

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym druk i umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

MARZENNA BARTOSZEWICZ¹ | ADAM JUNKKA¹ | JUSTYNA PALECZNY¹ | PAWEŁ MIGDAŁ² | MONIKA DZIĘGIELEWSKA³ | JOANNA CZAJKOWSKA⁴ | MICHAŁ WOREK⁵ | BARTŁOMIEJ DUDEK⁶

OCENA PRZYDATNOŚCI *IN VITRO* OPATRUNKU LIPIDOKOLOIDOWEGO ZAWIERAJĄCEGO JONY SREBRA DO ERADYKACJI BIOFILMÓW MIESZANYCH *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* I *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TWORZĄCYCH SIĘ W ZRÓŻNICOWANYCH WARUNKACH HODOWLANYCH

IN VITRO SUITABILITY OF A LIPOCOLLOID DRESSING CONTAINING SILVER IONS FOR THE ERADICATION OF MIXED *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BIOFILMS FORMED UNDER DIFFERENT CULTURE CONDITIONS

STRESZCZENIE: **Wstęp** Obecność biofilmów w ranie niegojącej się stanowi jeden z najistotniejszych czynników wikłających proces gojenia i podnoszących ryzyko przejścia infekcji z formy miejscowej do postaci uogólnionej (systemowej). Jednym ze sposobów leczenia powikłań związanych z obecnością infekcji wywołanej przez biofilm jest zastosowanie opatrunków zdolnych do eradykacji tych społeczności drobnoustrojów oraz do kontroli poziomu wysięku. **Cel** W niniejszej pracy doświadczalnej *in vitro* poddano ocenie przydatność lipidokoloidowych opatrunków zawierających jony srebrne do eradykacji biofilmów mieszanych *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Staphylococcus aureus*. **Materiał i metody** Ocenie poddano szczepy hodowane na nośniku organicznym, przypominającym powierzchnię rany, oraz w płynach symulujących środowisko rany niegojącej się. **Wyniki** Uzyskane wyniki wykazały wysokie zróżnicowanie liczby komórek tworzących biofilm w poszczególnych płynach hodowlanych oraz znacznie wyższą komponentę komórek *P. aeruginosa* niż *S. aureus* w strukturze biofilmu. Zastosowane opatrunki cechowały się wysoką zdolnością do eradykacji biofilmu mieszanego *P. aeruginosa* i *S. aureus*, przy czym w sztucznym wysięku obserwowano pełną eradykację tej struktury. Opatrunki były w stanie zaabsorbować, w zależności od użytego płynu symulującego środowisko rany, od 6- do 9-krotności swojej suchej masy, a przechodząc w formę żelu, nie traciły spistości. **Wnioski** Bazując na uzyskanych wynikach, należy stwierdzić, że opatrunki lipidokoloidowe zawierające jony srebra cechują się wysoką zdolnością do eradykacji biofilmu mieszanego *P. aeruginosa* i *S. aureus* oraz wysoką zdolnością do kontroli poziomu wysięku.

SŁOWA KLUCZOWE: biofilm mieszany, opatrunek lipidokoloidowy, rany niegojące, srebro

ABSTRACT: Introduction The presence of biofilms in a non-healing wound is considered one of the most significant factors complicating the healing process and increasing the risk of infection transition from the local to the generalized (systemic) form. The management of complications associated with the presence of biofilm infection may include such modalities as the use of dressings designed to eradicate these microbial communities, as well as to control the exudate level. **Aim** In this *in vitro* experimental research, the applicability of lipocolloid dressings containing silver ions for the eradication of mixed biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cultures was assessed. **Material and methods** Strains cultured on an organic carrier resembling the wound surface were assessed, as well as in fluids simulating the non-healing wound environment. **Results** The obtained results demonstrated a high differentiation of the number of cells forming the biofilm in the specific

- 1 Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
- 2 Katedra Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
- 3 Dziegielewska Instytut Oka w Warszawie
- 4 Laboratorium Mikrobiologii – Sieć Badawcza Łukasiewicz – PORT Polski Ośrodek Rozwoju Technologii
- 5 Specjalistyczny Szpital Miejski w Toruniu
- 6 Zakład Mikrobiologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii we Wrocławiu

✉ ADAM JUNKKA

Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Borowska 211a, 50-534 Wrocław, e-mail: adam.junkka@umw.edu.pl
ORCID: 0000-0002-7559-8903

Wpłynęło: 28.07.2022

Zaakceptowano: 16.08.2022

DOI: dx.doi.org/10.15374/FZ2022016

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym druk i umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

culturing fluids and a significantly higher component of *P. aeruginosa* cells than *S. aureus* in the biofilm structure. The applied dressings were characterized by a high eradication capacity of the mixed biofilm of *P. aeruginosa* and *S. aureus*, with full eradication of this structure observed in the artificial exudate. The dressings were able to absorb 6 to 9 times their dry weight, depending on the wound-simulating fluid used, and they did not lose their cohesiveness when transformed into a gel form. **Conclusion** On the basis of the obtained results, it should be emphasized that lipocolloid dressings containing silver ions are characterized by a high ability to eradicate the mixed biofilm of *P. aeruginosa* and *S. aureus* and present a high ability to control the exudate level.

KEY WORDS: lipo-colloid, mixed biofilm, non-healing wounds, silver

WSTĘP

Postępujący proces starzenia się społeczeństw zachodniej hemisfery oraz coraz wyższa częstotliwość zapadalności na choroby cywilizacyjne, takie jak otyłość, cukrzyca i choroby układu krążenia, przekładają się na coraz większą liczbę ran niegojących się oraz na rosnące obciążenie systemów opieki zdrowotnej związane z opieką nad pacjentami, u których tego typu rany występują.

Rana niegojąca się to przerwanie ciągłości skóry (a także tkanek podskórnych), niezasklepiające się w czasie 3 miesięcy, często mimo podjęcia działania terapeutycznego [14, 17]. Ryzyko wystąpienia rany niegojącej się jest wyższe u tych pacjentów, u których występują takie choroby współtowarzyszące, jak niewydolność tętnicza i żylna, cukrzyca, otyłość oraz choroby układu odpornościowego [2, 6–8, 12, 13, 22, 24]. Kolejnym istotnym czynnikiem podnoszącym ryzyko wystąpienia rany niegojącej się jest podeszły wiek pacjentów, u których, poza wysoką częstotliwością występowania wzmiankowanych już chorób układu immunologicznego i krwionośnego, dochodzi do spadku elastyczności i odporności skóry (na skutek między innymi obniżonego poziomu syntezy kolagenu) [11, 23].

Z socjologicznego oraz ekonomicznego punktu widzenia obecność rany niegojącej się u pacjenta przekłada się na podniesione ryzyko wystąpienia depresji, zmniejszenie poziomu jakości życia, a także wykluczenie zawodowe czy obniżenie zdolności pracowniczej (m.in. na skutek doznawanego bólu czy immobilizacji) [20]. Rana przewlekła, nieleczone w sposób prawidłowy, może prowadzić do ubytku zdrowia, szeroko rozumianej niepełnosprawności, a nawet do śmierci pacjenta.

