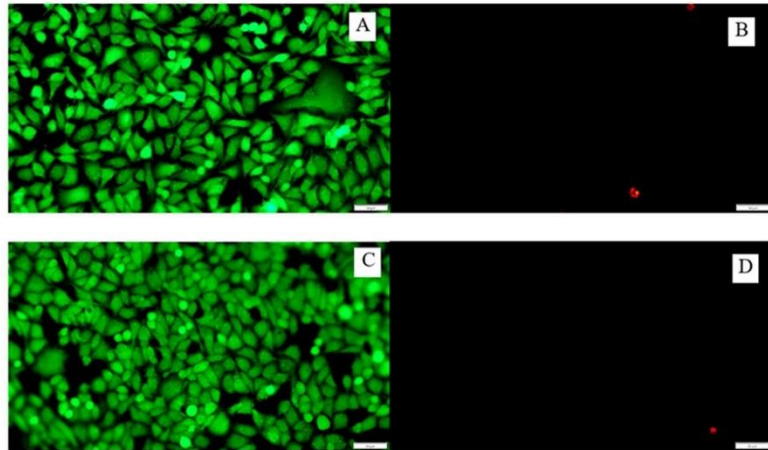


Figure 8. Cells of the A549 line seen under a fluorescence microscope after 24 h incubation on PVC discs without modification (A,B) and with gentamicin nanoparticles (C,D). The LIVE/DEAD method was used to image the cells. Live cells were stained green, dead cells stained red. White bars correspond to 50 μm .

4. Discussion

This paper highlights the possibility of the sonochemical incorporation of antibiotics on the surface of the tracheostomy tube to slow down bacterial adhesion. Similar studies on gentamicin and its bactericidal properties were carried out on other materials in different forms or using different technologies for its placement on the surface, as well.

The choice of an antibiotic for the functionalization of the polyvinyl chloride surface was dictated by scientific reports [18,24]. Ravenendra et al., in their research on bacterial biofilm, pointed to the greatest effectiveness of gentamicin and ciprofloxacin in the fight against bacterial biofilm on the surface of the tracheostomy tube [24]. In our own research on bacterial biofilm, we also noted the high effectiveness of gentamicin against bacterial strains isolated from patients with a tracheostomy [18]. The use of gentamicin for the treatment of infections of the etiology of Gram-negative aerobic bacteria was a breakthrough in the prevention of biofilm formation on their basis, including for those associated with the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. For over 50 years of its history, infections caused by multidrug-resistant bacteria have been successfully treated, e.g., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus* spp. Initially used parenterally since the 1990s, gentamicin has been used for topical treatment in the form of a collagen sponge, ointment, inhalation, and others in the rapidly developing branch of nanomedicine [25].

In most cases, however, polymer surfaces are chemically inert and devoid of reactive groups that can bind to other molecules on their surface. To increase the adhesive properties of the poly (vinyl chloride) surface, oxygen plasma treatment was used, thanks to which functional groups containing oxygen were generated. Such polar groups make the surface hydrophilic and form active centers for gentamicin molecule adsorption. The drugs can later be delivered to a specific environment because of the action of stimuli-responsive polymers [26]. In addition, the -COOH and -OH groups, due to the accumulated local charges, may negatively affect the adhesion of bacterial cells, thus preventing infection of the functionalized surface [27].

The effect of plasma treatment was monitored using the value of the contact angle of the surface. The preferential contact angle for biomaterials used in medicine should be less than 65 degrees [28]. This is important for biocompatibility with the tissues surrounding the biomaterial. The moderate hydrophilic properties of the biomaterial provide optimal conditions for cell proliferation and differentiation [29]. In addition, the hydrophilic character of the material reduces the adhesion of bacteria to the surface. In this work, the optimal parameters at which the smallest contact angle of the surface ($32^\circ \pm 2^\circ$) was obtained were reached after 180 s of exposure to 50 W plasma and 0.2 mbar oxygen pressure. Comparable results were obtained by Balazs [30]. In his experiment, after 120 s of oxygen plasma operation, the percentage of concentration of oxygen atoms on the PVC surface was the highest.

