

# Innowacyjne metody leczenia biofilmu w ranach przewlekłych

## Innovative methods of biofilm treatment in chronic wounds

Dorota Mehrholz<sup>1</sup>, Przemysław Domagała<sup>2</sup>, Ewelina Zielińska<sup>3</sup>, Wioletta Barańska-Rybak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>2</sup>Zakład Zarządzania w Pielęgniarstwie Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Chemii Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Przeł Dermatol 2016, 103, 295–302

DOI: 10.5114/dr.2016.61779

---

### STRESZCZENIE

#### SŁOWA KLUCZOWE:

biofilmy, bakteriofagi, owrzodzenie, probiotyki.

#### KEY WORDS:

biofilms, bacteriophages, ulcer, probiotics.

Jedną z nowoczesnych metod leczenia ran objętych biofilmem jest terapia bakteriofagami. Bakteriofagi (fagi) to wirusy infekujące bakterie. Fagi mają bardzo silne działanie bakteriobójcze oraz mogą się replikować w miejscu zakażenia. Doskonale rozprzestrzeniają się w biofilmie oraz mają zdolność do enzymatycznego rozkładu matrycy substancji polimerycznych. Terapia fagowa charakteryzuje się wysokim bezpieczeństwem stosowania oraz skutecznością w stosunku do opornych bakterii. Wyniki badań klinicznych z zastosowaniem bakterii probiotycznych wykazały podobną do środków antyseptycznych skuteczność przeciwbakteryjną. Bakterie probiotyczne lub wytwarzane przez te bakterie substancje mogą być skutecznym środkiem w walce z *Pseudomonas aeruginosa*. Innowacyjną metodą walki z biofilmem bakteryjnym jest również zastosowanie nanocząstek metali (NPs). Wstępne badania wykazały korzystny wpływ NPs na zmniejszenie warstwy biofilmu. Nowe terapie pozwolą szybciej i skuteczniej leczyć rany przewlekłe, a także obniżyć koszty opieki nad pacjentem z przewlekłym owrzodzeniem.

### ABSTRACT

One of the modern methods of treatment of wounds covered by a biofilm is bacteriophage therapy. Bacteriophages (phages) are viruses that infect bacteria. Phages have a very strong bactericidal effect and can replicate at the site of the infection. They spread in the biofilm, and have the capacity for enzymatic degradation of the polymeric matrix material. Phage therapy has a high level of security and efficacy against resistant bacteria. Results of clinical studies with probiotic bacteria have shown effectiveness similar to antiseptics. Probiotic bacteria or substances produced by these bacteria may be an effective means in the fight against *Pseudomonas aeruginosa*. An innovative method of fighting bacterial biofilm is also the use of metal nanoparticles (NPs). Preliminary studies have shown beneficial effects of NPs in reducing the biofilm layer. New therapies will rapidly and effectively treat chronic wounds and reduce the cost of care for chronic ulcers.

#### ADRES DO KORESPONDENCJI:

Przemysław Domagała  
Zakład Zarządzania  
w Pielęgniarstwie  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. Dębinki 7  
80-211 Gdańsk  
tel.: +48 58 349 19 80  
e-mail: coxbrikasta@gumed.edu.pl

## WPROWADZENIE

Rana przewlekła to ubytek skóry niepoddający się leczeniu [1]. Definicja ta nie zawiera jednoznacznie sprecyzowanego kryterium czasu, najczęściej jest to 6–8 tygodni [1, 2]. Czas potrzebny do zagojenia rany liczony jest w miesiącach lub latach. Najczęściej rany przewlekłe powstają w przebiegu przewlekłej niewydolności żyłnej (75%), miażdżycy tętnic kończyn dolnych (14%) lub cukrzycy (5%) [2].

Opieka nad pacjentem z przewlekłą raną lub ranami wymaga podejścia interdyscyplinarnego. Do podjęcia tematu skłania potrzeba szukania nowych możliwości leczenia przewlekłych owrzodzeń z powodu niedostatecznych efektów dotychczasowych terapii. Obecnie istnieje około 200 metod leczenia ran przewlekłych [3]. Pacjenci korzystają zarówno z metod leczenia zgodnych z medycyną opartą na faktach (ang. *evidence based medicine*), jak i leczenia niekonwencjonalnego [3]. Mnogość dostępnych terapii oznacza brak skutecznej i szybkiej metody leczenia. W niniejszej publikacji przedstawiono wpływ biofilmu na proces gojenia owrzodzeń oraz zaprezentowano trzy innowacyjne terapie.

## WPLYW BIOFILMU BAKTERYJNEGO NA GOJENIE RAN PRZEWLEKŁYCH

Do głównych funkcji skóry należy ochrona przed wnikaniem czynników chorobotwórczych. W skórze znajdują się komórki układu odpornościowego, stanowiące pierwszą linię obrony przed drobnoustrojami [4]. Ponadto skóra jest skolonizowana przez bakterie i grzyby tworzące florę saprofityczną [5, 6]. Główne grupy bakterii kolonizujących skórę to *Acinetobacteriae* oraz *Proteobacteriae* [5]. Tworzenie się biofilmu jest naturalną cechą wszystkich bakterii tworzących mikroflorę, zarówno skóry, jak i błon śluzowych. Wnikają one do organizmu w postaci planktonicznej, a następnie w wyniku adhezji pokrywają komórki i tkanki. Każde naruszenie ciągłości skóry powoduje zaburzenie równowagi pomiędzy układem immunologicznym i biofilmem bakterii saprofitycznych, co stwarza warunki dla wnikania patogenów [7]. Uszkodzony naskórek nie wydziela substancji antyseptycznych oraz ochronnych lipidów, aktywowana zostaje kaskada zapalna, co w efekcie prowadzi do powstania rany. Wnikające bakterie tworzą na ranie niekorzystny biofilm, który jest jednym z czynników opóźniających proces gojenia rany i podwyższających ryzyko infekcji [8].

