



Acta

Medica

Croatica



Vol. 70 2016.
Broj 1
Zagreb

UDC 61 • AMCREF 70 (1)
1-84 (2016)
ISSN 1330-0164

ACTA MEDICA CROATICA

GLASILO AKADEMIJE MEDICINSKIH ZNANOSTI HRVATSKE
Journal of the Academy of Medical Sciences of Croatia,
Praška 2/III
10000 Zagreb
Croatia

Urednica – Editor-in-Chief
NASTJA KUČIŠEC-TEPEŠ

Gošća-urednica – Guest-Editor
SANDRA MARINOVIĆ KULIŠIĆ

Tajnik – Editorial Assistant
ILIJA KUZMAN

Tehnička urednica – Editor
DUNJA BERITIĆ-STAHULJAK

Urednički odbor – Section Editors
Iva Alajbeg, Marko Banić, Nikolina Bašić Jukić, Iva Dekaris, Marko Duvnjak, Josip Djelmiš, Alenka Gagro, Josipa Kern, Petar Kes, Dragutin Košuta, Ratko Matijević, Zvonko Rumboldt, Adriana Vince

Predsjednica Uredničkog savjeta – Chief Council
JASNA LIPOZENČIĆ

Urednički savjet – Editorial Council
Mladen Belicza (Zagreb), Theodor Dürriegl (Zagreb), Vladimir Goldner (Zagreb), Hans Georg Fassbender (Mainz), Olga Jelić (Slavonski Brod), Tatjana Jeren (Zagreb), Vjekoslav Jerolimov (Zagreb), Anica Jušić (Zagreb), Eduard Klain (Zagreb), Jan Murker (München), Vasilije Nikolić (Zagreb), M. William Novick (Memphis), Vlado Oberiter (Zagreb), Željko Reiner (Zagreb), Danijel Rukavina (Rijeka), Melita Valentić-Peruzović (Zagreb), Pietro Vajlo (Napoli), John Wallwork (Cambridge), Ljiljana Zergollern-Čupak (Zagreb), Željko Zupancić (Zagreb)

Adresa Uredništva – Address of the Editorial Board
ACTA MEDICA CROATICA
Akademija medicinskih znanosti Hrvatske
Praška 2/III
10000 Zagreb, Hrvatska
Tel/fax: +385 1 46 40 586; E-mail: amzh@zg.t-com.hr

Časopis se tiska pet puta godišnje. Naručuje se neposredno od Uredništva. Godišnja pretplata u zemlji iznosi za ustanove 500,00 kn, za pojedince 150,00 kn, a uplaćuje se na IBAN HR5423600001101481831. Pretplata u inozemstvu iznosi protuvrijednost US \$ 150.- koju treba uplatiti na račun Privredna banka Zagreb, d.d. No. 70310998200-137182; Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 10 000 Zagreb, Praška 2/III, Hrvatska (za Acta Medica Croatica).

The Journal is published five times a year. Orders can be placed directly to our Editorial Office. The annual subscription in the country for institutions 500.00 kn, for individuals 150.00 kn to be paid to the account No. 2360000-1101481831; abroad: the equivalent of US \$150.- to be paid to our foreign currency bank account „Privredna banka Zagreb, d.d.“ No. 703109982800-137182; Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 10 000 Zagreb, Praška 2/III, Hrvatska (for Acta Medica Croatica).

Lektor – Lector
Antonija Redovniković

Omotna stranica – Cover design
Ivan Picelj
Tisak – Printed by
Gradska tiskara Osijek d.d., 31000 Osijek, Croatia
Tiska se u 500 primjeraka – Printed in 500 copies

Tiskanje časopisa potpomognuto je financijskim sredstvima Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.
The printing of the Journal is subsidized by the Ministry of Science, Education and Sports of the Republic of Croatia.

acta medica croatica

Časopis Akademije medicinskih znanosti Hrvatske

Acta Med Croatica • Vol. 70 Br. 1 • Str. 1-84 • Zagreb, ožujak 2016.

The Journal of the Academy of Medical Sciences of Croatia

ULOGA BIOFILMA U LIJEČENJU VRIJEDA

Indexed/abstracted in:

Biosis Previews

Cancerlit

Embase/Excerpta Medica

Health Planning and Administration

Medline/Index Medicus

Toxline

EBSCO

UVODNA RIJEČ

Ovaj tematski broj *Acta Medica Croatica*, koji sadrži predavanja autora sa Simpozija „Uloga biofilma u liječenju vrijeda“ pod pokroviteljstvom Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti i uz potporu *Stoma medical*, doprinos je obilježavanju 55. godine uspješnog djelovanja AMZH. Obuhvaćene su suvremene spoznaje o kroničnoj venskoj bolesti uključujući etiopatogenezu, dijagnozu, prevenciju i liječenje kroničnog vrijeda.

Kronični vrijed je javno-zdravstveni i ekonomski problem u Hrvatskoj, koji se danas može uspješno spriječiti ranom dijagnozom i pravilnom njegom vrijeda. Komplikacije su nažalost u praksi dosta česte. Primjena suvremenih antimikrobnih obloga usmjerenih na polivalentni biofilm u vrijedu danas je imperativ sprječavanja komplikacija i nastanka kroničnog vrijeda. Liječenje inficiranog vrijeda je za obiteljskog liječnika dugotrajno i skupo. Brojne bolesti također sudjeluju u patogenezi vrijeda uključujući dijabetes, pretilost i periferne vaskularne bolesti.

Danas je znanstveno dokazano da je bakterijski biofilm odgovoran za otežano cijeljenje vrijeda. U biofilmu vrijeda značajna je ekstracelularna polimerna tvar (EPS) koja obavlja bakterije i čini fizičku barijeru za fagocitozu i aktivaciju komplementa, a također sprječava penetraciju sistemskog antibiotika ili lokalno primijenjenog antimikrobnog sredstva. Prisustvo biofilma u vrijedu je značajka kroničnog vrijeda. U liječenju se protiv stvaranja biofilma koriste različiti tretmani kao *debridement*, antimikrobni lijekovi, lavaža, ali rezultati nisu zadovoljavajući. Za redukciju biofilma u rani znanstveno su istraživane suvremene metode liječenja, ali nisu u potpunosti objašnjene ni primjene u praksi. Molekulska terapija kao, na primjer, s D-amino

kiselinom i peptidima koji inhibiraju RNK, dokazali su učinkovitost u pokusima *in vitro* i *in vivo*, no primjena je u kliničkoj praksi otežana. Unatoč porastu znanja o mehanizmu virulencije biofima, otkrića učinkovitih lijekova nisu napredovala.

U studiji Akhila sur. iz 2014. godine autori su primijenili lokalne antibiotike i obloge s poliheksametilen biguanidom, te obloge *Aquacel hidrofiber* i *Aquacel Ag+ hidrofiber* kao „testne obloge“. Testna obloga sa srebrom je dokazala učinkovitost na biofilm uzrokovanih multibakterijama i to posebice na razinu *P. aeruginosa*. Otežano, odnosno odgođeno cijeljenje vrijeda je posljedica prekomjernog stvaranja eksudata u vrijedu, infekcije s više uzročnika te prisutnosti biofilma koji sprječavaju proces cijeljenja vrijeda. Iako na tržištu postoje brojne suportivne obloge za kronični vrijed, ipak se ne koriste adekvatno prema kliničkom stanju vrijeda, ne provodi se laboratorijska biokemijska i bakteriološka dijagnostika, a još manje klinička i bakteriološka identifikacija biofilma u vrijedu. Najnovije antimikrobne obloge imaju svojstvo uništenja i sprječavanja reformacije biofilma u vrijedu.

U ovom tematskom broju časopisa eksperti na ovom području detaljno prikazuju uspjehe istraživanja kroničnog vrijeda od dijagnoze, neophodne kliničke i mikrobiološke dijagnoze biofilma, te rezultata kliničkih postupaka *in vivo* i *in vitro* za otklanjanje biofilma. Antimikrobnim oblogama najnovije generacije postiže se uništenje a i sprječavanje nastanka novog biofilma u vrijedu.

SANDRA MARINOVIĆ KULIŠIĆ
JASNA LIPOZENČIĆ

OPENING REMARKS

This special issue of *Acta Medica Croatica* contains lectures presented at the symposium entitled *The Role of Biofilm in the Treatment of Ulcer*, organized by the Croatian Academy of Medical Sciences (CAMS) under patronage of Croatian Academy of Sciences and Arts, with valuable support from Stoma Medical, contributes to celebration of the 55th anniversary of successful CAMS activities. The issue brings state-of-the-art on the chronic venous disease including the etiopathogenesis, diagnosis, prevention and treatment of chronic ulcers.

Chronic venous disease is a public health and economic problem in Croatia, which today can be successfully prevented by early diagnosis and proper treatment. Complications are, unfortunately, quite frequently seen in daily routine. The application of advanced antimicrobial dressings targeting polyvalent biofilm in the wound is currently imperative for preventing complications and occurrence of chronic venous ulcers. Treatment of infected ulcer is for family doctor time-consuming and expensive. A number of diseases are also involved in the pathogenesis of ulceration including diabetes, obesity and peripheral vascular disease.

Today, it is scientifically proven that bacterial biofilm is responsible for difficult healing of the ulcer. The ulcer biofilm contains significant extracellular polymeric substances that enclose the bacteria and make a physical barrier for phagocytosis and complement activation, while preventing penetration of systemic antibiotics or locally applied antimicrobial agents. The presence of biofilm in the wound is a characteristic feature of chronic ulcer. In the treatment against biofilm, various treatments are used, such as debridement, antimicrobial agents, lavage, but results are not satisfactory. Modern methods of treatment for wound biofilm

reduction have been scientifically studied, but they are not completely explained and used in practice. For example, molecular therapy with D-amino acid and with peptides that inhibit RNA, have been proven effective in *in vitro* and *in vivo* experiments, but its application is difficult in clinical practice. Despite the increasing knowledge about the mechanism of biofilm virulence, discovery of effective drugs has not progressed.

In the study by Akhil *et al.* from 2014, the authors applied local antibiotics and dressings with poly-hexamethylene biguanide and Aquacel hydrofiber and Aquacel Ag + hidrofiber wraps as 'test dressings'. Test dressing with silver proved effective for multibacterial biofilm, particularly *Pseudomonas aeruginosa*.

Difficult or delayed ulcer healing is the result of excessive exudate in the ulcer, infection with multiple pathogens, and presence of biofilm that inhibits the ulcer healing process. Although there are many supportive dressings for chronic ulcers on the market, they are not used properly according to the clinical status of ulcers, while laboratory biochemical and bacteriological diagnosis generally is not obtained, let alone clinical and bacteriological identification of the biofilm. Modern antimicrobial dressings have the ability of destruction and prevention of biofilm reformation in ulcers.

In this thematic issue, experts in this field show in detail the results of successful research of chronic venous ulcers, from the diagnosis, necessary clinical and microbiological diagnosis of biofilm, to the results of clinical *in vivo* and *in vitro* research methods for biofilm removal. Antimicrobial dressings of the latest generation provide destruction and prevent formation of new biofilm in the ulcer.

SANDRA MARINOVIĆ KULIŠIĆ
JASNA LIPOZENČIĆ

KRONIČNI VRIJED – NOVE SPOZNAJE O ETIOPATOGENEZI I SUVREMENI TERAPIJSKI POSTUPAK

SANDRA MARINOVIĆ KULIŠIĆ

Klinički bolnički centar Zagreb, Klinika za dermatologiju i venerologiju, Zagreb, Hrvatska

Potkoljenični vrijed je najčešći oblik ulceracija na donjim ekstremitetima. Prevalencija potkoljeničnog vrijeda varira od 0,1 % do 0,6 % ukupne populacije – ovisno o zemlji i studiji. U većini studija se ipak navodi da 1 % populacije tijekom života barem jednom oboli od venskog vrijeda. Posljednje desetljeće došlo je do novih spoznaja o upalnoj fazi u kroničnom vrijedu, o značenju metaloproteinaza, faktora rasta, nepravilnoj mišićnoj funkciji, vaskularnoj insuficijenciji i prisutnost biofilma u vrijedu koji priječi fazu zacjeljivanja. Postoji nekoliko hipoteza kojima se nastoje objasniti patofiziološki koraci koji vode od venske hipertenzije u potkoljenični vrijed. Poznavanje patofiziologije vrijeda i postavljanje točne dijagnoze temelj su suvremenog zbrinjavanja venskog vrijeda. Moderne suportivne obloge danas poboljšavaju kvalitetu života bolesnika, no potrebna je njihova ciljana primjena prema postupniku i indikacijama. Najučinkovitija je danas u odstranjenju biofilma u vrijedu primjena hidrofiber obloga sa srebrom i dezinficijansom, jer utječu na odstranjenje i sprječavanje novonastalog biofilma u vrijedu.

Ključne riječi: kronični vrijed, infekcija, biofilm, antimikrobne obloge

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Sandra Marinović Kulišić, dr. med.
Klinički bolnički centar
Klinika za dermatovenerologiju
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Šalata 4
10 000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: sandra.marinovic@zg.htnet.hr

UVOD

Venski vrijed je područje diskontinuiteta kože, najčešće smješteno u distalnim dijelovima potkoljenica, a posljedica je kronične venske bolesti – venske hipertenzije. Različite je veličine i oblika, ponekad obuhvaća i cijelu cirkumferenciju ekstremiteta.

Posljednje se desetljeće u istraživanjima kronične venske bolesti (KVB) došlo do novih spoznaja o upalnom putu: migraciji leukocita, aktivaciji plazma stanica i granulocita te povišenoj aktivnosti metaloproteinaze – što sve zajedno uzrokuje oštećenje venskog zalistka. Drugi važan čimbenik uključen u patofiziologiju venskog vrijeda je oštećena mišićna aktivnost. Mišićna funkcija u potkoljenici u zdravoj populaciji povećava brzinu protoka krvi i održava ravnotežu tekućine u cirkulaciji. U bolesnika s nepravilnom mišićnom funkcijom često nastaju promjene na koži i teži stadij KVB te nastanak vrijeda.

Supportivne obloge u liječenju vrijeda važan su dio skrbi za bolesnike. Na raspolaganju je mnoštvo različitih obloga te je za pravi izbor obloge potrebno dobro poznavanje generičkih skupina obloga, njihova djelovanja na proces cijeljenja rane, te odstranjenja biofilma u vrijedu koji je odgovoran za komplikacije i necijeljenje vrijeda.

Epidemiologija

Učestalost venskog vrijeda, kao najteže manifestacije kronične venske bolesti, značajno raste kako populacija stari. Venski vrijed ne javlja se prije 60. godine života (1), a iznosi 0,7 % kod osoba starijih od 70 godina. Broj pacijenata koji pate od KVB je potcijenjen, jer je teško definirati bolest. Iako je klinički tijek KVB postepen, ipak tijekom vremena vrijed i KVB negativno utječu na zdravlje i kvalitetu života (1,2).

Etiopatogeneza

Kronična venska bolest započinje pokretanjem kaskade događaja koji dovode do patoloških promjena u venama i tkivu, a posljedica je kronična venska hipertenzija. Sve vene imaju zalistke, koji funkcioniraju kao ventili, te sprječavaju retrogradni tijek krvi. Mišići potkoljenice i venski zalisci zajedničkom akcijom reguliraju venski krvotok u donjim udovima. Muskulatura svojim kontrakcijama tijekom hodanja uzrokuje pražnjenje dubokih vena s posljedičnim padom tlaka, a tijekom mirovanja zalisci svojim zatvaranjem sprječavaju refluks krvi. Pri tomu nastali diferencijal tlaka između dubokih i površinskih vena usmjeruje venski krvotok iz površinskog u duboki sustav, tj. u pravcu nižega tlaka. Kod insuficijencije venskih zalistaka i zatajivanja mišićne pumpe ne nastaje pad venskog tlaka u dubokim venama nakon mišićne kontrakcije, te je stoga onemogućeno usisavanje krvi iz površinskih u duboke vene (2-4).

Inkompetencija valvularnog sustava čini osnovu patogenetskog i patofiziološkog mehanizma KVB. Funkcionalno oštećeni zalisci u dubokim venama dopuštaju retrogradni tijek venske krvi pri hodu i stajanju i razvoj povišenog tlaka u periferiji venskog bazena. Pri takvim povišenim vrijednostima krvnog tlaka vraćanje krvi kroz perforantne vene u površinski venski sustav dovodi do dilatacije i valvularne insuficijencije, tj. do nastanka varikoziteta. Visoki venski tlak izravno se prenosi u superficijalne vene koje dreniraju insuficijentne perforantne vene i potkožno tkivo. Perforantne vene ulijevaju se u duboke vene kroz mišićne fascije. Preveliko rastezanje venske stijenke na mjestu polazišta perforantnih vena iz površinskog venskog sustava dovodi do dilatacije tih vena u prolazu kroz mišićnu fasciju. Povišen hidrostatski tlak uzrok je transudacije i stvaranje otoka, povećane permeabilnosti kapilara i izlaska eritrocita i plazme u intersticij zbog čega se pojavljuju promjene boje kože, dermatoskleroza te destrukcija tkiva u obliku vrijeda. Ovo je zbivanje osobito izraženo u području medijalnog maleola, gdje zbog visokog tlaka nastaje transudacija seruma i propuštanje plazme, elektrolita, fibrinogena, eritrocita i makromolekula u intersticijski prostor, a perivaskularna depozicija fibrina smanjuje opskrbu kisikom kože i potpornog tkiva. Kao posljedica javljaju se edem, hipoksija tkiva, hemosiderinske pigmentacije na koži i nastanak vrijeda.

Postoji više teorija kojima se pokušava objasniti nastanak potkoljeničnog vrijeda (1-5). Najčešće se navodi "fibrin cuff theory" (barijera perfuzije kisika i nutritivnih tvari), kao posljedica prekapilarne fibroze gdje se povećava aktivnost upalnih stanica u okolno tkivo, te one oslobađaju proteinaze. Kapilarno oštećenje i fibrinska naslaga dovode do smanjenja ishrane okol-

nog tkiva te time nastaje vrijed koji ne cijeli. Teorija "white cell trapping theory" tumači da leukociti adheriraju na stanice endotela i uzrokuju tkivnu ishemiju te vaskulamo oštećenje oslobađanjem proteolitičkih enzima. Aglutinacija leukocita i adhezija na endotel zahtijeva istodobnu izražajnost adhezijskih molekula na stanicama endotela [intracelularna adhezijska molekula-1 (ICAM-1), vaskularna adhezijska molekula-1 (VCAM-1), E - selektin] i na leukocitima (5-9). Navedeni procesi dovode do brze migracije leukocita i monocita prema mjestu upale, gdje započinju odgovor na agresiju otpuštanjem upalnih medijatora i destrukcijom tkiva. Upalna interakcija leukocita i endotela ima važnu ulogu u nastanku venske bolesti i služi kao mehanizam okidanja za popuštanje zalistaka, refluksa i razvoja varikoznih vena, sve do vrijeda na potkoljenicama (4-7).

KLASIFIKACIJA KRONIČNE VENSKE BOLESTI

U praksi se nalazi nekoliko predloženih klasifikacija no od 1994. g. prihvaćena je klasifikacija pod nadzorom *American Venous Forum* koji je predložio klasifikaciju i stupnjeve za donje okrajine s kroničnom venskom bolesti. Kako bi se napravile standardizirane metode za opisivanje stanja bolesnika oboljelih od KVB napravljena je klasifikacija temeljena na kliničkim, etiološkim, anatomske i patofiziološkim rezultatima, poznata pod skraćenicom CEAP (kliničko-etioloko-anatomsko-patofiziološka klasifikacija). Većina se bolesnika nalazi u inicijalnom stadiju bolesti (C1-C2) te imaju telengiektazije, retikularne i varikozne vene. Kronična venska bolest pojavljuje se kod bolesnika s edemom, oštećenjem kože ili venskim vrijedom (C3-C6) (2-4).

Klasifikacija CEAP razvijena je kao kompleksna, deskriptivna platforma za izvještavanje o dijagnostičkim postupcima kronične venske bolesti, kao i način rutinskog pohanjivanja i vođenja bolesnikove dokumentacije. Klasifikacija se temelji na sljedećim kriterijima:

Klinička klasifikacija se odnosi na klasifikaciju stupnja ozbiljnosti bolesti, od potpuno zdravih nogu (0. stupanj) do aktivnih ulkusa (6. stupanj) (tablica 1).

Za svako kliničko stanje tom se klasifikacijom razlikuju:

- primarni od sekundarnih te od kongenitalnih slučajeva;
- refluks od opstruktivske patofiziologije;
- određuju se precizni anatomske segmenti zahvaćeni refluksom ili opstrukcijom.

Tablica 1.
Klinička klasifikacija CEAP (4)

Stupanj 0	nevidljivi ili palpabilni znakovi venske bolesti
Stupanj 1	teleangiektazije ili retikularne vene
Stupanj 2	varikozne vene
Stupanj 3	edem
Stupanj 4	kožne promjene opisane kod venskih bolesti (pigmentacija, lipodermatoskleroza, venski edem)
Stupanj 5	kožne promjene opisane u stupnju 4 samo s izliječenim ulkusom
Stupanj 6	kožne promjene kao u stupnju 4, ali s aktivnim ulkusom
s –	simptomi koji uključuju bol, zatezanje, iritaciju kože, grčenje mišića, kao i druge tegobe koje se mogu pripisati venskoj disfunkciji
a –	asimptomatski

Etiološka klasifikacija (tablica 2) označava prirodu bolesti vena koje mogu biti urođene, primarne i sekundarne. Primarna bolest je sporo progresivan degenerativni venski poremećaj koji rezultira slabim venskim zidom što uzrokuje venski refluks i obično započinje u površinskim venama. Post-trombotička sekundarna bolest je progresivnija upalna bolest kod koje nastaje distorzija venskog zasliska i venskog zida te kombinacija opstrukcije i refluksa, koji obično započinje u dubokim venama.

