

! 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.

ADAM JUNKA<sup>1</sup> | MONIKA DZIĘGIELEWSKA<sup>2</sup> | MICHAŁ WOREK<sup>3</sup> | MARZENNA BARTOSZEWICZ<sup>1</sup>

## OCENA SKUTECZNOŚCI MAŚCI SUTRIHEAL® FORTE 10% WZGLĘDEM TWORZONEGO PRZEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* I *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BIOFIMU MIESZANEGO O WYSOKIEJ TOLERANCJI NA BACYTRACYNĘ, NEOMYCYNĘ I POLIMYKSYNĘ A

EFFICACY ASSESSMENT OF SUTRIHEAL® FORTE 10% AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*  
AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* MIXED BIOFILM DISPLAYING HIGH TOLERANCE TO BACITRACIN,  
NEOMYCIN AND POLYMYXIN B

**STRESZCZENIE:** **Wstęp** Antybiotykooporne drobnoustroje tworzące biofilm wywołują poważne infekcje zagrażające zdrowiu i życiu milionów pacjentów na całym świecie. Nowoczesne wytyczne leczenia ran trudno gojących się zalecają stosowanie do zwalczania biofilmów miejscowo działających związków przeciwdrobnoustrojowych. **Cel** W niniejszej pracy podjęto próbę oceny aktywności maści zawierającej 10% formułację kwasów żywicznych (diterpenów) przeciwko biofilmowi mieszanemu stworzonemu przez *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. **Materiał i metody** Jako substancje porównawcze wykorzystano maść zawierającą formułację w stężeniu 5% oraz maść zawierającą bacytracynę, neomycynę i polimiksynę B. **Wyniki** Uzyskane wyniki wskazują na istotnie wyższą skuteczność maści zawierającej 10% formułację kwasów żywicznych w eradykacji biofilmu mieszanego, a także penetracji przez jego warstwy, niż pozostałych maści. **Wnioski** Biorąc pod uwagę przedstawione wyniki, można przyjąć, że zastosowanie maści zawierającej kwasy żywiczne przekłada się w warunkach klinicznych na wysoki poziom eradykacji biofilmu z rany oraz na niskie ryzyko rozwoju oporności drobnoustrojów.

**SŁOWA KLUCZOWE:** bacytracyna, biofilm mieszaný *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*, kwasy żywiczne, lignany, maść, rany, neomycyna, polimiksyna B

**ABSTRACT: Introduction** Antibiotic-resistant and biofilm-forming microorganisms cause serious infections which threaten the health and lives of millions of patients worldwide. Modern guidelines regarding the management of chronic wounds recommend the use of topical antimicrobial compounds to combat biofilms. **Aim** The presented study aimed to evaluate the activity of the ointment containing a 10% formulation of resin acids (diterpenes) against the mixed biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Material and methods** The ointment containing the formulation at a concentration of 5% and the ointment containing bacitracin, neomycin and polymyxin B were used as reference substances. **Results** The obtained results indicate a significantly higher effectiveness of the ointment containing a 10% formulation of resin acids in the eradication of mixed biofilm, as well as in penetration of its layers, than the other compared ointments. **Conclusion** In view of the results presented, it can be assumed that the use of an ointment containing resin acids results in a high level of wound biofilm eradication and a low risk of the development of microbial resistance in the clinical setting.

**KEY WORDS:** ointment, wounds, resin acids, lignans, bacitracin, neomycin, polymyxin B, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

- 1 Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
- 2 Dzięgielewska Instytut Oka w Warszawie
- 3 Specjalistyczny Szpital Miejski w Toruniu

### ✉ ADAM JUNKA

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

Wpłynęło: 13.03.2023

Zaakceptowano: 02.04.2023

DOI: dx.doi.org/10.15374/FZ2023005

! 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.

## WSTĘP

Wyniki przeprowadzonej w 204 krajach analizy wykazały, że na skutek zakażeń wywołanych przez bakterie antybiotykooporne rocznie umiera 4,95 milionów osób. Za śmierć niemal miliona z nich (929000) odpowiada 6 gatunków antybiotykoopornych drobnoustrojów: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* oraz *Acinetobacter baumannii* [1].

Kolejnym, poza antybiotykoopornością, czynnikiem przekładającym się na niepowodzenia terapeutyczne jest tworzenie przez drobnoustroje struktur określanych mianem biofilmu. Ta osiadła społeczność komórkowa otoczona jest przez polimerową macierz (ang. matrix), w skład której wchodzi cukry, białka, kwas nukleinowy, zniszczone komórki krwi lub wszystkie z wyżej wymienionych elementów jednocześnie [8]. Macierz biofilmowa pełni funkcje ochronne, odżywcze, stanowi środowisko wymiany genów kodujących oporność względem środków przeciwdrobnoustrojowych, różnicuje aktywność metaboliczną oraz zapewnia integralność społeczności komórek w biofilmie [4]. Na skutek przestrzennych, metabolicznych oraz fizjologicznych uwarunkowań, będących efektem obecności macierzy, komórki w biofilmie cechują się istotnie wyższą tolerancją na środki przeciwdrobnoustrojowe (np. antybiotyki i antyseptyki) w porównaniu do tzw. komórek niezadherowanych (wolno-pływających, planktonicznych) [5]. Biofilmy wywołują m.in. zakażenia skóry i ran trudno gojących się, kości, płuc, układu krwionośnego, pokarmowego oraz moczowego, a ich obecność związana jest z przewlekłym stanem zapalnym i postępującą destrukcją tkanek [18].