Biofilm jest to zorganizowana struktura komórkowa zatopiona w produkowanej przez siebie macierzy [8, 9], wykazująca adhezję do powierzchni zarówno biologicznych, jak i abiotycznych. Bakterie tworzące biofilm wydzielają do macierzy biopolime-

ry białkowo-cukrowe chroniące je przed atakiem ze strony układu odpornościowego oraz stosowanymi antybiotykami [10–12]. Biofilm jest złożony z wielu ściśle współpracujących gatunków bakterii, które współdziałają podobnie jak organizm wielokomórkowy [13].

W 1978 roku opisano obecność biofilmu bakteryjnego u człowieka [9]. Zwykle powstanie tej zwartej struktury bakteryjnej wiązano tylko z kolonizacją bakterii na wszczepianych materiałach i cewnikach [14, 15]. Obecnie wiadomo, że cechą bakterii jest tworzenie zorganizowanej struktury zaraz po wniknięciu i adhezji do komórki gospodarza, nie tylko na wszczepianej powierzchni nieożywionej [11].

Biofilmem pokryte są wszystkie rany ostre i przewlekłe [6, 8]. W 1999 roku Costerton i wsp. po raz pierwszy przedstawili koncepcję biofilmu bakteryjnego i jego roli w przewlekłych infekcjach [12]. Odkrycie zrewolucjonizowało podejście naukowców do leczenia przewlekłych zakażeń, ponieważ początkowo uważano, że bakterie mogą występować tylko w postaci planktonicznej, czyli w odseparowanych pojedynczych koloniach [11, 16]. Biofilm opóźnia gojenie rany oraz może być czynnikiem powodującym ostre zakażenie rany przewlekłej [8, 17]. Uważa się, że  $10^5$  bakterii na 1 g hamuje gojenie rany [1]. Obecność tej zwartej struktury zaburza procesy immunologiczne, ziarninowanie oraz naskórkowanie rany [18]. Biofilm pokrywający rany przewlekłe jest bardziej rozwinięty i zaawansowany od występującego w ranach ostrych [12, 19]. Z upływem czasu ranę zasiedlają nowe gatunki bakterii, które wydzielają nowe substancje, powodujące większą zjadliwość i odporność na stosowane leki [20, 21]. Zdolność biofilmu do wywołania ostrej infekcji determinowana jest przez rodzaj kolonizujących ranę bakterii, zjadliwość drobnoustrojów, zdolność do modyfikacji odpowiedzi immunologicznej oraz innych obciążeń pacjenta [2]. Wysoko zorganizowana struktura biofilmu zmniejsza przenikanie antybiotyków do rany [7]. Minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii (MIC) w biofilmie może być od 100 do 500 razy większe niż w przypadku bakterii w formie planktonicznej [21, 22]. Stosowanie antybiotyków na rany przewlekłe jest kontrowersyjne, ponieważ powoduje selekcję szczepów wielolekoopornych [7, 21]. Nie jest zalecane stosowanie antybiotyków w preparatach miejscowych. Posocznica i uogólniona infekcja bakteryjna wymaga zastosowania antybiotyku zgodnego z antybiogramem [21].

Gronkowce należą do bakterii najczęściej izolowanych z ran przewlekłych. Przeprowadzono badanie, w którym analizowano gatunki bakterii najczęściej bytujące na owrzodzeniach przewlekłych. Z wszystkich badanych ran wyizolowano więcej niż jeden gatunek bakterii. Okazało się, że *Staphylococcus aureus*

wyhodowano z 93,5% owrzodzeń. Pozostałymi izolowanymi gatunkami bakterii były: *Enterococcus faecalis* (w 71,7%), *Pseudomonas aeruginosa* (52,2%), gronkowce koagulazoujemne (45,7%), *Proteus* sp. (41,3%) oraz bakterie beztlenowe (w 39,1%) [21]. Bakteriami beztlenowymi tworzącymi biofilm są: *Prevotella*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* i *Porphyromonas* [21].

Największe zagrożenie dla pacjenta stwarza kolonizacja rany szczepami gronkowca złocistego, szczególnie MRSA (ang. *methicillin resistant Staphylococcus aureus*), wankomycynoopornymi szczepami *Enterococcus* oraz *P. aeruginosa* [17, 21, 23].

## DIAGNOSTYKA BIOFILMU

W przeciwieństwie do bakterii planktonicznych w klasycznych posiewach bakteryjnych nie stwierdza się obecności bakterii z biofilmu. Tylko dzięki zaawansowanym technikom biologii molekularnej, takim jak reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR), laserowa mikroskopia skanningowa oraz transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM), możliwe jest potwierdzenie obecności biofilmu [7, 24]. Obecnie ze względu na wysoki koszt takie badanie wykonuje się tylko podczas badań klinicznych.

Krytyczny próg gęstości biofilmu oznacza taką liczbę bakterii bytujących na ranie, która hamuje gojenie oraz może prowadzić do ostrej infekcji bakteryjnej. Często taki stan widoczny jest w postaci zatrzymania postępu gojenia rany. Na obecność krytycznej gęstości biofilmu na ranie może wskazywać czerwono-szare zabarwienie ziarniny oraz duża ilość wysięku [1]. Diagnostyka biofilmu pokrywającego rany wciąż pozostaje wyzwaniem i jest możliwa tylko dzięki wprawnemu oku doświadczonego klinicysty, ponieważ typowe symptomy zapalenia, takie jak obrzęk, zaczerwienienie, ból czy wzmożone ucieplenie, w przypadku ran przewlekłych mogą być minimalnie wyrażone lub nieobecne [21].

## NOWE METODY LECZENIA RAN PRZEWLEKŁYCH

Tworzenie biofilmu powoduje trudne do wyleczenia stany chorobowe skóry i błon śluzowych. Dlatego bardzo ważne jest wynalezienie nowych metod zarówno zapobiegania tworzeniu się biofilmu, jak i leczenia zakażeń z jego udziałem. Głównymi przyczynami niepowodzeń aktualnych metod terapii ran przewlekłych są zmniejszona penetracja i aktywność stosowanych leków oraz zaburzenia genotypu bakterii poddanych działaniu leków, powodujące ich lepsze przystosowanie do trudnych warunków środowiska (kwaśne pH czy mniejsza dostępność tlenu) [25]. Najbardziej zjadliwe gatunki, takie jak MRSA, są izolowane w wymazach od pacjentów ambulatoryjnych [26].