Tablica 2.
Etiološka klasifikacija (4)

Ec kongenitalna
Ep primarna
Es sekundarna (posttrombotska)
En nema venske etiologije

Anatomska klasifikacija se odnosi na smještaj proširenih vena. Jesu li površinske, duboke ili perforantne, odnosno kada se patologija nije mogla pripisati ni jednoj anatomskej kategoriji (tablica 3).

Tablica 3.
Anatomska klasifikacija (4)

As površinske vene
Ap perforantne vene
Ad duboke vene
An nema anatomske etiologije

Patofiziološka klasifikacija određuje prisutnost refluksa u površinskim, komunikantnim ili dubokim venskim sustavima, kao i opstrukciju u tijeku krvi. Revidiranoj klasifikaciji dodana je nova kategorija (Pn) kojom se naglašava da nije određeno radi li se o refluksu ili opstrukciji (tablica 4) (4).

Tablica 4.
Patofiziološka klasifikacija (4)

Pr refluks
Po opstrukcija
Pr,o refluks i opstrukcija
Pn nema venske patofiziologije

Američki venski forum je 2000. godine iz elemenata klasifikacije CEAP izveo sustav stupnjevanja ozbiljnosti bolesti vena [engl. *Venous Severity Score* (VSS sustav)]. VSS sustav je postupak evaluacije razrađen kao nadopuna klasifikaciji CEAP kako bi se omogućilo serijsko procjenjivanje. Svojstva VSS sustava neophodna su za longitudinalno praćenje kliničkog stanja bolesnika tijekom i nakon intervencije.

Ta se klasifikacija kombinira sa sustavom stupnjevanja ozbiljnosti venske bolesti:

- Stupanj venske nesposobnosti (engl. *Venous Disability Score* (VDS))
- Stupanj venske segmentne bolesti (engl. *Venous Segmental Disease Score* (VSDS))
- Stupanj kliničke ozbiljnosti stanja venske bolesti (engl. *Venous Clinical Severity Score* (VCSS)) (2-4).

Stupanj venske nesposobnosti

VDS procjenjuje učinak bolesti vena i određuje stupanj nesposobnosti vena u izvršavanju svoje funkcije. Boduje se na ljestvici od 0 do 3, na temelju sposobnosti za osmosatni rad/dan s pružanjem vanjske pomoći ili bez nje.

Stupanj venske segmentne bolesti

VSDS koristi anatomske i patofiziološke klasifikacije sustava CEAP za stupnjevanje venskog refluksa ili opstrukcije. Rezultat se dobije snimanjem venskih segmenata doplerskim ultrazvukom ili flebografijom.

Stupanj kliničke ozbiljnosti stanja venske bolesti

VCSS uključuje 9 značajki bolesti vena od kojih se svaka boduje ljestvicom stupnja ozbiljnosti od 0 do 3. Kako bi rezultat bio dinamičan, VCSS kategorije se boduju pojedinačno. To su promjene na koži (pigmentacije, upala i otvrdnuće kože) te ulceracije (broj, veličina i trajanje).

KLINIČKA SLIKA

Teleangiektazije (sinonimi: paučinaste vene, metličaste vene) su proširene intradermalne venule veličine manje od 1 mm (sl. 1).



Sl. 1. *Teleangiektazije*

Retikularne vene (sinonimi: plave vene, subdermalne (površinske) vene, venulektazije) su proširene potkožne plavkaste vene promjera od 1 do 3 mm. Obično su vijugave. Kod ove definicije su isključene vene koje su vidljive kod osoba s prozirnom kožom.

Varikozne vene (sinonimi: variks, varikozitet) su supkutane proširene vene promjera 3 mm ili više u uspravnom stavu. Ovdje se mogu ubrojiti i magistralne površinske vene, nemagistralne površinske vene ili duboke vene. Varikozne vene obično su vijugave, no čak se i tubularne safenične vene s refluksom krvi mogu klasificirati kao varikozne vene (sl. 2).



Sl. 2. Varikozne vene

Intradermalne vene (sinonim: *corona phlebectatica*) su brojne male intradermalne vene u obliku lepeze na medijalnim ili lateralnim dijelovima gležnja i stopala. Obično se smatraju ranim znakom napredne bolesti vena.

Edem (sinonim: oticanje oko gležnja) je vidljivo povećanje volumena tekućine u koži i supkutanom tkivu za koje je karakteristično uvlačenje tlakom. Venski edem odnosi se na edem noge, zgloba ili stopala, povezan s vidljivim refluksom ili opstrukcijom u venama na mjestu otoka.

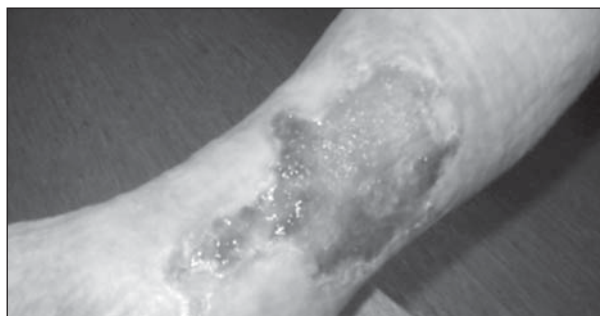
Pigmentacija kože: smeđkasto tamnjenje kože u području zgloba, no može se proširiti na stopalo ili potkoljenicu. Zbog dijapedeze eritrocita u vezivno tkivo korija, te depozita hemoglobina nastaju posljedično žućkasto-smeđkaste pigmentacije te upalno fibrozirajući proces na koži.

Egzemi: eritematozni dermatitis, koji može napredovati do egzematizacije zbog istjecanja tekućine ili zbog superinfekcije. Egzeme obično uzrokuje kronična venska bolest i senzibilizacija na prethodno primijenjenu lokalnu terapiju. Klinički se to očituje crvenilom kože, tzv. hipostazički dermatitis, koji karakteriziraju eritem, edem, madidacija, vezikule, erozije, krustozne naslage i ljuskanje.

Lipodermatoskleroza (LDS) je lokalizirana kronična upala i fibroza (ožiljkavanje) kože i potkožnih tkiva. Ponekad joj prethodi difuzni upalni edem kože, koji može biti bolan. Ne smije se zamijeniti s limfangitisom ili erizipelom odnosno celulitisom zbog sličnih karakterističnih lokalnih i sistemskih značajki. Lipodermatoskleroza je znak ozbiljne KVB.

Bijela atrofija (sinonim: *atrophie blanche*): lokalna, često okrugla bjelkasta i atrofična područja na koži okružena proširenim kapilarnim točkama i ponekad hiperpigmentacijom, a uzrokovana su okluzivnim kapilaritisom i arteriolitisom. Ovdje su isključeni ožiljci zacijeljenih ulceracija.

Venski vrijed: područje diskontinuiteta kože. Venski su vrijedovi ponajčešće smješteni u distalnim dijelovima potkoljenice, a posljedica su kronične venske bolesti – venske hipertenzije. Različite su veličine i oblika, ponekad mogu obuhvaćati i cijelu cirkumferenciju ekstremiteta. Oblikom variraju od okruglih, ovalnih, do serpiginoznih, trakastih i potpuno bizarnih. Rubovi prema okolnoj koži obično su oštri i dobro demarkirani, rjeđe možemo vidjeti elevirane i subminirane rubove. Dno potkoljeničnog vrijeda često je prekriveno žućkastim fibrinskim naslagama nakon čijeg uklanjanja zaostaju crvene granulacije i novoformirane kapilare (sl. 3). Okolna koža je hiperpigmentirana, često nadražena eksudatom, topla i upaljena. Prisutan je edem i lipodermatoskleroza. U pravilu potkoljenični vrijed ne boli. Iznimku, razumije se, čine stanja infekcije, pojava iritativnog i kontaktnog dermatitisa, te ulceracije u području *atrophie blanche* (bolnost zbog ishemije) i iznad tibije (periostalna bol). Perzistiranje vrijeda unatoč njezi, zahtijeva detaljnu mikrobiološku analizu i dokaz biofilma u vrijedu.



Sl. 3. *Ulcus cruris hypostasicum* (venski vrijed)

Biofilm je kompleksna, heterogena i integrirana pojava mikroorganizama, koja se sastoji od jedne ili više vrsta mikroorganizama, obavijenih ekstracelularnim polimeričnim matriksom, koji same proizvode.

Razlog stvaranja biofilma u domaćina je obrana od djelovanja imunskog sustava, efektivna kolonizacija i zauzimanje okoline bogate hranjivim produktima.

Perzistiranje mikroba unutar biofilma podržava kroničnu infekciju. Uloga biofilma je i biodegradacija tkiva, te onemogućavanje djelovanja antibiotika kao ciljanog liječenja infekcije. To je razlog da mnogobrojni termini koji se rabe u skrbi o vrijedu dovode do nepotrebnog ili pogrešnog liječenja.

S obzirom na dokazanu činjenicu da je antimikrobno liječenje kroničnog vrijeda s razvijenim biofilmom neučinkovito, potrebno ga je ukloniti novim hidrofiber oblogama sa srebrom (10-15).

DIJAGNOZA

Dijagnoza kronične venske bolesti postavlja se na temelju anamneze, kliničkog izgleda (lokalizacije, oblika, veličine, duljine, širine, izgleda ruba, stijenke i dna vrijeda), laboratorijske obrade: biokemijska analiza koja otkriva druge sistemske bolesti (tablica 5); mikrobiološka obrada biopata vrijeda dokazuje točan bakterijski uzrok vrijeda (kvantitativna i kvalitativna pretraga); biopsija kože za patohistološku pretragu isključuje maligne i upalne dermatoze; radiološko snimanje (dopler UZV, dupleks sonografija odnosno obojena dvostruka sonografija arterija i vena; oksimetrija, gležnanski indeks – ABPI, flebografija odnosno angiografija) utvrđuju lokalizaciju i vrstu venske insuficijencije (13,14).

Kompjuterizirana tomografija (CT), venografija i magnetska (MR) venografija su suvremene metode prikaza vena, koje zahtijevaju intravensku primjenu kontrasta. MSCT je danas metoda izbora za dijagnostiku plućne embolije, a vensku insuficijenciju se može prikazati u dubokim venama zdjelice i nogu, premda se time pacijenta izlaže velikoj dozi zračenja. Ove se metode rijetko koriste u primarnoj dijagnostici venske patologije.

Tablica 5.

Laboratorijske pretrage prije liječenja venskog vrijeda koje otkrivaju etiologiju vrijeda (13)

<hemoglobin – znak je anemije koja može usporiti cijeljenje
>broj leukocita – znak infekcije
<broj trombocita – otkrivanje trombocitopenije
>SE eritrocita – nespecifični biljeg infekcije i upale
Nalaz C reaktivnog proteina – koristan u dijagnozi upale i monitoringu liječenja infekcije
>ureja i kreatinin - ureja usporava zacjeljenje; renalna funkcija je bitna pri liječenju antibioticima
Sniženi albumin – gubitak proteina usporava cijeljenje
GUK – otkriva dijabetes
Nalaz RH faktora, ANA, lupus antikoagulantni test, antikardiolipinska antitijela → bilježi su za reumatske bolesti, sistemski eritematozni lupus, bolesti vezivnog tkiva
Krioglobulini, kriofibrinogen, protrombinsko vrijeme, antitrombin III, protein C i S, faktor II i V → probir za hiperkoagulabilnost

PREVENCIJA I LIJEČENJE VENSKE BOLESTI

1. Sistemska farmakoterapija se u liječenju venskog vrijeda primjenjuje godinama s ciljem da se farmakološkim putem smanje simptomi i znakovi koji se razvijaju kao posljedica venske hipertenzije. Veliki broj lijekova prirodnog podrijetla kao i onih sintetskih ima dokazana venoaktivna svojstva. Venoaktivni lijekovi su danas važna potpora uspješnosti ostalih terapijskih pristupa poput skleroterapije ili kirurških zahvata. Najvažniji učinak venoaktivnih lijekova je ciljano djelovanje na aktivaciju leukocita i njihovu interakciju sa stanicama endotela do koje dolazi tijekom razvoja upalnih procesa u venama.

Najčešće primjenjivani venoaktivni lijekovi:

- *Mikronizirana pročišćena flavonoidna frakcija (MPFF)*, koja se sastoji od 450 mg diosmina i 50 mg drugih flavonoida (hesperidin, linarin i izorhoifolin), venoaktivni je lijek s najvećim brojem objavljenih istraživanja, koji ima široku primjenu u ublažavanju simptoma kronične venske bolesti. Istraživanja ukazuju na to da je ova mješavina flavonoida učinkovitija od čistog diosmina, kao i da proces mikronizacije flavonoidnih čestica poboljšava crijevenu apsorpciju, a time i učinkovitost lijeka. Posebno zanimljiv je mehanizam djelovanja lijeka na upalne reakcije udružene s venskom hipertenzijom, na inhibiciju aktivacije leukocita, te na njihovu adheziju i migraciju. MPFF modificira interakciju leukocita s endotelom inhibiranjem ekspresije međustaničnih adhezijskih molekula (ICAM-1), vaskularnih adhezijskih molekula (VCAM) i leukocitnih adhezijskih molekula na monocitima i neutrofilima. Ovaj specifični mehanizam djelovanja prevencira oštećenje endotela i ukazuje na uporabu lijeka i u ranim i u kasnim stupnjevima kronične venske bolesti. Za razliku od drugih venoaktivnih lijekova, MPFF ima opisan učinak i na cijeljenje venskog vrijeda (16).

- *Okserutin, rutozidi i drugi venoaktivni lijekovi prirodnog podrijetla poput ekstrakta divljeg kestena (HCSE - horse chestnut seed extract)* vjerojatno imaju mehanizam djelovanja na vensku bol, osjećaj otjecanja nogu i druge simptome venske bolesti slično MPFF-u, ali su značajno manje istraženi u kliničkim uvjetima.
- *Sintetički lijekovi u terapiji kronične venske bolesti* (16-18)

Pentoksifilin je najviše istražen venoaktivni lijek u skupini lijekova sintetičkog podrijetla. Radi se o derivatu ksantina s jakim dokazima o djelovanju na mikrocirkulaciju. Pentoksifilin u kombinaciji s kompresijskom terapijom je učinkovitiji od placeba u liječenju venskog vrijeda. Uporaba pentoksifilina u praksi uglavnom je ograničena zbog visoke učestalosti gastrointestinalnih nuspojava i visoke cijene lijeka.

Drugu skupinu sintetičkih lijekova za kroničnu vensku bolest čine glikozaminoglikani (GAG), uključujući mezoglikan (visokopročišćeni prirodni GAG) i sulfodeksid (polisharidni sulfat) koji su dobro istraženi i u liječenju venskog vrijeda. Oni dokazano djeluju na inhibiciju adhezije leukocita, pojačavaju endogenu fibrinolizu i antitrombotska svojstva krvne plazme.

Važnost ograničene ishemije u genezi venskog vrijeda dovela je do istraživanja potencijalnog korištenja prostanoide, lijekova koji se koriste u uznapredovalim stupnjevima obliterirajuće arterijske bolesti. Najčešće korišteni lijekovi za sada su prostaglandin E1 i stabilni analog prostaciklina.

2. Kompresivna terapija - zlatni standard indiciran u svim stadijima kronične venske bolesti donjih ekstremiteta i limfedema (19). Kompresivnom terapijom izvodi se vanjski pritisak kompresivnim pomagalom na određeni dio tijela s namjerom povećanja venskog ili limfnog protoka te smanjenja edema tkiva. Zahtjevi za kompresijom kod bolesti vena mijenjaju se prema tome je li bolesnik pokretan ili nepokretan. To je zbog toga što je tlak u venskom sustavu puno viši u stanju kada bolesnik stoji (pritisak od 80-100 mm Hg) i jednak je težini stupa krvi iz desne pretkljetke do stopala. Međutim, tijekom hodanja (kod bolesnika s normalnom venskom cirkulacijom), pritisak rapidno pada na oko 10-20 mm Hg. Kada ležimo, pritisak u venskom sustavu je puno niži te je još niži, ako su noge podignute. Kod kompresivne terapije u ležećih bolesnika potrebno je primijeniti niži tlak (10-30 mm Hg), dok je kod uspravnog položaja i pokretnih bolesnika potreban veći vanjski tlak (40-50 mm Hg).

Mehanizam kompresivne terapije je ubrzati venski protok, redistribuirati volumen krvi u centralne dijelove tijela, smanjiti obrnuti tijek krvi u insuficijentnim venama i otok nogu, poboljšati djelovanje mišićne pumpe, ubrzati limfni protok i mikrocirkulaciju, koagulaciju i fibrinolizu.

Apsolutne kontraindikacije za kompresivnu terapiju su periferna arterijska bolest s kritičnom ishemijom, bakterijske upalne bolesti (celulitis, erizipel), dekompenzacija srca, trofičke promjene kože kod dijabetičkog stopala, progresivna sistemska skleroza s atrofijom kože, oštećenje senzibiliteta udova, ležeći, nepomični bolesnici, kontaktna preosjetljivost na komponente kompresijskih materijala, zloćudni tumori i maligni limfedem udova.

Kao i svaka terapija, tako i kompresivna, ima svoju „dozažu“, koja se mjeri u stupnjevima kompresije (mm Hg) i označava kao stupanj kompresije. Različite indikacije traže različiti stupanj kompresije (tablica 6) (20).

Tablica 6.
Indikacije za kompresivnu terapiju ()

Stupanj kompresije (CC)	mm Hg	Indikacije
CC I	20-30 mm Hg	C1-2, trudnoća bez edema potkoljenice
CC II	30-40 mm Hg	C3-6, trudnoća s edemima, poslije skleroterapije ili kirurškog zahvata, DVT, limfedem, posttrombotski sindrom
CC III	40-50 mm Hg	C5, poslije kirurškog zahvata, lipodermatoskleroza, DVT, limfedem, lipoedem, posttrombotski sindrom
CC IV	>50 mm Hg	limfedem, lipoedem

Za liječenje kompresivnom terapijom postoje tri vrste pomagala:

Kratko-elastični zavoji su primjereni u uznapredovalim stadijima bolesti koji se manifestiraju kožnim promjenama i prevenira se duboka venska tromboza kod ležećih bolesnika, te poslije skleroterapije i kirurške terapije varikoziteta. Izmjena zavoja se provodi između 1-7 dana.

Dugo-elastični zavoji izmjenjuju se svakodnevno, a pritisci u mirovanju su visoki kao i radni pritisci, ali nemaju utjecaja na duboke vene, a imaju ulogu u liječenju kronične venske bolesti.

Kompresivne čarape djeluju na površinski venski sustav i segmentno raspoređeni pritisci imitiraju fiziološku raspodjelu venskog tlaka te se preporučuju za terapiju održavanja u svim stadijima kronične venske bolesti (19-22).

3. Fizikalna i rehabilitacijska medicina - djelatnost usmjerena bolesniku koja se temelji na interdisciplinarnoj suradnji i timskom radu. Cilj rehabilitacije je postići što bolju pokretljivost gležnja i poboljšati aktivnost mišićne pumpe koja zbog inaktivitetne atrofije mišića lista može biti oslabljena, te reducirati limfedem i potaknuti dekongestiju.

Čimbenici rizika za razvoj KVB u domeni fizijatra dijele se na promjenjive i nepromjenjive. (tablica 7) (23).

Tablica 7.
Čimbenici rizika za kroničnu vensku bolest (23)

Promjenjivi	Nepromjenjivi
· sjedilači način života/neaktivnost	· spol
· BMI	· dob >50
· trauma	· varikoziteti/obiteljska predispozicija
· pušenje	· multiple trudnoće
· zanimanje/zadržavanje u prisilnom položaju (stajanje, sjedenje)	· duboka venska tromboza
· statički poremećaji stopala	· veća tjelesna visina

U cilju prevencije razvoja i progresije KVB, na promjenjive čimbenike utječemo na sljedeći način:

Medicinska gimnastika i samostalno vježbanje kod kuće

Znanstveno je dokazan pozitivan učinak redovne umjerene tjelesne aktivnosti (3 x tjedno u trajanju od 30 minuta).

Sport i rekreacija

Sportom možemo djelovati pozitivno na neke od varijabilnih čimbenika za KVB (šetnja, nordijsko hodanje, biciklizam, plivanje), dok negativno utječu sportovi koji uključuju: čučnjeve, duže zadržavanje u prisilnom položaju, rolanje, dizanje utega, alpsko skijanje, tenis.

Terapijski postupci

Fizikalna terapija i ostali terapijski postupci primjenjuju se u kombinaciji s kompresijom i drugim oblicima liječenja u osoba s KVB. Terapijski možemo djelovati analgetski, antiedemski, poticati cijeljenje te baktericidno.

Manualna limfna drenaža i masaža

Masaža nema većeg učinka na KVB, osim momentane opće ugođe i relaksacije. Manualna limfna drenaža u kombinaciji s kompresijom (sastavni dio) je učinkovita u stvaranju kolateralne limfne mreže, mobilizira edem, ublažava fibrozu i potiče transport limfnim žilama. Dobar rezultat kod limfedema i postoperativno kod venskih varikoziteta.