W ranach trudno gojących się (przewlekłych) występuje głównie biofilm mieszany, w skład którego wchodzi od dwóch do nawet kilkunastu gatunków drobnoustrojów. Wraz z upływem czasu dochodzi między nimi do ustalenia się stanu dynamicznej równowagi, w której jeden z gatunków zaczyna dominować (w aspekcie liczby komórek) nad pozostałymi. Do gatunków charakteryzujących się wysoką zdolnością do dominacji w obrębie konsorcjum biofilmowego należą m.in. *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Staphylococcus aureus*. Ich obecność w ranie przewlekłej prowadzi do rozprzestrzenienia się zakażenia, a w efekcie do poważnych konsekwencji zdrowotnych lub nawet do śmierci pacjenta [14]. Zgodnie z koncepcją ekwiwalentnej grupy patogenicznej każdy drobnoustrój wnosi do biofilmu mieszanego cechy własne o najwyższej zjadliwości, co przekłada się na podwyższoną (w porównaniu do biofilmów jednogatunkowych) zdolność do przetrwania i namnażania się w środowisku rany. Dotyczy to również oporności na stosowane w terapii antybiotyki. Obecnie algorytmy leczenia ran przewlekłych zalecają stosowanie antybiotykoterapii systemowej, natomiast w leczeniu miejscowym – interwencję chirurgiczną, użycie antyseptyków, lawaseptyków oraz aktywnych przeciwdrobnoustrojowo opatrunków [2].

Środki antyseptyczne stosowane do leczenia ran przewlekłych zagrożonych lub objętych procesem infekcyjnym wywołanym przez biofilmy powinny cechować się m.in. szerokim spektrum aktywności (względem jak najwyższej liczby gatunków drobnoustrojów) oraz być zdolne do penetracji przez macierz biofilmową – by dotrzeć do komórek położonych w najniższych (podstawnych) warstwach tej struktury, doprowadzić do ich eradykacji i zapobiec odtworzeniu (lub przynajmniej szybkiemu odtworzeniu) biofilmu.

Jedną z postaci leku/wyrobu medycznego zawierającego związki przeciwdrobnoustrojowe, przeznaczoną do stosowania na skórę i rany, są maści. Określone z nich zawierają antybiotyki (lub antybiotyki) i w świetle istniejących wytycznych nie powinny być wykorzystywane w leczeniu zainfekowanych ran przewlekłych, natomiast inne formuły zawierają związki antyseptyczne o szerokim spektrum działania [2]. We wcześniej opublikowanej pracy autorzy wykazali, że maść zawierająca 5% formułę kwasów żywiczych i lignanów, uzyskaną ze świerku norweskiego, cechuje się wysoką aktywnością względem biofilmów jednogatunkowych *S. aureus* lub *P. aeruginosa* oraz brakiem efektu cytotoksycznego w określonych stężeniach względem linii komórek odpowiedzialnych za gojenie się rany (fibroblastów i keratynocytów) [3]. Celem niniejszej pracy była zaś ocena aktywności przeciwbiofilmowej nowej, 10% formuły kwasów żywiczych i lignanów w porównaniu do 5% formuły oraz do maści zawierającej bacytracynę, neomycynę i polimiksynę B. W badaniu wykorzystano biofilm mieszany, tworzony przez *P. aeruginosa* oraz *S. aureus*, a ocenie za pomocą adekwatnych modeli doświadczalnych poddano nie tylko zdolność maści do eradykacji komórek bakteryjnych, ale także zdolność związków przeciwdrobnoustrojowych, wchodzących w skład maści, do penetracji przez warstwy biofilmu.

## MATERIAŁ I METODY

### SZCZEPY BAKTERYJNE

Szczepy bakteryjne poddane badaniu pochodziły z kolekcji Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Analizami objęto:

1. 45 klinicznych metycyloopornych szczepów *Staphylococcus aureus* [SA1–S45] izolowanych z owrzodzeń goleni.
2. 45 klinicznych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* [PA1–PA45] o oporności na cefepim, ceftazydynę, imipenem, meropenem, ciprofloksacyne, lewofloksacyne, gentamycynę, izolowanych z owrzodzeń goleni oraz odleżyn.

! 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.

W badaniu zastosowano maść SutriHeal® Forte 5% (zwaną dalej M5%), maść SutriHeal® Forte 10% (zwaną dalej M10%) oraz maść Tribiotic® (zwaną dalej TB), zawierającą neomycynę, bacytracynę oraz polimyksynę A. W badaniu zastosowano również czyste chemicznie postaci neomycyny, bacytracyny oraz polimyksyny A.

#### OKREŚLENIE MIC BADANYCH SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH WZGLĘDEM WYBRANYCH ANTYBIOTYKÓW

Określenie minimalnego stężenia hamującego (ang. minimum inhibitory concentration – MIC) bacytracyny oraz neomycyny względem szczepów gronkowców złocistych oraz polimyksyny B względem szczepów pałeczki ropy błękitnej przeprowadzono z wykorzystaniem metody mikrotitracyjnej w płytce 96-dołkowej, zgodnie z wytycznymi EUCAST. Z 24-godzinnej hodowli w podłożu płynnym przygotowano zawiesinę bakterii w soli fizjologicznej o gęstości 0,5 MF, którą następnie rozcieńczono 1000-krotnie w płynnej pożywce Muller-Hinton (M-H). W dołkach płytki 96-dołkowej przygotowano seryjne rozcieńczenia bacytracyny, neomycyny lub polimyksyny B. Do dołków płytki wprowadzono po 100 µL uprzednio przygotowanej zawiesiny bakteryjnej. Kontrolę wzrostu stanowiła zawiesina bakteryjna niepoddana aktywności środków przeciwdrobnoustrojowych; kontrolę jałowości – sterylne medium pozbawione drobnoustrojów. Układ eksperymentalny inkubowano w temperaturze 35°C/18 godz. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej oznaczono za pomocą dwóch metod (turbidometrycznie – z wykorzystaniem spektrometru oraz kolorymetrycznie – wykorzystując zjawisko konwersji bezbarwnego chlorku trifenylotetrazoliowego do czerwonego formazanu).

#### UTWORZENIE BIOFILMU MIESZANEGO *P. AERUGINOSA* + *S. AUREUS*

W oparciu o wyniki MIC do stworzenia biofilmu mieszanego wykorzystano szczep SA23, SA36 oraz szczep PA8. Inoculum 10<sup>5</sup> cfu/mL każdego ze szczepów wprowadzono w objętości 0,75 mL do dołków płytki 24-dołkowej. Drobnoustroje hodowano przez 24, 48, 72, 96 godz. w temperaturze 37°C w płynnej pożywce – bulion tryptozowo-sojowy (TSB). Co 24 godz. z dołków płytki 24-dołkowej usuwano medium, wprowadzano do nich 1 mL 0,5% saponiny oraz poddawano intensywnemu wytrząsaniu mechanicznemu na wytrząsarce Schutten. Następnie 100 µL zawiesiny zawierającej bakterie przenoszono do próbek zawierających 0,9% NaCl i wykonywano szereg rozcieńczeń. 100 µL każdego rozcieńczenia wysiewano na płytkę Columbia Agar oraz McConkey i rozprowadzano głaszczką po ich powierzchni. Płytki inkubowano 24 godz./37°C, a po czasie inkubacji

zliczono wyrosłe kolonie gronkowców oraz pałeczek ropy błękitnej. Skład ilościowy komórek poszczególnych gatunków tworzących biofilm potwierdzono w 3 powtórzeniach.

