MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2013, 65: 77 - 86

Analiza *in vitro* skuteczności modyfikowanych olejkami eterycznymi opatrunków absorpcyjnych wobec *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*.

In vitro efficacy analysis of absorbent dressing modified with essential oils, against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.

Budzyńska Aleksandra[1], Sadowska Beata[2], Więckowska-Szakiel Marzena[2], Różalska Barbara[2]

[1] Laboratorium Usług Mikrobiologiczno-Technicznych,
[2] Pracownia Biologii Zakażeń, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Przedstawiono dane potwierdzające możliwość rozszerzenia palety opatrunków, stosowanych w opiece i leczeniu ran przewlekle zakażonych, o opatrunki absorpcyjne modyfikowane fitozwiązkami. Jako obiekt badań użyto handlowo dostępny opatrunek chłonny nie zawierający w składzie środków antyseptycznych. Jego modyfikacja wybranymi olejkami eterycznymi skutkowała ograniczeniem przeżywania *S. aureus* i *C. albicans*, wchłoniętych do warstwy aktywnej.

Słowa kluczowe: *rany przewlekle zakażone, opatrunki aktywne, olejki eteryczne, S. aureus, C. albicans*

ABSTRACT

Introduction: The widespread use of antiseptics for wound dressings, unfortunately, not always effective, prompted us to search for alternative solutions, tailored to individual patient's needs. The aim of the study was checking the validity of the idea to apply some selected essential oils in order to modify active dressings which are routinely used in the care of chronically infected wounds. Our choice is commercially available an absorptive wound dressing which does not contain antiseptics (Sorbact).
Methods: The proposed is modification of dressing by its immersion in essential oil solution and then estimation of the biocide availability and stability during storage. Evaluation of inhibition of microbial surface growth (zone inhibition) and survival of absorbed microorganisms (retentivity by CFU counting) was performed directly after modification and repeated after 7 days of their storage at 4°C.

Results: This study indicated that the dressings containing essential oils can keep absorbed bacteria/fungi inside and efficiently limit their growth. Depending on the properties (composition of volatile fraction) of the tested essential oil, saturated dressings were more active when stored at 4°C for 7 days after their modification. The differences of antimicrobial strength, duration of the effect and retentivity between essential oils used for dressing modification have been shown.
Conclusions: Modification of absorbent dressings with essential oils is a good option to achieve better therapeutic effect. Using a mixture of these four essential in several different quantitative ratios can be considered and is worthy of further research.

Key words: *chronically infected wounds, active dressings, essential oils, S. aureus, C. albicans*

WSTĘP

W przewlekłych miejscowych zakażeniach, w których aktywne opatrunki są stosowane w terapii lub opiece paliatywnej, na czołowych miejscach plasują się zakażenia miejsca operowanego, niegojące się rany odleżynowe, „stopa cukrzycowa", owrzodzenia żylne podudzi i owrzodzenia nowotworowe. Problemy jakie występują w ich pielęgnacji to nieuchronne zakażenie zmian generujące, z uwagi na postępującą martwicę tkanek, przykry zapach i znaczny wysięk, silny ból i krwawienie w czasie opatrunku. Nikła skuteczność antybiotykoterapii tego typu zakażeń przewlekłych, u których podłoża niewątpliwie leży tworzenie struktur biofilmu, pociąga za sobą niekorzystne konsekwencje zdrowotne dla pacjenta oraz straty ekonomiczne związane z koniecznością zastosowania kolejnych zabiegów leczniczych i pielęgnacyjnych. W naszym przekonaniu wymusza to wyjście poza ramy ogólnie pojętej klasycznej medycyny i skłania do dania metodom niestandardowym szansy zaistnienia. W przypadku niegojących się owrzodzeń nie tylko opanowanie zakresu zakażenia, ale też ograniczenie emisji zapachu z rany, ma wymiar dobroczynnego aspektu psychologicznego. Wydaje się, że produkty takie jak olejki eteryczne czy ekstrakty roślinne, badane przez nas od wielu lat, przeżywają obecnie renesans jeśli chodzi o alternatywę dla często nieskutecznych antybiotyków (1, 2, 9, 12, 15, 17, 18, 23). W obecnej pracy podjęliśmy próbę udzielenia odpowiedzi na pytanie czy modyfikacja biologiczna jednego z dostępnych opatrunków komercyjnych, poprzez wysycenie go olejkiem eterycznym, będzie skutkować podniesieniem jego skuteczności badanej w warunkach eksperymentalnych *in vitro*.