U pacjentów nieznajdujących się w grupie podwyższonego ryzyka na skutek chorób współistniejących proces gojenia się rany przebiega w sposób prawidłowy dzięki współdziałaniu złożonego zbioru czynników komórkowych, wzrostu oraz modulacyjnych. W jego przebiegu można wyróżnić kolejne (choć często współistniejące w różnych obszarach rany) fazy: wysiękową, oczyszczania, proliferacyjną oraz przebudowy, zakończone zamknięciem się rany.

W przypadku ran niegojących się przebieg wyżej wymienionych faz (zarówno w aspekcie kolejności ich występowania, jak i efektywności) jest zaburzony. Prowadzi to do zatrzymania procesu gojenia, a nawet pogorszenia się stanu rany (powiększenia jej powierzchni oraz objętości).

Obecnie nowoczesne postępowanie z raną niegojącą się opiera się na opracowanym w 2018 r. algorytmie o akronimie TIMERS (który z kolei powstał na bazie poprzedniego, opracowanego w 2003 r., algorytmu określanego mianem TIME) [1]. Każda z liter akronimu określa czynności/procesy istotne w procesie gojenia się ran:

1. Opracowanie tkanki (ang. tissue – T).
2. Kontrola infekcji i stanu zapalnego (ang. infection/inflammation – I).
3. Utrzymanie prawidłowego poziomu wilgotności w ranie (ang. moisture – M).
4. Obserwacja brzegów rany i stymulacja naskórkowania (ang. edges – E).
5. Regeneracja (ang. regeneration – R).
6. Czynniki społeczne (ang. social and patient-related factors – S).

Zbyt niski lub zbyt wysoki poziom wysięku (M) w istotny sposób opóźnia proces gojenia, dlatego konieczne jest zapewnienie prawidłowej wilgotności łóżyska rany. W tym celu stosowane są m.in. opatrunki zdolne do wydzielania ze swojej struktury roztworów wodnych, zapewniających środowisko do migracji i namnażania się komórek odpowiedzialnych za gojenie się rany (fibroblastów i keratynocytów) i/lub zdolnych do pochłaniania i utrzymywania (sekwestracji) w swojej strukturze nadmiarowej objętości wysięku [15]. Kolejną, istotną w aspekcie omawianych zagadnień, cechą opatrunków stosowanych na rany niegojące się jest zdolność do kontroli poziomu biofilmu, czyli złożonych społeczności drobnoustrojów (najczęściej tworzonych w ranach przez różne gatunki bakterii, ale także przez bakterie oraz grzyby), które wykazują – m.in. dzięki obecności zewnątrzkomórkowej macierzy – podwyższoną tolerancję na stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe, przede wszystkim antybiotyki [26]. Badania ostatnich lat wykazały, że tzw. biofilm mieszany w ranie niegojącej się

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym druk i umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

może być tworzony nawet przez kilkanaście gatunków drobnoustrojów [16]. Jednymi z najczęściej izolowanych bakterii wywołujących infekcje związane z obecnością biofilmu w ranie przewlekłej są *Staphylococcus aureus* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. W biofilmie mieszanym w warunkach klinicznych interakcje pomiędzy tymi dwoma patogenami mogą przyjmować charakter zarówno antagonistyczny, jak i nieantagonistyczny [18]. Obecnie brak jest spójnych danych wskazujących na znaczenie biofilmów mieszanych w patofizjologii rany przewlekłej, jakkolwiek zgodnie z koncepcją tzw. ekwiwalentnej grupy patogenicznej, każdy drobnoustrój wnosi do biofilmu mieszanego cechy własne o najwyższej zjadliwości, co przekłada się na podwyższoną (w stosunku do biofilmów jednogatunkowych) zdolność do przetrwania i namnażania się w środowisku rany [21].

W poprzednich badaniach podjęto próbę oceny aktywności przeciwbiofilmowej i zdolności sekwestracyjnych aktywnych przeciwdrobnoustrojowo opatrunków lipidokoloidowych zawierających jony srebra, względem biofilmów jednogatunkowych *in vitro*, w tym tworzonych przez *S. aureus* oraz *P. aeruginosa*. Wykazano ich wysoką przydatność w tym aspekcie [3, 4]. Wzmiankowane opatrunki lipidokoloidowe zostały zaprojektowane w taki sposób, by spełniać założenia strategii TIMERS i cechują się wysokim poziomem zaawansowania technologicznego. Polega ono na zastosowaniu w charakterze rusztowania włókien poliakrylanowych (nadających opatrunkowi elastyczność, spójność oraz oporność na rozrywanie mechaniczne), które wypełnione jest warstwą lipidokoloidową (TLC), składającą się z karboksymetylocelulozy rozproszonej w lipofilnej warstwie petrolatum. Obecność elastycznych włókien poliakrylanowych w istotny sposób ułatwia nakładanie i zdejmowanie opatrunku oraz mechanicznie uszkadza strukturę biofilmu i tkanki martwiczej, natomiast warstwa lipidokoloidowa zdolna jest do wysokiej absorpcji płynu wysiękowego, a po wchłonięciu wysięku przekształca się w żel [5, 25]. Pozwala to zachować wilgotne środowisko w łóżysku rany oraz umożliwia namnażanie się i migrację w jego obrębie odpowiedzialnych za proces gojenia fibroblastów. Z kolei kationy srebrne stosowane w opatrunku w charakterze związku przeciwdrobnoustrojowego cechują się szerokim spektrum aktywności bakteriobójczej, obejmującym także gatunki bakterii, będące najczęstszymi czynnikami etiologicznymi infekcji ran przewlekłych [28]. Kationy srebrne mają wysoką zdolność do penetracji przez błony komórkowe i do interakcji z bakteryjnym DNA, prowadząc do zahamowania procesu replikacji materiału genetycznego, czego efektem jest śmierć komórek drobnoustrojów. Ten niespecyficzny mechanizm działania w znaczący sposób obniża ryzyko wystąpienia oporności bakteryjnej na srebro i przekłada się na wysoką skuteczność tego pierwiastka w walce z biofilmem bakteryjnym.

Ze względu na to, iż wyniki dotyczące aktywności zawierających srebro opatrunków lipidokoloidowych wykazały

ich znaczną skuteczność w eradykacji jednogatunkowych biofilmów *in vitro*, w niniejszej pracy podjęto próbę oceny skuteczności tych opatrunków względem biofilmu mieszanego, tworzono go przez istotne czynniki etiologiczne zakażeń ran przewlekłych – *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Staphylococcus aureus* [3, 4].