#### OKREŚLENIE METODĄ MIKROROZCIĘCZEŃ MBEC NEOMYCYN, BACYTRACYN ORAZ POLIMYKSYNY A WZGLĘDEM BIOFILMU MIESZANEGO (SA+PA)

Biofilm mieszany (Pa+Sa) przygotowano tak, jak opisano powyżej. Do wszystkich dołków płytki zawierającej biofilm wprowadzono 100 µl świeżego podłoża M-H, a następnie seryjne rozcieńczenia badanych związków przeciwdrobnoustrojowych. Dołek nr 11 płytki stanowił kontrolę jałowości badania (napelniono go jałową pożywką – M-H), zaś dołek nr 12 kontrolę dodatnią badania (zawierał biofilm mieszany niepoddany działaniu środków przeciwdrobnoustrojowych). Płytki inkubowano 24 godz. w temperaturze 37°C. Po upływie czasu inkubacji do płytek dodano 10 µl 0,5% chlorku 2, 3, 5-trifenylotetrazoliowego (ang. tetrazolium chloride – TTC). Po 2 godz. inkubacji w 37°C odczytano zmianę zabarwienia roztworów, na podstawie której wyznaczono wartość minimalnego stężenia eradykującego biofilm (ang. minimum biofilm eradication concentration – MBEC). Redukcja bezbarwnego TTC do czerwonego formazanu oznaczała obecność żywych oraz aktywnych metabolicznie komórek bakterii. Badanie wykonano w 3 powtórzeniach.

#### OCENA ANTYBIOFILMOWEJ AKTYWNOŚCI M5%, M10% ORAZ TB WZGLĘDEM BIOFILMU MIESZANEGO ZA POMOCĄ ZMODYFIKOWANEJ METODY ANTIBIOFILM DRESSING ACTIVITY MEASUREMENT (A.D.A.M.)

Powyższa metoda A.D.A.M. została szczegółowo opisana we wcześniejszej pracy autorów niniejszego manuskryptu [13]. 48-godzinny biofilm mieszany (Pa+Sa) poddano 24-godzinnej inkubacji ze związkami przeciwdrobnoustrojowymi. Następnie krążki agarowe zawierające biofilm przeniesiono do świeżych dołków płytki 24-dołkowej. Do dołków płytki wprowadzono 1 ml 0,1% roztworu saponiny i poddano wytrząsaniu w celu oddzielenia komórek tworzących biofilm od powierzchni agaru. Po zakończeniu wytrząsania wykonano seryjne rozcieńczenia otrzymanej zawiesiny w roztworze soli fizjologicznej, a 100 µL rozcieńczeń rozprowadzono szklaną głaszczką po powierzchni płytek agarowych Columbia Agar oraz McConkey. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godz. Po inkubacji policzono liczbę wyrosłych kolonii. Formuła używana do określenia poziomu redukcji biofilmu: 100% – (liczba cfu uzyskana z biofilmu traktowanego związkiem przeciwdrobnoustrojowym/liczba cfu uzyskana z biofilmu nietraktowanego związkiem przeciwdrobnoustrojowym) × 100%. Eksperymenty przeprowadzono w 3 powtórzeniach.

! 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 PRZENIKALNOŚCI ZWIĄZKÓW PRZECIWBIOFILMOWYCH Z M5%, M10% ORAZ TB ZA POMOCĄ MIKROSKOPII KONFOKALNEJ

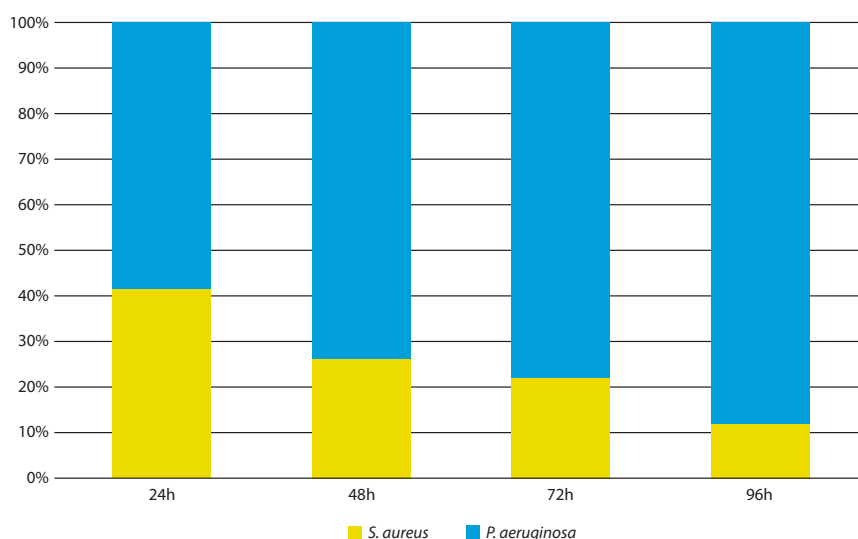
Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem 24-dółkowych płytek polistyrenowych (Nunc™ Lab-Tek™). Biofilmy poddane traktowaniu M5%, M10% lub TB 3-krotnie przepłukano ostrożnie roztworem jałowej soli fizjologicznej. Po zakończeniu przepłukiwania sól fizjologiczną usunięto, a do studzienek wprowadzono 1 ml 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, zaś biofilmy poddano wizualizacji z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Lumascope 720 z 20-krotnym powiększeniem obiektywu Olympus IPC. Zdjęcia zbierane były w przekroju poprzecznym struktury biofilmu, przy grubości (wysokości) warstwy wynoszącej 2 µm. Do oceny wybrano pola o grubości ~36 µm; zarejestrowano 18 warstw biofilmu. Zarejestrowane pole widzenia wynosiło 0,49 mm, a rozmiar ramki wyniósł 1200×1200 pikseli. Długości fali wzbudzenia/emisji dla SYTO® 9 i jodku propidyny wynosiły odpowiednio 480/500 nm i 490/635 nm. Następnie obrazy zostały przetworzone do trójwymiarowych wizualizacji za pomocą oprogramowania ImageJ (NIH, Bethesda). W celu uzyskania danych ilościowych dotyczących emisji światła pochodzącego od barwników SYTO® 9 oraz jodku propidyny również wykorzystano program ImageJ. Obraz konwertowany był do pliku 32-bitowego (prezentującego odcienie szarości), następnie rozłożony na pod-obrazy prezentujące poszczególne kanały fluorescencji. Intensywność (w odcieniach szarości) pikseli pochodzących z kanału fluorescencji czerwonej lub zielonej została zarejestrowana, przedstawiona w postaci parametru Mean Grey Value (MGV) i potraktowana jako estymator liczby komórek wybarwionych barwnikiem SYTO®