Such a strategy of surface functionalization with gentamicin on another popular medical polymer—polyethylene—has been reported elsewhere [31]. In another study, Bo-Yu Peng emphasized that the process of PVC depolymerization in the presence of intestinal bacteria is inhibited by using gentamicin. This additionally emphasizes the importance of using this antibiotic in our study on tracheostomy tubes [32].

Gentamicin nanoparticles were created and incorporated into the biomaterial using a homogenizer and ultrasonic technology. The sonochemical process can be used for the formation of nanoparticles of bioactive substances but also, which is of particular interest, the ultrasonic waves facilitate the direct embedment of the nanoparticles into the polymeric surfaces. This is due to ultrasonic energy access, which facilitates the loosening of the polymeric material structure. Such a sonochemical method was successfully employed for the fabrication and embedment of gentamicin nanoparticles into the surface of parylene C used for metal implant coating [16]. Here, we applied the same approach and showed that the method can be used for the functionalization of the PVC material used for the production of tracheostomy tubes.

We did not find gentamicin macromolecules in the tested solution, and the largest nanoparticles had a size of ~350 nm. The largest number of nanoparticles was obtained for a size of 50–75 nm. In a study by Kamal et al. [33], using the sol-gel method, they obtained nanoparticles with a size of 68 nm and confirmed their higher efficiency compared to standard gentamicin. The multiplicity of nanoparticles is of great importance in phagocytosis and pinocytosis. The larger the nanoparticle, the more difficult it is for it to get inside the cell using the above mechanisms. Hence, the smaller the size of the nanoparticle, the greater its biological activity [34]. Since drug nanoparticles are directly deposited on the polymeric surface during the sonochemical process, their stability in the solutions were of secondary importance for the proposed approach and we did not investigate it in detail.

In our study, the loading of gentamicin was performed in two steps. In the first stage, as a result of surface treatment with oxygen plasma, covalent bonds of groups -CO, COOH, OH with the PVC surface were formed. In the second stage, non-covalent bonds were formed between the functionalized surface and gentamicin (through the use of a large number of weak interactions such as electrostatic, ionic, van der Waals and hydrophobic interactions, adsorption, and hydrogen bonds) [25].

According to the analysis of bacterial adhesion on the PVC surface, it was possible to reduce the population of selected strains statistically significantly. Reducing the number of multidrug-resistant bacteria reduces the risk of developing systemic infections, including pneumonia, due to prolonged mechanical ventilation.

The therapeutic dose of gentamicin administered parenterally is 3–6 mg/kg of body weight per day [35]. Due to the narrow therapeutic range, patients should be monitored, especially those with impaired renal function. Gentamicin penetrates well into soft tissues (the highest concentration in the kidneys was 25–100 times higher than in serum), but in the bronchial secretion it is only 25%, which limits its use in patients with a tracheostomy [36]. Therefore, in the case of indications for its administration, it seems important to deliver it topically. The incorporation of gentamicin nanoparticles onto the surface of the tracheostomy tube enables the use of smaller doses of the antibiotic to fight

infections resulting from the presence of an artificial opening in the patient's neck. The tests performed confirmed the possibility of using the sonochemical method to functionalize the surface of the polyvinyl chloride material.

An important aspect is the cytotoxicity of gentamicin, especially in terms of its nephrotoxicity, neurotoxicity, and ototoxicity. Research by Kovacik et al. [37] on VERO cell lines (kidney epithelial cells extracted from African green monkeys) showed a decrease in cell survival and the inhibition of mitochondrial activity at gentamicin concentrations above 2 mg/mL. Similarly, research by Rathbone et al. [38], who evaluated the effect of various antibiotics, including gentamicin, on osteoblast viability, showed a decrease in cell count (>75%) with higher doses of gentamicin (>2 mg/mL). Our studies showed a decrease in the cell viability of the A549 line at concentrations >1.5 mg/mL; however, they seem to be more resistant to gentamicin, as at concentrations of 6.25 mg/mL 50% of the cells remained viable.