Elektrostimulacija

Izmjenična sinusoidna niskofrekventna struja frekvencije valova od 18 do 36 Hz djeluje na način elektromišićne stimulacije – inducira nevoljnu kontrakciju mišića. Nižim frekvencijama postiže se antiedemski učinak. S višim frekvencijama postiže se jače „pumpanje“ mišića (kod inaktivitetne atrofije), koje može biti u kombinaciji s drugim oblicima liječenja (23,24).

LIJEČENJE VENSKOG VRIJEDA

Liječenje kronične venske bolesti u fazi ulceracija je zahtjevno i sastoji se od niza općih mjera te lokalne i/ili sistemske terapije. Opće mjere su usmjerene na korekciju svih pratećih bolesti i stanja koja proces cijeljenja usporavaju: liječenje anemije, hipoproteinemije, dijabetesa, kardijalne dekompenzacije, smanjenje prekomjerne tjelesne mase. Lokalno liječenje sastoji se od

čišćenja vrijeda i odstranjenja različitih naslaga (uklanjanja gnojnih, krustoznih i nekrotičnih naslaga), dezinfekcije vrijeda i poticanja procesa granulacije i epitelizacije, uz sprječavanje sekundarne infekcije. U lokalnoj terapiji venskog vrijeda preporučuje se koncept liječenja TIME:

T - *tissue management* (procjena dna rane i postupak debridmana)

I - *infection* (procjena mikrobiološkog statusa rane, kontaminacija, kolonizacija, kritična kolonizacija ili infekcija)

M - *moisture balance* (količina sekrecije iz rane i vlažnost)

E - *Epithelisation* (napredovanje epitelizacije)

PREDNOST LOKALNOG LIJEČENJA SUVREMENIM SUPORTIVNIM OBLOGAMA

Danas je najučinkovitije i farmakoekonomski opravdano liječenje oblogama. Obloge za vlažno cijeljenje rane klinički su dokazane kao velika prednost u odnosu na klasično previjanje gazom (24-27). Elementi tih prednosti nalaze se u:

Bržem cijeljenju rana – zbog stalne temperature, vlažnog medija koji omogućuje brže migriranje stanica i poticanje djelovanja leukocita koji izlučuju faktore rasta.

Cjelidba rane filogenetski je drevni način tkivnog reagiranja koji se sastoji od složenog slijeda staničnih i biokemijskih događaja usmjerenih na ponovnu uspostavu tkivne cjelovitosti nakon ozljede. Cjelidbena kaskada je usklađen i dinamičan tkivni odgovor na strukturno i funkcijsko oštećenje.

Cijeljenju rane doprinose migracija i proliferacija stanica (granulociti, fibroblasti, stanice monocitne loze, epitelne stanice, endotelne stanice i druge stanice), regulacijske molekule (citokini, kemokini, čimbenici rasta i drugi), izvanstanični matriks te različiti humoralni i neuralni signali.

U kliničkom se tijeku cjelidba rane očituje kao primarno (akutno) zarastanje ili kao sekundarno (odgođeno, kronično) zarastanje. Brojni čimbenici, lokalni i sustavni, modificiraju tijek cijeljenja tkiva. Cijeljenje rane ima nekoliko faza, koje se dijelom preklapaju, a to su hemostaza, upalna (inflamatorna) faza, neovaskularizacija (neoangiogeneza), proliferativna faza i faza remodeliranja.

Prekid integriteta kože dovodi do krvarenja na koje se ubrzo nadovezuje hemostaza koja je rezultat triju odvojenih procesa – kontrakcije krvnih žila, stvaranje

trombocitnog čepa i koagulacije. Ti su hemostatski procesi ključni u očuvanju vaskularnog integriteta i u prevenciji ekscitivnog krvarenja. Za pokretanje tih događanja potrebni su mnogi čimbenici, kao što su faktor XII, faktor IX, von Willebrandov faktor i drugi. Kada dođe do ozljeđivanja krvnih žila oslobađaju se agensi koji potiču adheziju trombocita.

Hemostatička faza - pokreće se adhezijom trombocita na mjestu oštećenog endotela i otpuštanjem adenosin-skog difosfata (ADP) koji pojačava nakupljanje trombocita (agregaciju trombocita). Iz alfa zrnaca oslobađaju se trombocitni čimbenik rasta (PDGF), PF4 i transformirajući faktor rasta beta (TGF- β). PDGF je kemotaktičan za fibroblaste. Pri većim oštećenjima aktivacija humoralnog sustava zgrušavanja stvara fibrin razgradnjom fibrinogena čime se stvara ugrušak. Osim zadržavanja eritrocita fibrinska mreža služi i kao strukturna potpora za upalne stanice.

Utjecaj na upalnu fazu – alfa granule trombocita sadrže faktore rasta, kao što su trombocitni faktori rasta i transformirajući faktor rasta beta, koji difundiraju iz rane u okolno tkivo i stimuliraju ulazak upalnih stanica (neutrofili i makrofagi) u području rane. Makrofagi imaju iznimno važnu ulogu u cijeljenju rane, otpuštaju citokine i faktore rasta u ranu te na taj način stimuliraju fibroblaste, keratinocyte i endotelne stanice da obnavljaju oštećene krvne žile. Debridman dijelova oštećenog ekstracelularnog matriksa (ECM) potreban je da bi se omogućila migracija stanica unutar rane. To je olakšano oslobađanjem proteinaza od strane neutrofila i makrofaga koji razgrađuju oštećeni ECM. Te proteinaze odstranjuju oštećeni ECM i oslobađaju dodatne faktore rasta. Faktori rasta su neka vrsta međustanične signalizacije koja uređuje i usmjeruje cijeli kompleks tijeka stanične diobe, migracije, diferencijacije i produkcije različitih proteina tijekom cijeljenja rane. Taj je proces reguliran inhibitorom metaloproteinaze 1 (TIMP-1), koji sprječava nepotrebno oštećenje zdravog tkiva (3,13,26-30).

Važni faktori rasta u upalnoj fazi su:

- *Epidermalni faktor rasta* (EGF) nastaje u trombocitima i makrofagima i stimulira fibroblaste da izlučuju kolagenazu koja razgrađuje matriks u fazi remodelacije
- *Transformirajući faktor rasta* (TGF) se nalazi u trombocitima, makrofazima, limfocitima i hepatocitima
- *Vaskularno endotelni faktor rasta* (VEGF) stvaraju endotelne stanice i glavni mu je učinak promocija angiogeneze za vrijeme tkivne hipoksije
- *Fibroblastni faktor rasta* (FGF) nalazi se u makrofagima, mastocitima i T –limfocitima. Taj faktor rasta potiče angiogenezu, granulaciju i epitelizaciju

- *Trombocitno derivirajući faktor rasta* (PDGF) sadržavaju trombociti, a također i makrofagi i endotelne stanice. Taj faktor privlači makrofage i fibroblaste na mjestu oštećenja tkiva, a pospješuje i sintezu kolagena
- *Keratinocitni faktor rasta* izlučuju fibroblasti, a stimuliraju migraciju keratinocita i njihovu diferencijaciju i proliferaciju.

Poticanje granulacijske faze – trombociti i makrofagi su kemotaksični i privlače fibroblaste u području rane koji su najvažnije stanice uključene u proces stvaranja novog tkiva. Dio sekretorne aktivnosti makrofaga obuhvaća i oslobađanje fibroblastnog faktora rasta. Tijekom te faze fibroblasti su aktivirani i podvrgnuti proliferativnoj i sintetskoj aktivnosti. Osnovni fibroblastni faktor rasta je kemotaksičan i potiče mitozu fibroblasta. Prisutnost fibrina može stimulirati aktivnost fibroblasta, a diferencijacija fibroblasta je pod utjecajem kolagena, fibronektina ili laminina. Sinteza i razgradnja proteina ECM kritične su faze cijeljenja. Granulacijska faza uključuje stvaranje novih krvnih žila – angiogenezu. Nove krvne žile formiraju se kao kapilare koje se šire iz postojećih malih krvnih žila s rubova rane, te međusobno stvaraju anastomozu i formiraju novu kapilarnu mrežu. Rubovi rane se kontrahiraju i smanjuje se veličina izvornog tkivnog defekta.

Kontrola remodelacijske faze koja predstavlja ravnotežu razgradnje i resinteze kolagena na mjestu rane. Mi-fibroblasti doprinose privlačenju rubova rane. Kada je završen proces granulacije, proces remodelacije smanjuje količinu krvnih žila i broja stanica, te tako smanjuje metaboličku aktivnost što dovodi do manje hiperemije ožiljka.

Ako nije uslijedila normalna epitelizacija, vrijed usporeno cijeli.

Zašto dolazi do poremećaja cijeljenja venskog vrijeda?

- Neutrofili su prisutni tijekom cijelog puta cijeljenja, najvjerovatnije zbog stalnih poticaja: bakterije, leukociti, ishemija.
- Sekret vrijeda sadrži suvišak proinflammatoryh citokina, faktora rasta i matriks metaloproteinaze (MMP), koji usporavaju proliferaciju stanica i angiogenezu.
- Fibroblasti ne uspijevaju stvoriti dovoljnu količinu ekstracelularnog matriksa, jer je razgradnja kolagena veća od njegove sinteze.
- Povišena razina serumskih proteinaza razgrađuje fibronektin, esencijalni protein koji sudjeluje u remodeliranju ekstracelularnog matriksa, kao i faktore rasta.
- Poremećaji izlučivanja citokina i upalnog odgovora u vrijedu.

Smanjenje rizika od infekcije postiže se direktnim otpuštanjem iona srebra u ranu ili stvaranjem nepropusne barijere za bakterije i viruse što omogućuju suvremene hidrofibre obloge sa srebrom i dezinficijansom.

Veća udobnost i isplativost kod dugotrajnog liječenja rane dokazuju moderne suportivne obloge, jer smanjuju bolnost rane, ne lijepe se za ranu, a nisu potrebna svakodnevna previjanja. Od iznimne je važnosti da se pacijent može s njima tuširati i kupati.

Da bi se suportivne obloge pravilno primjenjivale razvili su se specifični klinički protokoli koji moraju sadržavati etiologiju vrijeda, procjenu vrijeda (dubina, veličina, stupanj čistoće, kontaminacija, stanje okolne kože, količina eksudata), prisustvo infekcije te opće stanje pacijenata. Često se u svakodnevnoj praksi za određene stadije vrijeda upotrebljava kodiranje sa sljedećim bojama: crna - nekrotična, žuta - rana s fibrinskim slojem, crvena - granulacija, ružičasta - epitelizacija vrijeda (13,26-28).

Nekroza - prisutnost odumrlog tkiva karakteristične crne boje. Tretman kojim se odstranjuje nekroza je debridman, kao osnovni preduvjet da bi rana zacijelila. Obloge i sredstva koja su indicirana u ovoj fazi, ponajprije imaju funkciju debridmana.

Fibrinske naslage - prisutnost nakupljenih naslaga fibrina i mrtvih stanica. Liječenje takve rane zahtijeva apsorpciju eksudata, fibrinolizu i odstranjivanje odumrlog tkiva. Primjena hidroaktivnog gela, koji potiče atraumatski i autolitički debridman, u kombinaciji s vlažnom oblogom maksimalno će ubrzati demarkiranje odumrlog tkiva i time omogućiti početak zacjeljivanja.

Granulacije - prisutnost vulnerabilnog tkiva crvene boje koje producira serozno sukrvavi eksudat. Skrb rane u stadiju granulacije zahtijeva da se taj proces neometano odvija.

Epitelizacija je ružičasti defekt karakterističan po migraciji i proliferaciji epitelnih stanica. Rana epitelizira procesom migracije stanica, tako da epitelne stanice migriraju uz rub defekta, te procesom proliferacije migriraju prema sredini defekta. Epitelizacija se odigrava tek kada granulacijsko tkivo dosegne rubove rane. Obloge potiču brzu epitelizaciju.

Obloge se dijele na primarne i sekundarne. Primarne su one koje su u neposrednom kontaktu s površinom rane, a sekundarne imaju ulogu držanja primarne obloge na pravom mjestu, a istodobno štite površinu rane od utjecaja vanjske sredine. Danas je sve više obloga koje imaju istodobno ulogu primarne i sekundarne obloge.

Osnovna uloga suportivnih obloga je da osiguraju optimalne fizikalno-kemijske uvjete za cijeljenje rane, a danas njihova uloga postaje sve zahtjevnija i aktivnija u smislu sprječavanja razvoja infekcije, kontrole eksudata, smanjenog broja debridmana i smanjenja bolnosti atraumatskim povojem (3,28-31).

Podjela suportivnih obloga prema načinu djelovanja na cijeljenje rane prikazana je u tablici 8 (30).

Tablica 8.
Način djelovanja i vrste suportivnih obloga

Način djelovanja	Vrsta obloge
Aktivacija autolitičkih procesa u rani	gelovi, obloge s dodacima (Ringerova otopina, fiziološke otopine), alginati
Granulacija, stvaranje „vlažne sredine“ i upijanje suvišnog sekreta	hidrokoloide (posebna skupina su hidrofibre), pjene, hidrokapilarne i silikonske obloge
Reepitelizacija	membrane, akrilati, terapijske obloge (resorptivne, neresorptivne), obloge s kolagenima, hidrobalansirane celulozne obloge, filmovi, mrežice
Protuupalno djelovanje	obloge s dodatkom srebra, ugljena, joda, polihexanida i medicinskog meda

SUVREMENE SUPORTIVNE OBLOGE ZA LIJEČENJE VENSKOG VRIJEDA

Hidrokoloide. Okluzivne, samoljepive obloge koje u strukturi imaju kombinaciju karboksimetilceluloze, želatine i pektina, a prekrivene su poliuretanskim filmom. Primjenjuju se za rane sa srednjom i slabijom sekrecijom. U kontaktu sa sekretom rane nastaje gel koji stvara optimalne uvjete za cijeljenje i potiče autolitički debridman i stvara vlažan medij. Ono što je važno napomenuti u praktičnoj primjeni je pravilna prosudba o stanju okolnog tkiva i količini eksudacije. Naime, ako je okolina defekta izrazito neishranjena, hidrokolid će povećati ranu, jer on radi autolitički debridman i razmekšava sve što nije dovoljno ishranjeno. Optimalan ritam izmjene obloga je dva do tri puta tjedno.

Indikacije su granulirajuće i epitelizirajuće rane sa srednjom i slabijom eksudacijom. Hidrokoloide su izrazito pogodni za autolitički debridman i zadržavaju eksudat rane na nekrotičnom tkivu (suhoj nekrozi ili fibrinskim naslagama).

Način primjene: Rana se ispere fiziološkom otopinom, okolina rane se posuši da bi se hidrokolid mogao zalijepiti. Obloga se mora promijeniti kada gel procuri s ruba (time je put bakterijama otvoren i moguća je infekcija), te mora biti 2 cm veća od ruba rane.

Hidrogel. Hidrogel se sastoji od netopivog polimera koji je hidrofilan i ima sposobnost apsorpcije velike količine tekućine. Osnovna funkcija je osigurati apsorpciju i debridman nekrotičnog ili fibrinskog tkiva ispod neke od aktivnih obloga.

Indikacije: Idealan za rane koje imaju minimalan eksudat ili ga uopće nemaju. Osigurava vlažne uvjete za cijeljenje. Povećavajući vlažnost ispod obloge, čisti i odstranjuje nekrotično tkivo.

Primjena: Aplikira se izravno na ranu i pokriva odgovarajućom oblogom. Ispire se s rane fiziološkom otopinom. Na vrlo suhim nekrozama izmjena obloga mora biti jedanput/dan. Vrlo je učinkovit za atrumatski i autolitički debridman rane.

Alginati. Prema kemijskoj strukturi sol je manuronične i glukuronske kiseline (kalcij-natrij). Izgleda kao mekano bijelo tkano vlakno koje se izrađuje od algi. Neki se alginati brže geliraju, ali stoga kraće stoje na rani, tj. potrebno ih je češće mijenjati. Njihova karakteristika je hemostatičnost i otpuštanje kalcija izravno u ranu, tako da su izvrstan odabir nakon nekroktomija ili pri akutnim krvarećim ranama.

Indikacije Rane sa srednjom i jakom eksudacijom (rane koje se gazom previjaju dva ili više puta/dan). Alginatne obloge neučinkovite su na suhim ranama, a izbor su i kod manjih krvarenja, jer njihov sastav aktivno sudjeluje u hemostazi otpuštajući kalcijeve ione u eksudat rane.

Primjena: Nakon ispiranja rane fiziološkom otopinom, obloga se aplicira na ranu na način da bude još barem pola centimetra veća od rane. Preko alginata aplicira se gaza ili još bolje neka od sekundarnih obloga.

Transparentni filmovi. Transparentni film je adhezivni semipermeabilni, prozirni ovoj. Voodootporan je, ali istodobno propustan za zrak. Izrađen je od poliuretana sa slojem adhezivnog akrilata. Temeljna mu je svrha prevencija infekcije, te kao sekundarna obloga potpomaže vlažnom mediju koji ubrzava celularnu migraciju u cijeljenju rane. Ne koriste se za rane koje imaju jaču sekreciju.

Hidrofiber obloga. Za rane sa izrazito jakom sekrecijom danas na tržištu dostupne su obloge od hidrofiber vlakna koje su po sastavu karboksimetil celuloza. Osim što imaju veliku mogućnost upijanja, čime izravno smanjuju broj previjanja, kontroliraju i mikrobiološku floru tako što pri apsorpciji eksudata bakterije ostaju zarobljene u hidrofiber vlaknu i tako se imobiliziraju. Pravilnom primjenom štite kožu od maceracije i smanjuju mogućnost kontaminacije pri izmjeni obloge. Hidrofiber vlakna pri geliranju stvara-

ju kohezivni gel čime zadržavaju vlažnost na dnu rane i onemogućuje njegovo isušivanje, ne lijepe se za dno rane i djelomično uklanjaju fibrinska vlakna.

Primjena: Ako rana ima defekt kože, nužno je da je obloga pola centimetra veća od ruba defekta, jer će se malo skupiti pri apsorpciji. Pokriva se gazom ili nekom od samoljepljivih obloga. Obloga se mijenja kada sekret probije sekundarnu oblogu, tj. kada se obloga u potpunosti izgledira.

Hidrofiber obloga sa srebrnim ionima. Primarna obloga namijenjena primjeni kod srednje do jako eksudirajućih akutnih i kroničnih rana u kojima je već prisutna infekcija ili postoji velika mogućnost za razvoj infekcije rane. Primjenom srebra u različitim oblicima, ionskim u određenoj koncentraciji ili izravno u strukturu vlakana koje se aplicira na ranu, omogućen je aktivniji pristup liječenju akutnih i kroničnih rana.

Indikacije: Ako rana ima izražene znakove infekcije, potrebno je izolirati etiološki uzročnik i ordinirati sistemski antibiotik. Uz sistemsku terapiju, lokalno su indicirane obloge sa srebrom. Kod kroničnih rana koje su sklone visokom riziku infekcije, kao što su dijabetičko stopalo i opekline, kao prvi izbor u terapiji trebaju biti obloge sa srebrom. Druge indikacije, bilo kronične, bilo akutne etiologije, zahtijevaju primjenu obloge sa srebrom uz individualnu primjenu.

Alginatna obloga s medicinskim medom. Med posjeduje dva osnovna svojstva kojima ostvaruje antibakterijsku aktivnost. Važan je izvor fenolnih spojeva koji pridonose antimikrobnoj i antioksidativnoj djelovanju. Prvo svojstvo temeljeno je na njegovim fizičko-kemijskim osobinama (osmolarnost, viskoznost, pH-vrijednost – aciditet). Drugo svojstvo meda zasnovano je na kemijskim strukturama koje se zajedničkim imenom zovu inhibini. Glavni sastojak meda koji mu osigurava antibakterijsku aktivnost je vodikov peroksid, koji ima dokazano antibakterijsko djelovanje na najčešće sojeve gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija u ranama, uključujući meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pyogenes*.

Kolageni. Kolagen je prirodan biomaterijal poznat još iz egipatske civilizacije. To je najobilniji protein u ljudskom tijelu. Kolagen je vrlo važan u procesu cijeljenja rane. Izvrstan je kemostatik.

Hidropolimeri - „pjene“. Hidrofilne poliuretanske pjene pripadaju velikoj obitelji suportivnih obloga za liječenje rana. Glavna im je karakteristika sposobnost apsorpcije. Prema indikacijama se preklapaju s hidrokolidima, jedino što nisu u rutinskoj primjeni za dijabetička stopala (prema broju kliničkih studija), ne potiču granulaciju i epitelizaciju kao hidrokolidi.

Bio-okluzivne obloge s dodatkom dezificijensa i srebra s djelovanjem na biofilm. Novosti su u liječenju kroničnih rana bio-okluzivnim oblogama. Posljednjih nekoliko godina raste broj kliničkih istraživanja u kojima se sve češće navodi pojava i prisustvo biofilma u ranama koje dugotrajno ne zacijeljuju. Prisustvo biofilma, koje se može klinički prepoznati prema određenom postupniku, potiče kroničnu upalnu reakciju u rani i prolongira cijeljenje vrijeda.

Kako antibiotici ne djeluju na biofilm, mora ga se mehanički ukloniti. Posljednja generacija bio-okluzivnih obloga ima uz srebro i dodatke (stabilizator i dezificijens) koji djeluju na razaranje biofilma. Na taj način omogućuju baktericidno djelovanje iona srebra, a najvažniji element je to što prevenira ponovno stvaranje biofilma na rani (2,3-7). Ove hidrofiber obloge sa srebrom i dezificijensom omogućuju ciljano liječenje kroničnog vrijeda i odstranjivanje biofilma koje svojstvo nemaju druge obloge. Omogućuju uspješno zacjeljivanje i prevenciju u kroničnom vrijedu (13,14,25-31).