9 albo PI. MGV oznaczony był jako średnia intensywność wszystkich pikseli podzielona przez liczbę pikseli. Dla obrazów RGB zarejestrowanych do celów tej analizy MGV obliczono przez konwersję każdego piksela do skali szarości za pomocą równania: kolor szary = 0,299 × kolor czerwony + 0,587 × kolor zielony + 0,114 × kolor niebieski. Dla każdej próbki zarejestrowano 24 obszary (ang. region of interest – ROI) z każdego kanału.

## OCENA AKTYWNOŚCI PRZECIWBIOFILMOWEJ MAŚCI M5%, M10%, TB W MODELU BIOCELULOZOWYM

Zawiesina  $2 \times 10^5$  CFU/mL *Komagataeibacter xylinus* uzyskana z 7-dniowej hodowli została wprowadzona do podłoża Herstina-Schramma zawierającego następujące składniki: glukoza (2% w/v; POCH, Gliwice), ekstrakt drożdżowy (0,5% w/v; Graso, Starogard Gdański), Bacto-Pepton (0,5% w/v; Graso, Starogard Gdański), kwas cytrynowy (0,115% w/v; POCH, Gliwice),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,27% w/v; POCH, Gliwice),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0,05% w/v; POCH, Gliwice) (2% w/v; Graso, Starogard Gdański) i etanol (1% v/v; POCH, Gliwice). Biosyntezę celulozy bakteryjnej (ang. bacterial cellulose – BC) przeprowadzono w płytkach 24-dółkowych. Otrzymany nośnik BC w postaci walców o średnicy 18 mm został poddany lizie alkalicznej (w celu usunięcia komórek *K. xylinus*) i dokładnemu przepłukaniu jałową wodą do uzyskania neutralnej wartości pH. Do tak przygotowanych nośników BC wprowadzono inoculum biofilmu mieszanego (Pa+Sa), a cały układ poddano inkubacji przez 48 godz./37°C. Po upływie czasu inkubacji biofilm mieszany ekspozycyjnie na działanie 500 mg/mL M5%, M10% lub TB przez 24 godz. czasu kontaktowego. Następnie do dołków płytki wprowadzono 1 ml 0,1% roztworu saponiny i poddano wytrząsaniu w celu oddzielenia komórek tworzących biofilm od powierzchni agaru. Po zakończeniu wytrząsania wykonano seryjne rozcieńczenia otrzymanej zawiesiny w roztworze soli fizjologicznej, zaś 100 µL rozcieńczeń rozprowadzono

Ryc. 1. Udział procentowy [%] komórek *S. aureus* oraz *P. aeruginosa* w biofilmie mieszanym (Sa+Pa) w kolejnych dobach 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.

szklaną gładką po powierzchni płytek agarowych Columbia Agar oraz McConkey. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godz. Po inkubacji policzono liczbę wyrosłych kolonii. Formuła używana do określenia poziomu redukcji biofilmu:  $100\% - (\text{liczba cfu uzyskana z biofilmu traktowanego związkiem przeciwdrobnoustrojowym} / \text{liczba cfu uzyskana z biofilmu nietraktowanego związkiem przeciwdrobnoustrojowym}) \times 100\%$ . Eksperymenty przeprowadzono w 3 powtórzeniach.

## ANALIZA STATYSTYCZNA

Oszacowanie istotności statystycznej uzyskanych wyników zostało przeprowadzone z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism, wersja 9. Normalność rozkładu oszacowano z wykorzystaniem testu D'Agostino-Pearsona. Ze względu na to, że uzyskane wartości nie wykazywały cech rozkładu normalnego, w obliczeniach wykorzystano test Kruskala-Walisa z analizą post-hoc Dunneta. Wyniki uznawano jako istotne przy wartości  $p < 0,05$ .

## WYNIKI

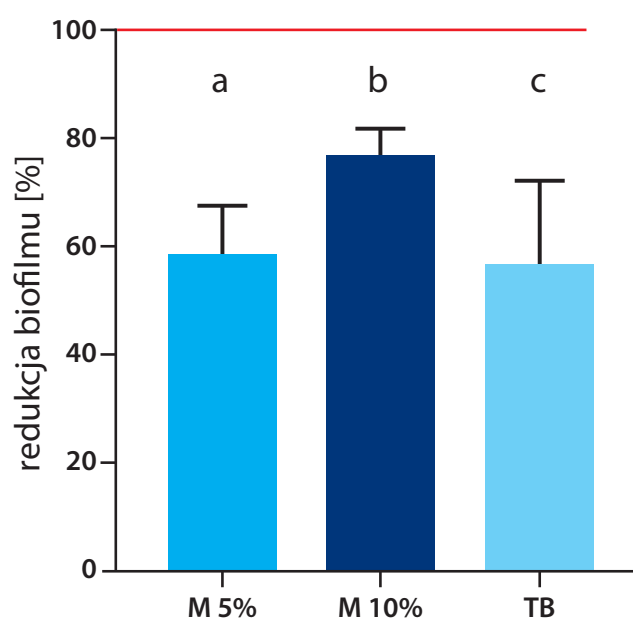
Wśród 45 przebadanych szczepów gronkowca złocistego zidentyfikowano 1 izolat oporny na neomycynę (SA23, MIC=1 mg/L). W przypadku bacytracyny zakres MIC względem gronkowców wynosił 0,25–32 mg/L. Najwyższą wartość stężenia hamującego wykazano dla szczepów SA7, SA22 oraz SA36 (32 mg/L). W przypadku izolatów pałeczek ropy błękitnej ( $n=45$ ) zakres MIC polimyksyny A wynosił 0,5–128 mg/L. Najwyższe stężenie hamujące wykazano dla szczepu PA8 (128 mg/L). Do dalszych badań wybrano szczep SA23, SA36 oraz szczep PA8, które hodowano w postaci biofilmu mieszanego przez 24–96 godz. Skład procentowy komórek *S. aureus* oraz *P. aeruginosa*, określany za pomocą posiewów ilościowych w kolejnych dobach hodowli, przedstawiono na Ryc. 1.