5. Conclusions

The incorporation of nanoparticles onto the surface of tracheostomy tubes can significantly reduce the adhesion of bacteria to their surface and, thus, inhibit the formation of a bacterial biofilm. These studies provide a good example of how to effectively fight microorganisms while reducing the dose of gentamicin through targeted on-site delivery. They also illustrate the efficacy of combined oxygen plasma (generation of surface polar groups) and sonochemical (embedding of gentamicin nanoparticles) functionalization of the PVC tracheostomy tubes to improve their therapeutic and bactericidal performance.

Author Contributions: Conceptualization, Ł.Ś., M.B.-W., A.K. and E.P.; methodology, Ł.Ś., M.G.-C., M.B.-W., K.K., E.P. and A.K.; validation, Ł.Ś., M.G.-C., D.O., M.B.-W. and A.K.; formal analysis, Ł.Ś.; investigation, Ł.Ś.; resources, Ł.Ś.; data curation, Ł.Ś., M.G.-C., D.O. and K.K.; writing—original draft preparation, Ł.Ś.; writing—review and editing, Ł.Ś., M.G.-C., M.B.-W., A.K., K.K. and E.P.; visualization, Ł.Ś. and M.G.-C.; supervision, M.B.-W. and A.K.; funding acquisition, Ł.Ś. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by InterDokMed grant number POWR.03.02.00-00-I013/16.