Preporuke za primjenu pojedinih obloga prikazane su u tablici 9.

Tablica 9.

Temeljna načela kod izbora suvremene obloge za rane s obzirom na dno rane prema Falangi

Dno rane (D)(boja i iscjedak)	Prikladne moderne obloge
D1 nekroza s malo/bez iscjetka	hidrogeli sa sekundarnom oblogom
D2 nekroza s umjerenim iscjetkom	hidrogeli sa sekundarnom oblogom, alginati
Fibrinske naslage (C) (boja i iscjedak) C1 fibrinske obloge s malo iscjetka	hidrogeli sa sekundarnom oblogom, obloge s dodatkom fiziološke otopine, obloge s dodatkom Ringerove otopine
C2 fibrinske obloge s umjerenim iscjetkom	alginati, obloge s dodatkom fiziološke otopine, obloge s dodatkom Ringerove otopine
C3 fibrinske obloge s obilnim iscjetkom	alginati
Granulacijsko tkivo (B) (boja i iscjedak) (B2) granulacijsko tkivo i malo fibrina s umjerenim iscjetkom	poliuretanske, silikonske pjene, hidrokoloidi, hidrofibre, hidrokapilarne obloge
B3 granulacijsko tkivo i malo fibrina s obilnim iscjetkom	poliuretanske, silikonske pjene, hidrofibre, hidrokapilarne obloge
Granulacijsko tkivo u fazi epitelizacije (A) A1 granulacijsko tkivo s malo iscjetka/ bez iscjetka	poliuretanske membrane, stanjene poliuretanske i silikonske pjene, trakasti hidrokoloidi, akrilne obloge, poliuretanski filmovi
A2 granulacijsko tkivo s umjerenim iscjetkom	trakaste poliuretanske i silikonske pjene, trakasti hidrokoloidi

A3 granulacijsko tkivo s obilnim iscjetkom	poliuretanske i silikonske pjene, hidrokoloidi i hidrofibre, hidrokapilarne obloge
Bakterijska upala	obloge s dodatkom srebra, ugljena, meda, joda, antiseptika
Rane koje polako cijele zbog drugih uzroka	resorptivne i neresorptivne terapijske obloge, obloge s kolagenom

ZAKLJUČAK

Kronični vrijed je kompleksna rana i posljedica je razvoja patofiziološkog procesa, otežanog ili onemogućenog cijeljenja. Učestalost odnosno incidencija i prevalencija kroničnog vrijeda uglavnom je nepoznata. Vaskularna insuficijencija, infekcija i biofilm u vrijedu predisponirajući su čimbenici za njegov razvoj.

Biofilm je kompleksna, heterogena i integrirana pojava mikroorganizama, koja se sastoji od jedne ili više vrsta mikroorganizama, obavijenih ekstracelularnim polimeričnim matriksom, koji same proizvode. Razlog stvaranja biofilma u domaćina je obrana od djelovanja imunskog sustava, efektivna kolonizacija i zauzimanje okoline bogate hranjivim produktima. Perzistiranje mikroba unutar biofilma podržava kroničnu infekciju. Uloga biofilma je i biodegradacija tkiva, te onemogućavanje djelovanja antibiotika - kao ciljanog liječenja infekcije. To je razlog da mnogobrojni termini koji se rabe u skrbi o vrijedu dovode do nepotrebnog ili pogrešnog liječenja. S obzirom na dokazanu činjenicu da je antimikrobno liječenje kroničnog vrijeda s razvijenim biofilmom neučinkovito, potrebno ga je ukloniti novim hidrofiber oblogama sa srebrom.

Novija saznanja o biofilmu, standardizirani postupci i praktične preporuke uz primjere iz kliničke prakse o venskom vrijedu, pridonose uspješnom zbrinjavanju i prevenciji komplikacija u vrijedu, značajno poboljšavajući kvalitetu života bolesnika. Stoga će daljnje kliničke studije u istraživanju biofilma u vrijedu dokazati uspješnost liječenja hidrofiber oblogama sa srebrom i dezinficijensima.

L I T E R A T U R A

1. Bradbury A, Evans C, Allan P i sur. What are the symptoms of varicose veins? Edinburgh vein study cross sectional population survey. *BMJ* 1999; 318: 353-6.
2. Cornwall JV, Dore CJ, Lewis JD. Leg ulcers: epidemiology and aetiology. *Br J Surg* 1986; 73: 693-6.
3. Ramelet AA, Kern P, Perrin M, eds. Les varices et teleangiectasies (in French). Paris, France: Masson, 2003.
4. Labropoulos N. Hemodynamic changes according to the CEAP classification. *Phlebology* 2003; 40: 125-36.
5. Schultz- Ehrenburg U, Reich S, Robak-Pavelczyk B i sur. Abstract presented at the 16 th Annual Meeting of American Venous Forum, February 26-29, 2004; Orlando, Fla.
6. Lin P, Phillips T. Ulcers. U: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, Horn TD, Mascaro AJ, Salasche SJ, Saurat JH, Stingl G. *Dermatology*. Edinburgh: Mosby, 2003, 1631-49.
7. Porter JM, Moneta GL. International Consensus Committee on chronic venous disease. Reporting standards in venous disease: an update. *J Vasc Surg* 1995; 21: 635-45.
8. Coleridge-Smith PD, Thomas P, Scurr JH, Domandy JA. Causes of venous ulceration: a new hypothesis. *BMJ* 1988; 296: 1693-5.
9. Ono T, Bergan JJ, Schmid- Schonbein GN, Takase S. Monocyte infiltration into venous valves. *J Vasc Surg* 1998; 27: 158-66.
10. Mortimer PS, Bumard KG. Diseases of the veins and arteries: leg ulcers. U: Bums T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. *Rook's textbook of Dermatology*. Turin: Blackwell Science Ltd, 2004, 50.1-54.
11. GeIlfand JM, Margolis DJ. Decubitus (pressure) ulcers and venous ulcers. U: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 6. izdanje, New York (NY): McGraw - Hill; 2003, 1256-65.
12. Braun-Falco O, Plewig G, Wolf HH, Burgdorf WHC. Diseases of the blood vessels. U: Braun-Falco O, Plewig G, Wolf HH, Burgdorf WHC. *Dermatology*. 2. potpuno izmijenjeno izdanje, Berlin: Springer Verlag, 2000, 882-946.
13. Marinović Kulišić S. Vaskularne bolesti kože. U: Bašta-Juzbašić A i sur. *Dermatovenerologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2014, 383-97.
14. Eklof B, Perrin M, Delis KT, Rutherford RB, Gloviczki P. Updated terminology of chronic venous disorders: the VEIN-Term transatlantic interdisciplinary consensus document. *J Vasc Surg* 2009; 49: 498-501.
15. Kučićec-Tepeš N. Značajke infekcije kronične rane. *Acta Med Croatica* 2011; 65(Supl 2): 87-94.
16. Paysant J, Sansilvestri-Morel P, Bouskela E, Verbeuren T. J. Different flavonoids present in the micronized purified flavonoid fraction (Daflon 500 mg) contribute to its anti-hyperpermeability effect in the hamster cheek pouch microcirculation. *Int Angiol* 2008; 27: 81-8.
17. Smith PD. Micronized purified flavonoid fraction and the treatment of chronic venous insufficiency: microcirculatory mechanisms. *Microcirculation* 2000; 7: 35-40.
18. Lyseng-Williamson KA, Perry CM. Micronised purified flavonoid fraction: a review of its use in chronic venous insufficiency, venous ulcers and haemorrhoids. *Drugs* 2003; 63: 71-100.
19. Nicolaides AN. Investigation of Chronic Venous Insufficiency. A Consensus Statement. *Circulation* 2000; 102: e126-e163.
20. Partch H i sur. Classification of compression bandages: practical aspect. ICC meeting, Rostock, Oct.4, 2006.
21. Kecelj Leskovic N. Pressure and stiffness with elastic and inelastic compression materials. *EWMA J* 2006; 6: 35-6.
22. Goldman R, Popescu A, Thomas Hess C, Salcido R, Prevention and Management of Chronic Wounds. U: Braddom R, Ed. *Physical medicine & Rehabilitation*. Philadelphia, USA: Saunders Elsevier Philadelphia, 2007, 685-708.
23. Jajić I, Jajić Z. i sur. *Fizikalna i rehabilitacijska medicina*. Zagreb: Medicinska naklada, 2008.
24. Roaldsen KS, Biguet G, Elfving B. Physical activity in patients with venous leg ulcer – between engagement and avoidance. A patient perspective. *Clin Rehabil* 2011; 25: 275-86.
25. Trent JT, Falabella A, Eaglstein WH, Kirsner RS. Venous ulcers: pathophysiology and treatment options. *Ostomy Wound Manage* 2005; 51: 38-54.
26. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-22.
27. Hill KE, Davies CE, Wilson MJ, Stephens P, Harding KG, Thomas DW. Molecular analysis of the microflora in chronic venous leg ulceration. *J Med Microbiol* 2003; 52: 365-9.
28. Mertz PM, Eaglstein WH. The effect of a semioclusive dressing on the microbial population in superficial wounds. *Arch Surg* 1984; 119: 287-9.
29. Schultz GS, Barillo DJ, Mozingo DW, Chin GA. Wound bed preparation and a brief history of TIME. *Int Wound J* 2004; 1: 19-32.
30. Gray M. Is larval [maggot] debridement effective for removal of necrotic tissue from chronic wounds? *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2008; 35: 378-84.
31. Percival SL, Bowler P, Woods EJ. Assessing the effect of an antimicrobial wound dressing on biofilms. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 52-7.

SUMMARY

CHRONIC WOUND – A NEW ETIOPATHOGENETIC STATE AND MODERN THERAPEUTIC APPROACH

S. MARINOVIĆ KULIŠIĆ

University of Zagreb, School of Medicine, Department of Dermatovenereology, Zagreb, Croatia

Lower leg ulcer is the most common form of ulceration of lower extremities. The prevalence of leg ulcer varies among studies from 0.1% to 0.6%. During the last decade, new concepts on the inflammatory phase in chronic ulcer have been discovered, such as the importance of metalloproteinases, growth factor, irregular muscular function, vascular insufficiency and presence of biofilm in the ulcer that prevents healing. There are several hypotheses to explain the pathophysiological steps, referring to popliteal venous hypertension. Currently, the treatment of leg ulcer relies on due knowledge of ulcer pathophysiology and making an accurate diagnosis. Today, modern supportive dressings improve the patient's quality of life; however, their targeted application according to the protocol and indications is required. A new method of efficient wound biofilm exclusion today is the application of hydrofiber dressings containing a combination of silver ions and two disinfectants because they influence the exclusion and prevention of new biofilm formation in the ulcer.

Key words: chronic ulcer, infection, biofilm, antimicrobial dressings

KIRURŠKA ISKUSTVA U LIJEČENJU KOMPLIKACIJA VRIJEDA

RADO ŽIC, BOŽO GORJANC, ZDENKO STANEC, SREČKO BUDI, RUDOLF MILANOVIĆ,
ZLATKO VLAJČIĆ, FRANJO RUDMAN, KREŠIMIR MARTIĆ, ŽELJKA ROJE i REBEKA HELD

Klinička bolnica Dubrava, Klinika za plastičnu, rekonstrukcijsku i estetsku kirurgiju, Zagreb, Hrvatska

Potkoljениčni vrijed je učestala bolest u općoj populaciji koja ima za posljedicu znatan morbiditet. Poseban problem je široka diferencijalna dijagnoza što se etiologije tiče tako da uzrok može biti metabolički, imunološki, vaskularni, onkološki ili miješani. Pristup liječenju je multidisciplinarni. Uz niz uključenih medicinskih struka kirurgija je bitan faktor u liječenju komplikacija vrijeda, postoji niz učinkovitih zahvata koji uz pravu indikaciju imaju za ishod cijeljenje. Uz plastično rekonstrukcijske metode postoji i niz komplementarnih metoda uglavnom iz domene vaskularne kirurgije kojima se optimizira lokalno i regionalno stanje te poboljšava rezultat liječenja.

Ključne riječi: potkoljениčni ulkus, kirurške metode liječenja, rekonstrukcijske metode

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. Rado Žic, dr. med.
Klinička bolnica Dubrava
Klinika za plastičnu, estetsku
i rekonstrukcijsku kirurgiju
Avenija Gojka Šuška
10 000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: rzic@kdb.hr

UVOD

Potkoljениčni vrijed ili ulkus je bolest koja ima multifaktorsku genezu, te ju karakterizira znatan morbiditet (1). Ovisno o njoj etiologiji postoje različite metode liječenja te bolesti, od raznih konzervativnih metoda pa do kirurških zahvata (2). Postoji niz komplikacija potkoljениčnog vrijeda koje otežavaju dostizanje željenog cilja - cijeljenje. U svakoj kroničnoj rani što je i sam vrijed postoji niz faktora koji otežavaju cijeljenje (3). Jedan faktor je sam bolesnik odnosno biometaboličko stanje njegovog organizma, te kao posebno bitan čimbenik neurovaskularni status ekstremiteta. Bez utjecaja na poboljšanje općeg stanja (regulacija glikemije, korekcija nutritivnih deficita), te regionalno stanje (povećanje protoka krvi u ekstremitetu) nije zadovoljeno postojanje osnovnih uvjeta za cijeljenje.

Drugi faktor su lokalni čimbenici koji otežavaju cijeljenje. Naime u svakoj kroničnoj rani nalazi se jedan biološki teret u obliku devitaliziranog tkiva, upalnih stanica, eksudata i mikroorganizama od kojih su najčešći bakterije (4). Jedan od problema povezanih s vrijedom je i stvaranje biofilma, odnosno površinskog sloja koji se sastoji od bakterija i ekstracelularne polimerične tvari u kojoj se one nalaze i koja ih štiti od štetnih utjecaja okoline. Kao takav, biofilm izolira bak-

terije od utjecaja antimikrobnih lijekova, te od samog imunološkog sustava.

Treći i ne najmanje bitan faktor je, razumije se, sama etiologija vrijeda, jer u vrlo širokoj diferencijalnoj dijagnozi uzrok je glavni čimbenik koji određuje prognozu (5) pa bez postavljanja ispravne dijagnoze nismo u mogućnosti kreirati ispravan i učinkovit plan liječenja.

Kirurško liječenje ima bitnu ulogu u sprječavanju i rješavanju komplikacija do kojih može doći. Postoji niz kirurških metoda, od onih najjednostavnijih poput nekrektomije, pa do onih najkompleksnijih poput slobodnog prijenosa tkiva da bi se riješile komplikacije vrijeda (6).

KIRURŠKE METODE LIJEČENJA KOMPLIKACIJA VRIJEDA

Nekrektomija

Jedna od najučinkovitijih i najjednostavnijih metoda je nekrektomija odnosno debridman samog vrijeda. Kirurška nekrektomija se najčešće radi pomoću skal-

pela, iako se često koriste i specifični instrumenti poput raznih kireta i uključuje mehaničko odstranjenje devitaliziranog tkiva uz bakterije, eksudat i biofilm dok se ne dođe do zdravog tkiva (7). Uz tradicionalni mehanički debridman postoje i drugi načini mehaničkog čišćenja poput korištenja hidroenergije, biološke terapije (crvi), tvari koje enzimski rastvaraju biološki teret na rani (8). To su sve vrijedne metode koje se mogu koristiti u kombinacijama ili zasebno.

Terapija negativnim tlakom

Kao novija metoda u komparaciji s ostalima, terapija negativnim tlakom se pokazala vrijednim dodatkom nekrektoziji, te jednostavnijim rekonstrukcijskim metodama poput rekonstrukcije slobodnim kožnim transplantatom (9). Naime, takozvano kondicioniranje kronične rane, odnosno prelaženjem kronične rane u akutnu ne bi li se postigli povoljniji odnosno čisti uvjeti za rekonstrukciju, vrlo se učinkovito postiže korištenjem negativnog tlaka uz dakako dobar debridman. Dodatna neprocjenjiva uloga negativnog tlaka je u fiksaciji transplantata da se minimizira gubitak presatka zbog nakupljanja eksudata ili krvi, te smicanja.

Rekonstrukcijski kirurški zahvati

U slučajevima kada je cijeljenje vrijeda otežano ili traje predugo usprkos svim poduzetim mjerama u obzir dolazi ekscizija vrijeda do u zdravo tkivo, te rekonstrukcija defekta. Kada se razmatra rekonstrukcija defekta uzima se u obzir plastično kirurška doktrina da se prvo koriste najjednostavnije metode, te da se slično rekonstruira sličnim.

Prva i najčešće korištena metoda je rekonstrukcija defekta transplantatom djelomične debljine kože po Thierschu. Kod tog zahvata nakon ekscizije ili nekrektozije vrijeda defekt se pokriva kožnim transplantatom djelomične ili pune debljine kože najčešće uzetim sa suprotne natkoljenice (10). Nakon što se transplantat fiksira za podlogu trebaju 2-3 dana da krvožilni pupoljci iz podloge urastu u presadak i na taj način ga inkorporiraju. Za taj proces potreban je stalan kontakt transplantata i podloge, tako da bilo koji faktor koji u ranoj fazi odvoji presadak od podloge poput hematoma ili smicanja uzrokuje gubitak presatka.

Kompleksnija i rjeđe korištena metoda rekonstrukcije su lokalni ili regionalni režnjevi. Ta metoda uključuje odvajanje tkiva koje je u blizini vrijeda da bi se vrijed rekonstruirao. Tkivo se samo djelomično odvaja od podloge tako da je vaskularizirano mostom tkiva (koža, potkožno tkivo, fascija, mišić ili bilo koja kombinacija), te se koristi da se pokrije defekt (11). Konfiguracije režnjeva su mnogobrojne i uključuju pokrete klizanje, transpoziciju i rotaciju tkiva. Često nakon ta-

kvih zahvata nastaje sekundarni defekt koji se rekonstruira transplantatom djelomične debljine kože po Thierschu. Poseban tip režnjeva su i peteljasti režnjevi koji su potpuno odvojeni te vaskularizirani samo krvožilnom peteljkom te se njima može lakše manipulirati. Primjer takvih zahvata su i takozvani propeler režnjevi (12).

Na samom vrhu ljestvice su metode kojima se tkivo potpuno odvaja od podloge te prenosi na mjesto defekta. Ta metoda zahtijeva ponovnu uspostavu krvotoka metodama mikrovaskularne kirurgije, odnosno zahtijeva formiranje mikroanastomoze. Najčešće korišteni slobodni režnjevi su podlaktični režanj, režanj m. latisimusa dorzi, te režanj prednje lateralne strane natkoljenice (13). Slobodni režnjevi se vrlo rijetko koriste u liječenju vrijeda i samo kada se iscrpe sve ostale mogućnosti.

Zadnja metoda koja se često i ne smatra rekonstrukcijskom, te na neki način označava neuspjeh liječenja, je amputacija. Amputacija je funkcionalni oblik liječenja i rezervirana je najčešće za opsežne cirkularne ulkuse refraktorne na terapiju (14). Amputacija je zahvat kojim se rješavaju komplikacije vrijedova koje se nije moglo riješiti drugim metodama i priprema bolesnika za buduće protetsko zbrinjavanje u cilju postizanja bolje funkcije nego je ona za vrijeme trajanja bolesti. Kod nekih ulkusa kod kojih je etiologija onkološka, amputacija može biti prvi i najbolji izbor (15).

Pomoćni kirurški zahvati

Etiološki u pozadini nastanka vrijeda i njegovog ne-cijeljenja često postoji vaskularni problem, bilo da je riječ o venskoj ili arterijskoj insuficijenciji. Ako postoji vaskularna insuficijencija bilo kojeg oblika, potrebno ju je korigirati inače neće doći do cijeljenja. Kirurški zahvati uključuju podvezivanje safenofemoralnog ušća uz ekstirpaciju perifernih proširenih vena, te moguće podvezivanje insuficijentnih perforatora. U slučaju arterijske insuficijencije dolazi u obzir endovaskularno liječenje postavljanjem stentova na mjesta suženja arterije ili otvorene kirurške metode čiji spektar ide od jednostavnijih kao endarterektomije do kompliciranijih poput raznih premoštenja (16).

ZAKLJUČAK

Kirurški zahvati su vrijedna i učinkovita metoda kojom se mogu na zadovoljavajući način zbrinuti komplikacije vrijeda. U samom pristupu bolesniku uvijek se prvo koriste jednostavnije metode koje će dati najbolji rezultat. Kompliciranije metode su rezervirane za manji postotak pacijenata s nizom komplikacija. Jedan

bitan čimbenik liječenja vrijeda je pravilno postavljanje dijagnoze jer je diferencijalna dijagnoza široka i etiologija određuje i ispravan pristup i prognozu. Uz pravilno postavljanje dijagnoze, multidisciplinarni pristup u kojemu kirurgija ima važnu ulogu, vrijed je bolest koja je izlječiva u visokom postotku.