Do dalszych analiz wykorzystano 48-godzinny biofilm mieszany (Pa+Sa) o składzie procentowym wynoszącym 73,7% (pałeczka ropy błękitnej), 26,3% (gronkowiec złocisty)  $\pm 10,5\%$ . Biofilm mieszany cechował się wysoką tolerancją względem neomycyny oraz polimyksyny A (potencjalne wartości hamujące wzrostu znajdowały się powyżej mierzalnego zakresu stężeń), natomiast minimalne stężenie bacytracyny, hamujące wzrost komponenty gronkowcowej biofilmu mieszanego, wynosiło 128 mg/L. 48-godzinny biofilm mieszany (Pa+Sa) traktowano zatem jako społeczność drobnoustrojów oporną/wykazującą istotnie podwyższoną tolerancję na składniki przeciwdrobnoustrojowe maści TB. Następnie dokonano oceny aktywności M5%, M10% oraz TB względem biofilmu mieszanego (Pa+Sa) z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody A.D.A.M. (Ryc. 2).

Uzyskane wyniki wskazują, że poziom redukcji badanego biofilmu mieszanego (Pa+Sa) był porównywalny po zastosowaniu maści TB lub M5%, natomiast zastosowanie maści M10% prowadziło do istotnie wyższego poziomu redukcji biofilmu mieszanego niż maści M5% lub TB ( $p < 0,05$ ). W kolejnym etapie doświadczenia oszacowano zdolność do przenikania komponentów aktywnych M5%, M10% oraz TB przez warstwy biofilmu (począwszy od warstwy szczytowej do warstwy podstawnej, stykającej się z powierzchnią płytki polistyrenowej) (Ryc. 3).

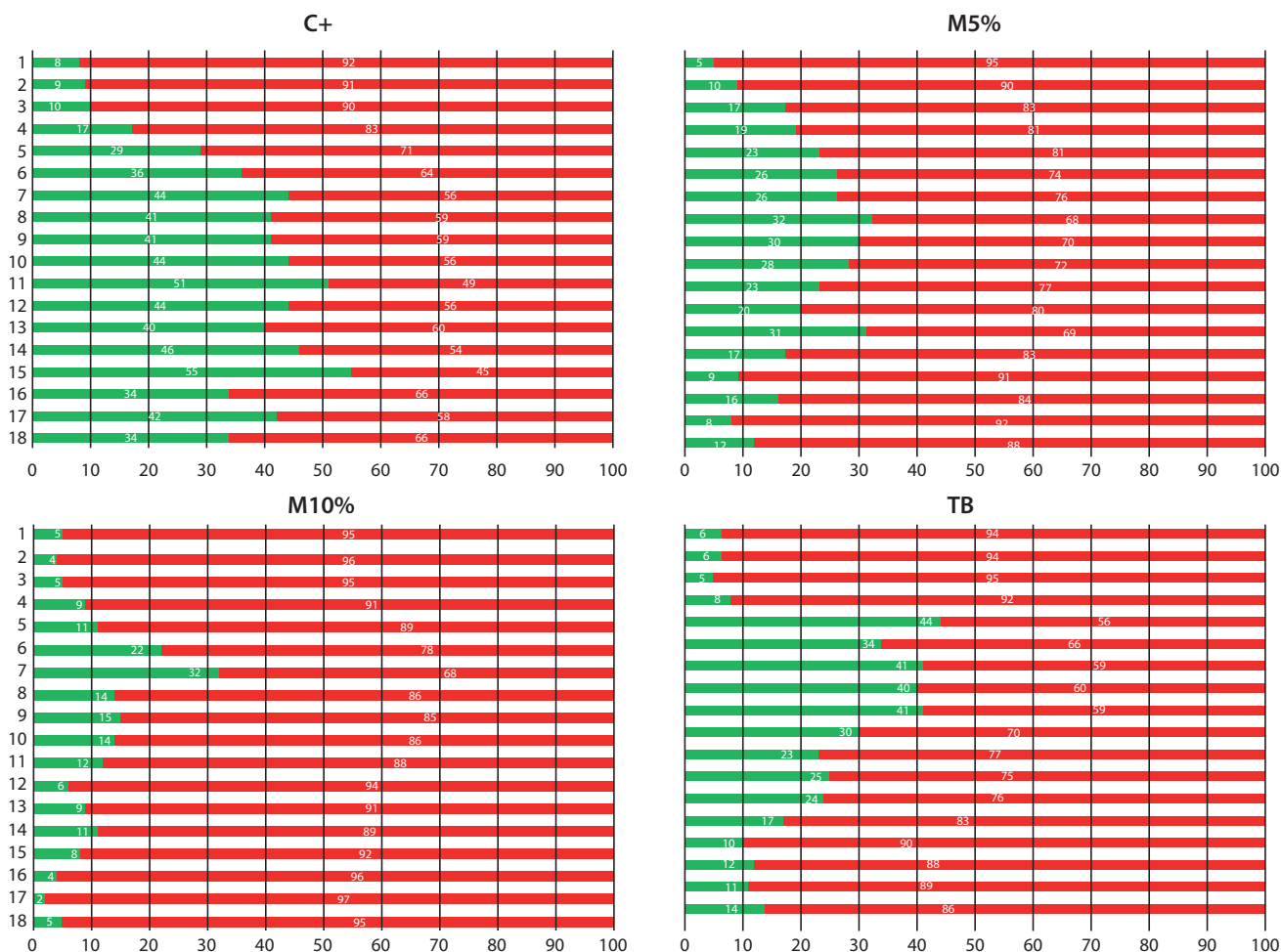
Uzyskane wyniki wskazują wyższą zdolność maści M10% niż M5% do penetracji przez warstwy biofilmu oraz niszczenia tworzących je komórek. Z kolei zdolność do penetracji i niszczenia komórek tworzących poszczególne warstwy biofilmu zmierzona dla maści M5% oraz TB cechowała się zbliżonymi wartościami. W przypadku maści M10% zaobserwowano najwyższą zdolność do eliminacji komórek położonych w najniższej, podstawnej warstwie biofilmu w porównaniu z maścią M5% lub TB (zmniejszenie względnej liczby komórek żywych w porównaniu do biofilmu kontrolnego wynosiło 29% vs. 22% vs. 20%, odpowiednio). Wizualizację biofilmu mieszanego (Pa+Sa) poddanego aktywności maści 5%, 10%, TB lub niepoddanego działaniu związków przeciwdrobnoustrojowych (C+) przedstawiono na Ryc. 4.