Institutional Review Board Statement: Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of The Jagiellonian University in Krakow, Poland (KBET/1072.6120.153.2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: Lukasz Ścibik acknowledges the support of InterDokMed project no. POWR.03.02.00-00-I013/16. The BX63 fluorescence microscope (Olympus) used in the research was funded from the budget of the qLIFE Priority Research Area under the Strategic Program Excellence Initiative at Jagiellonian University.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Abril, M.K.M.; Berkowitz, D.M.; Chen, Y.M.; Waller, L.A.; Martin, G.S.M.; Kempker, J.A.M. The Epidemiology of Adult Tracheostomy in the United States 2002–2017: A Serial Cross-Sectional Study. *Crit. Care Explor.* **2021**, *3*, e0523. [[CrossRef](#)]
2. Lewith, H.; Athanassoglou, V. Update on management of tracheostomy. *BJA Educ.* **2019**, *19*, 370–376. [[CrossRef](#)]
3. Ferro, A.; Kotecha, S.; Auzinger, G.; Yeung, E.; Fan, K. Systematic review and meta-analysis of tracheostomy outcomes in COVID-19 patients. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2021**, *59*, 1013–1023. [[CrossRef](#)]
4. Klotz, R.; Probst, P.; Deininger, M.; Klaiber, U.; Grummich, K.; Diener, M.K.; Weigand, M.A.; Büchler, M.W.; Knebel, P. Percutaneous versus surgical strategy for tracheostomy: A systematic review and meta-analysis of perioperative and postoperative complications. *Langenbecks Arch. Surg.* **2018**, *403*, 137–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ochońska, D.; Ścibik, Ł.; Brzychczy-Włoch, M. Biofilm Formation of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity. *Pathogens* **2021**, *10*, 1345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Delaney, A.; Bagshaw, S.M.; Nalos, M. Percutaneous dilatational tracheostomy versus surgical tracheostomy in critically ill patients: A systematic review and meta-analysis. *Crit. Care* **2006**, *10*, R55. [CrossRef]
7. Ratner, B.D.; Zhang, G. A History of Biomaterials. *Biomater. Sci.* **2020**, *21*–34. [CrossRef]
8. Bayda, S.; Adeel, M.; Tuccinardi, T.; Cordani, M.; Rizzolio, F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* **2019**, *25*, 112. [CrossRef]
9. Lebeaux, D.; Ghigo, J.M.; Beloin, C. Biofilm-related infections: Bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2014**, *78*, 510–543. [CrossRef]
10. Vestby, L.K.; Grønseth, T.; Simm, R.; Nesse, L.L. Bacterial Biofilm and Its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics* **2020**, *9*, 59. [CrossRef]
11. Chytrosz-Wrobel, P.; Golda-Cepa, M.; Kubisiak, P.; Kulig, W.; Cwiklik, L.; Kotarba, A. Sonochemical Formation of Fluorouracil Nanoparticles: Toward Controlled Drug Delivery from Polymeric Surfaces. *ACS Appl. Nano Mater.* **2023**, *6*, 4271–4278. [CrossRef]
12. Chaves, B.J.; Tadi, P. Gentamicin. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2022. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557550/> (accessed on 1 May 2022).
13. Yang, Z.; Kang, S.G.; Zhou, R. Nanomedicine: De novo design of nanodrugs. *Nanoscale* **2014**, *6*, 663–677. [CrossRef]
14. Taheri-Ledari, R.; Zhang, W.; Radmanesh, M.; Mirmohammadi, S.S.; Maleki, A.; Cathcart, N.; Kitaev, V. Multi-Stimuli Nanocomposite Therapeutic: Docetaxel Targeted Delivery and Synergies in Treatment of Human Breast Cancer Tumor. *Small* **2022**, *16*, 2002733. [CrossRef]
15. Zhang, W.; Taheri-Ledari, R.; Hajizadeh, Z.; Zolfaghari, E.; Ahghari, M.R.; Maleki, A.; Hamblin, M.R.; Tian, Y. Enhanced activity of vancomycin by encapsulation in hybrid magnetic nanoparticles conjugated to a cell-penetrating peptide. *Nanoscale* **2020**, *12*, 3855–3870. [CrossRef] [PubMed]
16. Golda-Cepa, M.; Chytrosz, P.; Chorylek, A.; Kotarba, A. One-step sonochemical fabrication and embedding of gentamicin nanoparticles into parylene C implant coating: Towards controlled drug delivery. *Nanomedicine* **2018**, *14*, 941–950. [CrossRef] [PubMed]
17. Kwieciński, K.; Pudelko, I.; Knap, K.; Reczyńska-Kolman, K.; Krok-Borkowicz, M.; Ochońska, D.; Brzychczy-Włoch, M.; Pamuła, E. Insight in Superiority of the Hydrophobized Gentamicin in Terms of Antibiotics Delivery to Bone Tissue. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12077. [CrossRef] [PubMed]
18. Ścibik, Ł.; Ochońska, D.; Golda-Cepa, M.; Brzychczy-Włoch, M.; Kotarba, A. Microbiological analysis of tracheostomy tube biofilms and antibiotic resistance profiles of potentially pathogenic microorganisms. *Otolaryngol. Pol.* **2022**, *76*, 1–13. [CrossRef]
19. Śliwka, L.; Wiktorska, K.; Suchocki, P.; Milczarek, M.; Mielczarek, S.; Lubelska, K.; Cierpień, T.; Łyżwa, P.; Kielbasiński, P.; Jaromin, A.; et al. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0155772. [CrossRef]
20. ibidi GmbH, Version 2.0 (Online). 2015. Available online: https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN33_Live_Death_staining_with_FDA_and_PI.pdf (accessed on 2 November 2022).
21. Golda-Cepa, M.; Brzychczy-Włoch, M.; Engvall, K.; Aminlashgari, N.; Hakkarainen, M.; Kotarba, A. Microbiological investigations of oxygen plasma treated parylene C surfaces for metal implant coating. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *52*, 273–281. [CrossRef]
22. Cavalu, S.; Roiu, G.; Pop, O.; Heredea, D.A.P.; Costea, T.O.; Costea, C.F. Nano-Scale Modifications of Amniotic Membrane Induced by UV and Antibiotic Treatment: Histological, AFM and FTIR Spectroscopy Evidence. *Materials* **2021**, *14*, 863. [CrossRef]
23. Maczynska, B.; Secewicz, A.; Smutnicka, D.; Szymczyk-Ziółkowska, P.; Dudek-Wicher, R.; Junka, A.; Bartoszewicz, M. In vitro efficacy of gentamicin released from collagen sponge in eradication of bacterial biofilm preformed on hydroxyapatite surface. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0217769. [CrossRef]
24. Raveendra, N.; Rathnakara, S.H.; Haswani, N.; Subramaniam, V. Bacterial Biofilms on Tracheostomy Tubes. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2021**, *74*, 4995–4999. [CrossRef] [PubMed]
25. Chen, C.; Chen, Y.; Wu, P.; Chen, B. Update on new medicinal applications of gentamicin: Evidence-based review. *J. Formos. Med. Assoc.* **2014**, *113*, 72–82. [CrossRef]
26. Akdogan, E.; Sirin, H.T. Plasma surface modification strategies for the preparation of antibacterial biomaterials: A review of the recent literature. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *131*, 112474. [CrossRef]
27. Rezaei, F.; Shokri, B.; Sharifian, M. Atmospheric-pressure DBD plasma-assisted surface modification of polymethyl methacrylate: A study on cell growth/proliferation and antibacterial properties. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *360*, 641–651. [CrossRef]
28. Vogler, E.A. Water and the Acute Biological Response to Surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1999**, *10*, 1015–1045. [CrossRef] [PubMed]
29. Shafei, S.; Foroughi, J.; Chen, Z.; Wong, C.S.; Naebe, M. Short Oxygen Plasma Treatment Leading to Long-Term Hydrophilicity of Conductive PCL-PPy Nanofiber Scaffolds. *Polymers* **2017**, *9*, 614. [CrossRef]
30. Balazs, D.; Favez, D.; Chevotot, Y.; Xanthopoulos, N.; Granges, C.; Aronsson, B.-O.; Sidouni, F.; Descouts, P.; Mathieu, H.J. Surface modification of PVC endotracheal tubes: Oxygen plasma treatment and aging effects. *Eur. Cells Mater.* **2001**, *1*, 18–24.
31. Kumar, R.M.; Gupta, P.; Sharma, S.K.; Mittal, A.; Shekhar, M.; Kumar, V.; Kumar, B.M.; Roy, P.; Lahiri, D. Sustained drug release from surface modified UHMWPE for acetabular cup lining in total hip implant. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *77*, 649–661. [CrossRef]
32. Peng, B.-Y.; Chen, Z.; Chen, J.; Yu, H.; Zhou, X.; Criddle, C.S.; Wu, W.-M.; Zhang, Y. Biodegradation of Polyvinyl Chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Environ. Int.* **2020**, *145*, 106106. [CrossRef]