MATERIAŁ I METODY

WYTWORZENIE NOŚNIKÓW Z BIOCELULOZY IMITUJĄCYCH POWIERZCHNIĘ RANY

Celulozotwórczy szczep *Komagataeibacter xylinus* został przesiany z zamrożenia -80°C na płynną pożywkę Hestrina-Schramma (2% glukoza (POCH Polska), 0,5% baktopepton (Graso Biotech), 0,5% ekstrakt drożdżowy (Graso Biotech), 0,27% wodorofosforan sodu (Chempur), 0,115% kwas cytrynowy (Stanlab), 0,05% heptahydrat siarczynu magnezu (Stanlab), 1% etanol (POCH Polska)), a następnie poddany procesowi inkubacji w dołkach płytki 24-dołkowej przez 7 dni, aż do wytworzenia nośnika celulozowego o średnicy 18 mm. Po zakończeniu hodowli z nośnika wypłukano wodą, a komórki *K. xylinus* usunięto w procesie lizy alkalicznej w 0,1 M NaOH (POCH) w temperaturze 80°C. Zalkalizowane nośniki poddawano wielokrotnemu przepłukiwaniu wodą, aż do ustalenia wartości pH na poziomie wynoszącym 7. Tak uzyskane nośniki poddano sterylizacji, a następnie przechowywano w temperaturze 8°C do czasów dalszych analiz.

WYBÓR SZCZEPÓW DO BADAŃ

Do celów eksperymentalnych zastosowano szczep *P. aeruginosa* oraz *S. aureus* o numerach 15442 oraz 6538, odpowiednio, z kolekcji ATCC, a także po 8 szczepów należących do gatunku *P. aeruginosa* oraz *S. aureus* izolowanych z zakażeń goleni, wchodzących w skład kolekcji szczepów Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

PRZYGOTOWANIE OPATRUNKU URGOCLEAN® Ag PAD DO BADAŃ

Przed przeprowadzeniem analiz opatrunki rozpakowano w warunkach aseptycznych w komorze laminarnej Mars ScanLaf i pocięto uprzednio wyjałowionymi nożyczkami na równoboczne fragmenty o wymiarze wynoszącym 18×18 mm. Tak uzyskane fragmenty opatrunków przekładano do jałowego, zamykanego pojemnika i przechowywano do czasu przeprowadzenia analiz.

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym druk i umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

OCENA LICZBY KOMÓREK TWORZĄCYCH BIOFILM MIESZANY *P. AERUGINOSA* I *S. AUREUS*

Hodowlę biofilmów mieszanych prowadzono w dołkach płytki 24-dołkowej na nośniku celulozowym przez okres 7 dni w warunkach komory wilgotnej, bez dodawania medium w okresie hodowli. Początkowe inoculum bakterii obu gatunków ustalono densytometrycznie na 10⁵ cfu/mL i wprowadzono je w stosunku 1:1 (v/v) dla zawiesin zawierających oba gatunki, uzyskując 4 ml zawiesin. Do hodowli zastosowano:

- medium Tryptic Soya Broth (TSB), lub;
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, bez dodatku antybiotyku/antymikotyku), lub;
- sztuczny wysięk (AE) o składzie (v/v): 88% pożywki RPMI (Biowest), 10% płodowej surowicy bydlęcej (Bioest), 1% mucyny, 1% albuminy surowicy bydlęcej;
- heparynizowaną krew baranią.

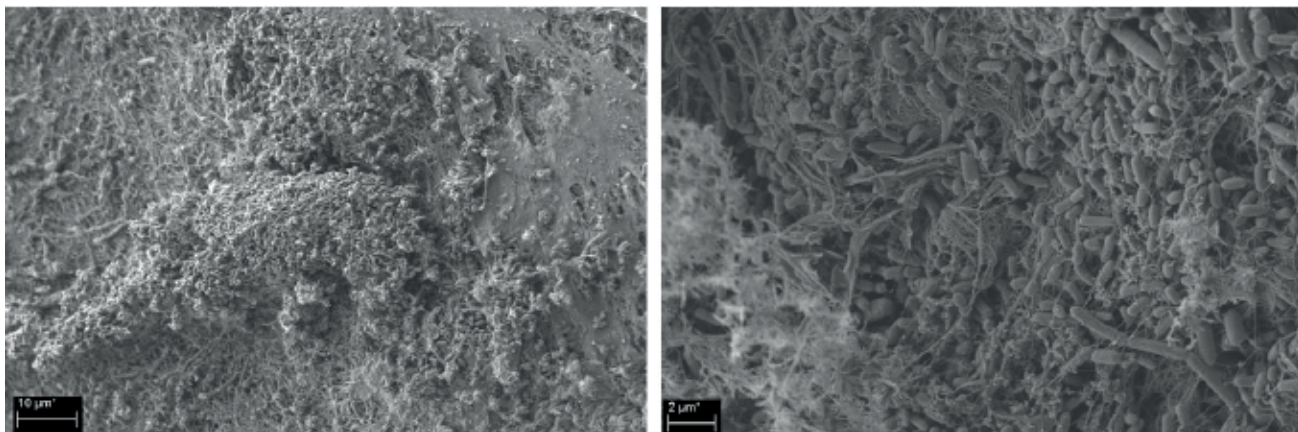
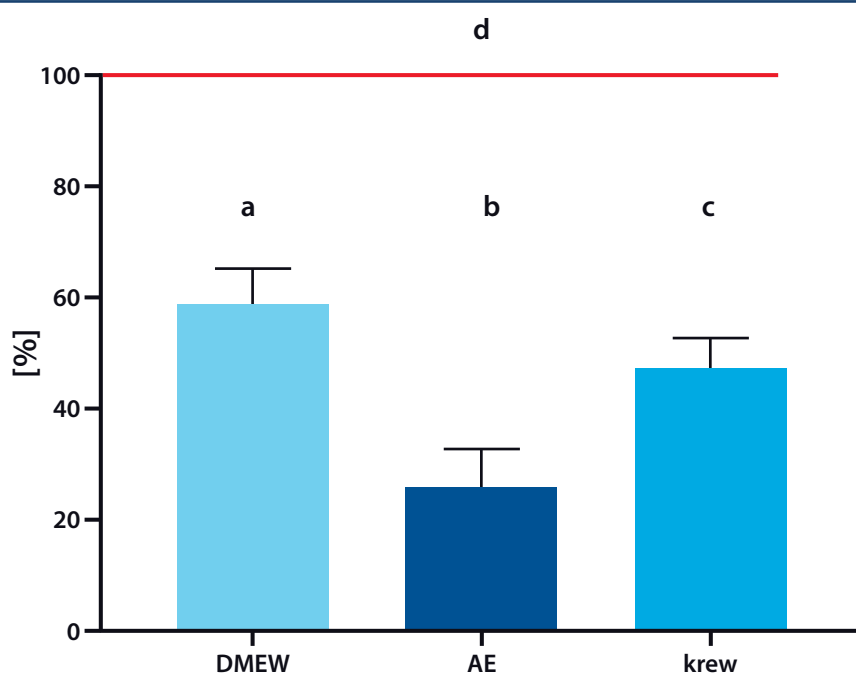
Po upływie 7-dniowego czasu hodowli płynne pożywki usuwano, a nośnik celulozowy z bakteriami wprowadzano

do 5 ml 0,5% saponiny (Merck) w celu oderwania biofilmu oraz rozbicia agregatów komórkowych. Zawiesinę komórek bakteryjnych wprowadzano następnie do szeregu rozcieńczeń w soli fizjologicznej, a następnie wykonywano posiew ilościowy na podłożu McConkeya oraz Columbia agar. Podłoża agarowe z bakteriami inkubowano przez 24h/37°C. Po upływie czasu inkubacji zliczano wyrosłe na nich kolonie.