## NANOCZĄSTKI W LECZENIU RAN PRZEWLEKŁYCH

### Unikalne właściwości nanostruktur

Nanotechnologia jest obecnie jedną z najbardziej obiecujących i najszybciej rozwijających się dziedzin nauki, która znajduje szerokie zastosowanie w medycynie, w tym w farmakoterapii. Spowodowało to wzrost zainteresowania badaniami nad unikalnymi właściwościami struktur w skali *nano*, które są coraz bardziej rozpowszechniane. Nanocząstki są niewielkimi strukturami, których wielkość nie przekracza 100 nm. Mogą one mieć różne kształty oraz właściwości biologiczne, przy czym charakteryzują je również pewne cechy wspólne. Przede wszystkim jest to duża powierzchnia w stosunku do rozmiarów, dzięki której możliwe jest zmniejszenie stosowanych dawek. Łatwiejsze jest także wiązanie ligandów, które rozpoznawałyby receptory komórek docelowych i tym samym umożliwiłyby dostarczenie leku do ściśle określonego miejsca. Dzięki temu zmniejszona zostaje również toksyczność leku w stosunku do zdrowych komórek i tkanek, a także działanie uboczne stosowanych nanocząstek (NPs) [27]. Zmniejszenie dawki i działań niepożądanych wiąże się też ze zmniejszeniem kosztów terapii.

Kolejną pożądaną właściwością NPs, umożliwiającą dotarcie potencjalnego leku do najtrudniej dostępnych struktur, jest łatwość penetrowania przez błony biologiczne i bariery ustrojowe. Co więcej, ze względu na brak specyficznych receptorów NPs nie są rozpoznawane i niszczone przez układ immunologiczny [27].

Nanocząstki stosowane są między innymi w diagnostyce medycznej i inżynierii tkankowej, a także coraz szerzej w profilaktyce i leczeniu zakażeń bakteryjnych oraz grzybiczych. Z przeprowadzonych badań wynika, że niektóre nanocząstki mają szerokie spektrum działania antybakteryjnego i grzybobójczego, a także działanie przeciwzapalne.

Przedstawione powyżej właściwości stanowią podstawę domniemań, że niektóre nanocząstki mogą być z powodzeniem wykorzystywane w terapii zakażeń z udziałem biofilmów drobnoustrojów, a tym samym mogą w przyszłości stać się skutecznym lekiem wykorzystywanym w terapii ran przewlekłych [28].

### Nanocząstki a biofilm

Ciekawą alternatywę w zwalczaniu biofilmu zarówno bakteryjnego, jak i grzybiczego może przynieść zastosowanie NPs niektórych metali, m.in. srebra, cynku i dwutlenku tytanu [28].

Nanocząstki dwutlenku tytanu (TiO<sub>2</sub>NPs) to jedne z najpowszechniej produkowanych na świecie nanocząstek metali. Dzięki swoim właściwościom antyseptycznym minimalizują ryzyko wystąpienia infekcji bakteryjnej [29]. Oddziaływanie TiO<sub>2</sub>NPs

z komórkami bakterii destabilizuje ich błony komórkowe, co powoduje uszkodzenie, a w konsekwencji śmierć komórki bakteryjnej.  $\text{TiO}_2$ NPs pod wpływem światła dzięki absorpcji fotonów przechodzą w stan wzbudzony. Stają się one w ten sposób akceptorem elektronów, co zakłóca procesy zachodzące w komórkach bakteryjnych. Takie właściwości dwutlenku tytanu nazywa się fotokrystalicznymi. Niestety proces ten jest długotrwały i mało wydajny [30].

Skuteczniejszym rozwiązaniem w leczeniu przewlekłych ran pokrytych biofilmem może być zastosowanie nanocząstek złota (AuNPs). Nanocząstki złota nie wykorzystują światła w działaniu przeciwbakteryjnym. Zachodzi tu natomiast zjawisko zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmowego [31]. Plazmonami powierzchniowymi nazywane są zbiorowe oscylacje elektronów występujące na powierzchni międzyfazowej (np. między dielektrykiem –  $\text{TiO}_2$ NPs – a przewodnikiem – AuNPs). Taka oscylacja powoduje wzbudzenie AuNPs, które w ten sposób stają się akceptorem elektronów i niszczą błony komórkowe bakterii [32, 33]. Li i wsp. w badaniach mikrobiologicznych na szczepach *E. coli* i *S. aureus* poddanych działaniu zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmowego z wykorzystaniem AuNPs zaobserwowali uszkodzenie błony komórkowej oraz organelli komórkowych. Jednocześnie wykazano, że AuNPs nie mają działania cytotoksycznego w stosunku do zdrowych komórek [30].

Duże nadzieje w leczeniu ran przewlekłych wiąże się z nanocząstkami srebra (AgNPs). Mają one silne właściwości bakteriobójcze, grzybobójcze i przeciwzapalne [34]. Udowodniono, że AgNPs hamują proliferację szczepów bakterii o różnych aktywnościach bakteryjnych i różnym potencjale tworzenia biofilmu. Wykazali również, że AgNPs działają cytotoksycznie na wiele antybiotykoopornych szczepów bakterii, m.in. *P. aeruginosa* [35]. Z kolei Ramalingam i wsp. zaobserwowali wysoką aktywność antyproliferacyjną AgNPs wobec szczepów *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* sp. i *Cornebacterium* sp. Ponadto w badaniach stwierdzono, że AgNPs zapobiegają powstawaniu biofilmu bakterii *P. aeruginosa* i *S. aureus* w obrębie ran lub uszkodzonych błon śluzowych [36–38].