33. Kamal, R.; Kahdhum, Q.A.; Mohammed, A.I.; Essa, A.J.; Elhamid, M.A.A.; Mohamad, E.A. Evaluation the Biological Activity of Nano-Gentamicin Prepared and Char-acterization of Nanoparticles. *Iraqi J. Ind. Res.* **2021**, *8*, 84–90. [[CrossRef](#)]
34. Barar, J. Bioimpacts of nanoparticle size: Why it matters? *Bioimpacts* **2015**, *5*, 113–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Beraud, G.; Moal, G.; Elsendoorn, A.; Tattevin, P.; Godet, C.; Alfandari, S.; Couet, W.; Roblot, P.; Roblot, F. A survey on the use of gentamicin in infective endocarditis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *31*, 1413–1418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Pennington, J.E.; Reynolds, H.Y. Concentrations of gentamicin and carbenicillin in bronchial secretions. *J. Infect. Dis.* **1973**, *128*, 63–68. [[CrossRef](#)]
37. Kovacik, A.; Tvrda, E.; Fulopova, D.; Cupka, P.; Kovacikova, E.; Zbynovska, K.; Massanyi, P. In Vitro Assessment of Gentamicin Cytotoxicity on the Selected Mammalian Cell Line (Vero cells). *Adv. Res. Life Sci.* **2017**, *1*, 111–116. [[CrossRef](#)]
38. Rathbone, C.R.; Cross, J.D.; Brown, K.V.; Murray, C.K.; Wenke, J.C. Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity. *J. Orthop. Res.* **2011**, *29*, 1070–1074. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW

Kraków, 23.05.2023

Mgr Dorota Ochońska,
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *Microbiological analysis of tracheostomy tube biofilms and antibiotic resistance profiles of potentially pathogenic microorganisms* (Otolaryngol Pol. 2022;76(5):1-13. doi:10.5604/01.3001.0015.8827); oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- opracowaniu metodologii badań z zakresu mikrobiologii
- nadzór nad prawidłowym przebiegiem badania
- walidacja wyników