OCENA SKUTECZNOŚCI OPATRUNKU URGOCLEAN® Ag PAD WZGLĘDEM BIOFILMU MIESZANEGO *P. AERUGINOSA* I *S. AUREUS*

Do oceny skuteczności badanego opatrunków zastosowano zmodyfikowaną metodę Antibiofilm Dressing's Activity Measurement (ADAM), w której rolę podłoża do rozwoju biofilmu pełnił nośnik celulozowy (wytworzony, jak to opisano w pkt. 1), a środowiska biofilmu: pożywki TSB, lub DMEM, lub AE [10]. Czas kontaktowy opatrunku z biofilmem wynosił 24h. Biofilm w układzie doświadczalnym

Ryc. 1. Porównanie [%] liczby komórek tworzących biofilm mieszany *P. aeruginosa* i *S. aureus* na nośniku celulozowym w różnych mediach hodowlanych: TSB (wyniki przyjęte jako referencyjne, oznaczone czerwoną linią, 100%), DMEM, sztucznym wysięku (AE) oraz we krwi. a, b, c, d – różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$).



Ryc. 2. Biofilm mieszany *P. aeruginosa* i *S. aureus* na nośniku celulozowym w sztucznym wysięku. Powiększenie 2500× (część lewa panelu) i 5000× (część prawa panelu), mikroskop Zeiss Auriga 60.

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym druk i umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

hodowano przez 7 dni w temperaturze 37°C w warunkach komory wilgotnej. Kontrolę eksperymentu (100% poziom przeżywalności komórek w biofilmie) stanowił układ, w którym biofilmu nie poddano aktywności środka przeciwdrobnoustrojowego. Po upływie czasu hodowli biofilm poddawano procedurze posiewów ilościowych (jak opisano w pkt. 4) oraz wizualizacji z wykorzystaniem mikroskopii elektronicznej i fluorescencyjnej. Równolegle procedurom mającym na celu oszacować aktywność przeciwdrobnoustrojową badanego opatrunku poddano biofilm jednogatunkowy stworzony przez *P. aeruginosa* lub *S. aureus*, z zachowaniem takich samych warunków eksperymentalnych, jakie zastosowano dla biofilmu mieszanego *P. aeruginosa* i *S. aureus*.

WIZUALIZACJA BIOFILMÓW Z WYKORZYSTANIEM MIKROSKOPII ELEKTRONOWEJ

Nośniki BC zawierające biofilm drobnoustrojów umieszczono w 2% glutardehydzie i poddano inkubacji przez okres 4h w temperaturze wynoszącej 4°C. Po upływie czasu inkubacji próbki poddano przepłukiwaniu wodą 3× przez okres 2 min. i wprowadzono do rosnących stężeń etanolu (szereg alkoholowy) w sekwencji: 2×10 min. w 10%; 1×10 min. w stężeniach: 25%, 50%, 70%, 80%, 90%, i finalnie 2×15 min. w 100% w celu dehydratacji. Odwodnione próbki poddano suszeniu w temperaturze pokojowej. Próbki napyłano z wykorzystaniem napyłarki Quorum i poddawano obrazowaniu z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronicznego Zeiss Auriga 60.

WIZUALIZACJA BIOFILMÓW Z WYKORZYSTANIEM MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ

Nośniki BC zawierające biofilm drobnoustrojów wprowadzono do 2 ml mieszaniny barwników SYTO-9 oraz jodku propidyny (PI) (LIVE/DEAD™ BacLight™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)) na czas wynoszący 15 min. w temperaturze pokojowej, bez dostępu do światła. Po zakończonej inkubacji mieszaninę barwników usunięto z wykorzystaniem pipety automatycznej, a próbki wprowadzono do dołków płytki 24-dołkowej i poddano wizualizacji z wykorzystaniem mikroskopu Etaluma 800 z 20-krotnym powiększeniem obiektywu (Olympus IPC). Długości fali wzbudzenia/emisji dla SYTO9 i jodku propidyny wynosiły odpowiednio 480/500 nm i 490/635 nm.

OCENA ZDOLNOŚCI OPATRUNKU URGOCLEAN® Ag PAD DO ABSORBCJI BADANYCH PŁYNÓW

18×18 mm fragmenty opatrunków zważono z zachowaniem zasad aseptyki na wadze analitycznej, a następnie wprowadzono na 48h do zastosowanych w badaniu płynów (TSB, AE, DMEM, krew baranina) w temperaturze 37°C. Następnie opatrunki przetarto delikatnie jałowym papierem i ponownie zważono na wadze analitycznej.

OBLICZENIA STATYSTYCZNE

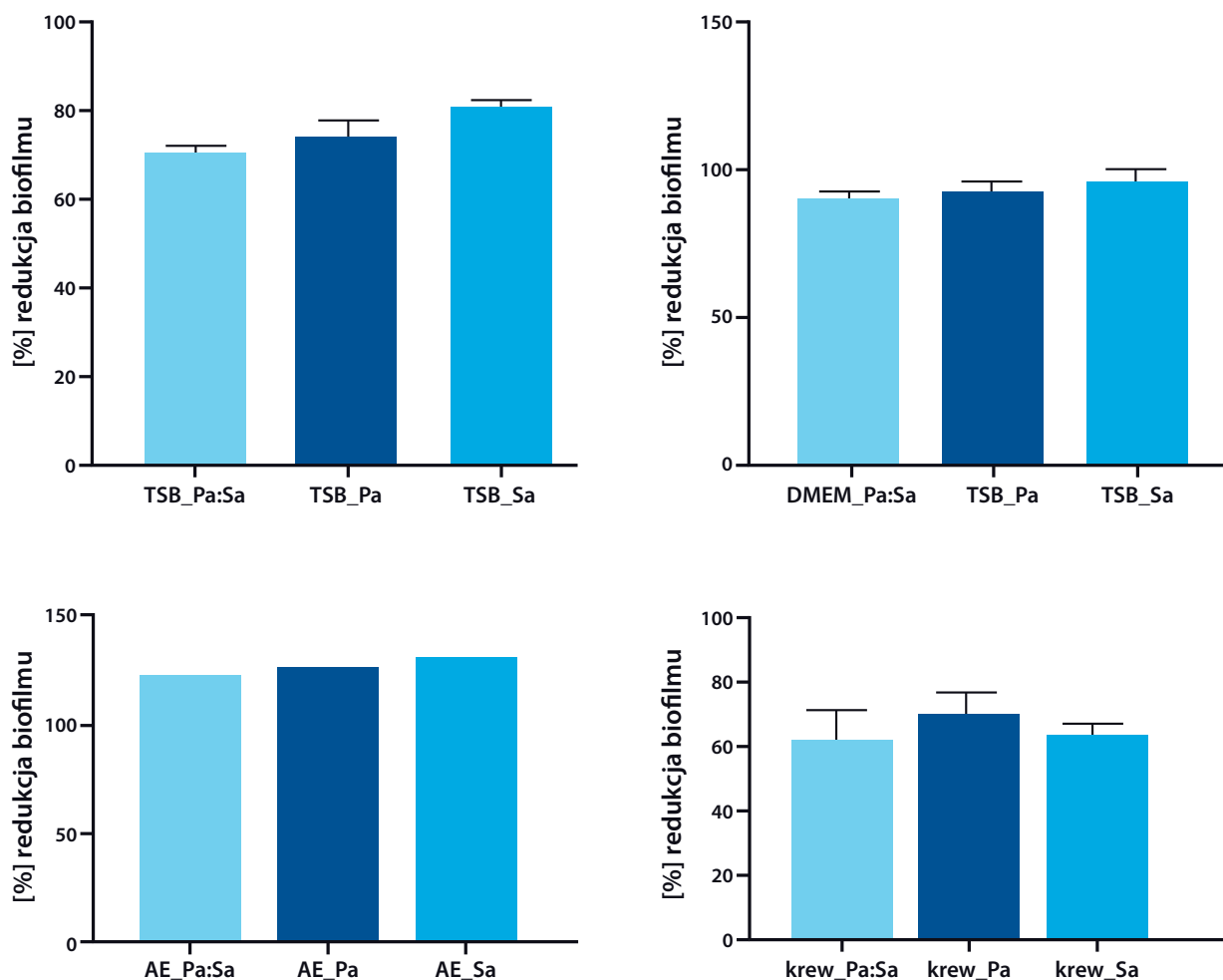
Określenia istotności statystycznej uzyskanych wyników dokonano z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad 8, stosując test Kruskala-Wallisa z analizą post-hoc Dunnetta lub test t-studenta ($p < 0,05$).