Kolejnymi nanocząstkami mogącymi znaleźć zastosowanie w leczeniu biofilmu bakteryjnego są nanocząstki tlenku cynku (ZnONPs) [39]. Tlenek cynku od wielu lat jest wykorzystywany w preparatach dermatologicznych. W celu określenia właściwości antykolonizacyjnych ZnONPs przeprowadzono badania, które wykazały hamujący wpływ tych nanocząstek na tworzenie biofilmu bez wpływu na wzrost zdrowych komórek. Ponadto ZnONPs znacznie zwiększają hydrofilowość komórek bakteryjnych [39, 40].

Podsumowując – dotychczasowe badania dotyczące aktywności przeciwdrobnoustrojowej, w tym przeciwbakteryjnej, NPs są bardzo obiecujące. Stwierdzono ponadto, że NPs hamują tworzenie się biofilmu bakteryjnego bez negatywnego wpływu na żywotność zdrowych komórek [25].

### Szkodliwe właściwości nanocząstek

Opisane powyżej unikatowe właściwości nanocząstek wskazują, że mogłyby one zostać wykorzystane w leczeniu ran z udziałem biofilmów drobnoustrojów, jednak z uwagi na nieliczne i często kontrowersyjne informacje dotyczące toksycznego działania na organizm człowieka zastosowanie nanocząstek w terapii zakażeń pozostaje ograniczone. Kocbek i wsp. zaobserwowali niekorzystny wpływ długotrwałej ekspozycji na ZnONPs na ludzkie keratynocyty [41]. Również Świdwińska-Gajewska i Czerczak opisują potencjalne zagrożenia dla komórek eukariotycznych narażonych na działanie AgNPs [27, 42]. Aitken i wsp. stwierdzili jednak, że nie ma bezpośrednich badań dowodzących szkodliwego działania nanocząstek na skórę oraz ich penetracji w głąb tkanki [43]. Wyniki te potwierdzili Piasecka-Zelga i wsp. [44]. Z powyższych informacji wynika, że nie ma jednoznacznej odpowiedzi na pytanie o szkodliwość nanocząstek w stosunku do komórek eukariotycznych, zwłaszcza komórek skóry. Konieczne jest więc prowadzenie dalszych badań w tym kierunku.

### TERAPIA FAGOWA

Jedną z nowoczesnych metod leczenia ran objętych biofilmem jest terapia bakteriofagami. W Polsce ma ona nadal charakter eksperymentu, jednak jest możliwa po uzyskaniu zgody komisji bioetycznej we współpracy z Ośrodkiem Terapii Fagowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu.

Bakteriofagi (fagi) to wirusy, które infekują bakterie. Uznawane są za najliczniejsze drobnoustroje na świecie. Szacuje się, że na każdą komórkę bakterii przypada 10 fagów. Jak wszystkie inne wirusy, są one zdolne jedynie do replikacji wewnątrz komórki gospodarza. Ze względu na cykl życiowy wyróżnia się dwa rodzaje bakteriofagów: bakteriofagi lityczne oraz bakteriofagi lizogeniczne. Z terapeutycznego punktu widzenia jedynie fagi przeprowadzające cykl lityczny znajdują zastosowanie w terapii biofilmu, ponieważ powodują one zniszczenie komórki bakteryjnej [45]. Rozwój terapii fagowej podyktowany jest rosnącą antybiotykoopornością bakterii. Fagi mają bardzo silne działanie bakteriobójcze oraz mogą się replikować w miejscu zakażenia. Stwierdzono, że po aplikacji na ranę fagi, które powstały na skutek na-

mnożenia, rozprzestrzeniły się na cały biofilm [46]. Sugeruje to, że do leczenia odpornej na antybiotyki infekcji mogą wystarczyć pojedyncze dawki bakteriofagów [46]. W dodatku stwierdzono, że niektóre bakteriofagi są zdolne do wytwarzania enzymów – depolimeraz, które niszczą matrycę substancji polimerycznych (ESP), nadających biofilmowi określoną strukturę [46, 47]. Poza tym bakteriofagi mogą zainfekować przetrwale w środku macierzy pozakomórkowej bakterie, tzw. *persisters*, charakteryzujące się opornością na tradycyjne metody leczenia. W przypadku aktywacji mogą one zostać zniszczone przez bakteriofagi, co zmniejsza ryzyko nawrotu infekcji [47].

Badania przeprowadzone przez SETHA i wsp. [48] na królikach, których skóra została zainfekowana *S. aureus*, wykazały skuteczność terapii fagowej. Badanie objęło cztery grupy – trzy eksperymentalne i jedną kontrolną. W pierwszej z grup eksperymentalnych fagi były aplikowane co drugi dzień, w drugiej stosowano jedynie oczyszczanie rany, natomiast trzecia łączyła obie te metody. W obu grupach stosujących pojedynczą metodę w porównaniu z grupą kontrolną stwierdzono poprawę, jednak przy zastosowaniu obu metod w połączeniu była ona jeszcze bardziej znamienna [48].

Niegojące się rany będące jednym z powikłań cukrzycy są najczęstszym nieurazowym powodem amputacji kończyny dolnej. Ze względu na niedostateczną perfuzję tkanek, niewystarczające lokalne stężenie antybiotyków i rosnącą antybiotykooporność konwencjonalne leczenie zainfekowanych ran cukrzycowych często kończy się niepowodzeniem. W portugalskim badaniu przeprowadzonym przez Mendesa i wsp. dotyczącym efektywności leczenia zmian zainfekowanych przez *S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz *Acinetobacter baumannii* na zwierzęcym (świńskim i szczurzym) modelu cukrzycy stwierdzono, że stosowanie bakteriofagów zmniejsza liczbę kolonii bakteryjnych oraz przyspiesza gojenie się rany, szczególnie w połączeniu z jej oczyszczaniem [49]. Również inne badania przeprowadzone przez Marza i wsp., McVay i wsp. oraz Krylov i wsp. wykazały skuteczność bakteriofagów w leczeniu ran zakażonych przez *P. aeruginosa* [50–52].