MATERIAŁ I METODY

Podłoża, olejki eteryczne. Podłoża: tryptozowo-sojowe (TSB, Difco, Polska), Sabouraud Dextrose agar (SDA, BTL, Polska), Mueller-Hinton agar (MHA, Difco, USA), RPMI-1640 (CytoGen, Polska); olejki roślinne: melisowy *(Melissa citrata indica),* geraniowy *(Pelargonium graveolens),* cytronelowy *(Cymbopogon nardus)* i goździkowy *(Eugenia caryophyllata)* (Pollena Aroma, Polska).

Badany opatrunek. Opatrunek typu Sorbact (ABIGO MEDICAL AB, Polska) - aseptycznie przygotowane kwadraty o wymiarach 1,5 x 1,5cm.

Drobnoustroje. Szczepy referencyjne: *S. aureus* ATCC 6538 i *C. albicans* ATCC 10231. *S. aureus* hodowano na podłożu MHA przez 24 godz. w temp. 37°C, a *Candida* na podłożu SDA przez 48 godz. w temp. 35°C. Ze świeżych hodowli drobnoustrojów przygotowano wyjściowe zawiesiny komórek o gęstości $1x10^8$ kom/ml (*S. aureus)* i $5x10^6$ kom/ml (*C. albicans)*. Zawiesiny przygotowano w fizjologicznym roztworze NaCl (0,85%), posługując się pomiarem nefelometrycznym i poddano dalszym niezbędnym rozcieńczeniom w odpowiednim podłożu płynnym.

Wyznaczenie stężeń olejków (EO) hamujących wzrost hodowli planktonowych *S. aureus* i *C. albicans* (MIC). Zastosowano metodę mikrorozcieńczeń w bulionie zgodnie z wytycznymi EUCAST, w modyfikacji własnej (6,7). Rozcieńczenia olejków wykonano wstępnie w alkoholu etylowym w stosunku 1:1, a następnie odpowiednio w podłożu TSB lub RPMI-1640 (w postępie geometrycznym) w zakresie stężeń zależnym od ocenianej metody badania aktywności. Wyznaczono stężenie MIC dla *S. aureus* na 0,048% v/v (olejek melisowy) i 0,097% v/v (olejki: geraniowy, cytronelowy i goździkowy) oraz dla *C. albicans* na 0,097% v/v dla wszystkich badanych olejków.

Ocena biobójczej skuteczności modyfikowanych opatrunków - metoda dyfuzji. W doświadczeniu użyto roztworów olejków eterycznych w zakresie stężeń 6,25-3,125% v/v. Próbki opatrunków nasączone roztworami EO lub podłożem (jako próba kontrolna) przenoszono po odsączeniu na podłoża z posiewem powierzchniowym (murawa) *S. aureus* ($2x10^5$ kom/ml) lub *C. albicans* ($1x10^6$ kom/ml). Po 24 godz. kontaktu modyfikowanego opatrunku z posiewem drobnoustrojów mierzono strefę zahamowania ich wzrostu wokół opatrunków oraz dokonano oceny ilościowej absorpcji drobnoustrojów z miejsca kontaktu do wnętrza opatrunku. W tym celu, wchłonięte przez opatrunki drobnoustroje uwalniano przez sonikację (po umieszczeniu ich w 1 ml 0,85% NaCl), a liczbę żywych drobnoustrojów oceniano przez wysiew seryjnych rozcieńczeń uzyskanych zawiesin na odpowiednie podłoża stałe (CFU/ml). Ocenę hamowania wzrostu powierzchniowego oraz przeżywania zaabsorbowanych drobnoustrojów powtórzono po 7 dniach przechowywania modyfikowanych opatrunków w temp. 4°C, wg. procedury opisanej wyżej.

Ocena przeżywania depozytu *S. aureus/ C. albicans* w opatrunkach modyfikowanych olejkami. Fragmenty opatrunków nasączone roztworami olejków w stężeniu MIC i 2MIC lub odpowiednim podłożem (jako kontrola), umieszczano w płytkach Petri'ego (średnica - 3cm) i nanoszono na nie po 100 µl zawiesiny drobnoustrojów o gęstości $1x10^6$ kom/ml (*S. aureus)* lub $1x10^5$ kom/ml (*Candida*). Próby (n=3), po 24 godz. inkubacji w temp. 37°C przeniesiono do probówek zawierających po 1 ml 0,85% NaCl, poddano sonikacji i dokonano wysiewu na odpowiednie podłoża stałe w celu oceny liczby żywych bakterii/ grzybów (CFU/ml).