LITERATURA

1. Šitum M, Kolić M, Redzepi G, Antolić S. Chronic wounds as a public health problem. *Acta Med Croatica* 2014; 68 Suppl 1: 5-7.
2. Van Gent WB, Catarinella FS, Lam YL i sur. Conservative versus surgical treatment of venous leg ulcers: 10-year follow up of a randomized, multicenter trial. *Phlebology* 2015; 30(1 Suppl): 35-41.
3. Hunter M. Assessing the effect of chronic oedema with associated ulceration. *Br J Community Nurs* 2015; Suppl Chronic:S8, S10-3.
4. Jockenhöfer F, Chapot V, Stoffels-Weindorf M i sur. Bacterial spectrum colonizing chronic leg ulcers: a 10-year comparison from a German wound care center. *J Dtsch Dermatol Ges* 2014;12: 1121-7.
5. Läuchli S, Bayard I, Hafner J, Hunziker T, Mayer D, French L. Healing times and the need for hospitalization for leg ulcers of different etiologies. *Hautarzt* 2013; 64: 917-22.
6. Dogra S, Rai R. Venous leg ulcer: Topical treatment, dressings and surgical debridement. *Indian Dermatol Online J* 2014; 5: 371-3.
7. Widener JM. Venous leg ulcers: Summary of new clinical practice guidelines published August 2014 in the *Journal of Vascular Surgery. J Vasc Nurs* 2015; 33: 60-7.
8. Wilasrusmee C, Marjareonrungrung M, Eamkong S, Attia J, Poprom N, Jirasisrithum S, Thakkestian Maggot therapy for chronic ulcer: a retrospective cohort and a meta-analysis. *Asian J Surg* 2014; 37: 138-47.
9. Dumville JC, Land L, Evans D, Peinemann F. Negative pressure wound therapy for treating leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 14: 7. CD011354.
10. Audrain H, Bray A, De Berker D Full-thickness skin grafts for lower leg defects: an effective repair option. *Dermatol Surg* 2015; 41: 493-8.
11. Dhamangaonkar AC, Patankar HS. Reverse sural fasciocutaneous flap with a cutaneous pedicle to cover distal lower limb soft tissue defects: experience of 109 clinical cases. *J Orthop Traumatol* 2014; 15: 225-9.
12. Li T, Chen Z, Cong X i sur. Clinical application of perforator propeller flaps with anastomosis of superficial veins. *Article in Chinese*. 2015; 31: 107-10.
13. Kallio M, Vikatmaa P, Kantonen I, Lepäntalo M, Venermo M, Tukiainen E. Strategies for free flap transfer and revascularisation with long-term outcome in the treatment of large diabetic foot lesions. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2015; 50: 223-30.
14. Miteva M, Lanuti E, Romanelli P Commentary on frequency of malignant neoplasms in 257 chronic leg ulcers. *Dermatol Surg* 2013; 39: 855-6.
15. Sirbi AG, Florea M, Pătrașcu V i sur. Squamous cell carcinoma developed on chronic venous leg ulcer. *Rom J Morphol Embryol* 2015; 56: 309-13.
16. Shumkov OA, Liubarskiĭ MS, Altukhov IA, Soluianov MIu, Smagin MA. The role of vascular surgery in the multidisciplinary approach to the diabetic foot syndrome. *Khirurgiia (Mosk)* 2013; 11: 9-15.

SUMMARY

SURGICAL EXPERIENCES IN THE TREATMENT OF ULCER COMPLICATIONS

R. ŽIC, B. GORJANC, Z. STANEC, S. BUDI, R. MILANOVIĆ, Z. VLAJČIĆ, F. RUDMAN,
K. MARTIĆ, Ž. ROJE and R. HELD

Dubrava University Hospital, Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Zagreb, Croatia

Lower leg ulcers have a high incidence in general population and are associated with a significant morbidity rate. Wide differential diagnosis considering their etiology poses considerable problem, as the causes are diverse including metabolic, immune, oncologic, vascular and mixed ones. Approach to treatment should be multidisciplinary, and among various medical specialties surgery plays an important role. There are numerous efficient procedures that require proper indication to be successful. Along with reconstructive methods, there are complementary methods, mainly from the field of vascular surgery; when combined, they produce good results.

Key words: lower leg ulcer, surgical treatment methods, reconstructive surgery

ANTIMIKROBNE OBLOGE ZA INFICIRANI VRIJED I KLINIČKE SPOZNAJE O BIOFILMU

SANDRA MARINOVIĆ KULIŠIĆ, JASNA LIPOZENČIĆ¹ i SUZANA TUNUKOVIĆ²

Klinički bolnički centar Zagreb, Klinika za dermatologiju i venerologiju,

¹Akademija medicinskih znanosti Hrvatske i ²Stoma Medical d.o.o., Zagreb, Hrvatska

Današnje spoznaje i dokazi o biofilmu, interakcije između različitih bakterijskih vrsta, te ukupna virulencija mikroba imaju utjecaj na odgođeno cijeljenje rane i razvoj infekcije. Kvalitetan opis kliničkih simptoma uz suvremena saznanja o mikrobima rane odličan su vodič za kreiranje strategije liječenja kroničnog vrijeda. Zbog sve boljeg razumijevanja uloge biofilma u produljenju vremena liječenja i znanja o sustavu i strukturi biofilma istraživači su razvili Ag+tehnologiju. Ta tehnologija ima jake sinergističke učinke između općenite antimikrobne aktivnosti ionskog srebra i specifičnih spojeva koji pomažu u učinkovitosti ometanja i uklanjanja biofilma.

Ključne riječi: antimikrobne obloge, srebro, infekcija, biofilm, kronični vrijed

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Sandra Marinović Kulišić, dr. med.
Klinički bolnički centar
Klinika za dermatovenerologiju
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Šalata 4
10 000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: sandra.marinovic@zg.htnet.hr

UVOD

Otkad postoje, lokalna antimikrobna sredstva uvelike se koriste u terapiji kroničnog vrijeda zbog činjenice da je infekcija rane jedna od najčešćih komplikacija. Lokalna antimikrobna terapija ima svoje prednosti, ali i velike nedostatke. Ključni kriterij za odabir vrste, načina i vremena djelovanja antimikrobnog sredstva je definiranje kriterija znakova infekcije kroničnog vrijeda. S obzirom na činjenicu da su mehanizmi cijeljenja i stanice koje u njemu sudjeluju iznimno osjetljivi na agresivnu primjenu antimikrobnih sredstava s jedne strane, te da je masovna, a nedovoljno ciljana antibiotska terapija s druge strane dovela do pojave masovne rezistencije bakterija, možemo reći da su klinički znakovi i kriteriji prepoznavanja infekcije ključni za pravilno tretiranje kroničnog vrijeda. Iz navedenih razloga u svijetu postoji značajna uloga suvremenih antimikrobnih sredstava s dodatkom srebra, koja istodobno nisu toksična za procese cijeljenja, a baktericidna su i ne stvaraju rezistenciju.

Moderne obloge kao suvremeni dio lokalne terapije imaju i komponentu kontrole infekcije u kroničnom vrijedu dodavanjem dezinficijensa ili srebra, a osim toga imaju i mehanički način uklanjanja bakterija inkapsuliranjem u vlastitu strukturu vlakna. Dosadašnja terapija nije bila potpuno učinkovita kod onog kroničnog vrijeda koji je kontinuirano razvijao biofilm na svojoj površini. Stoga je bilo ključno klinički identificirati znakove biofilma u kroničnom vrijedu i na taj način razvijati moderniju i učinkovitiju oblogu za rane, te odrediti adekvatnu i ciljanu terapiju.

ANTIMIKROBNE OBLOGE ZA INFICIRANI VRIJED

Infekcija kroničnog vrijeda isključivo se liječi sistemskom primjenom antibiotika.

Lokalna primjena antibiotske terapije striktno je kontraindicirana i davno napuštena klinička praksa, jer

dokazano razvija rezistenciju bakterija. Kronična rana uvijek ima prisutne bakterije i nemoguće ih je u potpunosti odstraniti, ni mehanički, npr. debridmanom, ispiranjem dezinficijensom, antibiotskom terapijom. Ono na što se isključivo može djelovati je broj prisutnih bakterija, čime direktno kontroliramo i sprječavamo da se njihovim razmnožavanjem razvije infekcija rane (1).

Kako je kronični vrijed izrazito osjetljiv u aspektu fizioloških procesa cijeljenja, primjena antimikrobnih sredstava mora biti suportivna za djelovanje, npr. fibroblasti koji izlučuju kolagen, makrofage koji izlučuju faktore rasta itd. Ako su antimikrobna sredstva citotoksična za navedene stanice i procese, imat ćemo prolongirano i odgođeno cijeljenje vrijeda. Primjena srebra u modernim oblogama značajan je iskorak u kontroli infekcija kroničnih rana općenito (2). Primjena srebra kao topičnog antibakterijskog sredstva u oblozi za rane, te njegova učinkovitost određuje se prema nekoliko kriterija. Prvi je fizikalna karakteristika i sastav obloge u kojoj se srebro nalazi. Tako imamo veliki spektar obloga čija je struktura, npr. gaza, vazelin, poliuretan, hidrokoloid, alginat ili hidrofiber vlakno u kojima se nalazi ionsko srebro. Sama struktura obloge je iznimno važna jer direktno utječe na učinkovitost srebra iz obloge. Jedno od istraživanja, koje je provedeno kao usporedba djelovanja npr. poliuretana sa srebrom na neravnine kontaminirane bakterijama, prikazalo je da postoje značajna razlike u efikasnosti antibakterijskog djelovanja upravo zbog nesposobnosti prijanjanja na neravnine dna rane čime se nije spriječilo razmnožavanje bakterija (3,4).

Temeljno pitanje učinkovitosti obloge sa srebrom je u mehanizmu otpuštanja ionskog srebra, antibakterijskom spektru djelovanja s jedne strane i testiranja na eventualnu citotoksičnost za fibroblaste, pojavu hiperpigmentacije i sigurnosti primjene na velikim tjelesnim površinama u smislu moguće sistemske apsorpcije s druge strane. Ako obloga ne ostavlja tzv. mrtve prostore u dnu rane (npr. hidrofiber vlakno), učinkovitost srebra će biti daleko veća. Osim toga u strukturi obloge moraju postojati dokazani elementi kvalitetne apsorpcije eksudata, zadržavanja eksudata, npr. kompresija sprječava lateralno curenje te maceraciju okolne kože. Nije nevažan element smanjenje bolnosti koju pacijent osjeća pri nošenju obloge, kao i pri izmjeni obloge. Druga važna karakteristika moderne obloge sa srebrom su njezini kinetički procesi i mehanizmi otpuštanja srebra, pri čemu najčešće govorimo o ionskom srebru (5).

Kinetika otpuštanja i baktericidnog djelovanja ionskog srebra u vezi je s njegovom koncentracijom u strukturi vlakna obloge i količini eksudata koji se pri tome otpušta iz rane. Obloga mora imati kontinuirano djelovanje

vanje srebra i to minimalno do 7 dana, kao i dokazani antibakterijski spektar *in vitro* i *in vivo*, a pri tome ne smije prouzročiti diskoloraciju kože ili biti citotoksična za fibroblaste. Za svaku indikaciju u kojoj se smije koristiti obloge sa srebrom moraju postojati kliničke studije i reference o učinkovitosti i neškodljivosti (6).

Percival i sur. su dokazali da obloge sa srebrom cjelovito ubijaju bakterije u biofilmu tijekom djelovanja od 48 sati. To novije istraživanje ukazalo je na vrijednost obloge s ionskim srebrom u primjeni na kronične rane (7). Osim toga, dokazano je da ionsko srebro reducira rast biofilma *P. aeruginosa* i *S. aureus*, dva najznačajnija uzročnika bolničkih infekcija. Srebro u kombinaciji s aminoglikozidom iskazalo je jako dobro djelovanje na biofilmove, nasuprot pojedinačnoj primjeni bilo antiseptika, bilo antibiotika (8).

Iz navedenih karakteristika idealna obloga sa srebrom trebala bi imati učinkovito i kontinuirano otpuštanje ionskog srebra tijekom cijelog vremena aplikacije na rani. Opušteno srebro trebalo bi biti u koncentracijama koje su potrebne za kontrolu infekcije, a ne smije se ni u kojem slučaju sistemski apsorbirati. Osim toga, idealna obloga sa srebrom mora imati idealan omjer mogućnosti kontrole eksudata iz rane u kombinaciji s antimikrobnim djelovanjem. Morala bi biti jednostavna i ugodna za pacijenta s mogućnošću atraumatskog prevoza i jednostavna za primjenu. Posljednja karakteristika je isplativost i dokazani povoljni omjer troška i koristi (*cost benefit*) (9-11).

Zbog sve boljeg razumijevanja uloge biofilma u produljenju vremena liječenja i znanja o sustavu i strukturi biofilma istraživači su razvili Ag+tehnologiju. Ta tehnologija ima jake sinergističke učinke između općenite antimikrobne aktivnosti ionskog srebra i specifičnih spojeva koji pomažu u učinkovitosti ometanja i uklanjanja biofilma (8,9).

ŠTO JE BIOFILM?

Biofilm je kompleksna, heterogena i integrirana zajednica na internoj površini prihvaćenih mikroorganizama, koja se sastoji od jedne ili više vrsti mikroba obavijenih ekstracelularnim polimernim matriksom koji proizvode.

Razlog stvaranja biofilma u domaćina je obrana od djelovanja imunskog sustava, učinkovita kolonizacija i zauzimanje okoline bogate hranjivim produktima. Perzistiranje mikroba unutar biofilma podržava kroničnu infekciju. Uloga biofilma je i biodegradacija tkiva, te onemogućavanje djelovanja antibiotika – kao ciljanog liječenja infekcije (12).

KAKO NASTAJE BIOFILM?

Fenotipske i biokemijske osobitosti mikroba u biofilmu razlikuju se od mikroba izvan njega. Bakterije unutar biofilma su sesilne, a da bi se ostvario biofilm iz planktonskih slobodnih oblika oni moraju proći kompleksan proces pretvorbe. Planktonske bakterije priliče se uz površinu poput podloge rane i počnu se množiti i izlučivati hidratiziranu matricu polisaharidaze. Dok se množe, bakterije se prilagođavaju okolini kako bi si olakšale preživljavanje. Kako se biofilm razvija i sazrijeva, sve čvršće prijanja uz površinu i može otpuštati planktonske bakterije i fragmente biofilma kako bi se biofilm stvorio i na drugom mjestu. Imunostni sustav pokušava napasti biofilm, izlučivanjem visokih razina proteinaze, antimikrobnih enzima i reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), koji ne moraju biti učinkoviti. Ovi faktori stimuliraju stvaranje viška eksudata, što može potaknuti rast biofilma i posljedično povećati opasnost od infekcije (9-12).

OTPORNOST BIOFILMA NA BAKTERIJE

Stanice u biofilmu su 10-100 puta otpornije na antibiotike od planktonskih. Razlozi otpornosti su višeznačajni, te razlikujemo nekoliko procesa:

- antibiotici ne mogu proći kroz ekstracelularni matriks, te se ne mogu vezati za ciljna mjesta djelovanja na bakterijskoj stanici
- inaktivacija antibiotika enzimima, koji se nalaze unutar matriksa biofilma, a koje produciraju zaštićene bakterije unutar te transformacije
- usporeni i reducirani rast, kao vrsta metaboličkog procesa bakterija uvjetuje slabiju osjetljivost na antibiotike
- anaerobni uvjeti reduciraju aktivnost antibiotika
- izmijenjeni geni mikroba koji stvaraju biofilm istodobno modificiraju genotipska i fenotipska obilježja mikroba, što dovodi do rezistencije na antibiotike. Na taj se način aerobi transformiraju u anaerobe (12).

METODE DOKAZIVANJA BIOFILMA

Prepoznavanje biofilma je veliki izazov. Unatoč uspješnoj primjeni antimikrobnih obloga sa srebrom u kroničnom vrijedu uz nove spoznaje o prisustvu biofilma neophodno je napraviti njegovu detaljnu kliničku identifikaciju (12-14).

U ovom trenutku samo specijalizirana mikroskopija može zasigurno otkriti biofilm. Samo specijalizirani

mikrobiološki laboratoriji mogu imati opremu i stručnost potrebnu za efikasno ispitivanje biofilma u uzorcima rana. Dok se standardno bojanje po Gramu može koristiti za vizualizaciju mikrobioloških zajednica u uzorcima rana, tu je tehniku potrebno kombinirati s jačim tehnikama poput epifluorescencije, konfokalne i elektronske mikroskopije. Zbog toga je potreban razvoj testa na mjestu pružanja zdravstvene zaštite (12).

LABORATORIJSKE POMOĆI KOD POTVRĐIVANJA BIOFILMA

Bojenje po Gramu s laganom mikroskopijom

- Rutinski se primjenjuje u svim mikrobiološkim laboratorijima
- Može se primjenjivati kako bi se vizualizirale mikrobne agregacije/zajednice u uzorcima rana
- Mora se koristiti u konjunktiji sa sofisticiranijim tehnikama mikroskopije.

Epifluorescentna mikroskopija s fluorescentnom peptid nukleinskom kiselinom *in situ* hibridizacijom (PNA FISH):

- Koristi fluorescentno bojanje kako bi specifično označila bakterijske nukleinske kiseline, biofilm polisaharide i nukleinske kiseline u uzorcima rana

Konfokalna laserska pretražna mikroskopija (CLSM):

- Sofisticirana tehnika mikroskopije koja omogućuje vizualizaciju „mokrih“ uzoraka (bolje za biofilm) za razliku od „fiksiranih“ uzoraka
- bez potrebe za sekcioniranjem

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM):

- Koristi lasersku zraku za pretraživanje površine fiksiranog uzorka
- Brzu pripremu uzorka (dehidracija)
- SEM ne može biti primijenjen kao jedina tehnika potvrđivanja (pozitivni test) biofilma te se mora kombinirati s jednom od ovdje opisanih tehnika

Pretražna elektronska mikroskopija u uvjetima okoliša (ESEM):

- Omogućuje slikanje površine hidriranih uzoraka bez potrebe za velikom pripremom uzorka i presvlačenjem uzorka (15).

KLINIČKE SPOZNAJE O BIOFILMU

Kliničke studije pokazuju da je možda moguće razlikovati biofilm od nekrotičnog tkiva po izgledu i ponašanju (tablica 1).

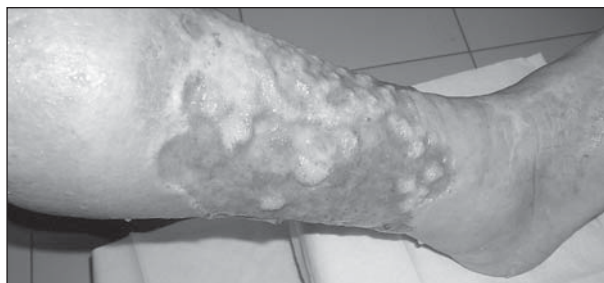
Tablica 1.
Kliničke pomoći kod potvrđivanja biofilma u venskom vrijedu (14)

Pitanje	Prisutnost biofilma
Može li se površinski materijal lagano i bez traume odlijepiti od potkožne površine kože primjenom tehnika fizičkog odstranjivanja?	✓
Zadržava li se površinski materijal usprkos autolitičkom ili enzimatskom debridmanu?	✓
Reformira li se površinski materijal brzo (unutar dan, dva) bez čestih intervencija (primjerice čišćenje, debridman)?	✓
Reagira li vrijed slabo na topičke ili sistemske antibiotike?	✓
Reagira li vrijed slabo na obloge koje sadrže antiseptičke agense (primjerice srebro, jod, PHMB) uključujući i proizvode za koje je poznato iz studija da kontroliraju biofilm <i>in vitro</i> (primjerice <i>Hydrofiber</i> obloge koje sadrže srebro, kadeksomer jod ili nanokristalno srebro)	✓
Reagira li vrijed zadovoljavajuće na multi-modalne strategije kao što su debridman, čišćenje i antimikrobne obloge sa srebrom	✓

Nekrotično tkivo – sadržava mrtvo devitalizirano tkivo rane koje je spojeno s donjim živim tkivom (sl. 1).



Biofilm tvori sjajnu, prozirnu supstanciju sličnu gelu, ili sluzaste komadiće ili slojeve u podlozi rane, i često se stvara unutar nekoliko sati nakon odstranjivanja odumrlog tkiva (sl. 2).



Fizičkim uklanjanjem, tj. debridmanom nekrotičnog tkiva iz rane praćenim ogromnom populacijom mikroba, te stvorenim biofilmom omogućuje se revitalizacija tkiva uz mogućnost ciljanog antimikrobnog liječenja. Uklanjanje devitaliziranog tkiva koje je ujedno i strano tijelo u vrijedu dovodi do redukcije ukupnog broja bakterija, smanjuje ukupnu koncentraciju egzo- i endotoksina bakterije, te proteaza i neutrofila kao posljedica intenzivne obrane domaćina. Odstranjivanjem odumrlog tkiva se ne uklanja biofilm, ali se stimulira metabolička aktivnost biofilma, smanjuje tolerancija preostalog biofilma i povećava podložnost antimikrobnim oblogama i reakcija imunostnog sustava (12-15).

Otkriće da najmanje 60 % kroničnih rana sadrži biofilm ukazuje da je veliki indeks sumnje na biofilm opravdan u ranama koje nisu pravodobno liječene.

Iz kliničkih promatranja biofilm rane povezan je s temeljnim patofiziološkim faktorima poput bolesti perifernih arterija, infekcija rana, osteomijelitisa i neravnoteže vlažnosti zbog čega je izrazito važno da liječnici prate, ocjenjuju i pristupaju svim faktorima koji doprinose venskom vrijedu (14-16) (tablica 2).