*Staphylococcus aureus* jest podstawowym patogenem w zakażeniu ran w przebiegu cukrzycy. Szacuje się, że MRSA występuje w 15–30% zakażonych ran. Indyjskie badania przeprowadzone przez Chhibbera i wsp. [53] na mysim modelu cukrzycy wykazały, że jednorazowe podanie bakteriofagów było tak samo skuteczne w przebiegu zakażenia tylnej łapy jak zastosowanie linezolidu. Jednocześnie, podobnie jak w innych badaniach, stwierdzono, że skojarzenie obu terapii dawało efekt synergistyczny [53].

Obserwowany wzrost antybiotykooporności *A. baumannii* coraz częściej skutkuje niepowodzeniami

w terapii zakażeń wywołanych przez tę bakterię. Stosowanie terapii fagowej w przebiegu takich infekcji może być zatem perspektywiczne [54]. W badaniach przeprowadzonych na szczurzym modelu cukrzycy wykazano skuteczność terapii bakteriofagami w przebiegu rany zainfekowanej *A. baumannii* [55].

W badaniach Rhoadsa i wsp. [56] u 39 pacjentów z przewlekłymi owrzodzeniami żylnymi stwierdzono bezpieczeństwo terapii fagowej. Zastosowano fagi przeciwko *S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz *E. coli* [56]. Inne badania [57], którymi również zostali objęci pacjenci z owrzodzeniami w wyniku przewlekłej niewydolności żylny, potwierdziły skuteczność terapii fagowej w tej grupie chorych. Pacjentom, którzy nie odpowiadali na konwencjonalną terapię, aplikowano preparat składający się z biodegradowalnego polimeru impregnowanego antybiotykiem oraz bakteriofagami litycznymi. Całkowite wygojenie się ran zaobserwowano u 67 (70%) pacjentów spośród 98. W 24 przypadkach zaobserwowano poprawę. Jedynie u 5 pacjentów, u których chorobą współistniejącą była cukrzyca, terapia okazała się nieskuteczna. Nie stwierdzono żadnych ogólnoustrojowych działań niepożądanych w całej grupie badanej [57].

Wykazano również skuteczność bakteriofagów w leczeniu ran oparzeniowych zainfekowanych przez takie drobnoustroje, jak *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii* czy MRSA. Poza tym bakteriofagi mogą być stosowane wraz z antybiotykami jako leczenie wspomagające [58].

Bakteriofagi znalazły ponadto zastosowanie w leczeniu innych zakażeń opornych na antybiotyki, takich jak zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, czerwonka czy zapalenie płuc [46]. Potencjalnie fagi mogą zostać wykorzystane w terapii infekcji wywołanych przez inne drobnoustroje [59].

## PROBIOTYKI STOSOWANE MIEJSCOWO

Bakterie probiotyczne to tak zwane „dobre” bakterie. Występują one nie tylko w naturalnej florze bakteryjnej człowieka, lecz także na przykład w sfermentowanej żywności. Utrata tego rodzaju mikroflory może być przyczyną namnażania się chorobotwórczych bakterii. Ponadto stwierdzono, że podawanie probiotyków hamuje ich rozwój. Jeden z opatentowanych szczepów *Bacillus coagulans* w wyniku wytwarzania peptydów przeciwdrobnoustrojowych może mieć zastosowanie w miejscowym leczeniu ran zainfekowanych przez *Pseudomonas* i *Staphylococcus* [58]. Zarówno badania przedkliniczne, jak i przeprowadzane u ludzi wykazały skuteczność probiotyków w profilaktyce i terapii wielu schorzeń wywołanych przez czynniki infekcyjne, immunologiczne oraz zapalne [60].

Stwierdzono, że bakterie probiotyczne zawarte w kefirze są skuteczne w zapobieganiu i leczeniu in-

fekcji u ludzi. W jednym z badań Rodriguesa i wsp. [61] przeprowadzonych na szczurach wykazano, że kefir był skuteczny w terapii infekcji skóry wywołanych przez *S. aureus*. Tego rodzaju leczenie było bardziej skuteczne niż zewnętrzne stosowanie emulsji zawierającej klostebol z neomycyną [61].

W badaniu, w którym zastosowano bakterie probiotyczne – *Lactobacillus plantarum*, stwierdzono, że mają one zdolność do hamowania aktywności patogennej *P. aeruginosa* zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Wskazuje to, że *L. plantarum* i/lub wytwarzane przez te bakterie substancje mogą być skutecznym środkiem w walce z tą lekooporną bakterią [62]. Inne badanie, przeprowadzone na szczurach, w którym wykorzystano te same bakterie, wykazało statystycznie istotną poprawę w grupie szczurów, w której zastosowano *L. plantarum* na podłożu eucerynowym, w porównaniu z grupą, w której użyto samej euceryny [63]. W jednym z badań stwierdzono, że maść zawierająca *L. plantarum* miała działanie antybakteryjne podobne jak 0,1-procentowy roztwór chlorheksydyny [64].

Dotychczas wykazano skuteczność probiotyków w leczeniu takich schorzeń, jak wrzody żołądka i infekcje jamy ustnej. Badania przeprowadzone na fibroblastach i macierzy DNA wskazują, że probiotyki mają zdolność do naturalnej stymulacji odpowiedzi immunologicznej skóry, przez co wzmagają jej regenerację i zdrowienie. Na tej podstawie można wnioskować, że mogą one znaleźć zastosowanie m.in. w leczeniu zespołu stopy cukrzycowej [65]. Również badania kanadyjskie wskazują, że probiotyki mogą zostać wykorzystane w terapii ran przewlekłych [66]. Przeprowadzono je na króliczym modelu niedokrwionej rany zainfekowanej przez *S. aureus*. W badaniu tym zastosowano opatrunek z bakteriami probiotycznymi *Lactobacillus fermentum*, wytwarzającymi tlenek azotu (NO). Zebrane dane wskazują, że wszystkie rany poddane aktywności *L. fermentum* wykazywały znaczną poprawę, co również potwierdzono w badaniu histologicznym [66].