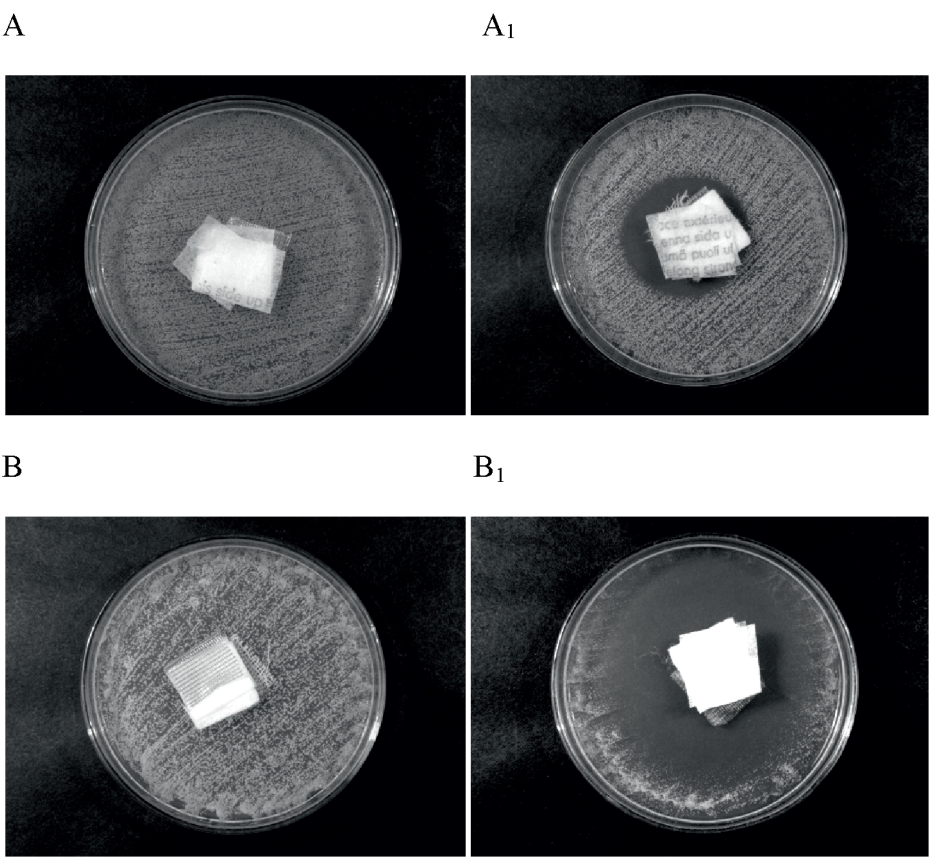
Obliczenia statystyczne. Wszystkie eksperymenty zostały wykonane w trzech powtórzeniach, a wyniki z badań ilościowych wyrażono jako wartości średnie ± S.D.

WYNIKI I DYSKUSJA

Odpowiedzi na pytanie, co można zaproponować w zamian klasycznego postępowania terapeutycznego, mało skutecznego w leczeniu przewlekłych zakażeń miejscowych, poszukuje się od wielu lat i wciąż brakuje optymalnych rozwiązań problemu. W każdej ranie, nawet tej wizualnie „czystej", znajdują się liczne bakterie wywodzące się z mikrobiomu

skóry/błon śluzowych. W efekcie ich namnażania w miejscach braku lub osłabienia nadzoru immunologicznego, tworzące się owrzodzenie i okoliczne tkanki mogą nabrać cech rany zakażonej z objawami takimi, jak stan zapalny, obfity wyciek treści ropnej, odór. Najczęściej rozwijają się w takich przypadkach zakażenia oportunistyczne - wśród bakterii wiodącym patogenem są gronkowce z gatunku *S. aureus* i *S. epidermidis* oraz różne gatunki bakterii beztlenowych, a dominującymi patogenami grzybowymi są przedstawiciele rodzaju *Candida*. Zakażenia te mogą mieć charakter miejscowy lub przybierać przebieg uogólniony, co może grozić poważnymi konsekwencjami zdrowotnymi. W ich terapii należy uwzględnić nie tylko próbę wyleczenia (co rzadko uwieńczone jest sukcesem), ale też kontrolę emisji i modyfikacji przykrego zapachu z rany. Wymaga to oczyszczania łożyska rany, systematycznej zmiany opatrunków i stosowania środków antyseptycznych w celu ograniczenia stopnia kolonizacji mikrobiologicznej (3, 4, 11, 20).