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Łukasza Ścibika jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Łukasza Ścibika polegający na:

- pracowaniu metodologii badań
- przeprowadzenie wszystkich eksperymentów, walidacja i analiza otrzymanych wyników
- projekt i opracowanie manuskryptu
- finansowanie badań


.....
(podpis współautora)

Kraków, 23.05.2023

Dr inż. Monika Gołda-Cępa
Grupa Chemii Powierzchni i Materiałów, Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Jagielloński

OŚWIADCZENIE

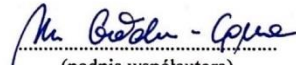
Jako współautor pracy: *Microbiological analysis of tracheostomy tube biofilms and antibiotic resistance profiles of potentially pathogenic microorganisms* (Otolaryngol Pol. 2022;76(5):1-13. doi:10.5604/01.3001.0015.8827); oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- przygotowanie konceptu manuskryptu
- walidacji wyników

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Łukasza Ścibika jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Łukasza Ścibika polegający na:

- opracowaniu metodologii badań
- przeprowadzenie wszystkich eksperymentów, walidacja i analiza otrzymanych wyników
- projekt i opracowanie manuskryptu
- finansowanie badań


(podpis współautora)

Kraków, 23.05.2023

Prof. dr hab. Monika Brzychczy-Włoch
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *Microbiological analysis of tracheostomy tube biofilms and antibiotic resistance profiles of potentially pathogenic microorganisms* (Otolaryngol Pol. 2022;76(5):1-13. doi:10.5604/01.3001.0015.8827); oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- przygotowanie konceptu manuskryptu
- opracowaniu metodologii badań z zakresu mikrobiologii
- walidacja wyników i korekta manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Łukasza Ścibika jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Łukasza Ścibika polegający na:

- opracowaniu metodologii badań
- przeprowadzenie wszystkich eksperymentów, walidacja i analiza otrzymanych wyników
- projekt i opracowanie manuskryptu
- finansowanie badań

Zakład Molekularnej
Mikrobiologii Medycznej UJ CM
Monika Brzychczy-Włoch
prof. dr hab. Monika Brzychczy-Włoch
kierownik

.....
(podpis współautora)

Kraków, 23.05.2023

Prof. dr hab. Andrzej Kotarba
Grupa Chemii Powierzchni i Materiałów, Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Jagielloński

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *Microbiological analysis of tracheostomy tube biofilms and antibiotic resistance profiles of potentially pathogenic microorganisms* (Otolaryngol Pol. 2022;76(5):1-13. doi:10.5604/01.3001.0015.8827); oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na**:


- przygotowanie konceptu manuskryptu
- walidacja wyników i korekta manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Łukasza Ścibika jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Łukasza Ścibika polegający na:

- opracowaniu metodologii badań
- przeprowadzenie wszystkich eksperymentów, walidacja i analiza otrzymanych wyników
- projekt i opracowanie manuskryptu
- finansowanie badań

prof. dr hab. Andrzej Kotarba


Zespół Chemii Powierzchni
i Materiałów

.....
(podpis współautora)

Kraków, 23.05.2023

Mgr Dorota Ochońska,
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *Sonochemical deposition of gentamicin nanoparticles at the PCV tracheostomy tube surface limiting bacterial biofilm formation* (Materials 2023, 16, 3765. <https://doi.org/10.3390/ma16103765>) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- opracowaniu metodologii badań z zakresu mikrobiologii
- nadzór nad prawidłowym przebiegiem badania
- walidacja wyników

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Łukasza Ścibika jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Łukasza Ścibika polegający na:

- opracowaniu metodologii badań
- przeprowadzenie wszystkich eksperymentów, walidacja i analiza otrzymanych wyników
- projekt i opracowanie manuskryptu
- finansowanie badań


.....
(podpis współautora)

Kraków, 23.05.2023

Dr inż. Monika Gołda-Cępa
Grupa Chemii Powierzchni i Materiałów, Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Jagielloński