## KOSZTY LECZENIA RAN PRZEWLEKŁYCH

Na świecie obserwuje się wyraźny wzrost liczby ran przewlekłych [67], których leczenie generuje niezwykle wysokie koszty. Szacuje się, że w Australii roczny koszt ich leczenia wynosi niemal 3 miliardy dolarów australijskich. Z tego względu należy poszukiwać bardziej skutecznych i tańszych metod terapii. Ważne wydaje się zwiększenie świadomości tego problemu nie tylko wśród pracowników ochrony zdrowia, lecz także naukowców i decydentów [68].

Stwierdzono, że można obniżyć koszty leczenia ran poprzez identyfikację, czy są one objęte biofilmem bakteryjnym za pomocą badań molekularnych, a następnie dobór odpowiedniego leczenia [67]. Jed-

na z analiz wykazała, że zastosowanie nowoczesnego opatrunku pokrytego czynnikiem nanooligosacharydowym (ang. *nano-oligosaccharide factor* – NOSF) znacznie obniżało koszt leczenia ran przewlekłych w porównaniu z opatrunkiem piankowym [69]. Wywołuje to przekonanie, że nowe technologie, oprócz lepszych efektów terapii, mogą generować także niższe koszty.

W badaniach przeprowadzonych w Wielkiej Brytanii wykazano, że z powodu ran przewlekłych cierpi 6% społeczeństwa Walii, natomiast koszty ich rocznego leczenia szacuje się na ponad 328 milionów funtów brytyjskich. W skali wszystkich wydatków na ochronę zdrowia koszty leczenia ran przewlekłych stanowią około 5,5% [70].

Z danych amerykańskich wynika, że 7,6% pacjentów przyjmowanych do szpitala spełniało kryteria rozpoznania rany przewlekłej. W wyniku ran przewlekłych tylko w Stanach Zjednoczonych umiera rocznie ponad 100 tysięcy pacjentów, natomiast koszty ich terapii szacuje się na około 26 miliardów dolarów rocznie [71].

Analiza polskich badaczy porównująca koszty leczenia bakteriofagami i antybiotykami infekcji paciorkowcowej wykazała, że zastosowanie bakteriofagów może być rozwiązaniem alternatywnym do antybiotykoterapii, nie tylko ze względu na oporność bakterii na antybiotyki, lecz także koszty [72].

## PODSUMOWANIE

Tworzenie biofilmu ludzkich drobnoustrojów chorobotwórczych powoduje trudne do wyleczenia stany chorobowe skóry i błon śluzowych. Dlatego bardzo ważne jest wynalezienie nowych metod zapobiegania tworzeniu biofilmu i leczenia zakażeń z jego udziałem. Główną przyczyną niepowodzeń aktualnych metod terapii ran przewlekłych są zmniejszone przenikanie i aktywność stosowanych leków oraz zaburzenia genotypu bakterii poddanych działaniu leków, powodujące lepsze ich przystosowanie do trudnych warunków środowiska (kwaśne pH czy mniejsza dostępność tlenu). Trudności w leczeniu ran przewlekłych osiągają skalę globalną, nie tylko ze względu na rosnącą antybiotykooporność bakterii, lecz także koszty terapii. Wyniki wielu badań wskazują na skuteczność innowacyjnych metod, takich jak zastosowanie bakteriofagów, probiotyków czy nanocząstek, w leczeniu ran zakaźnych.

## Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

## Piśmiennictwo

1. Siddiqui A.R., Bernstein J.M.: Chronic wound infection: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2010, 28, 519-526.