W niniejszej pracy przedstawiono nowatorskie podejście do potencjalnego zastosowania olejków eterycznych w połączeniu z właściwościami jednego z dostępnych handlowo typów opatrunków aktywnych, który nas zainteresował z racji swoich cech. Część opatrunku chłonnego typu „Sorbact" stykająca się z raną, składa się z włókien celulozowych impregnowanych DACC - chlorkiem dialkilokarbamoilowym, wspartych na warstwie absorpcyjnej zbudowanej z litej wiskozy i hydropoliestru. Opatrunki te, jak deklaruje producent, dzięki oddziaływaniom hydrofobowym skutecznie i bezpiecznie wiążą patogenne mikroorganizmy, usuwając je z łożyska rany (strona www. producenta). Z aktualnych danych piśmiennictwa tematu wynika, że właśnie niezwykle ważnym elementem wpływającym na terapeutyczną skuteczność opatrunku takiego typu jest możliwość „wciągnięcia" drobnoustrojów z opatrywanej rany i ich zatrzymania w jego wnętrzu (10, 14, 22). W prezentowanej pracy potwierdzono założenie, iż przez połączenie cech fizyko-chemicznych opatrunku chłonnego z aktywnością biobójczą olejków eterycznych, można uzyskać efekt zniszczenia pochłoniętych bakterii/grzybów. Stwierdzono, że olejki melisowy, geraniowy, cytronelowy oraz goździkowy użyte do nasączenia opatrunków w stężeniu 3,125% hamowały w niewielkim stopniu wzrost drobnoustrojów w kontakcie bezpośrednim z ich posiewem powierzchniowym. Efekt uległ wyraźnemu wzmocnieniu po zwiększeniu ich stężenia powyżej 5%. Można tę obserwację wyjaśnić wolną dyfuzją olejków i/lub silnym ich związaniem przez warstwę chłonną opatrunku i interpretować jako zaletę (olejki w stężeniach 1-5% i powyżej są zazwyczaj w bezpośrednim kontakcie cytotoksyczne dla komórek makroorganizmu). W niniejszej pracy wykonano dodatkowe doświadczenie, w którym ocenie poddano rozmiar strefy zahamowania wzrostu wokół fragmentów opatrunków nasyconych olejkami przechowywanych przez 7 dni w temp. 4°C. Takie postępowanie miało symulować przeniesienie wcześniej przygotowanego opatrunku, przechowywanego w temperaturze chłodziarki, na zakażoną ranę. Tak jak się spodziewano, uzyskano w ten sposób efekt „koncentracji" frakcji lotnej olejków w warstwie chłonnej opatrunku i ich szybkie „uwolnienie" po przeniesieniu opatrunku do temp. inkubacji wynoszącej 37°C. Skutkowało to, w większości przypadków, prawie całkowitym lub całkowitym zahamowaniem wzrostu zarówno *S. aureus*, jak i *C. albicans* (zona $\geq$ 80 mm), przez opatrunki umieszczone na inokulowanych podłożach stałych. W związku z powyższym, aby pokazać efekt działania, jeden z przykładów przedstawiony na Ryc. 1. dotyczy mniej intensywnie działającego w tych warunkach olejku goździkowego. Strefa zahamowania wzrostu *S. aureus* ATCC 6538 wynosiła 30 mm, a zahamowanie wzrostu *C. albicans* ATCC10231 oceniono na 60 mm.



Ryc. 1. Skuteczność biobójcza opatrunków modyfikowanych przez zanurzanie w olejku eterycznym goździkowym (z *Eugenia caryophyllata*). Ocena efektu metodą dyfuzji w agarze, po 7 dniach od przygotowania opatrunku i przechowywania w 4°C.
A - opatrunek kontrolny w kontakcie z *S. aureus* ATCC 6538; A_1 - modyfikowany olejkiem; B - opatrunek kontrolny w kontakcie z *C. albicans* ATCC 10231; B_1 - modyfikowany olejkiem

W następnym etapie tej serii badań dokonano określenia stopnia absorpcji bakterii/grzybów przez warstwę chłonną modyfikowanych olejkami opatrunków i przeżywania tam drobnoustrojów, w porównaniu do kontroli (opatrunek oryginalny). Bezpośredni kontakt (24 godz.) opatrunku z powierzchnią podłoża agarowego inokulowanego wcześniej zawiesiną danego drobnoustroju skutkował intensywną absorpcją komórek bakterii/grzybów. Ocena ilościowa odzyskanych sonikatów wykazała, że w porównaniu do kontroli przeżywalność *S. aureus* ATCC 6538 w opatrunkach modyfikowanych wynosiła 22,37±3,38% (o. melisowy); 5,3±2,28% (o. geraniowy); 20,26±8,17% (o. cytronelowy); 41,94±3,3% (o. goździkowy). W odniesieniu do *C. albicans* ATCC 10231 efekt był nieco słabszy – przeżywalność oceniono na, odpowiednio: 60,52±9,0%; 15,39±4,7%; 48,75±2,4%; 44,26±3,9% (wartości przypisane do rodzaju olejków wymienionych w kolejności jak wyżej).