W skład biofilmu mieszanego (Pa+Sa) wchodziła subpopulacja komórek martwych (bądź uszkodzonych), wybarwionych na kolor czerwony/pomarańczowy, oraz komórki żywe (nieuszkodzone), barwiące się na kolor zielony. Wprowadzenie do biofilmu maści M10%, M5% lub TB przekładało się na istotny wzrost sygnału pochodzącego od komórek martwych (uszkodzonych), był on silniejszy w przypadku



Ryc. 2. Redukcja badanego biofilmu mieszanego po ekspozycji na M5%, M10% lub TB. Czerwona linia wskazuje wartość aktywności metabolicznej biofilmu niepoddanego ekspozycji na M5%, M10% lub TB (brak redukcji, 100% wzrost). Pary liter a/b oraz b/c wskazują na istotność statystyczną różnic w redukcji ( $p < 0,05$ ).

! 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. Przenikalność/aktywność bójcza maści M5%, M10%, TB przez biofilm mieszany. Oś Y: warstwy biofilmu (grubość warstwy = 2  $\mu$ m, łącznie 36  $\mu$ m). Warstwa 1: szczytowa. Warstwa 18: dolna. Dla każdej warstwy zaznaczono stosunek [%] komórek żywych (kolor zielony) do komórek martwych (kolor czerwony). Wybarwienie komórek wykonano z wykorzystaniem mieszaniny Filmtracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit (SYTO® 9: jodek propidyny). C+: biofilm niepoddany aktywności środków przeciwdrobnoustrojowych. M5%, M10% – maści zawierające formułę kwasów żywiczych w stężeniu 5% lub 10%, odpowiednio; TB – maść zawierająca neomycynę, bacytracynę oraz polimiksynę A.

maści M10% niż TB. W kolejnym doświadczeniu, z wykorzystaniem modelu biocelulozowego, oszacowano liczbę komórek [%] w biofilmie mieszanym (Pa+Sa), przetrwałych traktowanie maściami M10%, M5% lub TB (Ryc. 5).

Uzyskane wyniki wskazują na istotnie wyższą zdolność maści M10% do eradykacji biofilmu mieszanego (Pa+Sa) w porównaniu do maści M5% oraz TB. 24-godzinna ekspozycja biofilmu mieszanego na maść M10% prowadziła do eradykacji około 90% komórek tworzących biofilm, podczas gdy ekspozycja biofilmu mieszanego na maści M5% lub TB skutkowała eradykacją na poziomie 60–70%.

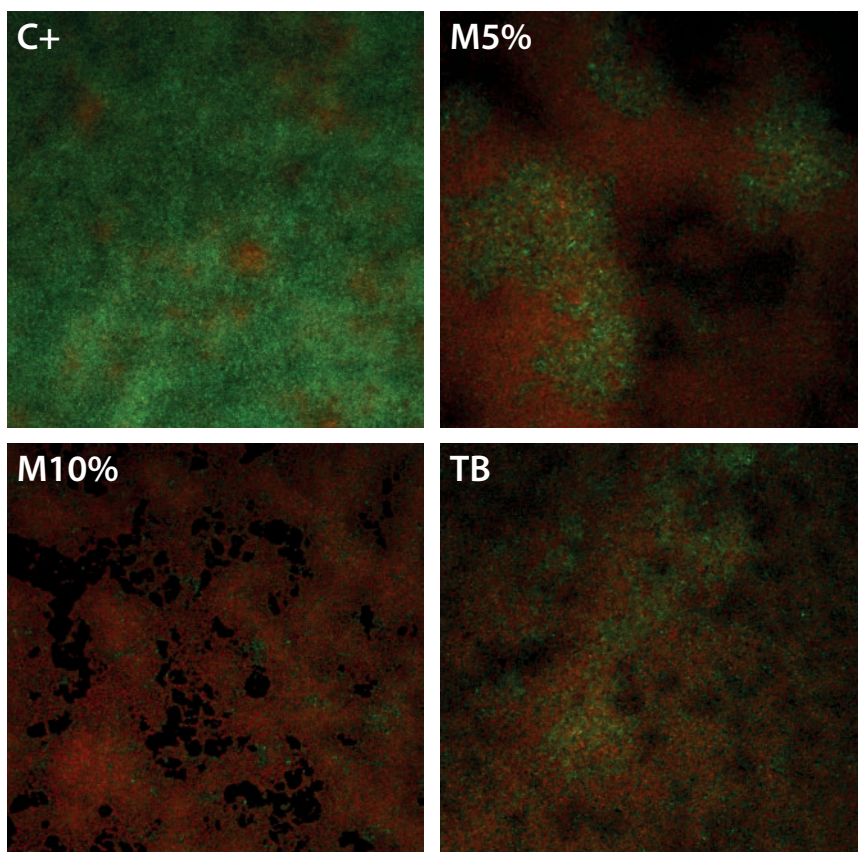
## DYSKUSJA

Stosowanie maści zawierającej antybiotyków bądź antybiotyków do leczenia infekcji ran trudno gojących się obarczone jest ryzykiem wykształcenia przez mikroorganizmy tolerancji, a następnie oporności na wyżej wymienione środki przeciwdrobnoustrojowe. Do tego niepożądanego efektu dochodzi m.in. poprzez uwalnianie się z maści antybiotyków