WYNIKI

Wyniki posiewów ilościowych ko-hodowli szczepów *P. aeruginosa* i *S. aureus*, przeprowadzonych w celu wytworzenia biofilmu mieszanego, wykazały, że w przypadku 100% kombinacji specyficznego szczepu *S. aureus* ze specyficznym szczepem *P. aeruginosa* liczba komórek Gram-ujemnych pałeczek ropy błękitnej była istotnie statystycznie wyższa ($p < 0,05$), w porównaniu do liczby komórek Gram-dodatniego gronkowca. W przypadku 34% ko-hodowli w 7. (ostatnim) dniu inkubacji dochodziło do całkowitego zaniku komórek *S. aureus* w biofilmie (stawał się on biofilmem jednogatunkowym, tworzonym jedynie przez *P. aeruginosa*). W przypadku pozostałych 66% ko-hodowli średni stosunek liczby komórek *P. aeruginosa* do liczby komórek *S. aureus* wynosił 7:3, odpowiednio, a w skrajnych wynikach 9:1 lub 4:6 dla komórek *P. aeruginosa* i *S. aureus*, odpowiednio. W oparciu o uzyskane wyniki do dalszych badań wykorzystano ko-hodowlę szczepu klinicznego *P. aeruginosa* 4 (Pa4) oraz szczepu klinicznego *S. aureus* 22 (Sa22), w którym stosunek [%] liczby komórek obu patogenów wynosił [72,3±4,9]:[27,7±4,9], odpowiednio, jako reprezentatywny dla grupy biofilmów mogących być określonych w zastosowanym układzie badawczym, jako biofilmy mieszane.

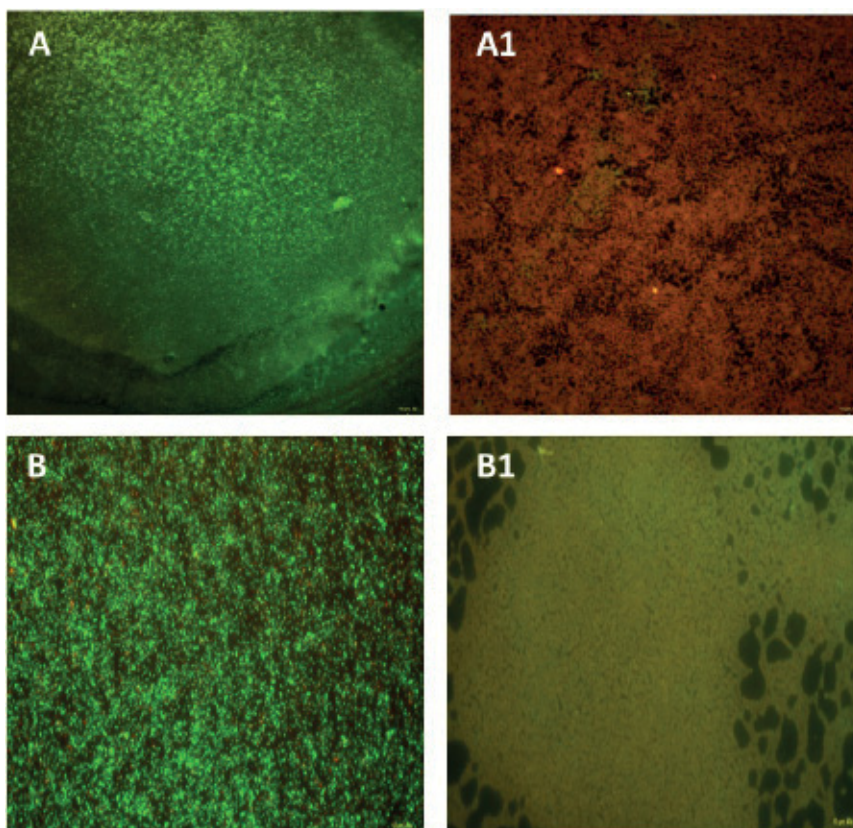
W kolejnym etapie doświadczenia oszacowano zdolność biofilmu mieszanego Pa4:Sa22 do tworzenia biofilmu na nośniku celulozowym w pożywce TSB. Liczbę komórek tworzących biofilm w tym medium uznano jako referencyjną względem liczby komórek tworzących biofilm w DMEM, AE lub krwi (Ryc. 1). Wyniki wskazują, że biofilm mieszany *P. aeruginosa* i *S. aureus* tworzony był przez istotnie niższą liczbę komórek ($p < 0,05$) w mediach DMEM, AE oraz krwi, w porównaniu z standardowym medium mikrobiologicznym TSB. Z kolei w sposób istotnie statystyczny wyższa liczba komórek tworzyła biofilm mieszany w pożywce DMEM niż we krwi oraz sztucznym wysięku, a także wyższa liczba komórek tworzyła biofilm mieszany we krwi niż w sztucznym wysięku ($p < 0,05$). Jednocześnie przeprowadzone analizy wyników posiewów ilościowych wykazały, że stosunek liczby komórek *P. aeruginosa* do liczby komórek *S. aureus* nie ulegał istotnej zmianie w zależności od zastosowanego medium i wynosił średnio 7:3. Wizualizację biofilmu mieszanego Pa4:Sa22 na nośniku celulozowym w sztucznym wysięku przedstawiono na Ryc. 2. Następnie przeprowadzono, z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody Antibiofilm Dressing's Activity

- ! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym druk i umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.