W tabeli I. przedstawiono dane przetworzone z obliczeń CFU/ml, uzyskanych w następnej serii doświadczeń mających na celu ocenę liczebności depozytu bakterii/grzybów po 24 godz. od naniesienia wystandaryzowanych zawiesin *S. aureus* (10^5) bądź *C. albicans* (10^4) na badany fragment opatrunku o powierzchni 2,25 cm^2. Stwierdzono, że inokulum bakterii/ grzybów w opatrunku niemodyfikowanym po 24 godz. wzrastało średnio do ok. 10^7 (*S. aureus*) i do ok. 10^6 (*C. albicans*). Natomiast w przypadku zastosowania opatrunków nasyconych olejkami eterycznymi w stężeniach MIC, uzyskano wyraźny efekt eradykacji drobnoustrojów, w nasileniu zależnym od typu olejku eterycznego (Tabela I). Po podwyższeniu stężenia olejków zastosowanych do modyfikacji opatrunku do wartości 2x MIC, uzyskano efekt proporcjonalnie wyższy (dane nie pokazane). Analiza wyników uzyskanych w badaniach z zastosowaniem tych dwu różnych metod, w których stwierdzono ograniczenie przeżywania bakterii/grzybów spontanicznie wchłoniętych przez opatrunek po jego kontakcie z posiewem powierzchniowym, wykazała ich pozytywną korelację.

Tabela I. Ocena stopnia eradykacji drobnoustrojów z warstwy chłonnej opatrunków modyfikowanych olejkami eterycznymi, użytymi w stężeniu MIC.

Olejek / Stężenie	Eradykacja depozytu drobnoustrojów z opatrunku [%]	
	S. aureus ATCC 6538	*C. albicans* ATCC 10231
Melisowy	99,4	14,78
Geraniowy	22,3	93,17
Cytronelowy	77,67	52,51
Goździkowy	98,85	10,41

Najbardziej zbliżone do opatrunków badanych przez nas, biorąc pod uwagę ich cechy fizyko-chemiczne, są opatrunki alginianowe, dekstranomery i opatrunki hydrokoloidowe. Znane jest dobroczynne działanie opatrunków zawierających np. sole sodowe i wapniowe kwasu alginowego, otrzymywanego z wodorostów morskich. Alginian wapnia jest nierozpuszczalny w wodzie, ale dzięki obecności jonów sodu w wysięku z owrzodzenia, następuje wymiana jonów i powstaje alginian sodu, przekształcający się w hydrofilowy żel, który oczyszcza owrzodzenie i zapobiega wysuszaniu, przyspiesza ziarninowanie i epitelizację. Niektóre z tego typu opatrunków mają właściwości hemostatyczne z uwagi na fakt, iż jony wapnia uwalniane do rany powodują aktywację płytek krwi i przyspieszają hemostazę. Tak jak stosowane w niniejszej pracy opatrunki typu „Sorbact", te alginianowe wiążą drobnoustroje i resztki martwiczych tkanek, zamykając je w strukturze żelu i separując od dna owrzodzenia. Z kolei opatrunki hydrokoloidowe, zbudowane z cząsteczek karboksymetylocelulozy, żelatyny i pektyny, działają na zasadzie reakcji z wysiękiem wchłanianym przez wewnętrzną warstwę opatrunku. Skutkuje to zwiększeniem jego objętości i przyjęciem konsystencji półpłynnego żelu wypełniającego dno rany. Dochodzi wówczas do powstania warunków dogodnych do przywrócenia sprawności fizjologicznych etapów gojenia rany (mikroklimat, niskie pH, aktywacja tworzenia nowych naczyń, ziarninowanie, epitelializacja, hamowanie namnażania się drobnoustrojów). Tego typu opatrunki nie są jednak polecane do stosowania w opatrywaniu ran zakażonych. W takich przypadkach są natomiast przydatne opatrunki typu „hydrofibre". Podobnie jak używane przez nas opatrunki typu „Sorbact" tworzą żel, pochłaniają i zatrzymują wysięk wraz z bakteriami wewnątrz struktury opatrunku, izolując je od wnętrza owrzodzenia (22). Opatrunek zmodyfikowany przez nas przez wysycenie go