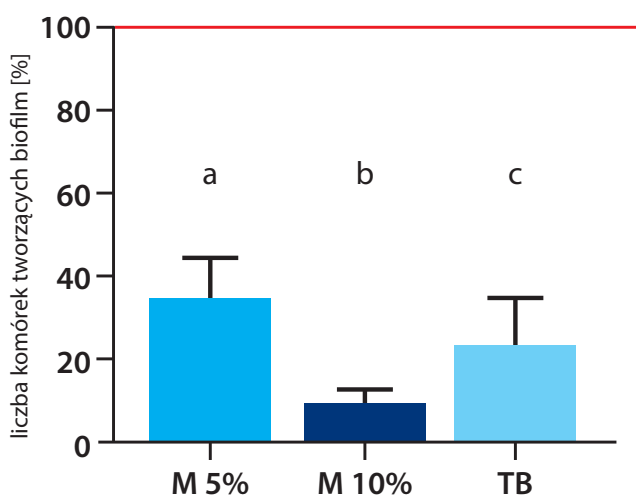
w stężeniach poniżej wartości MIC. Przedłużająca się ekspozycja mikroorganizmów na podprogowe stężenie antybiotyku (sub-MIC) prowadzić może do indukcji oporności krzyżowej, skutkującej rozwojem wielolekooporności [11]. Co więcej, występujące w ranie przewlekłej biofilmy mieszane cechują się wysoką tolerancją na antybiotyki, co zawdzięczają obecności macierzy biofilmowej, zróżnicowanej aktywności metabolicznej oraz wysokiemu zagęszczeniu przestrzennemu komórek (ułatwiającemu wymianę genów oporności). Stąd stosowanie maści antybiotykowych nie jest zalecane w aktualnych wytycznych leczenia ran przewlekłych [2].

Maści M5% oraz M10%, oceniane w niniejszym badaniu, nie zawierają w swym składzie pojedynczego związku przeciwdrobnoustrojowego, tylko zróżnicowane, występujące naturalnie w drzewach iglastych (świerkach norweskich) kwasy żywicze. Należą one do grupy związków chemicznych, określanych mianem diterpenów. Kwasy żywicze wykazują charakter zarówno hydrofobowy, jak i hydrofilowy, co tłumaczy ich częściową rozpuszczalność w wodzie. W skład żywicy świerkowej wchodzi: kwas abietynowy, neoabietynowy,

! 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. 4. Biofilm mieszany, znakowany mieszaniną barwników Filmtracer™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit (SYTO® 9: jodek propidyny). C+: biofilm nietraktowany środkami przeciwdrobnoustrojowymi. M5%, M10%, TB – biofilm traktowany maściami M5% lub M10% lub TB, odpowiednio. Kolor zielony – komórki żywe/nieuszkodzone; kolor czerwony/pomarańczowy – komórki martwe/uszkodzone na skutek aktywności M5% lub M10% lub TB.



Ryc. 5. Redukcja badanego biofilmu mieszanego po ekspozycji na 500 mg/mL M5%, M10% lub TB w modelu biocelulozowym. Czerwona linia wskazuje liczbę komórek biofilmu niepoddanego ekspozycji na M5%, M10% oraz TB (brak redukcji, 100% wzrost). Pary liter a/b oraz b/c wskazują na istotność statystyczną różnic ( $p < 0,05$ ).

dehydroabietynowy, p-kumarowy, pimarowy, izopimarowy, lewopimarowy, sandrakopimarowy, palustrowy, a także lignany: pinorezynol, matairezynol, larikirezynol [6]. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wskazują na wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową, w tym przeciwbiofilmową, wyżej wymienionych kwasów względem m.in. takich patogenów, jak *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* czy *Clostridium perfringens* [7, 9, 10]. Z kolei lignany charakteryzują się silną aktywnością przeciwutleniającą [15].

Za pomocą Transmisyjnej Mikroskopii Elektronowej wykazano, że drobnoustroje poddane działaniu kwasów żywicznych cechują się zaburzoną morfologią i funkcjonalnością ścian komórkowych, prowadzącą do przerwania ciągłości tej struktury, a w efekcie do wypływu cytoplazmy z komórki i jej śmierci [16]. Mechanizm aktywności przeciwdrobnoustrojowej kwasów żywicznych przypomina zatem mechanizm aktywności takich nowoczesnych antyseptyków, jak poliheksanidyna [17]. Jednocześnie, biorąc pod uwagę zróżnicowanie w budowie chemicznej kwasów żywicznych wchodzących w skład maści, należy założyć, że ryzyko rozwinięcia względem nich tolerancji przez drobnoustroje jest znikome.

W niniejszym badaniu do celów eksperymentalnych utworzono w warunkach *in vitro* biofilm mieszany *P. aeruginosa* + *S. aureus*, cechujący się tolerancją na bacytracynę, neomycynę i polimyksynę A (Ryc. 1, 2). Maść zawierająca 10% ekstrakt kwasów żywicznych (M10%) charakteryzowała się istotnie wyższą aktywnością przeciwbiofilmową oraz zdolnością do penetracji przez biofilm mieszany niż maść antybiotykowa (Ryc. 3, 4). Ta ostatnia cecha ma istotne znaczenie, ponieważ znacząco osłabia integralność fizyczną biofilmu i może prowadzić do defragmentacji tej struktury, a w efekcie do skuteczniejszej jej eradykacji. Jakkolwiek uzyskane wyniki wskazują na częściową zdolność biofilmu mieszanego (Pa+Sa) do przetrwania 24-godzinnej ekspozycji na zastosowane maści, niezależnie od użytego modelu doświadczalnego (w tym modelu biocelulozowego, w którym biofilm tworzy się na porowatej, nierównej powierzchni przypominającej tkankę),

! 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.

poziom redukcji liczby komórek tworzących biofilm był istotnie wyższy, gdy stosowano maść M10% niż maść TB [12].