Tablica 2.
Protokol vrijeda koji je u opasnosti od infekcije (13)

- 1. Procjena i status rane**
 - Vrsta rane
 - Vrsta tkiva (nekroza, fibrinske naslage, granulacija)
 - Veličina rane (dužina, širina, dubina)
 - Eksudat (boja, konzistentnost, razina)
 - Okolna koža (eritem, oticanje, diskoloracija, maceracija)
 - Znakovi i simptomi infekcije (bol, miris, vrućica, oticanje)
- 2. Odstranjivanje odumrlog tkiva**
- 3. Tretman rane**
 - Primjena antimikrobnih obloga
- 4. Procjena i dokumentacija vrijeda**
 - Potencijalni klinički indikatori za suspektan biofilm (znakovi lokalne ili sistemske infekcije odmah nakon prekida antibiotske terapije iako je bila ciljana terapija, vlažnost, površina vrijeda - viskozna, mliječna)

ZAKLJUČAK

Zbog sve boljeg razumijevanja uloge biofilma u produljenju vremena liječenja i znanja o sustavu i strukturi biofilma istraživači su razvili antimikrobne obloge - Ag+tehnologiju. Ta tehnologija ima jake sinergističke učinke između općenite antimikrobne aktivnosti ionskog srebra i specifičnih spojeva koji pomažu u učinkovitosti ometanja i uklanjanja biofilma. Liječenje inficiranog vrijeda mora sadržavati procjenu inficiranog vrijeda, upravljanje aktivnom infekcijom i sprječavanje ponovnog nastanka infekcije. Debridman vrijeda

treba primijeniti kako bi se spriječio nastanak otpornog biofilma te uklonilo mrtvo tkivo. Nakon uklanjanja biofilma treba primjenjivati antimikrobne obloge sa srebrom kao dio sustavnog pristupa liječenja kroničnog vrieda radi sprječavanja ponovnog nastanka biofilma i suzbijanja bakterija koje uzrokuju infekciju.

LITERATURA

1. Kirketerp-Møller K, Jensen PO, Fazli M i sur. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2717-22.
2. Mooney EK, Lippitt C, Friedman J. Safety and efficacy report – silver dressings. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117: 666-9.
3. Cutting KF, White RJ, Hoekstra H. Topical silver-impregnated dressings and the importance of the dressing technology. *International Wound J* 2009; 6: 396-402.
4. White RJ. An historical overview of the use of silver in wound management. Chapter 7. pp 59-68 In: *The Silver Book* Dinton Wiltshire, UK: 2003. Quay Books.
5. Newman GR, Walker M, Hobot J, Bowler P. Visualisation of bacterial sequestration and bactericidal activity within hydrating hydrofibre dressings. *Biomaterials* 2005; 27: 1129-39.
6. Walker M, Parsons D. Hydrofiber technology: its role in exudate management. *Wounds-UK* 2010; 6: 31-8.
7. Percival SL, Bowler P, Woods EJ. Assessing the effect of

an antimicrobial wound dressing on biofilm. *Wound Repair* 2008; 16: 52-7.

8. Kim J, Pitts B, Stewart PS, Camper A, Yoon J. Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrob Agent Chemother* 2008; 52: 1446-5.
9. Bowler PG, Jones SA, Walker M, Parsons D. Microbicidal properties of a silver-containing hydrofiber dressing. *J Burn Care Rehabil* 2004; 25: 192-96.
10. Walker M, Cochrane CA, Bowler PG, Parsons D, Bradshaw P. Silver deposition and tissue staining associated with wound dressings containing silver. *Ostomy Wound Manage* 2006; 52: 42-50.
11. Waring MJ, Parsons D. Physico-chemical characterisation of carboxymethylated spun cellulose fibres. *Biomaterials* 2001; 22: 903-12.
12. Kučičec Tepeš N. Značenje infekcije kronične rane. *Acta Med Croatica*, 2011; 65 (Supl.2): 87-94.
13. Parson D, Metcalf D. Understanding local barriers to wound healing. *Wound International* 2014; (Suppl): 1-5.
14. Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A i sur. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair Regen* 2008; 182: 6482-9.
15. Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME i sur. Chronic wounds and the biofilm paradigm. *J Wound Care* 2010; 19: 45-53.
16. Percival SL, Bowler PG. Biofilms and their potential in wound healing. *Wounds* 2004; 16: 234-40.

SUMMARY

ANTIMICROBIAL DRESSINGS FOR INFECTED ULCER AND CLINICAL COMPREHENSION OF BIOFILM

S. MARINOVIĆ KULIŠIĆ, J. LIPOZENČIĆ¹ AND S. TUNUKOVIĆ²

*Zagreb University Hospital Center, Clinical Department of Dermatovenereology,
¹Croatian Academy of Medical Sciences and ²Stoma Medical, Zagreb, Croatia*

Current knowledge and proofs of biofilm, interactions between various bacterial species and overall virulence of microbes play a role in delayed healing of wound and development of infection. High quality description of clinical symptoms and current knowledge of microbes provide an excellent guideline for creating the strategy of wound treatment. Owing to better understanding of the role of biofilm in prolongation of healing time and facts about biofilm system and structure, scientists have developed the Ag+ technology. This technology has strong synergistic effects of the general and antimicrobial activity of ionic silver and specific compounds, which have proved efficient in biofilm obstruction and removal.

Key words: antimicrobial dressings, silver, infection, biofilm, chronic ulcers

UTJECAJ BIOFILMA NA CIJELJENJE RANE I POSTUPAK ZA IDENTIFIKACIJU BIOFILMA U RANI

JASENKA ŠKRLIN

Centar za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije, Klinička bolnica Dubrava, Zagreb, Hrvatska

Mikroorganizmi mogu postojati kako u planktonskom, tako i u stanju biofilma. Svaki fenotip ima ulogu u zakašnjelom zacjeljivanju te uzrokuje infekcije akutnih i kroničnih rana. Međutim, virulentni biofilm je osnovni razlog da do zacjeljivanja rana ne dolazi pravodobno. Zbog hipoteze da mikroorganizmi mogu adherirati za svaku površinu, biofilm se može naći u svim kroničnim ranama. Međutim, sam po sebi biofilm nije najveća prepreka zacjeljivanju kroničnih rana, već njegova virulentnost i patogenost. Ustanoviti koji specifični patogeni biofilm uzrokuje zakašnjelo zacjeljivanje rana pomoglo bi boljoj praksi u liječenju i njezi rana, no poteškoća i daljnje provođenje velikih randomiziranih kontroliranih studija o biofilmu moguće je samo vizualnom dijagnostikom odnosno dokazom biofilma mikroskopskom analizom histološki obrađenog biopтата rana.

Ključne riječi: bakterije, biofilm, kronična infekcija, dijagnostika

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. Jasenka Škrin, dr. med.
Centar za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije
Klinička bolnica Dubrava
Avenija Gojka Šuška 6
10 000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: jas@kdb.hr

UVOD

Biofilm u ranama, implantatima i trajnim ugrađenim uređajima stvara kronične, a vrlo često i za život opasne infekcije i upale. Takve perzistentne infekcije mogu dovesti do oštećenja tkiva, neuspjeha ugrađivanja implantata, disfunkcije uređaja pa čak i do smrti. Biofilm infekcije je vrlo teško liječiti zbog toga što matrica (engl. *matrix*) biofilma uzročniku (koji su često rezistentne bakterije) osigurava fizičku zaštitu od antibiotske terapije.

Brza detekcija i identifikacija biofilma može dati prije nego potrebne informacije za ranu dijagnozu i učinkovito liječenje. Međutim, identifikacija bakterijskih vrsta u biofilmu je izazov zbog njihove fiziološke heterogenosti. Konvencionalne metode otkrivanja biofilma oslanjaju se na kultivaciju koja za dijagnozu zahtijeva nekoliko dana i ima nisku osjetljivost, dok su molekularne metode detekcije, kao što su lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction* - PCR) i fluorescentna hibridizacija *in situ* (engl. *Fluorescence in situ Hybridization* - FISH) razvijene na temelju

genotipa i genomskog profiliranja te ostaju izazov za brzo prepoznavanje biofilma (1).

BIOFILM I RANA

Primarna funkcija kože je da služi kao barijera prema vanjskoj okolini. Zacjeljivanje rana na koži je složeni proces koji uključuje staničnu proliferaciju, migraciju i preoblikovanje tkiva što ponovno dovodi do uspostave njezine primarne funkcije. Propust u liječenju rana može dovesti do daljnjih komplikacija, uključujući septikemiju, kroničnu bol, prolongiranu hospitalizaciju, amputaciju i smrt. U humanoj medicini, kronične rane uključuju rane donjih ekstremiteta zbog komorbiditeta kao što je šećerna bolest, visoki tlak ili venska hipertenzija i sl. Bakterije prisutne u kroničnim ranama imaju ulogu u odgođenom zacjeljivanju tkiva. Smatra se da bakterije prisutne u kroničnim ranama ne postoje samo u planktonskom obliku, već su one karakterizirane i kao polimikrobne kolonije bakterija u zajednici, zvanom biofilm (2).

Biofilm se sastoji od skupina bakterija koje su adheirane na površinu okružene ekstracelularnim polimernom matricom. Matrica biofilma čini više od 90 % suhe mase biofilma stvarajući trodimenzionalnu mikrookolinu koja štiti bakterije. Takva arhitektura je jedinstvena značajka koja definira biofilm, regulirajući njegova fizička i funkcionalna svojstva. U matrici, ovisno o bakterijskoj vrsti razlikujemo fizičku strukturu biofilma i sastav ekstracelularne polimerne supstancije (engl. *Extracellular Polymeric Substances* - EPS) kao što su polisaharidi, proteini, nukleinske kiseline i lipidi. Na primjer, polisaharidi su neutralni u streptokokima (3), polianionski u pseudomonasu (4) i polikationski u stafilocoku (5). Unutar vrste EPS su još raznolikiji: polisaharidi iz različitih sojeva *Streptococcus thermophilus* imaju različite sastave i omjere monomera te posjeduju različite molekulske mase. Funkcija biofilma je raznolika i uključuje zaštitu od okoline, skladištenje hrane i staničnu komunikaciju (engl. *quorum sensing*). Prema tome, ekspresija gena i fenotip bakterija u biofilmu je različita od slobodno-živućih planktonskih bakterija.

Prisutnost biofilma u kroničnim ranama dovodi do nekoliko zajedničkih obilježja; onemogućuju djelovanje antibiotika na bakterije te održavaju zahvaćeno inficirano tkivo u perzistentnom upalnom stanju. Dodatno, dokazano je da prisutnost biofilma inducira kroničnu i/ili "tihu" upalu te odgađa zacjeljivanje rana, ali su mehanizmi zakašnjelog zacjeljivanja nedovoljno poznati (6).

U nedavno objavljenom članku Marano i sur. (2) su dokazali da sastav sekreta iz biofilma bakterija može inhibirati normalno zacjeljivanje rane uključujući staničnu proliferaciju i migraciju. Za eksperiment su uključili dvije najčešće bakterije povezane s kroničnim ranama *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Toplinskom obradom i mikrofiltracijom dokazano je da je biofilm aktivnost *S. aureus* zbog proteina, za razliku od *P. aeruginosa* čija je aktivnost posljedica djelovanja malih molekula. Proteomskom analizom identificirano je nekoliko proteina koji su navodno povezani s usporenim zacjeljivanjem rana, uključujući: alfa hemolizin, alkohol dehidrogenazu, fruktoza-bifosfat aldolazu, laktat dehidrogenazu i epidermalni stanični razlikovni inhibitor (engl. *epidermal cell differentiation inhibitor*).

INFEKCIJE POVEZANE SA STRANIM TIJELOM

Formiranje biofilma je presudni korak u patogenezi mnogih subakutnih i kroničnih bakterijskih infekcija, uključujući i infekcije povezanih sa stranim tijelom. Unatoč sterilizaciji i aseptičkim postupcima u SAD-u

2004. g. učestalost infekcija povezanih s implantatima kao rezultatom bakterijske adhezije i formacije biofilma na implantacijskom mjestu čini preko polovice svih bolničkih infekcija s procjenom od 1 milijun slučajeva na godinu.

Prema *National Institutes of Health* biofilm produkcija smatra se medicinski važnim pojmom, jer sudjeluje u preko 80 % mikrobnih infekcija u ljudskom tijelu (7). U prirodi biofilm stvara 99 % bakterija, a kao najčešći mikroorganizmi odgovorni za dvije trećine infekcija povezanih sa stranim tijelom su bakterije koje formiraju - stafilocoki (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*), nakon kojih slijede *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterococcus* spp, a od gljivičnih infekcija *Candida* sp.

DIJAGNOSTIKA

Bakterije koje su na dnu biofilma (pod anaerobnim uvjetima) ujedno su i razlogom ekstremne rezistentne antibiotske terapije kao i često izrazito teške kultivacije biofilm producirajućih bakterija tradicionalnim mikrobiološkim metodama (8).

Da bi se direktno vizualizirala trodimenzionalna struktura bakterijskog biofilma *Center for Genomic Sciences* razvio je novi dijagnostički protokol - konfokalnu lasersku skener mikroskopiju (*Confocal Laser Scanning Microscopy* - CLSM) temeljenu na 16S rRNA uz metodu fluorescentne hibridizacije *in situ* (*Fluorescence In situ Hybridization* - FISH).

Na temelju strukturnih i kemijskih razlika između biofilma autori članka (1) opisuju novu metodu, koja se na temelju principa "kemijskog nosa" može koristiti za detekciju i razlikovanje vrsta pa čak i sojeva unutar biofilma. Riječ je o metodi zlatne nanočestice temeljene na višekanalnom fluorescentnom senzoru (engl. *gold nanoparticle /AuNP/ - based multichannel fluorescence sensor*) za detekciju i identifikaciju sastava biofilma specifičnog za vrstu na temelju sveukupnih fizikalno-kemijskih svojstava.

DIJABETIČKO STOPALO

Rane dijabetičkog stopala su obično kolonizirane različitom mikrobiološkom florom te mogu biti dodatno inficirane specifičnim uzročnikom. Kako je poznato da su uzročnici unutar biofilma 1000 puta rezistentniji na antimikrobnu terapiju (za razliku od planktonskih bakterija), a mogu biti prisutni u kroničnim ranama, sve veći je interes otkriti njihovu etiološku ulogu. U nedavnom

istraživanju (9) prisutnost uzročnika unutar biofilma u ranama dijabetičkog stopala dokazalo se upotrebom nekoliko metoda vizualizacije. Uzorci nakon *debridement* rana dijabetičkih bolesnika, histološki obrađeni (rezovi) pregledani su pomoću svjetlosnog mikroskopa (preparat po Gramu), fluorescentne metode (engl. *Fluorescence In Situ Hybridisation* - FISH) i elektronskim mikroskopom (engl. *Environmental Scanning Electron Microscope* - ESEM) obuhvaćujući i kvantifikaciju broja kolonija (engl. *Colony Forming Units* - CFU). Svi su uzorci imali $>10^5$ CFU/g tkiva. Rezultat pilot studije bio je da svjetlosni mikroskop i FISH metoda vizualiziraju/ističu bakterijske kolonije i matricu biofilma učinkovitije nego ESEM, te da se i rutinskim Gram preparatom mogu dokazati mikrokolonije i/ili amorfne tvari (indikativno za biofilm) u kroničnim ranama.

OSTALE KLINIČKE SLIKE

Unutar biofilma mikroorganizmi su zaštićeni od fagocitoze i ostalih antimikrobnih djelovanja te se zbog lokalizacije ne mogu dokazati rutinskim mikrobiološkim metodama. To je ujedno i razlog „sterilnih kultura“, naročito kroničnih rana (*ulcus cruris*, dijabetičko stopalo, ishemijski ulkusi potkoljenica i dr.) kao i infekcija kirurškog mjesta (*Surgical Site Infections* – SSI). U recentnoj literaturi autori (10-12) opisuju studije u kojima su najnovijim metodama FISH/CLSM dokazali uzročnike takvih vrsta infekcija.

Biofilm od nekoliko bakterijskih vrsta (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp, *Micrococcus* sp. uz dominaciju *Pseudomonas aeruginosa*) opisuju Malic i sur. (10) u nezacjeljivanim inficiranim kroničnim ranama (13). Slično opisuju i Bjarnsholt i sur. (11) u venskim i ishemičnim ulkusima nogu te dijabetičkom stopalu gdje su u bazalnom dijelu biofilma izolirali *Pseudomonas aeruginosa*, koji je bio uzrokom neuspjeha antibiotske terapije i antifagocitnog djelovanja domaćina.

Osim navedenih infekcija, biofilm je mnogo češće uzrokom neeradikiranih infekcija povezanih sa stranim tijelom, tj. implantatima kao što su: centralni venski kateter, srčane valvule, mehaničko srce (VAD), koronarne premosnice (*bypass*), srčani stimulator (*pacemaker*), neurokirurški ventrikularni *shunt*, ugradbeni neurološki stimulatori, artroproteze, medicinski proizvodi za fiksaciju fraktura, te druge različite vrste implantata - dojke, kohleje, intraokularne leće, zubiju i dr.

Prevenција adhezije biofilma je puno bolje rješenje nego liječenje istoga, jer se time izbjegava potreba za dugotrajnom, vjerojatno neučinkovitom sistemskom antibiotskom terapijom, a i reducira se rizik od razvoja rezistencije uzročnika kao i crijevne flore.

ZAKLJUČAK

Mikroorganizmi rutinski kontaminiraju, koloniziraju i često inficiraju sve tipove rane. Infekcija rane i moguće kritična kolonizacija su glavne prepreke za zacjeljivanje. Unutar zadnjih 10 godina, kod kroničnih rana sve se više prepoznaju prisutnost i negativni učinci biofilma. Zakašnjelo zacjeljivanje rana uglavnom se odnosi na prisutnost mikroorganizama u biofilmu, koji su otporni na obranu domaćina i antimikrobnu terapiju

Pomoću brzog (nekoliko minuta) i učinkovitog višekanalnog nano-senzora može se uspješno detektirati i diferencirati biofilm od patogenih i apatogenih bakterija. Ove odrednice učinkovite su za biofilm na površini i u eksperimentalnom modelu rane, a rezultat dijagnostike može biti vizualan ili snimljen kamerom. Sumarno, takvom se dijagnostikom može omogućiti ciljano liječenje biofilma antimikrobnim oblogama umjesto terapije antibioticima širokog spektra, koji puta i empirijski (1).

L I T E R A T U R A :

1. Li X, Kong H, Mout R i sur. Rapid identification of bacterial biofilms and biofilm wound models using a multichannel nanosensor. ACSNANO 2014; 8: 12014-19.
2. Marano RJ, Wallace HJ, Wijeratne D, Fear MW, Wong HS, O'Handley R. Secreted biofilm factors adversely affect cellular wound healing responses *in vitro*. Sci Rep 2015; 5: 13296.
3. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. Microbiology 2001; 147: 3-9.
4. Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Curr Opin Microbiol 2007; 10: 644-8.
5. Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. Mol Microbiol 2002; 43: 1367-78.
6. Rhoads DD, Wolcott RD, Percival SL. Biofilms in wounds: management strategies. J Wound Care 2008; 17: 502-8.
7. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 999-1007.
8. Nistico L, Gieseke A, Stoodley P i sur. Fluorescence "in situ" hybridization for the detection of biofilm in the middle ear and upper respiratory tract mucosa. Methods Mol Biol 2009; 493: 191-213.
9. Oates A, Bowling FL, Boulton AJM, Bowler PG, Metcalf DG, McBain AJ. The visualization of biofilms in chronic diabetic foot wounds using routine diagnostic microscopy methods. J Diabetes Res 2014, Article ID 153586, 8 pages.
10. Malic S, Hill KE, Hayes A i sur. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent *in situ* hybridization (PNA FISH). Microbiology 2009; 155: 2603-11.

11. Bjarnsholt T, Kirketerp Moller K, Jensen PO i sur. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 2-10.

12. Kathju S, Nistico L, Hall-Stoodley L i sur. Chronic surgical site infection due to suture-associated polymicrobial bio-

film. *Surg Infect* 2009; 10: 457-61.

13. Percival SL, McCarty SM, Lipsky B. Biofilms and wounds: An overview of the evidence. *Advances Wound Care* 2015; 4: 373- 81.

SUMMARY

IMPACT OF BIOFILM ON HEALING AND A METHOD FOR IDENTIFYING IT IN THE WOUND

J. ŠKRILIN

Dubrava University Hospital, Department of Clinical Microbiology and Hospital Infections, Zagreb, Croatia

The skin microbiome is the aggregate of microorganisms that reside on the surface and in deep layers of the skin. Skin is colonized by bacteria, fungi, viruses and mites, maintaining a balance. Disruption in the ecosystem results in skin infections. Chronic wounds in diabetics, elderly and immobile individuals are at risk of skin organisms to invade and become pathogenic upon breach of the skin barrier. The bacteria of the skin microbiome may contribute to delayed healing and persistent inflammation. *Staphylococcus epidermidis* is an invasive skin organism that causes infection, i.e. hospital acquired infection (HAI) on medical devices and form biofilm. At the most basic level, biofilm can be described as bacteria embedded in a thick, slimy barrier of sugars and proteins. The biofilm barrier protects the microorganisms from external threats. Biofilms provide a reservoir of potentially infectious microorganisms that are resistant to antimicrobial agents, and their importance in the failure of medical devices and chronic inflammatory condition is increasingly being recognized. Particular research interest exists in the association of biofilms with wound infection and non-healing, i.e. chronic wounds. There is now strong evidence that biofilm is present in the majority of chronic wounds. Specialized microscopic techniques used since 2008 have allowed several research groups to demonstrate that 60% to 90% of chronic wounds have biofilm *versus* only 6% of acute wounds. While many studies confirm that chronic wounds often contain a polymicrobial flora, controversy remains with regard to whether these organisms directly contribute to non-healing. It seems most likely that individual bacteria themselves are not directly responsible for non-healing wounds. Rather, there is direct correlation between the presence of four or more distinct bacterial species in a wound and non-healing, suggesting that mixed microbial populations are the cause of pathology. The most reliable method to confirm the presence of a biofilm is specialized microscopy, e.g., bright-field, fluorescence *in situ* hybridization (FISH), and environmental scanning electron microscope (ESEM). Surface wound cultures underestimate total wound microbiota – misleading. Histological staining of deep debrided tissue shows evidence of biofilms. Now it is recognized that the majority of microbial species in chronic wounds are anaerobic bacteria (deep swabbing techniques yield similar findings to biopsies) if samples are processed within two hours. Traditional (wound culture method) cultures have limitations because all microbes (the organisms within the biofilm) cannot be isolated in culture or cannot be detected. Therefore, the most effective methods are molecular analyses.