olejkami eterycznymi, nie tylko wchłaniał wysięk ale działał także biobójczo. Stwierdzono, że w zależności od intensywności działania lotnych frakcji danego olejku, wysycone nimi opatrunki działają lepiej albo tuż po ich modyfikacji lub dopiero po przetrzymaniu w temp. 4°C przez 7 dni. W tym czasie ulega skumulowaniu potencjał biobójczy składników lotnych, które w niskiej temperaturze są nieaktywne. Powyższa obserwacja jest niezwykle interesująca i może mieć wymiar potencjalnie aplikacyjny, takie jak – uproszczenie procedury przygotowania tego typu niekonwencjonalnych opatrunków, możliwość zmniejszenia stężenia zastosowanych olejków i/lub skrócenie czasu kontaktu z „raną". Tym samym założenia podjęte w tych badaniach zostały potwierdzone eksperymentalnie.

Wśród nowoczesnych opatrunków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym najczęściej wymienia się opatrunki zawierające antybiotyki, antyseptyki oraz różne chemiczne postaci srebra (jonowe, metaliczne, kompleksowane, nanocząsteczki). Zastosowanie opatrunków uwalniających miejscowo takie produkty biobójcze ma wiele zalet, ponieważ może zapewnić skumulowane stężenie aktywnego składnika bezpośrednio w ranie. Zmniejsza to ryzyko rozwoju mikroorganizmów opornych i ogranicza ujawnienie się skutków ubocznych działania leków, tak jak to ma miejsce podczas ich stosowania systemowego (4, 20). Aktualnie znanych jest także szereg niekonwencjonalnych opatrunków, które dotąd znalazły zastosowanie w eksperymentalnej opiece paliatywnej pacjentów z chronicznymi, zakażonymi owrzodzeniami, w tym u chorych onkologicznych. Są to np. opatrunki z jogurtu z żywymi kulturami bakterii, opatrunki z pasty cukrowej czy miodu leczniczego (miód Manuka) oraz np. opatrunki z nasion kozieradki oraz stosowanie aromaterapii z wykorzystaniem niektórych olejków eterycznych (3, 4, 10, 11, 15, 23).

W tradycji medycyny ludowej rośliny od dawna stanowią istotne źródło produktów służących utrzymaniu kondycji zdrowotnej lub intuicyjnego leczenia różnych schorzeń. W naszych badaniach *in vitro* sprawdzono hipotezę, iż cechy biologiczne olejków eterycznych mogą pozytywnie wpływać na patofizjologię zakażenia przewlekłego, ograniczając stopień kolonizacji hipotetycznej rany. W piśmiennictwie dotyczącym tego tematu jest coraz więcej danych eksperymentalnych oraz klinicznych potwierdzających ich skuteczność (1, 2, 5, 8, 9). Na uwagę zasługuje stwierdzona przez nas aktywność przeciwdrobnoustrojowa/przeciwbiofilmowa olejków w zastosowanym modelu badawczym symulującym kontakt opatrunku z zakażoną raną. Wykazano w nim redukcję stopnia przeżywalności depozytu drobnoustrojów wchłoniętych lub naniesionych na powierzchnię modyfikowanego opatrunku.

Dla wielu produktów roślinnych wykazano wcześniej aktywność wspomagającą proces gojenia ran. Wyciągi z liści *Budleja globosa*, liści *Chromolaena odorata* czy ziaren strączkowych *Scrophularia nodosa* stymulują w warunkach *in vitro* wzrost i proliferację fibroblastów skórnych, w efekcie czego nasilają produkcję kolagenu. Podobne działanie w badaniach *in vivo* na modelu zwierzęcym wykazuje alkoholowy ekstrakt *Helianthus annus* i świeży sok z liści *Jasminum auriculatum*. Natomiast ekstrakt z liści *Datura alba*, liści *Ginko biloba* czy nalewka z ziela *Hypericum perforatum* wykazują aktywność proepitelializacyjną. Nieliczne ekstrakty roślinne, jak wyciąg z kwiatów *Calendula officinalis*, z liści *Centella asiatica* czy liści *Aloe vera*, dzięki szerokiej aktywności biologicznej, znalazły już zastosowanie w wyrobach leczniczych i kosmetycznych (12, 16). Rzadziej wskazuje się na możliwość zastosowania w tym celu olejków eterycznych, z uwagi na ich zwykle wysoką cytotoksyczność. Aktualnie jednak na uwagę zasługują coraz częściej opisywane właściwości prozdrowotne olejków eterycznych, szczególnie w ich zastosowaniu miejscowym (9, 13,