Ryc. 3. Porównanie zdolności lipidokoloidowego opatrunku srebrowego do eradykacji biofilmu mieszanego [Pa:Sa] oraz jednogatunkowego [Pa] lub [Sa], utworzonego w medium TSB, DMEM, sztucznym wysięku [AE] lub krwi.

Ryc. 4. Eradykacja biofilmu mieszanego *P. aeruginosa* i *S. aureus* przez opatrunek lipidokoloidowy zawierający srebro. A, B: biofilm mieszanany, tworzący się w sztucznym wysięku lub we krwi, odpowiednio. A1, B1: pozostałości biofilmu po zastosowaniu opatrunku. Kolor zielony – żywe komórki *P. aeruginosa* i *S. aureus* w biofilmie; kolor czerwony/pomarańczowy – komórki *P. aeruginosa* i *S. aureus* martwe; kolor żółto-pomarańczowy – nałożenie fluorescencji od komórek żywych oraz martwych; czarne przestrzenie – obszar, w którym brak jest zarówno komórek żywych, jak i martwych.



! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym druk i umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

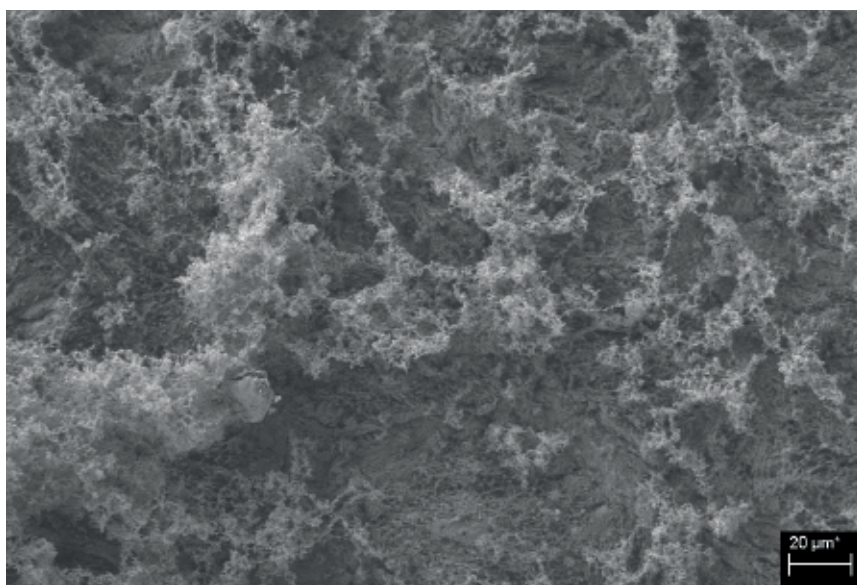
Measurement (ADAM), ocenę aktywności przeciwbiofilmowej opatrunku lipidokoloidowego zawierającego jony srebra względem biofilmu mieszanego Pa4:Sa22 oraz biofilmów jednogatunkowych tworzonych na nośniku celulozowym przez szczep Pa4 lub Sa22 w poszczególnych pożywkach (Ryc. 3). Wyniki wskazują na wysoką zdolność badanego opatrunku do eradykacji zarówno biofilmu mieszanego [Pa4:Sa22], jak i biofilmów jednogatunkowych tworzonych przez *P. aeruginosa* 4 lub *S. aureus* 22. W przypadku biofilmów tworzonych w sztucznym wysięku oraz w medium DMEM zdolność eradykacyjna opatrunku sięgała 100%, natomiast w bogatym medium mikrobiologicznym 80%, a w pełnej krwi – pomiędzy 60% a 70%. Na Ryc. 4 przedstawiono proces eradykacji biofilmu mieszanego za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, potwierdzony dodatkowo za pomocą mikroskopii elektronowej dla biofilmu mieszanego wytworzonego w sztucznym wysięku (Ryc. 5).

Finalnie dokonano oceny zdolności opatrunku lipidokoloidowego zawierającego srebro do pochłaniania płynów zastosowanych w niniejszej pracy, jako środowisko do hodowli biofilmu. Wyniki analizy przedstawiono na Ryc. 6. Opatrunek lipokoloidowy cechował się zdolnością pochłaniania badanych płynów przekraczającą 6-krotnie swoją

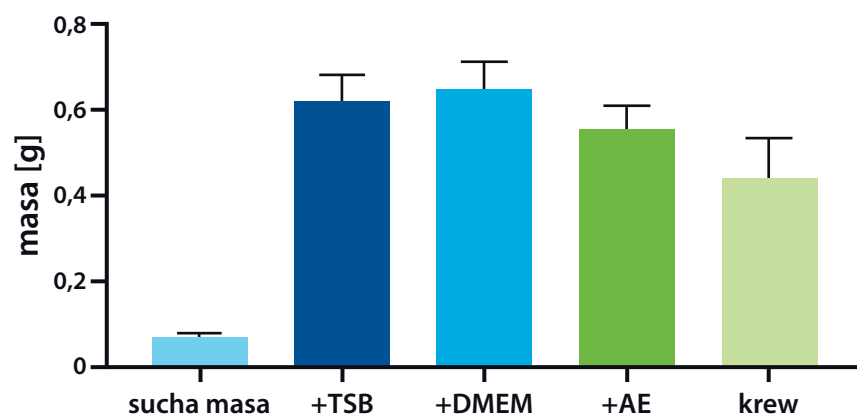
suchą masę w inkubacji w obecności krwi, 7-krotnie, gdy zastosowanym płynem był sztuczny wysięk, oraz 8- i 9-krotnie, gdy opatrunek inkubowany był w obecności DMEM lub TSB, odpowiednio.

DYSKUSJA

Trudności terapeutyczne z eradykacją biofilmów wikłających proces gojenia ran spowodowane są nie tylko specyficznymi cechami umożliwiającymi tym społecznościom drobnoustrojów przetrwanie w środowisku rany (macierz zewnątrzkomórkowa, zróżnicowanie aktywności metabolicznej komórek), ale także w dużej mierze warunkami panującymi w tej niszy. Na warunki te wpływ mają zaburzenia pracy układu krwionośnego i odpornościowego, z którymi boryka się znaczna część pacjentów, a które prowadzą do wytworzenia rany niegojącej się [24]. Powyższe zaburzenia pozwalają drobnoustrojom rozwijać się i tworzyć biofilm na skutek braku adekwatnej reakcji ze strony zarówno komórkowych komponentów układu immunologicznego, jak i komponentów niekomórkowych (przeciwciał, układu dopełniacza). Zastosowany w niniejszej pracy model



Ryc. 5. Powierzchnia nośnika zasiedlonego uprzednio przez biofilm mieszany po zastosowaniu opatrunku lipidokoloidowego zawierającego jony srebra. Skaningowy Mikroskop Elektronowy Zeiss Auriga 60.