2. **Krasowski G.:** Leczenie ran przewlekłych – cz. I: Definicja, etiologia, epidemiologia, fizjologia i patofizjologia gojenia się ran. [http://www.mp.pl/zakrzepica/wytyczneartykuly/artykuly\\_przegladowe/show.html?id=88117](http://www.mp.pl/zakrzepica/wytyczneartykuly/artykuly_przegladowe/show.html?id=88117) (dostęp 01.07.2015 r.)
3. **Rosenbaum C.:** An overview of integrative care options for patients with chronic wounds. *Ostomy Wound Manage* 2012, 58, 44-51.
4. **Jabłońska S., Majewski S.:** Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową. PZWL, Warszawa, 2005.
5. **Grice E.A., Segre J.A.:** The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011, 9, 244-253.
6. **Scales B.S., Huffnagle G.B.:** The microbiome in wound repair and tissue fibrosis. *J Pathol* 2013, 229, 323-331.
7. **Wolcott R., Costerton J.W., Raoult D., Cutler S.J.:** The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect* 2013, 19, 107-112.
8. **Hurlow J., Couch K., Laforet K., Bolton L., Metcalf D., Bowler P.:** Clinical biofilms: a challenging frontier in wound care. *Adv Wound Care* 2015, 4, 295-301.
9. **Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.J.:** How bacteria stick. *Sci Am* 1978, 238, 86-95.
10. **Metcalf D., Bowler P.:** Biofilm delays wound healing: a review of the evidence. *Burn Trauma* 2013, 1, 5-12.
11. **Marcinkiewicz J., Strus M., Pasich E.:** Antibiotic resistance: a 'dark side' of biofilm – associated chronic infections. *Pol Arch Med Wewn* 2013, 123, 309-313.
12. **Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.:** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284, 1318-1322.
13. **Wolcott R., Dowd S.:** The role of biofilms: are we hitting the right target? *Plast Reconstr Surg* 2011, 127, Supl, 285-355.
14. **Tollefson D.F., Bandyk D.F., Kaebnick H.W., Seabrook G.R., Towne J.B.:** Surface biofilm disruption. Enhanced recovery of microorganisms from vascular prostheses. *Arch Surg* 1987, 122, 38-43.
15. **Donlan R.M.:** Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002, 8, 881-890.
16. **Vyas K.S., Wong L.K.:** Detection of biofilm in wounds as an early indicator for risk for tissue infection and wound chronicity. *Ann Plast Surg* 2016, 76, 127-131.
17. **Seth A.K., Geringer M.R., Gurjala A.N., Hong S.J., Galiano R.D., Leung K.P. i inni:** Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-infected wounds with clinical wound care strategies: a quantitative study using an in vivo rabbit ear model. *Plast Reconstr Surg* 2012, 129, 262e-274e.
18. **Seth A.K., Geringer M.R., Hong S.J., Leung K.P., Mustoe T.A., Galiano R.D.:** In vivo modeling of biofilm-infected wounds: a review. *J Surg Res* 2012, 178, 330-338.
19. **Bjarnsholt T.:** The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS* 2013, 136 Supl., 1-51.
20. **Seth A.K., Geringer M.R., Galiano R.D., Leung K.P., Mustoe T.A., Hong S.J.:** Quantitative comparison and analysis of species-specific wound biofilm virulence using an in vivo, rabbit-ear model. *J Am Coll Surg* 2012, 215, 388-399.
21. **Gjødtsbøl K., Christensen J.J., Karlsmark T., Jørgensen B., Klein B.M., Kroghfelt K.A.:** Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J* 2006, 3, 225-231.
22. **Pasich E., Walczewska M., Pasich A., Marcinkiewicz J.:** Mechanizm i czynniki ryzyka powstawania biofilmu bakteryjnego jamy ustnej. *Postep Hig Med Dosw* 2013, 67, 736-741.
23. **Ansari M.A., Khan H.M., Khan A.A., Sultan A., Azam A.:** Characterization of clinical strains of MSSA, MRSA and MRSE isolated from skin and soft tissue infections and the antibacterial activity of ZnO nanoparticles. *World J Microbiol Biotechnol* 2012, 28, 1605-1613.
24. **Gurunathan S., Han J.W., Kwon D.N., Kim J.H.:** Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale Res Lett* 2014, 9, 373.
25. **Salunke G.R., Ghosh S., Santosh-Kumar R.J., Khade S., Vashisth P., Kale T. i inni:** Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant *Plumbago zeylanica* and their application in biofilm control. *Int J Nanomedicine* 2014, 9, 2635-2653.
26. **Eckmanns T., Richter D., Feig M.:** [MRSA and ESBL in outpatient: development from 2008 up to 2012 and socio-demographic differences]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2014, 127, 399-402.
27. **Świdwińska-Gajewska A.M.:** Nanocząstki (część 2) – korzyści i ryzyko dla zdrowia. *Med Pr* 2007, 58, 253-263.
28. **Huang R., Li M., Gregory R.L.:** Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* 2011, 2, 435-444.
29. **Niska K., Pyszka K., Tukaj C., Wozniak M., Radomski M.W., Inkiewicz-Stepniak I.:** Titanium dioxide nanoparticles enhance production of superoxide anion and alter the antioxidant system in human osteoblast cells. *Int J Nanomed* 2015, 10, 1095-1107.
30. **Li J., Zhou H., Qian S., Liu Z., Feng J., Jin P. i inni:** Plasmonic gold nanoparticles modified titania nanotubes for antibacterial application. *Appl Phys Lett* 2014, 104, 26.
31. **Zalyubovskiy S.J., Bogdanova M., Deinega A., Lozovik Y., Pris A.D., An K.H. i inni:** Theoretical limit of localized surface plasmon resonance sensitivity to local refractive index change and its comparison to conventional surface plasmon resonance sensor. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 2012, 29, 994-1002.
32. **Praig V., McIlwee H., Schauer C., Boukherroub R., Szunerits S.:** Localized surface plasmon resonance of gold nanoparticle-modified chitosan films for heavy-metal ions sensing. *J Nanosci Nanotechnol* 2009, 9, 350-357.
33. **Park K.H., Kim S., Yang S.M., Park H.G.:** Detection of DNA immobilization and hybridization on gold/silver nanostructures using localized surface plasmon resonance. *J Nanosci Nanotechnol* 2009, 9, 1374-1378.
34. **Velázquez-Velázquez J.L., Santos-Flores A., Araujo-Meléndez J., Sánchez-Sánchez R., Velásquez C., González C. i inni:** Anti-biofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015, 49, 604-611.
35. **Ali K., Ahmed B., Dwivedi S., Saquib Q., Al-Khedhairy A.A., Musarrat J.:** Microwave accelerated green synthesis of stable silver nanoparticles with *Eucalyptus globulus* leaf extract and their antibacterial and antibiofilm activity on clinical isolates. *PLoS One* 2015, 10, e0131178.
36. **Pérez Díaz M., Boegli L., James G., Velásquez C., Sánchez-Sánchez R., Martínez-Martínez R.E. i inni:** Silver nanoparticles with antimicrobial activities against *Streptococcus mutans* and their cytotoxic effect. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015, 1, 360-366.
37. **Ramalingam V., Rajaram R., Premkumar C., Santhanam P., Dhinesh P., Vinothkumar S. i inni:** Biosynthesis of silver nanoparticles from deep sea bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JQ989348 for antimicrobial, antibiofilm, and cytotoxic activity. *J Basic Microbiol* 2014, 54, 928-936.
38. **Sivakamavalli J., Deepa O., Vaseeharan B.:** Discrete nanoparticles of *ruta graveolens* induces the bacterial and fungal biofilm inhibition. *Cell Commun Adhes* 2014, 21, 229-238.
39. **Guerreiro-Tanomaru J.M., Trindade-Junior A., Costa B.C., da Silva G.F., Drullis Cifali L., Basso Bernardi M.I. i inni:**