Newer methods using microbial DNA may help decipher the role the microbes play in infection and critical colonization and provide quantitative and qualitative information on the range of microorganisms, including bacteria and biofilm formation.

Key words: bacteria, biofilm, chronic infections, diagnosis

ULOGA ANTISEPTIKA I STRATEGIJA UKLANJANJA BIOFILMA KRONIČNE RANE

NASTJA KUČIŠEC-TEPEŠ

Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, Zagreb, Hrvatska

Kronična rana ne cijeli u očekivanom razdoblju jer je zaostala u upalnoj fazi cijeljenja. Razlog tome je prisutnost nekrotičnog tkiva, velikog broja mikroorganizama - dominantno bakterija koje izlučuju biofilm - uz ishemiju, hipoksiju i edem. Biofilm je prisutan u 90 % kroničnih i 6 % akutnih rana. Biofilm je korporativna zajednica mikroba adheriranih na površine (rana) kojom upravljaju *quorum sensing* molekule. Zajednica je okružena s hidratantnim matriksom od ekstracelularnih polimernih sastojaka (slime) koji štite mikrobe od djelovanja antibiotika, antiseptika, obrane makroorganizma i stresa. Primarni uzrok kroniciteta rane je biofilm, jer uzrokuje permanentnu upalu, odgođeno formiranje granulacijskog tkiva, migraciju epitelnih stanica i rezervoar je mikroba koji uzrokuju infekciju kronične rane. Cilj dobre kliničke prakse jest da omogući cijeljenje kronične rane u očekivanom razdoblju. Za postizanje cilja nužno je reducirati i cjelovito ukloniti biofilm iz rane i prevenirati njegovu rekonstrukciju. To se postiže primjenom antibiofilm aktivnih spojeva i postupcima koji će razgraditi *quorum sensing* molekule, degradirati ekstracelularne polimerne sastojke (EPS) i blokirati prihvaćanje za površine. Suvremena istraživanja ukazala su da primjena antiseptika ima učinak u prevenciji infekcije i potpora je ciljanom liječenju. Činjenica je da su samo neki antiseptici primjenjivi za kronične rane i aktivni na biofilme primarnih uzročnika infekcije *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Pseudomonas aeruginosa*. Učinkoviti antiseptici su oktenidin dihidroklorid, poliheksanidi, povidon jodin i kadeksomer, nanokristalno srebro i manuka-tip meda. Nepokoreni biofilm je perzistentan problem kroničnih i kroničnih inficiranih rana. Činjenica je da ni jedan pojedinačni terapijski postupak, kao ni pojedini antiseptik, ne mogu cjelovito uništiti biofilm. To je razlog da suvremeni postupci liječenja i skrbi o kroničnoj rani primjenjuju multimodalnu strategiju u obliku kombinacije mehaničko-kemijskih postupaka: *debridement*, antiseptici, antimikrobne potporne obloge. Debridmanom se otvara terapijski „prozor“ za djelovanje antiseptika i antibiotika tijekom 72 sata što omogućuje uklanjanje biofilma i aktivno uništavanje sesilnih i planktonskih bakterija. Tim se postupkom onemogućuje i reformacija biofilma. Postupci se moraju intenzivno ponavljati, antiseptici i potporne obloge izmjenjivati ovisno o stadiju ležišta rane i komorbiditetnim čimbenicima bolesnika. Rezultati kliničkih studija ukazuju da samo takav proaktivan pristup kroničnoj rani omogućuje cijeljenje u očekivanom razdoblju.

Ključne riječi: kronična rana, biofilm, antiseptici

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Nastja Kučičec-Tepeš, prim.dr.med.
Šulekova 30
10 000 Zagreb, Hrvatska
Tel: 095 3777176
E-pošta: davorin.tepes@gmail.com

UVOD

Kronična rana je rana koja je zaostala u upalnoj fazi cijeljenja i ne može napredovati u daljnjem fiziološkom procesu, tj. u proliferativnu i remodelirajuću fazu. Razlog tome je prisustvo nekrotičnog tkiva, velikog broja mikroorganizama, dominantno bakterija, eksudata. U takvoj okolini bakterije proliferiraju i koloniziraju ranu uz izgradnju protektivnog sloja oko kolonija nazvanog biofilm. Biofilm je primarni uzrok kroniciteta rane, jer uzrokuje perzistentnu upalu, odgođeno

formiranje granulacijskog tkiva, migraciju epitelnih stanica i rezervoar je mikroba koji uzrokuju infekciju (1,2). Pri tom procesu čimbenici građevinskih elemenata nužni za fiziološko cijeljenje, keratinociti, čimbenici rasta, mitogeni i drugi posve su inertni ili razoreni (3). Perzistentna upala i prisustvo biofilma stimuliraju produkciju proinflammatoryh citokina, visoku razinu matriks metaloproteinaza i ekscesivnu prisutnost neutrofila (3). Biofilm je prisutan u 90 % kroničnih i 6 % akutnih rana (4,5).

Biofilmovi povezani s ljudskim tijelom uglavnom se razvijaju na tipično sterilnim područjima, teško se dijagnosticiraju i liječe, jer su tolerantni ili otporni na uobičajenu antibiotsku terapiju, antiseptike i imuni odgovor domaćina. Proučavanje klinički relevantnih biofilмова usmjereno je na specifična anatomska mjesta, različita tkiva i bolesti, fokusirajući se na cilj, a taj je: što treba učiniti da se ublaži ili ukloni njihovo patološko djelovanje.

Postoji niz s biofilmom udruženih infekcija (BAI - engl. *Biofilm-Associated Infections*) među koje pripadaju i infekcije kroničnih rana s učestalošću od 40 % do 80 %, koje su ujedno i paradigma za biofilm (6,7).

ŠTO ZNAMO O BIOFILMU?

Prvi opis biofilma zabilježio je Antoine van Leeuwenhoek 1684. godine (10). Definiranje biofilma mijenjalo se godinama vezano uz razvoj molekularnih metoda i kliničkih opažanja (9).

Biofilm je:

- * Zajednica bakterija prihvaćenih za površine, zatvorenih u ekstracelularni polisaharidni vlastito proizvedeni matriks (11)
- * Biofilmovi su kompleksne zajednice mikroba koje se sastoje od bakterija i gljiva. Mikrobi sintetiziraju i izlučuju protektivni matriks koji prihvaća zajednicu biofilma za žive i nežive površine (12,13)
- * Biofilmovi su dinamične heterogene zajednice koje se kontinuirano mijenjaju. Sastoje se od jedne vrste mikroba, ali češće od multiplih različitih vrsta (14,15)
- * Koherentni klaster bakterijskih stanica zarobljenih u polimerni matriks, koje iskazuju povećanu toleranciju na antibiotike, antiseptike i imuni odgovor domaćina (8)
- * Kompleksna mikrobna zajednica koja se sastoji od bakterija povezanih u zaštitni matriks izgrađen od šećera i proteina, koja se stvara na površini medicinskih umetaka i na ranama (16)
- * Zajednica mikroorganizama adherirana za površine (rana, obloge) okružena s hidratantnim matriksom od ekstracelularnih polimernih sastojaka (EPS ili SLIME) koja štiti mikrobe od antimikrobnih tvari, obrane makroorganizma i stresa. EPS je građen predominantno od polisaharida (razlika u vrstama bakterija) proteina, glikopeptida, i ekstracelularne DNK, koja se oslobađa iz živih i mrtvih bakterija (17).
- * To je korporativna zajednica mikroorganizama (planktonskih i sesilnih) s jasnom arhitekturom, kojom upravljaju *quorum sensing* (QS) molekule

(feromoni). Preko njih se odvija komunikacija između specijesa, mijenja se fenotip bakterija, a time i virulencija. QS može izlučiti >800 novih proteina koji se nalaze u fenotipu planktonskih bakterija (18,19). QS molekule imaju sposobnost produkcije čimbenika virulencije, formiranja biofilma i razvoja rezistencije na razini izmjene genetskog materijala (20). Posljedica tih procesa su perzistentne bakterije ili perzisteri ili sesilne metabolički inaktivne, otporne na antibiotike, antiseptike i obranu domaćina, dominantne u zajednici biofilma (21). Predispozicijski uvjeti za razvoj biofilma su isti koji uvjetuju i razvoj kronične rane uz karakterističnu neučinkovitost antibiotika primijenjenih u ciljanom liječenju (22).

- * Formiranje biofilma razvija se u nekoliko stadija. Prvi stadij je da se slobodne planktonske bakterije prihvaćaju za žive ili nežive površine. Ta faza je reverzibilna. Drugi stadij karakteriziraju prihvaćene ili sesilne bakterije. Izmjenom gena omogućeno je preživljavanje mikroba procesom hibernacije i anaerobnog metabolizma. To je posljedica komunikacije između bakterija putem *quorum sensing* molekula. Ta faza je ireverzibilna. Nakon prihvaćanja slijedi treća faza ili izgradnja zaštitnog ekstracelularnog polimernog omotača (EPS). To je matriks ili *slime* biofilma. EPS u sastavu varira ovisno o prisutnom mikrobu. Zreli biofilm kontinuirano „prolijeva“ planktonske bakterije, mikrokolonije i fragmente u okolinu. Dispergira se po ležištu rane, ali i perivaskularno (23,24). Širenje biofilma znatno otežava eradikaciju i rezultira daljnjim raspadom rane (4).
- * Brzina stvaranja biofilma mjeri se u satima. Pri povoljnim uvjetima prihvaćanje mikroba za podlogu odvija se tijekom minute, a rast mikrokolonija tijekom 2-4 sata. Razvoj inicijalnog EPS rezultira iskazivanjem tolerancije na biocide, antibiotike i antiseptike nakon 6-12 sata. Cjelovito izgrađen zreli biofilm rezistentan na biocide dokazuje se za 2-4 dana ovisno o specijesu i uvjetima rasta. Tipične planktonske bakterije koje izgrađuju biofilm i uzročnici infekcije kronične rane su: *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*.

Reformacija biofilma nakon mehaničkog uništavanja moguća je u roku od 24 sata, ovisno o specijesu (25). Proces reformacije omogućen je rasapom planktonskih bakterija oslobođenih iz biofilma, iz fragmenata ostalih nakon mehaničkog uklanjanja ili rastom iz novo unesenih mikroba u ranu (22).

Mikroorganizmi u biofilmu zaštićeni su od djelovanja imunog sustava domaćina, a tolerantni su ili rezistentni na djelovanje antibiotika, antiseptika i na stres. Mehanizmi koji to omogućuju su blokiranje, uzaja-

mna zaštita i hibernacija. EPS štiti mikrobe od prodira velikih molekula, protutijela i upalnih stanica kroz matriks ograničavanjem nutritivnih resursa i limitiranjem kisika. Služi kao difuzijska barijera i za male molekule, kao što su antibiotici. Uzajamna zaštita osobitost je polimikrobnih biofilma koji dominantno uzrokuju infekciju kronične rane i snažnije odgađaju cijeljenje (8). Rezistentne vrste štite osjetljive prijenosom gena između specijesa (enzimi ili promjena stanične stijenke) te tako iskazuju različite razine virulencije mikroba (26-28). Proces hibernacije je sposobnost subpopulacije bakterija u biofilmu da mogu razviti metaboličko mirovanje. Na taj način postaju rezistentne na djelovanje antibiotika, jer se nalaze u neaktivnom obliku. To je ujedno i mehanizam otpornosti na stres (29). Biofilm stimulira kronični upalni odgovor domaćina, koji ujedno pogoduje razvoju samoga biofilma. Prisustvo neutrofila i makrofaga koji okružuju biofilm (strano tijelo) izlučuju visoke razine reaktivnih oksigenirajućih tvari (ROS) i proteaza (matriks mekoproteinaze, elastaze) koje razaraju zdravo tkivo, imune stanice. Fibroblasti kao esencijalne stanice u procesu cijeljenja rane fenotipski su alterirani, pa je njihova sposobnost replikacije i produkcije građevnih elemenata onemogućena, a time i izgradnja granulacijskog tkiva (31).

CILJ

Cilj dobre kliničke prakse je omogućiti kroničnoj rani da zacijeli u očekivanom razdoblju. Da bi se to postiglo nužno je:

- * reducirati biofilm
- i
- * prevenirati reformaciju biofilma.

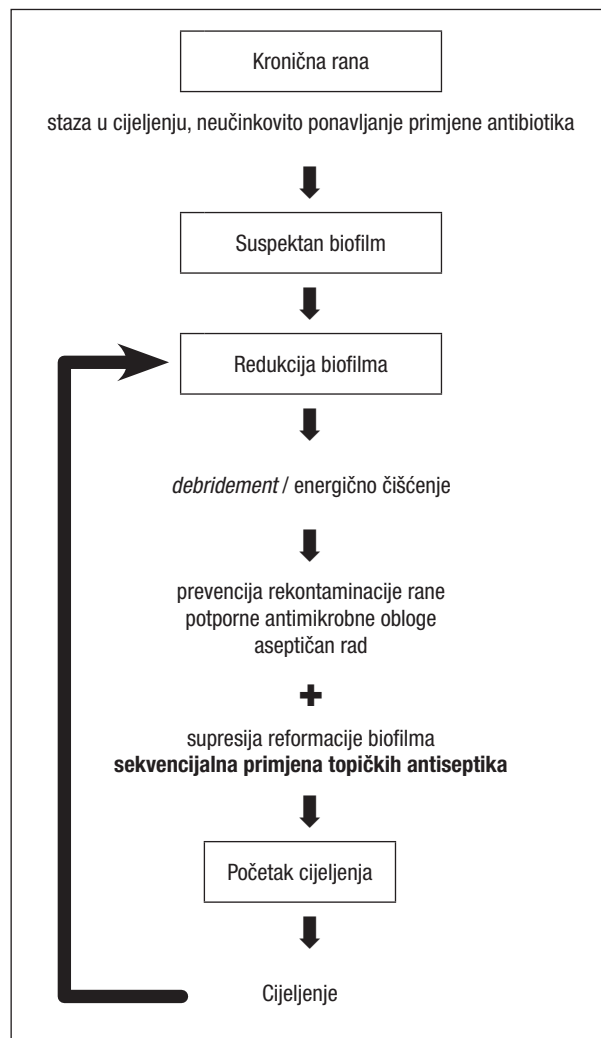
Zadane ciljeve nije moguće ostvariti pojedinačnim postupcima. Proaktivan stav uključuje kombinaciju strategija temeljenih na elementima pripreme ležišta rane s jasno određenim ciljevima koji se kao cjelina nazivaju „biofilm-temeljna skrb o rani“ (22,25,73). Obrada rane s biofilmom uvjetuje učestali *debridement* uz kombinaciju primjene učinkovitih antiseptika i antimikrobnih potpornih obloga koji imaju sposobnost eliminiranja ili inhibiranja biofilma (32,33). Antibiofilm spojevi moraju imati sposobnost razaranja biofilma na način da:

- razgrade *quorum sensing* molekule
- degradiraju ekstracelularne polimerne tvari (EPS)
- blokiraju prihvaćanje na površine (4)

TERAPIJSKE OPCIJE

Prepoznavanje biofilma je teško, pa kombinacija vizualnih pokazatelja uz kliničke znakove određuje kliničku praksu djelovanja na biofilm (10,16,17,27,34,35) (tablica 1).

Tablica 1.
Principi djelovanja na biofilm (17)



Debridement i energično čišćenje kronične rane s biofilmom ključni su terapijski postupci (5,36,41). Opće je prihvaćena činjenica da je oštri *debridement* ključ koji će preokrenuti kroničnu ranu u akutnu, te tako stvoriti uvjete za cijeljenje (37). To je „zlatni standard“ jer razara biofilm i eksponira planktonske bakterije vanjskim utjecajima (27). Fizičko ponavljanje oštrog *debridementa* rezultira uklanjanjem djelomičnog ili cjelovitog biofilma tijekom 48-72 sata, a to omogućuje otvaranje terapijskog „prozora“ (38,39). Tim postupkom uklanja se „stari“ biofilm (izgrađena struktura, hibernacija, dobro izraženi odgovor na stres), suprimira se ponovni rast, a „novo“ stvoreni nezreli biofilm (neizgrađena struktura, aktivni metabolizam, slabiji

odgovor na stres) osjetljiviji je na djelovanje antiseptika, obloga (38). Terapijskim „prozorom“ omogućuje se razaranje biofilma prije završetka maturacijske faze i ponovne reformacije cjelovitog biofilma. Osim toga oslobođene sesilne bakterije postaju mnogo osjetljivije na vanjske utjecaje (4,37). Ponavljanje debridmana iskazalo se značajnim i smislenim postupkom kojim se mijenja osjetljivost biofilma na antibiofilm aktivne tvari (40). Primjenom mehaničke energije i alternativnih biocida na strukturu glikokaliksa biofilma moguće ga je eradicirati (4,38,40).

Cjelovito uklanjanje biofilma debridmanom je malo vjerojatno, jer on ima tendenciju širenja i obnavlja se iznimno brzo. Zbog toga je nužno kombinirati *debridement* i iskoristiti terapijski „prozor“ za primjenu aktivnih antiseptika i suvremenih obloga (34).

Terapijski „prozor“ od 48 sati omogućava aktivnost antibiotika, a do 72 sata djelovanje određenih antiseptika (38). Pri svim tim procesima, ravnoteža vlage je esencijalna za optimalizaciju okoline rane i minimalizaciju rekonstrukcije biofilma (17).

ANTISEPTICI

Nepokoreni biofilm je perzistentni problem kroničnih i kroničnih inficiranih rana. Činjenica je da ni jedan pojedinačni terapijski postupak, kao ni pojedinačni antiseptik nemaju cjelovitu učinkovitost na planktonske i sesilne polimikrobne zajednice biofilma. To je temeljni razlog da se terapijski postupci i antibiofilm aktivne tvari moraju kombinirati (18,19). Učinkoviti antimikrobni spojevi su antiseptici, a neki od njih imaju sposobnost supresije biofilma u ranama (42). Suvremena istraživanja ukazala su da primjena površinski aktivnih tvari - antiseptika - za kronične rane imaju učinak u prevenciji infekcije i kao potpora ciljanom liječenju (43). Antiseptici su aktivne tvari, različite kemijske strukture koji se razlikuju po sastavu, spektru djelovanja na stanicu mikroba, učinkovitosti, citotoksičnosti, teratogenosti, indukciji rezistencije i aktivnosti na biofilm (44).

Činjenica je da su samo neki antiseptici pogodni za primjenu na kroničnu ranu i učinkoviti na biofilm. Prema preporukama i zaključcima *American Medical Association* (AMA), grupe autora Müller G, Kramer A, *A World Union of Wound Healing Societies Initiative, an International Consensus* (WUWHS) i *European Wound Management Association* (EWMA) sljedeći su antiseptici primjenjivi za kronične rane i učinkoviti na biofilm (45-49): Oktenidin dihidroklorid, polihexanidi, povidon jodin i kadeksomer, nanokristalno srebro i manuka-tip meda (45-49) (tablica 2).

Tablica 2.

Preporuke o vrsti antiseptika za kronične rane

Antiseptik	Consensus paper AMA 2004 (45)	GMS interdisc. 2007 (46)	WUWHS 2008 (47)	Kramer A 2008 (49)	EWMA 2013 (48)
Oktenidin dihidroklorid	+	+	+	+	+
Poliheksanidi	+	+	+	+	+
Povidon jodin	+	+	+	+	+
Klorheksidin diglukonat	-	+	+	+	+
Srebro: sulfadiazin	+	+			+
Nanokristalno			+		+
Kadeksomer jodin	+				
Manuka-tip meda			+		+

Cilj svake preporuke je da odgovorno dizajnira primjenu antiseptika pri kroničnoj rani, te omogući kvalitetno cijeljenje razarajući biofilm i sprječavajući njegovu reformaciju multimodalnim postupcima (2,31,32,38). Pri tome je izrazito značajno ograničiti primjenu antiseptika od nekritične i nekontrolirane primjene (42). Kombinacija debridmana i antiseptika kombinirana s tenzidima (detergentom) može cjelovito ukloniti biofilm u kroničnoj rani (50) (tablica 3).

Tablica 3.

Antiseptici učinkoviti na biofilm (48)

Godina primjene	Vrsta antiseptika	Djelovanje na biofilm	Selekcija rezistentnih mutanti
od antike do danas	srebro-nanokristalno	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	NE
1954.	klorheksidin diglukonat	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	NE
1956.	povidon jodin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	NE
1984.	oktenidin dihidroklorid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus spp</i>	NE
1994.	polihexanidi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Escherichia coli</i>	NE
2005.	Manuka-tip meda (polako otpuštajući vodikov peroksid)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MRSA	NE

Oktenidin dihidroklorid (OH)

Oktenidin dihidroklorid (OH) je pozitivno nabijeni bispiridin, koji posjeduje široki spektar antimikrobne aktivnosti. To uključuje *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*; značajne ili dominantne uzročnike infekcije kronične rane (51). Ne iskazuje osobitosti citotoksičnosti, karcinogenosti, teratogenosti ili mutagenosti, pa je stoga iznimno prikladan za primjenu u imunokompromitiranih bolesnika (52).