Ryc. 6. Różnice w masie opatrunku suchej i mokrej po inkubacji w obecności medium TSB, DMEM, sztucznego wysięku (AE) lub krwi.

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym druk i umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

eksperymentalny *in vitro* pozwala w dużej mierze na odtworzenie warunków panujących w ranie niegojącej się poprzez zastosowanie pożywek, do pewnego stopnia przypominających swym składem wysięk z rany (DMEM, AE), oraz krwi, którą wysięk może (choć nie musi) być podbarwiony. Dodatkowo przeprowadzone eksperymenty wykonano na nośniku celulozowym, którego nieregularna, porowata, elastyczna struktura odwzorowuje w określonej mierze powierzchnię topograficzną łożyska rany (stanowi ponadto odwzorowanie w większym stopniu, niż stosowana w standardowych modelach *in vitro* płaska i gładka powierzchnia płytki polistyrenowej). W 2021 r. zespół Palecznej i wsp. wykazał, że skład i właściwości płynu, w którym hodowany jest biofilm, przekłada się zarówno na poziom jego biomasy, jak i aktywności metabolicznej [19]. Również wyniki przedstawione na Ryc. 1 wskazują na istotnie wyższą liczbę komórek tworzonych w bogatym, zawierającym wysokie stężenie glukozy medium mikrobiologicznym (TSB) niż w płynach mających symulować wysięk z rany (DMEM, AE) oraz we krwi. Z kolei wyższa liczba komórek tworzących biofilm we krwi niż w sztucznym wysięku (AE) może być spowodowana faktem wykorzystania przez komórki drobnoustrojów elementów morfotycznych (których brak jest w AE) jako źródła pożywienia. Uzyskane dane dotyczące różnic w liczebności komórek tworzących biofilm, hodowanych w poszczególnych pożywkach, pozwalają na potencjalny wgląd w możliwości tworzenia biofilmu u pacjentów z ranami, w których dochodzi do gromadzenia się różnych typów wysięku (np. wysięk podbarwiony krwią bądź nie, wysięk zawierający podwyższone stężenie glukozy itp.). Co więcej, jak przedstawiono to na Ryc. 2, obraz biofilmu mieszanego wytworzonego na elastycznym, porowatym nośniku celulozowym w sztucznym wysięku znacząco odbiega od obrazów (w tym tych prezentowanych przez autorów niniejszego artykułu) biofilmu wytworzonego na płaskiej powierzchni polistyrenu w pełnym medium mikrobiologicznym [9]. Biofilmy tworzące się w warunkach naśladujących ranę przewlekłą cechują się niższą liczbą tworzących je komórek, jednak relatywnie obfitszą macierzą komórkową. Wykonanie badań przedstawionych na Ryc. 1 i 2 było konieczne do zrozumienia procesów zachodzących po ekspozycji biofilmów utworzonych w poszczególnych pożywkach na lipidokoloidowy opatrunek zawierający srebro (Ryc. 3). Eradykacja biofilmu mieszanego, wytworzonego w pełnym medium, osiągała średni poziom 73% (w 24-godzinny czas kontaktowy) oraz 77% oraz 82%, gdy ekspozycji na opatrunek poddano biofilmy jednogatunkowe *P. aeruginosa* oraz *S. aureus*, odpowiednio. W przypadku biofilmów jednogatunkowych jest to wynik korelujący z danymi, które przedstawione zostały w poprzednich pracach autorów; niższe niż 10% różnice w liczbie komórek wynikać mogą zarówno z czułości metody, jak i z faktu zmienności wewnątrzgatunkowej poszczególnych szczepów *P. aeruginosa* czy *S. aureus*, która

przejawia się m.in. w zróżnicowanej wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe [3, 4]. Poziom eradykacji biofilmów mieszanych i jednogatunkowych (wytworzonych w sztucznym wysięku i DMEM) po zastosowaniu opatrunku lipidokoloidowego zawierającego srebro wynosił ponad 90%; w przypadku biofilmów jednogatunkowych rosnących w sztucznym wysięku zaobserwowano pełną (100%) eradykację. Poziom eradykacji biofilmu mieszanego rosnącego w tym medium (choć wynosił ponad 90%) był niższy w przypadku biofilmów jednogatunkowych, co sugerować może podwyższoną tolerancję biofilmów mieszanych na środki przeciwdrobnoustrojowe. Stosunek komórek gronkowca do komórek pałeczki ropy błękitnej w biofilmie stanowił 3:7. Na tym etapie badań i analizy wyników nie można wysnuć wniosków co do udziału komórek gronkowca np. w tworzeniu ochronnej macierzy zewnątrzkomórkowej, wymagałoby to zastosowania zaawansowanych metod spektroskopowych i pozwoliłoby na określenie różnic strukturalnych w macierzy oraz oszacowanie wkładu poszczególnych gatunków patogenów w tworzenie tej struktury [27]. Biofilmy mieszane hodowane we krwi cechowały się wyższą tolerancją na zastosowany opatrunek, niż biofilmy hodowane w sztucznym wysięku oraz w pożywce DMEM, a zbliżoną (około 70%) do tej obserwowanej w przypadku biofilmów utworzonych w pełnym medium, mimo że liczba komórek w ostatnim z wymienionych typów biofilmów była wyższa o około 50%. Może to być związane ze zdolnością obu patogenów do inkorporowania elementów morfotycznych krwi do struktury macierzy i wykorzystywania ich w celach ochronnych. Należy jednak zauważyć, że aktywność opatrunku lipidokoloidowego zawierającego srebro względem biofilmu utworzonego we krwi pozwoliła na istotne obniżenie liczby komórek tworzących go, co ma istotne znaczenie, biorąc pod uwagę fakt wymiany opatrunków i czasu, jakiego biofilm potrzebuje do odtworzenia swojej pełnej struktury w warunkach *in vivo*. Z kolei na Ryc. 4, obrazującej biofilmy utworzone w sztucznym wysięku bądź we krwi, można zauważyć istotne zmniejszenie liczby żywych komórek patogenów (w przypadku sztucznego wysięku – pełną eradykację), ale także przestrzenie (widoczne w obrazie fluorescencyjnym jako czarne obszary), w których doszło nie tylko do pełnego uśmiercenia komórek bakteryjnych na skutek aktywności jonów srebrnych, ale także do ich dezintegracji i usunięcia z układu eksperymentalnego. Dane te znalazły również potwierdzenie w obrazowaniu wykonanym za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (Ryc. 5), na którym można dostrzec bezkomórkowe pozostałości zdeintegrowanego biofilmu.