20, 17, 18, 19, 21). Niedawno kilka olejków eterycznych (m. in. z drzewa herbacianego oraz olejek eukaliptusowy) uzyskało zezwolenie na wykorzystywanie ich jako skutecznych i bezpiecznych antyseptyków. Na tej podstawie *Warnke* i wsp. (23) wykorzystali wybrane olejki eteryczne o przyjemnym zapachu do leczenia niektórych objawów ubocznych u pacjentów z nieoperacyjnymi rakami płaskonabłonkowymi szyi i głowy, cierpiącymi na zakażenia owrzodzeń nowotworowych. W badaniach wykorzystano mieszankę olejków: eukaliptusowego (70 mg), z drzewa herbacianego (50 mg), cytronelowego (45 mg), cytrynowego (45 mg), koniczynowego (7 mg), tymiankowego (3 mg), sporządzonych w formie aerozolu na bazie 40% alkoholu etylowego. W badaniach klinicznych zaobserwowano działanie antyseptyczne oraz przeciwzapalne zastosowanej mieszanki. Ponadto znacząco zmniejszono nieprzyjemny zapach oraz zaobserwowano reepitelializację zainfekowanych tkanek. W naszych badaniach wykazano, że zastosowane olejki eteryczne charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością w tym modelu doświadczalnym, chociaż wartości ich MIC/MBC, określone wcześniej były zbliżone. Wynika to z faktu odmiennego składu olejków, w tym zawartości frakcji lotnych. Przeprowadzona wcześniej analiza chromatograficzna w fazie gazowej sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS) badanych olejków wykazała, że olejek melisowy zawierał 10,9% monoterpenów, olejek cytronelowy 3,5% a w dwu pozostałych olejkach ich nie wykryto. Z kolei frakcja bogata w fenylopropan stanowiła 86% składu olejku goździkowego a była nieobecna w pozostałych badanych olejkach. Jeśli chodzi o zawartość poszczególnych składników, znanych ze swojej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, to również zanotowano istotne różnice ilościowe. Zawartość eugenolu stwierdzono tylko w olejku goździkowym (86,2%). Najwyższą zawartość citronelolu wykryto w olejku geraniowym (44,0%), geraniolu i citronelalu w olejku cytronelowym (odpowiednio 22,4% i 36,2%). W olejku melisowym znaczącą frakcję stanowił citronelol (37,0%) oraz neral/geranial – citral (odpowiednio 8,6%+10,1%) (5). Niewykluczone, że dla uzyskania optymalnego addytywnego efektu terapeutycznego słuszna byłaby sugestia o zbadaniu efektywności mieszanki tych czterech olejków, w kilku różnych proporcjach ilościowych.

PODSUMOWANIE

Opatrunek aktywny (absorpcyjny), modyfikowany eksperymentalnie przez wysycenie go olejkami eterycznymi, nie tylko wchłania drobnoustroje ale działa biobójczo. W badaniach *in vitro* symulujących kontakt opatrunku z zakażoną raną wykazano redukcję stopnia przeżywalności depozytu drobnoustrojów wchłoniętych lub naniesionych na powierzchnię modyfikowanego opatrunku. Tym samym potwierdzono założony cel pracy. Zastosowane olejki eteryczne (melisowy, geraniowy, cytronelowy i goździkowy) charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością w tym modelu doświadczalnym, chociaż wartości ich MIC/MBC określone wcześniej wobec S. *aureus* i *C. albicans,* były zbliżone. Niewątpliwie wynika to z faktu nie tylko innej struktury populacji drobnoustrojów (zawiesina/populacja osiadła) badanej w danym teście, ale przede wszystkim, odmiennego składu tych olejków w tym zawartości frakcji lotnych i proporcji składników biologicznie aktywnych. W zależności od intensywności działania lotnych frakcji danego olejku, wysycone nimi opatrunki działały zazwyczaj lepiej po przetrzymaniu w temp. 4^{o}C przez 7 dni. Można sugerować, że warto byłoby zbadać ich aktywność po krótszym czasie od ich przygotowania. Co więcej, dla

uzyskania optymalnego efektu terapeutycznego można by ocenić zależność skuteczności opatrunku od użycia mieszanki tych olejków, w kilku różnych proporcjach ilościowych.