- Effect of zirconium oxide and zinc oxide nanoparticles on physicochemical properties and antibiofilm activity of a calcium silicate-based material. *Sci World J* 2014, 2014, 975213.
40. Lee J., Kim Y., Cho M., Lee J.: ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiol Res* 2014, 169, 888-896.
  41. Kocbek P., Teskac K., Kreft M.E., Kristl J.: Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Small* 2010, 6, 1908-1917.
  42. Świdwińska-Gajewska A.M., Czerczak S.: Nanosilver – harmful effects of biological activity. *Med Pr* 2014, 65, 831-845.
  43. Aitken R.J., Creely K.S., Tran C.L.: Nanoparticles: an occupational hygiene review. Institute of Occupational Medicine, Edinburgh, 2004.
  44. Piasecka-Zelga J., Zelga P., Górnicz M., Strzelczyk P.: Acute dermal toxicity and sensitization studies of novel nano-enhanced UV absorbers. *J Occup Heal* 2015, 57, 275-284.
  45. Azeredo J., Sutherland I.W.: The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol* 2008, 9, 261-266.
  46. Sousa C., Botelho C., Oliveira R.: Nanotechnology applied to medical biofilms control. [w:] *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. Vol. 2. A. Méndez-Vilas (red.), Formatex Research Center, Badajoz, 2011, 878-888.
  47. Harper D., Parracho H., Walker J., Sharp R., Hughes G., Werthén M. i inni: Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics* 2014, 3, 270-284.
  48. Seth A.K., Geringer M.R., Nguyen K.T., Agnew S.P., Dumanian Z., Galiano R.D. i inni: Bacteriophage therapy for *Staphylococcus aureus* biofilm-infected wounds: a new approach to chronic wound care. *Plast Reconstr Surg* 2013, 131, 225-234.
  49. Mendes J.J., Leandro C., Corte-Real S., Barbosa R., Cavaco-Silva P., Melo-Cristino J. i inni: Wound healing potential of topical bacteriophage therapy on diabetic cutaneous wounds. *Wound Repair Regen* 2013, 21, 595-603.
  50. Marza J.A.S., Soothill J.S., Boydell P., Collins T.A.: Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. *Burns* 2006, 32, 644-646.
  51. McVay C.S., Velásquez M., Fralick J.A.: Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51, 1934-1938.
  52. Krylov V., Shaburova O., Krylov S., Pleteneva E.: A genetic approach to the development of new therapeutic phages to fight *Pseudomonas aeruginosa* in wound infections. *Viruses* 2013, 5, 15-53.
  53. Chhibber S., Kaur T., Kaur S.: Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: effective treatment in eliminating methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from diabetic foot infections. *PLoS One* 2013, 8, e56022.
  54. Mihi M.R., Martinez L.R.: Novel therapies for treatment of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* skin infections. *Virulence* 2011, 2, 97-102.
  55. Shivaswamy V.C., Kalasuramath S.B., Sadanand C.K., Basavaraju A.K., Ginnavaram V., Bille S.: Ability of Bacteriophage in resolving wound infection caused by multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in uncontrolled diabetic rats. *Microb Drug Resist* 2015, 21, 171-177.
  56. Rhoads D.D., Wolcott R.D., Kuskowski M.A., Wolcott B.M., Ward L.S., Sulakvelidze A.: Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care* 2009, 18, 237-238, 240-243.
  57. Markoishvili K., Tsitlanadze G., Katsarava R., Morris J.G., Sulakvelidze A.: A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *Int J Dermatol* 2002, 41, 453-458.
  58. Sevgi M., Toklu A., Vecchio D., Hamblin M.R.: Topical antimicrobials for burn infections - an update. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2013, 8, 161-197.
  59. Kutateladze M., Adamia R.: Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol* 2010, 28, 591-595.
  60. Wong V.W., Martindale R.G., Longaker M.T., Gurtner G.C.: From germ theory to germ therapy: skin microbiota, chronic wounds, and probiotics. *Plast Reconstr Surg* 2013, 132, 854e-861e.
  61. Rodrigues K.L., Caputo L.R.G., Carvalho J.C.T., Evangelista J., Schneedorf J.M.: Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrob Agents* 2005, 25, 404-408.
  62. Valdéz J.C., Peral M.C., Rachid M., Santana M., Perdigón G.: Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. *Clin Microbiol Infect* 2005, 11, 472-479.
  63. Heydari N.M., Tajabadi E.M., Dehghan B.S., Torabi K.M., Zahedi F.: Study of cutaneous wound healing in rats treated with *Lactobacillus plantarum* on days 1, 3, 7, 14 and 21. *African J Pharm Pharmacol* 2011, 5, 2395-2401.
  64. Marlicz W.: Nie tylko antybiotykoterapia – potencjalne wskazania do stosowania probiotyków. *Zakażenia* 2013, 13, 26-33.
  65. Sonal Sekhar M., Unnikrishnan M.K., Vijayanarayana K., Rodrigues G.S., Mukhopadhyay C.: Topical application/formulation of probiotics: will it be a novel treatment approach for diabetic foot ulcer? *Med Hypotheses* 2014, 82, 86-88.
  66. Jones M., Ganopolsky J.G., Labbé A., Gilardino M., Wahl C., Martoni C. i inni: Novel nitric oxide producing probiotic wound healing patch: preparation and in vivo analysis in a New Zealand white rabbit model of ischaemic and infected wounds. *Int Wound J* 2012, 9, 330-343.
  67. Wolcott R.: Economic aspects of biofilm-based wound care in diabetic foot ulcers. *J Wound Care* 2015, 24, 189-190, 192-194.
  68. Kapp S., Santamaria N.: Chronic wounds should be one of Australia's National Health Priority Areas. *Aust Health Rev* 2015, 39, 600-602.
  69. Augustin M., Herberger K., Kroeger K., Muentner K.C., Goepel L., Rychlik R.: Cost-effectiveness of treating vascular leg ulcers with UrgoStart® and UrgoCell® Contact. *Int Wound J* 2016, 13, 82-87.
  70. Phillips C.J., Humphreys I., Fletcher J., Harding K., Chamberlain G., Macey S.: Estimating the costs associated with the management of patients with chronic wounds using linked routine data. *Int Wound J* 2015 doi: 10.1111/iwj.12443.
  71. Kahn J.M., Le T., Angus D.C., Cox C.E., Hough C.L., White D.B.: The epidemiology of chronic critical illness in the United States. *Crit Care Med* 2015, 43, 282-287.
  72. Międzybrodzki R., Fortuna W., Weber-Dąbrowska B., Górski A.: Phage therapy of Staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postepy Hig Med Dosw* 2007, 61, 461-465.

Otrzymano: 13 I 2016 r.

Zaakceptowano: 11 VII 2016 r.