Kwasy żywiczne służą drzewom do zabezpieczania przed drobnoustrojami nieciągłości strukturalnych, będących odpowiednikami ran u człowieka. Wykorzystywane były do leczenia infekcji ran już przez społeczeństwa pierwotne [10]. W czasach obecnych wykorzystywanie i naśladowanie procesów naturalnych w ściśle kontrolowanych warunkach doświadczalnych nosi miano mimetyzmu. Ta prężnie rozwijająca się koncepcja naukowa bazuje na przekonaniu, że organizmy żywe przez miliony lat udoskonalą odpowiedź na poszczególne bodźce, a naśladowanie wzorców tych odpowiedzi przekłada się na istotną korzyść (w tym przypadku dla pacjenta). Biofilm tworzony przez drobnoustroje jest strukturą zmienną i reaktywną, zdolną do relatywnie szybkiej adaptacji do pojedynczego czynnika stresowego, jakim jest obecność antybiotyku. W znacznie mniejszym stopniu jest on natomiast w stanie przetrwać w obecności (w tym samym czasie) kilkunastu związków o szerokim spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, obecnych w badanej maści zawierającej formułę kwasów żywicznych i lignanów.

Biorąc pod uwagę przedstawione w niniejszej pracy wyniki *in vitro*, można zatem przyjąć, że zastosowanie maści zawierającej kwasy żywiczne przekłada się w warunkach klinicznych nie tylko na wysoki poziom eradykacji biofilmu z rany, ale także na niskie ryzyko rozwoju oporności drobnoustrojów, a co za tym idzie niższe koszty leczenia i istotną poprawę stanu zdrowia pacjentów.

## WNIOSKI

1. M10% cechuje się istotnie wyższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową (przeciwbiofilmową) niż M5% oraz TB. Maść M5% cechuje się porównywalną aktywnością przeciwdrobnoustrojową (przeciwbiofilmową) do maści TB.
2. Przenikalność komponentów aktywnych maści M10% przez biofilm mieszany *P. aeruginosa* + *S. aureus*, prowadząca do redukcji liczby żywych komórek, jest wyższa w porównaniu do maści M5% oraz TB. Przeprowadzone badania wykazały również odmienne modele przenikania komponentów aktywnych maści M10% oraz M5%, w porównaniu do maści TB, przez biofilm mieszany *P. aeruginosa* + *S. aureus*. Zdolność

do przenikania komponentów aktywnych maści M5% oraz M10% do podstawnych warstw biofilmu jest wyższa w porównaniu do zdolności przenikania antybiotyków będących składnikami aktywnymi maści TB.

KONFLIKT INTERESÓW: nie zgłoszono.

## PIŚMIENNICTWO

1. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 2022;399(10325):629–655.
2. Bartoszewicz M, Banasiewicz T, Bielecki K et al. Zasady postępowania miejscowego i ogólnego w ranach/owrzodzeniach przewlekłych objętych procesem infekcji. *Forum Zakażeń* 2019;10(1):1–30.
3. Bartoszewicz M, Junka A. Ocena aktywności *in vitro* maści SutriHeal® Forte 5% względem *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* oraz linii komórkowych odpowiedzialnych za proces gojenia się rany. *Forum Leczenia Ran* 2021;2(2):71–80.
4. Bisht K, Wakeman CA. Discovery and therapeutic targeting of differentiated biofilm subpopulations. *Front Microbiol* 2019;10:1908.
5. Gebreyohannes G, Nyerere A, Bii C, Sbhata DB. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon* 2019;5(8):e02192.
6. Goels T, Eichenauer E, Langeder J et al. Norway Spruce Balm: phytochemical composition and ability to enhance re-epithelialization *in vitro*. *Planta Med* 2020;86(15):1080–1088.
7. Haman N, Morozova K, Tonon G, Scampicchio M, Ferrentino G. Antimicrobial effect of *Picea abies* extracts on *E. coli* growth. *Molecules* 2019;24(22):4053.
8. Hobley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev* 2015;39(5):649–569.
9. Ito Y, Ito T, Yamashiro K et al. Antimicrobial and antibiofilm effects of abietic acid on cariogenic *Streptococcus mutans*. *Odontology* 2020;108(1):57–65.
10. Jokinen JJ, Sipponen A. Refined spruce resin to treat chronic wounds: rebirth of an old folkloristic therapy. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2016;5(5):198–207.
11. Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell* 2010;37(3):311–320.
12. Krasowski G, Junka A, Paleczny J et al. *In vitro* evaluation of polihexanide, octenidine and NaClO/HClO-based antiseptics against biofilm formed by wound pathogens. *Membranes (Basel)* 2021;11(1):62.
13. Krzyżek P, Gościński G, Fijałkowski K et al. Potential of bacterial cellulose chemisorbed with anti-metabolites, 3-bromopyruvate or sertraline, to fight against *Helicobacter pylori* lawn biofilm. *Int J Mol Sci* 2020;21(24):9507.
14. Pouget C, Dunyach-Remy C, Magnan C, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP. Polymicrobial biofilm organization of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in a chronic wound environment. *Int J Mol Sci* 2022;23(18):10761.
15. Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C, Toledo E, Delgado-Rodríguez M, Gaforio JJ. Naturally lignan-rich foods: a dietary tool for health promotion? *Molecules* 2019;24(5):917.
16. Sipponen A, Peltola R, Jokinen JJ et al. Effects of Norway spruce (*Picea abies*) resin on cell wall and cell membrane of *Staphylococcus aureus*. *Ultrastruct Pathol* 2009;33(3):128–135.
17. Sowlati-Hashjin S, Carbone P, Karttunen M. Insights into the polyhexamethylene biguanide (PHMB) mechanism of action on bacterial membrane and DNA: a molecular dynamics study. *J Phys Chem B* 2020;124(22):4487–4497.
18. Wi YM, Patel R. Understanding biofilms and novel approaches to the diagnosis, prevention, and treatment of medical device-associated infections. *Infect Dis Clin North Am* 2018;32(4):915–929.