PIŚMIENNICTWO

1. *Agarwal V, Lal P, Pruthi V.* Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. Mycopathologia 2008; 165: 13-9.
2. *Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomarb M.* Biological effects of essential oils – a review. Food Chem Toxicol 2008; 46: 446-75.
3. *Bearden DT, Allen GP, Christensen JM.* Comparative *in vitro* activities of topical wound care products against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2008, 62: 769-72.
4. *Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM.* Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. J Pharm Sci 2007; 97: 2892-923.
5. *Budzyńska A, Sadowska B, Lipowczan G* i inni. Activity of selected essential oils against *Candida* spp. strains. Evaluation of new aspects of their specific pharmacological properties, with special reference to Lemon Balm. Adv Microbiol 2013 (w druku)
6. *Budzyńska A, Sadowska B, Paszkiewicz M, Różalska B.* Ocena bójczego działania fazy płynnej i frakcji lotnej olejków eterycznych na hodowle biofilmowe *Staphylococcus aureus* oraz *Candida albicans*. Własne rozwiązania metodyczne. Med Dośw Mikrobiol 2011; 63: 327-31.
7. *Budzyńska A, Więckowska-Szakiel M, Kalemba D* i inni. The optimization of methods utilized for testing the antibacterial activity of essential oils. Med Dośw Mikrobiol 2009; 61: 281-7.
8. *Budzyńska A, Więckowska-Szakiel M, Sadowska B* i inni. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. Pol J Microbiol 2011; 60: 35-41.
9. *Edris AE.* Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. Phytother Res 2007, 21: 308-23.
10. *Fujiwara T, Hosokawa K, Kubo T.* Comparative study of antibacterial effects and bacterial retentivity of wound dressings. Eplasty 2013; 13: 31-40
11. *Hampton S.* Malodorous fungating wounds: how dressings alleviate symptoms. Br J Community Nurs 2008; 13: 34-6.
12. *Habbu P. V., Joshi H., Patil B. S.* Potential wound healers from plant origin. PHCOG Rev 2007; 1: 271-82.
13. *Khosravi R, Shokri H, Kermani S* i inni. Antifungal properties of *Artemisia sieberi* and *Origanum vulgare* essential oils against *Candida glabrata* isolates obtained from patients with vulvovaginal candidiasis. J Med Mycol 2011; 21: 93-9.
14. *Lipp C, Kirker K, Agostinho A* i inni. Testing wound dressings using an *in vitro* wound model. J Wound Care 2010; 19: 220-6.
15. *Mercier D, Knevitt A*. Using topical aromatherapy for the management of fungating wounds in a palliative care unit. J Wound Care 2005, 14: 497-8.
16. *Rajeshkumar R, Sundararaman M*. Emergence of *Candida* spp. and exploration of natural bioactive molecules for anticandidal therapy – Status Quo. Mycoses 2012; 55: e60-e73.
17. *Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R.* Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties- an overview. Forsch Komplementmed 2009; 16: 79-90.
18. *Sherry E, Boeck H, Warnke PH.* Topical application of a new formulation of eucalyptus oil phytochemical clears methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Am J Infect Control 2001, 29: 346.

19. *Silva F, Ferreira S, Duarte A* i inni. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. Phytomedicine 2011; 19: 42-7.
20. *Skórkowska-Telichowska K, Bugajska-Prusak A, Pluciński P* i inni. Fizjologia i patologia przewlekle niegojących się owrzodzeń oraz sposoby ich miejscowego leczenia w świetle współczesnej wiedzy medycznej. Dermatologia Praktyczna 2009; 5: 15-29.
21. *Solórzano-Santos F, Miranda-Novales MG.* Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. Curr Opin Biotechnol 2012; 23: 136-41.
22. *Tkachenko O, Karas JA.* Standardizing an *in vitro* procedure for the evaluation of the antimicrobial activity of wound dressings and the assessement of three wound dressings. J Antimicrob Chemother 2012; 67: 1697-700.
23. *Warnke PH, Sherry E, Russo PAJ* i inni. Antibacterial essential oils in malodorous cancer patients: clinical observations in 30 patients. Phytomedicine 2006; 13: 463-7.

Badania były finansowane z grantu NCN nr. UMO-2011/01/N/NZ6/00317 dla A.B.

Otrzymano: 4 VII 2013 r.
Adres Autora: 90-237 Łódź, Banacha 12/16, Pracownia Biologii Zakażeń, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki,
E-mail rozab@biol.uni.lodz.pl Tel.: 42-635 4185