Ze względu na fakt, iż nadmiar płynu (wysięku) istotnie upośledza proces gojenia się rany, w ostatnim etapie badań przeprowadzono ocenę zdolności lipidokoloidowego opatrunku zawierającego jony srebrne do pochłaniania płynów wykorzystanych w niniejszej pracy do hodowli

! Artykuł jest dostępny na zasadzie dozwolonego użytku osobistego. Dalsze rozpowszechnianie (w tym druk i umieszczanie w sieci) jest zabronione i stanowi poważne naruszenie przepisów prawa autorskiego oraz grozi sankcjami prawnymi.

biofilmów. Zastosowane fragmenty opatrunków absorbowały masę płynów stanowiącą 6-krotność (w przypadku krwi) do 9-krotności swojej suchej masy (w przypadku DMEM). Zauważono dodatkowo, że po upływie czasu inkubacji z płynami opatrunki, przyjąwszy formę żelu, nie traciły swojej spójności, prawdopodobnie na skutek obecności włókien poliakrylanowych stanowiących objętość dla karboksymetylocelulozy rozproszonej w lipofilnej warstwie petrolatum. Zatem obserwowana w tym badaniu eksperymentalnym wysoka zdolność do pochłaniania płynów połączona z przejściem opatrunku w formę żelową powinna przełożyć się w warunkach *in vivo* na utrzymanie właściwej wilgotności rany, która jest jednym z kluczowych czynników warunkujących prawidłowy proces gojenia.

PODSUMOWANIE

Rosnąca liczba ran niegojących się w społeczeństwie i związane z tym ubytki na zdrowiu, a nawet śmierć pacjentów, wymuszają zastosowanie odpowiednich rozwiązań terapeutycznych. Obecność w ranie biofilmów (szczególnie biofilmów mieszanych) uważana jest za jeden z najistotniejszych czynników wikłających proces gojenia i podnoszących ryzyko przejścia infekcji z formy miejscowej do postaci uogólnionej (systemowej). Stąd, biorąc pod uwagę przedstawione w niniejszej pracy korzystne wyniki aktywności przeciwbiofilmowej oraz zdolność do kontroli poziomu wysięku (reprezentowanego w niniejszej pracy przez zróżnicowane kompozycyjnie płyny hodowlane) badanych opatrunków lipidokoloidowych zawierających srebro, należy uznać (w granicach dopuszczalnych przy ekstrapolacji wyników uzyskanych w modelach *in vitro* na dane kliniczne), że stanowią one skuteczne rozwiązanie w procesie opieki nad raną niegojącą się, wikłaną obecnością drobnoustrojów tworzących biofilm.

KONFLIKT INTERESÓW: Pracę wykonano w ramach zadania statutowego: SUBZ.D230.22.026.

PIŚMIENNICTWO

- Atkin L, Bučko Z, Conde Montero E et al. Implementing TIMERS: the race against hard-to-heal wounds. *J Wound Care* 2019;23(Suppl. 3a):S1–S50.
- Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv Ther* 2014;31(8):817–836.
- Bartoszewicz M, Junka A, Dydak K, Fijałkowski K. Ocena skuteczności opatrunku UrgoClean® Ag względem form biofilmowych patogenów ran przewlekłych. *Leczenie Ran* 2018;15(2):45–50.
- Bartoszewicz M, Junka A, Oleksy M et al. Skuteczność opatrunku UrgoClean® Ag Pad w eradykacji i sekwestracji *in vitro* drobnoustrojów będących czynnikiem etiologicznym zakażeń ran przewlekłych. *Forum Zakażeń* 2019;10(3):159–168.
- Bernard FX, Barrault C, Juchaux F, Laurensou C, Apert L. Stimulation of the proliferation of human dermal fibroblasts *in vitro* by a lipidocolloid dressing. *J Wound Care* 2005;14(5):215–220.
- Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med* 2006;23(6):594–608.
- Bonkemeyer Millan S, Gan R, Townsend PE. Venous ulcers: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2019;100(5):298–305.
- Bowers S, Franco E. Chronic wounds: evaluation and management. *Am Fam Physician* 2020;101(3):159–166.
- Chabowski K, Junka AF, Szymczyk P et al. The application of impedance micro-sensors for real-time analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Pol J Microbiol* 2015;64(2):115–120.
- Dydak K, Junka A, Dydak A et al. *In vitro* efficacy of bacterial cellulose dressings chemisorbed with antiseptics against biofilm formed by pathogens isolated from chronic wounds. *Int J Mol Sci* 2021;22(8):3996.
- Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2011;19(3):441–453.
- Grey JE, Harding KG, Enoch S. Venous and arterial leg ulcers. *BMJ* 2006;332(7537):347–350.
- Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010;89(3):219–229.
- Järbrink K, Ni G, Sönnergren H et al. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Syst Rev* 2016;5(1):152.
- Kammerlander G, Andriessen A, Asmussen P, Brunner U, Eberlein T. Role of the wet-to-dry phase of cleansing in preparing the chronic wound bed for dressing application. *J Wound Care* 2005;14(8):349–352.
- Malone M, Bjarnsholt T, McBain AJ et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *J Wound Care* 2017;26(1):20–25.
- Martinengo L, Olsson M, Bajpai R et al. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Ann Epidemiol* 2019;29:8–15.
- Millette G, Langlois J-P, Brouillette E, Frost EH, Cantin AM, Malouin F. Despite antagonism *in vitro*, *Pseudomonas aeruginosa* enhances *Staphylococcus aureus* colonization in a murine lung infection model. *Front Microbiol* 2019;10:2880.
- Palczyński J, Junka A, Brożyna M et al. The high impact of *Staphylococcus aureus* biofilm culture medium on *in vitro* outcomes of antimicrobial activity of eound antiseptics and antibiotic. pathogens. 2021;10(11):1385.
- Renner R, Erfurt-Berge C. Depression and quality of life in patients with chronic wounds: ways to measure their influence and their effect on daily life. *Chronic Wound Care Manag Res* 2017;4:143–151.
- Roy S, Elgharably H, Sinha M et al. Mixed-species biofilm compromises wound healing by disrupting epidermal barrier function. *J Pathol* 2014;233(4):331–343.
- Stiehl JB. Failure of healing in chronic diabetic wounds: A case report. *Adv Skin Wound Care* 2020;33(11):1–5.
- Thomas DR, Burkemper NM. Aging skin and wound healing. *Clin Geriatr Med* 2013;29(2):xi–xx.
- Tsourd E, Barthel A, Rietzsch H, Reichel A, Bornstein SR. Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus. *Biomed Res Int* 2013;2013:385641.
- Viennet C, Bridge J, Gabiot AC, Humbert P. Comparison of different wound dressings on cultured human fibroblasts and collagen lattices. *J Wound Care* 2003;12(10):385–390.
- Wei D, Zhu X-M, Chen Y-Y et al. Chronic wound biofilms: diagnosis and therapeutic strategies. *Chin Med J (Engl)* 2019;132(22):2737–2744.
- Zhang B, Powers R. Analysis of bacterial biofilms using NMR-based metabolomics. *Future Med Chem* 2012;4(10):1273–1306.
- Zieliński M, Kucharzewski M, Szweczyk MT et al. Opatrunki lipidokoloidowe – nowatorska koncepcja leczenia szerokiego spektrum ran ostrych i przewlekłych. *Leczenie Ran* 2016;13(3):77–83.