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *Sonochemical deposition of gentamicin nanoparticles at the PCV tracheostomy tube surface limiting bacterial biofilm formation* (Materials 2023, 16, 3765. <https://doi.org/10.3390/ma16103765>) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- opracowaniu metodologii badań z zakresu fizykochemii
- nadzór nad prawidłowym przebiegiem badania
- walidacja wyników

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Łukasza Ścibika jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Łukasza Ścibika polegający na:

- opracowaniu metodologii badań
- przeprowadzenie wszystkich eksperymentów, walidacja i analiza otrzymanych wyników
- projekt i opracowanie manuskryptu
- finansowanie badań


(podpis współautora)

Kraków, 23.05.2023

Mgr inż. Konrad Kwiecień,
Katedra Biomateriałów i Kompozytów, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Akademia
Górnictwo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie

OŚWIADCZENIE

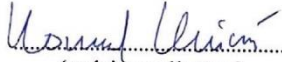
Jako współautor pracy: *Sonochemical deposition of gentamicin nanoparticles at the PCV tracheostomy tube surface limiting bacterial biofilm formation (Materials 2023, 16, 3765. <https://doi.org/10.3390/ma16103765>)* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- opracowaniu metodologii badania kinetyki uwalniania leku
- nadzór nad prawidłowym przebiegiem badania
- walidacja danych i edycja manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek Łukasza Ścibika jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Łukasza Ścibika polegający na:

- opracowaniu metodologii badań
- przeprowadzenie wszystkich eksperymentów, walidacja i analiza otrzymanych wyników
- projekt i opracowanie manuskryptu
- finansowanie badań


(podpis współautora)

Kraków, 23.05.2023

Prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła,
Katedra Biomateriałów i Kompozytów, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Akademia
Górnicza-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *Sonochemical deposition of gentamicin nanoparticles at the PCV tracheostomy tube surface limiting bacterial biofilm formation (Materials 2023, 16, 3765. <https://doi.org/10.3390/ma16103765>)* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- opracowaniu metodologii badania kinetyki uwalniania leku
- nadzór nad prawidłowym przebiegiem badania
- walidacja danych i edycja manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek Łukasza Ścibika jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Łukasza Ścibika polegający na:

- opracowaniu metodologii badań
- przeprowadzenie wszystkich eksperymentów, walidacja i analiza otrzymanych wyników
- projekt i opracowanie manuskryptu
- finansowanie badań



(podpis współautora)

Kraków, 23.05.2023

Prof. dr hab. Andrzej Kotarba
Grupa Chemii Powierzchni i Materiałów, Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Jagielloński

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *Sonochemical deposition of gentamicin nanoparticles at the PCV tracheostomy tube surface limiting bacterial biofilm formation* (Materials 2023, 16, 3765. <https://doi.org/10.3390/ma16103765>) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- przygotowanie konceptu manuskryptu
- opracowaniu metodologii badań z zakresu fizykochemii
- walidacja wyników i korekta manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Łukasza Ścibika jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Łukasza Ścibika polegający na:

- opracowaniu metodologii badań
- przeprowadzenie wszystkich eksperymentów, walidacja i analiza otrzymanych wyników
- projekt i opracowanie manuskryptu
- finansowanie badań

prof. dr hab. Andrzej Kotarba

Zespół Chemii Powierzchni
i Materiałów

.....
(podpis współautora)

Kraków, 23.05.2023

Prof. dr hab. Monika Brzychczy-Włoch
Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *Sonochemical deposition of gentamicin nanoparticles at the PCV tracheostomy tube surface limiting bacterial biofilm formation* (Materials 2023, 16, 3765. <https://doi.org/10.3390/ma16103765>) oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- przygotowanie konceptu manuskryptu
- opracowaniu metodologii badań z zakresu mikrobiologii
- walidacja wyników i korekta manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Łukasza Ścibika jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Łukasza Ścibika polegający na:

- opracowaniu metodologii badań
- przeprowadzenie wszystkich eksperymentów, walidacja i analiza otrzymanych wyników
- projekt i opracowanie manuskryptu
- finansowanie badań

Zakład Molekularnej
Mikrobiologii Medycznej UJ CM

prof. dr hab. Monika Brzychczy-Włoch
kierownik

.....
(podpis współautora)