OH kation je aktivna tvar koja se veže na negativno nabijenu staničnu ovojnici bakterije, razarajući vitalne funkcije staničnih membrana i ubijajući stanicu. Osim toga čvrsto adherira na lipidnu komponentu (kardiolipin) koji je istaknut u bakterijskim staničnim membranama. Djelovanje mu je izrazito baktericidno bez atakiranja na ljudske epitelne stanice (53).

Djelovanje OH dominantno je istraženo na biofilmovima implantata, različitim neživim površinama i usnoj šupljini (54).

Rešliński i sur. dokazali su da OH djeluje baktericidno na biofilmove *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* *in vitro* (55). Junka i suradnici verificirali su učinkovitost OH direktno na biofilmove odgovorne za odgođeno cijeljenje rane. Dokazali su eradikaciju biofilмова *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (56).

OH je stabilan pri pH 1,6-12,2 i otporan na hidrolizu. Ipak, dokazano je da OH pri pH od 5,5 može dovesti do alteracije u sastavu fosfolipida i promjena u sastavu stanične membrane bakterije. Izmjene pH mogu igrati ulogu pri razvoju rezistencije na kationske biocide (42).

Poliheksametilen biguanidi (PHMB)

Poliheksametilen biguanidi (PHMB) su kationski antiseptici, kemijski stabilni, netoksični i bez indukcije rezistencije. Ne iskazuju citotoksičnost, teratogenost ni mutagenost. Primijenjeni u potpunim oblogama kombiniraju se antiseptičke osobitosti sa sposobnošću apsorbaranja ili otpuštanja vlage što omogućuje primjenu i za rane s malo sekreta (42).

PHMB djeluje na staničnu membranu bakterije inaktivirajući efluks pumpu i tako iskazuje izrazitu baktericidnu aktivnost. Djelovanje je izvanredno brzo. Posljedica je ireverzibilni gubitak osnovnih staničnih komponenta, a to razara citoplazmatsku membranu (57). Zbog brzine djelovanja prevenira se razvoj rezistencije. Primjenjuje se u različitim oblicima (otopine, obloge, spužve, gelovi itd.) Ipak, još uvijek nije posve

jasno djelovanje PHMB na bakterijsku stanicu, te se istražuje još jedan način djelovanja. Naime i elektrostatska interakcija PHMB s kiselim fosfolipidima u citoplazmatskoj membrani, uzrokuje rupturu membrane s gubitkom permeabiliteta bez lize staničnog zida (57).

Djelovanje PHMB na biofilmove evaluirano je od različitih istraživačkih skupina na biofilmovima u rana s odgođenim cijeljenjem i *in vitro* na sesilnim bakterijama. PHMB penetrira kroz matriks biofilma i ubija sesilne bakterije pod uvjetom da se primjenjuje kontinuirano (58). Biocidan je za biofilmove planktonskih bakterija *Escherichia coli* i *Staphylococcus epidermidis*, ali ne inaktivira *Staphylococcus aureus* učinkovito (58). Razara biofilm *Pseudomonas aeruginosa* (59,74). Maksimalna aktivnost PHMB je pri pH 5-6. Mnogo je aktivniji pri alkalnom pH.

Jodidi

Jodin se kao antiseptik ekstenzivno upotrebljava kadama. Prvi antiseptik bio je tinktura kalijevog jodida i etanola ili Lugolova otopina. Jodin se rabi u kliničkoj praksi od 1950. do danas, ali u različitim oblicima zbog brojnih nuspojava koje su se vremenom uklanjale.

Postoji četiri vrste nosača koji se rabe. To su polioksi-mer jodofori, kationski surfaktanti jodofori, ne-ionski surfaktanti jodofori i polivinil-pirolidin jodofori (60). Jodin posjeduje široki baktericidni spektar temeljen na agregaciji bakterija i diferencijaciji stanične penetracije. Ne uzrokuje rezistenciju.

U vodenim otopinama postoji sedam osnovnih vrsta jodina, a samo hidratizirani jodin (I_2), hipoidolna kiselina (HOI) i kation jodin (H_2OI^+) su baktericidi (60).

Brzo djelovanje jodina događa se na razini respiratornog lanca, blokirajući transport elektrona kroz elektrofiličnu reakciju, oštećujući prihvatanje kisika u aeroba (60). Primarna učinkovitost je interakcija jodina s proteinima citoplazmatske membrane, zatim penetracija kroz stanični zid, raspad sinteze proteina kao i funkcije lipidnih membrana i nukleinske kiseline (61).

Povidon jodin (PVP-1) je u vodi topivi kompleks koji se sastoji od elementarnog jodina i sintetskog polimera koji postupno otpušta jodin. Zbog toga je slabiji alergen i iritans od elementarnog jodina (62). Posjeduje široki spektar aktivnosti na gram-pozitivne, gram-negativne bakterije, gljive, neke viruse pa čak i bakterijske spore (63,46).

Povidon jodin djeluje na matriks glikokaliksa *Pseudomonas aeruginosa*, ali i na miješani biofilm pseudo-

monasa i stafilokoka. Zanimljiva je spoznaja da nema razlike u građi glikokaliksa između biofilma sesilnih i planktonskih bakterija, ali je distribucija glikokaliksa oko bakterijskih kolonija različita. Tako, na primjer, otpornost *Pseudomonas aeruginosa* u biofilmu na PVP-1 ovisi o protektivnoj naslagi stanica unutar matriksa glikokaliksa, koje uvjetuju produženje kontakta s jodinom da bi dosegao granice na unutrašnjem ležištu biofilma. Terapija negativnim tlakom uz primjenu povidon jodina daje dobre rezultate pri liječenju kroničnih inficiranih rana (64).

Kadeksomer jodin (CI) uveden je u kliničku praksu 1980. kao alternativa PVP-1 i iskazao je bolje i kontrolirano oslobađanje jodina s reduciranom toksičnošću. CI učinkovito razara biofilmove *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Učinkovitost se sastoji u prožimanju (namakanju) mikrobnih stanica koje okružuju glikokaliks. Na taj način omogućuje se jodinu da postepeno ubija *Staphylococcus aureus* unutar biofilma bez klinički značajnog oštećenja stanica domaćina. Značajno je da CI učinkovito destruiira zreli (maturacijski) biofilm (65).

Aktivnost jodina povezana s pH kreće se u rasponu od 3 do 9. Najjača biocidna aktivnost je pri pH 3-6. Bez obzira na prikazane vrijednosti učinkovitost jodina je uglavnom konstantna i nema velikih oscilacija u odnosu na pH okoline (42).

Srebro

U antisepsi rane srebro se rabi još od doba antike, a u posljednjih 200 godina primjenjuje se kao srebrno nitratna otopina. Od 1960. u kliničkoj praksi primjenjuje se srebrni sulfadiazin i ionizirano srebro u niskim koncentracijama, kao najkvalitetniji biocid.

Učinkovitost ionskog srebra ipak je ograničena prisustvom aniona, iona, klorida, fosfata. Razina ionskog srebra koja djeluje inhibitorno na mikrobe u rani iznosi 5-50 mgL⁻¹ ili 5.000-50.000 ppm (66). Osjetljivost mikroba signifikantno varira ovisno o vrsti. Iznimno je važno kontrolirati primjenu srebra, jer je dokazano da prekomjerna i nekontrolirana uporaba može rezultirati tolerancijom nekih bakterija zbog akumulacije aktivne tvari. Takav oblik rezistencije dokazan je u *Pseudomonas stutzeri* i nekih članova porodice *Enterobacteriaceae* (42,67).

Interakcija srebra s eksudatom iz rane ionizira inertni metal u aktivni oblik pri čemu se oslobađa antimikrobna učinkovitost. Antimikrobna aktivnost srebra rezultira reakcijom sa skupinama tiol, sulfid, iridazol, karboksil što dovodi do denaturacije proteina bakterijske stanične membrane. Osim toga srebro može oštetiti i celularnu respiraciju, vezati se za

mikrobnu DNK i interferirati s prijenosom elektrona (68). Kada se srebro nalazi u obliku nanopartikala ima sposobnost reakcije s bazama DNK što onemogućuje replikaciju. To je glavni mehanizam djelovanja na gram-negativne bakterije *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia proteamaculans* (42). Osim toga srebro može spriječiti podjelu mikrobnih stanica akumulirajući intracelularne vakuole, razarajući citoplazmatsku membranu i prirodni električni potencijal (van der Wallsove sile) (12).

Brzo djelovanje srebra na metaboličke procese bakterija rezultira i brzim baktericidnim djelovanjem (68).

Učinkovitost ionskog srebra na redukciju razine mikroba u biofilmu ili preveniranju reformacije biofilma ovisi o koncentraciji nanopartikala. Razina od 100 mgL⁻¹ je nedostatna da razori biofilmove. Koncentracije >100-150 mgL⁻¹ su dostatne da razore biofilmove *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia proteamaculans*, te da ubiju sesilne oblike *E. coli* u biofilmu. Sesilne bakterije su 25 puta tolerantnije na nanosrebro od planktonskih. Visoke koncentracije nanosrebra učinkovite su i u destabilizaciji matriksa biofilma *S. epidermidis* (69).

Cjelovitu destrukciju mikroba u polimikrobnom biofilmu, sastavljenom od *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Enterobacter cloacae*, pri ekspoziciji nanosrebru tijekom 48 sati dokazao je Percival, ali *in vitro* (70).

Utjecaj pH na antimikrobnu učinkovitost srebra je bitna, jer o pH okoline ovisi učinkovita produkcija srebrnih nanopartikala. Oksidirajući oblik srebra prisutan je u kiselom okruženju pri pH 5,5 i o tome ovisi bakterijska osjetljivost i antimikrobna učinkovitost (42).

Manuka-tip meda

U nizu aktivnih antibiofilm spojeva moramo navesti i novo-zelandski manuka-tip meda. Mnoge studije opisivale su antibakterijsku učinkovitost meda, ali nažalost nisu kvalitetno dokumentirale antibakterijske komponente ni njihovu kvantifikacijsku razinu. Zbog toga je bilo nemoguće dokazati učinkovitost meda kao vrijednog agensa protiv biofilma i učinkovitog spoja pri liječenju kronične rane.

Precizna istraživanja i dobar opis svojstava novo-zelandskog manuka-tip meda otkrila su da on posjeduje dvije antibakterijske komponente. To su metilgliksal i vodikov peroksid, koje su kvantificirane i dokazano učinkovite na biofilmove *Staphylococcus aureus* i MRSA (metilicilin resistant *S. aureus*). Metilgliksal i vodikov peroksid djeluju sinergistički tako da međupenetrira kroz matriks biofilma i ubija u njemu zaroblje-

ne sesilne stanice. Pri tome ne inducira rezistenciju. Dominantno se primjenjuje u suvremenim potpornim oblogama (71,72).

RASPRAVA

Gljučna komponenta kronične rane je odgođeno cijeljenje i kronična infekcija pri čemu je biofilm mikroba dominantni virulentni čimbenik (4). Ciljevi liječenja su razoriti biofilm i onemogućiti njegovu reformaciju (2,21). Postoji mnogo vrsta antimikrobnih aktivnih spojeva, ali egzistira samo nekoliko relevantnih podataka o njihovoj učinkovitosti inhibicije stvaranja biofilma ili razaranja postojećeg. Ni za jedan antibiofilm spoj nije dokazano da je aktivan za cijeli spektar mikroba koji se nalaze u kroničnim ranama ili da djeluje na sve bitne komponente biofilma (EPS, QS, prihvatanje na površine) (4,17) (tablica 4).

Tablica 4.
Djelovanje antiseptika na strukturu biofilma
(56,58,64,65,69,71)

Antiseptik	Biofilm
Oktenidin dihidroklorid	destrukcija EPS, alteracija fosfolipida i promjene stanične stijenke
Poliheksanidi	penetracija kroz matriks biofilma i ubija sesilne bakterije
Povidon jodin	djelovanje na matriks glikokaliksa, prodor do ležišta biofilma
Kadeksomer jodin	destrukcija zrelog (maturacijskog) biofilma
Nanokristalno srebro	destrukcija matriksa biofilma, ležišta i sesilnih bakterija
Manuka-tip meda	penetracija kroz matriks biofilma i ubija sesilne bakterije

Sve to je razlog da je nužan multimodalni pristup liječenju (17). Pod tim podrazumijevamo učestali oštri *debridement*, primjenu mehaničke energije, aplikaciju antiseptika učinkovitih na biofilmove dominantnih uzročnika infekcije kronične rane, potpornih obloga s antibakterijskim i antibiofilm djelovanjem simultano (33). Sve je to dio koordinirane strategije koja može omogućiti cijeljenje rane, a ujedno ukazuje na nužnost i potrebu primjene različitih tipova liječenja kroničnih rana (27,34).

Od budućih se istraživanja očekuje cjelovito razumijevanje kompleksnog bakterijskog ekosistema-biofilma, kako bi se moglo napredovati u skrbi i liječenju. Znanstveni ciljevi uključuju bolju dijagnostiku i liječenje, kvalitetnije određivanje dijagnostičkih biljega koji će razlikovati planktonske od sesilnih ili biofilm stanica (9,73).

To zahtijeva razvoj liječenja planiranog za pojedinu - individualnu ranu, a ne općeniti, generalizirani pristup liječenju (4).

ZAKLJUČAK

Ciljana primjena antiseptika za kronične rane vremenski je ograničena, simultana i dio je aktivnog multimodalnog pristupa liječenju i prevenciji infekcije. Primjena antiseptika jasno definira vrstu aktivne tvari, vrijeme, način i razlog uporabe, sposobnost uništavanja biofilma, te onemogućavanje njegovog ponovnog obnavljanja te konačno i cijeljenje kronične rane u očekivanom razdoblju.

Učinkoviti antibiofilm antiseptici prema međunarodnim preporukama su: oktenidin-dihidroklorid, polihexanidi, povidon jodin i kadeksomer, nanokristalno srebro, klorheksidin diglukonat i manuka-tip meda. Učinkovitost je različita jer ovisi o vrsti bakterije koja proizvodi biofilm, količini organskog matriksa i hipervarijabilnosti biofilma, te okolini. Ni jedan antiseptik nije učinkovit na sve vrste mikroba u kroničnoj rani kao ni na sve komponente biofilma. To je razlogom što su antiseptici dio aktivnog multimodalnog pristupa rješavanju problema nazvanog biofilm.

L I T E R A T U R A

1. Nguyen K, Seth AK, Hong SJ i sur. Deficient cytokine expression and neutrophil oxidative burst contribute to impaired cutaneous wound healing in diabetes, biofilm-containing chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2013; 21: 833-4.
2. Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J Wound Care* 2010; 19: 45-53.
3. James GA, Swogger E, Wolcott R i sur. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 37-44.
4. Attinger CH, Wolcott R. Clinically addressing biofilm in chronic wounds. *Advances in Wound Care* 2012; 3: 127-32.
5. Harding KG, Carville K, Cuddigan J i sur. Wound infection in clinical practice. *Int Wound J* 2008; doi:10111/j 1742-81x.
6. Expert working group. Wound infection. *Int Wound J* 2008; 5: 1-11.
7. Kučišec-Tepeš N. Prepoznavanje i liječenje infekcije kronične rane. *AMC* 2014; 67(supl 1): 51-9.
8. Burmølle M, Thomsen TR, Fazli M i sur. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59: 324-36.

9. Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S i sur. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. Federation of European Microbiological Societies. FEMS Immunol Med Microbiol 2012; 65: 127-45.
10. Percival ST, Malic S, Cruz S, Williams DW. Introduction to biofilms. U: Percival ST, Knottenbelt D, Cochrane CC. Biofilms in veterinary medicine. Vol. 6. Berlin Heidelberg: Springer, 2011, 41-68.
11. Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ. The bacterial glycalyx in nature and disease. ANNU Rev Microbiol 1981; 36: 299-324.
12. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infection. Science 1999; 284: 1318-22.
13. Stoodley P, Saver K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. ANNU Rev Microbiol 2002; 56: 187-209.
14. Dowd SE, Sun J, Sector PR i sur. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE and full ribosome shotgun sequencing. BMC Microbiol 2008; 8: 43.
15. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. Call Microbiol 2009; 11: 1034-43.
16. Leaper DJ, Schula G, Carville K i sur. Extending the TIME concept what have we learned in the past 10 years? Int Wound J 2012; 9(supl 2): 1-19.
17. Metcalf DG, Bowler PG, Hurlow J. A clinical algorithm for wound biofilm identification. J Wound Care 2014; 23: 137-42.
18. Rhoads DD, Wolcott RD, Percival SL. Biofilms in wounds. Management strategies. J Wound Care 2008; 11: 502-8.
19. Wolcott R. Understanding biofilm formation and biofilm-based wound care. Wound Middle East (Wound International) 2014; 1: 24-6.
20. Holm A, Vikström E. Quorum sensing communication between bacteria and human cells: signals, targets and functions. Front Plant Sci 2014; 5: 309-11.
21. Keast D, Carville K, Fletcher I, Schultz G, Black J. Understanding and managing wound biofilm. Wounds International 2014; 5: 20-4.
22. Phillips PL, Wolcott RD, Fletcher I, Schultz GS. Biofilms made easy. Wound International 2010; 1: 1-6.
23. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix, „house of biofilms cells“. J Bacteriol 2007; 189: 7945-7.
24. O'Toole G, Kaplan HB, Wolter R. Biofilm formation as microbial development. ANNU Rev Microbiol 2000; 54: 49-79.
25. Besaer E, Kroukamp G, Wolfaardt GM i sur. Metabolic differentiation in biofilms as indicated by carbon dioxide production rates. APPL Environ Microbiol 2010; 76: 1189-97.
26. Liu Y, Li J. Role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the initial adhesion, growth and detachment of *Escherichia coli* in porous media. Environ Sci Technol 2008; 42: 443-9.
27. Hurlow J, Cough K, Laforet K, Bolton L, Metcalf D, Bowler P. Clinical biofilms: A challenging frontier in wound care advances. Wound Care Adv (New Rochelle) 2015; 5: 295-301.
28. Seth AK, Geringer MR, Galinao RD i sur. Quantitative comparison and analysis of species wound biofilm virulence using an in vivo rabbit model. J Am Coll Surg 2012; 215: 388-99.
29. Kosenglu H, Aslan G, Esen N i sur. Ultrastructural stages of biofilm development of *Escherichia coli* on urethral catheters and effects of antibiotics on biofilm formation. Urology 2006; 68: 942-6.
30. Lawrence JR, Swershan GD, Kuhlicke LI, Neu TR. In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. Can J Microbiol 2007; 53: 450-8.
31. Wolcott RD, Kennedy IP, Dowd SE. Healing and healing rates of chronic wounds in the age of molecular pathogen diagnostics. J Wound Care 2010; 19: 272-4.
32. Wolcott RD, Kennedy IP, Dowd SE. Regular debridement is the main tool for maintaining a healthy wound bed in most chronic wounds. J Wound Care 2009; 18: 54-6.
33. Rodeheaver GT, Ratliff GR. Wound cleansing, wound irrigation, wound disinfection. U: Rodeheaver GT i sur. Chronic wound care. A clinical source book for healthcare professionals. HMP Communication Malvern, 2007, 331-42.
34. Rajpaul K. Biofilm in wound care. Community Wound Care 2015; 13: 6s-11s.
35. White RJ, Cutting KF. Wound biofilms-are they visible? Wound Care 2012; 21: 140-1.
36. Cardinal M, Eisenbud DE, Armstrong DG i sur. Serial surgical debridement a retrospective study on clinical outcomes in chronic lower extremity wounds. Wound Repair Regen 2009; 17:306-8.
37. Kirshen C, Woo K, Ayello EA, Sibbald RG. Debridement. A vital component of wound bed preparation. Adv Skin Wound Care 2006; 19: 508-11.
38. Wolcott RD, Rumbaugh KP, James G i sur. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time dependent therapeutic window. J Wound Care 2010; 8: 320-4.
39. Percival SL, Suleman L. Slough and biofilm: removal of barriers to wound healing by desloughing. J Wound Care 2015; 24: 498-510.
40. Wolcott RD, Dowd SE. A rapid molecular method for characterising bacterial bioburden in chronic wounds. J Wound Care 2008; 17: 513-20.
41. Excisional debridement of wound for infection. BioMed Lib Review CN; 709697631, ISSN; 2331-5717, 2015; 12:7. on line
42. Percival SL, Finnegan S, Donelli G, Vuotto C, Rimmer S, Lipsky BA. Antiseptics for treating infected wounds: efficacy on biofilms and effect of pH. Crit Rev Microbiol 2014; 1-17. ISSN 1549-7828. <http://informahealthcare.com/mbly>.
43. Human use antiseptic drugs. Guidance dokument. Health Canada 2009.
44. Kučišec-Tepeš N. Antiseptici u prevenciji infekcije kronične rane - činjenice i zablude. AMC 2015; 67(supl 1): 91-9.

45. Assessment of the evidence on antiseptics: A consensus paper on their use in wound care. *J Wound Care* 2014; 4: 1-8.
46. Müller G, Kramer A. Wechselwirkung von Octenidin und Chlorhexidin mit Saugerzellen und die resultierende Mikrobiolozie der Reaktionsprodukte. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 2007; 2: 17.
47. A World Union of wound healing societies initiative. Wound infection in clinical practice. An international consensus. Principles of best practice. London; WUWH, 2008; 1-10.
48. A EWMA document. Antimicrobials and non-healing wounds. Evidence, controversies and suggestions. *J Wound Care* 2013; 5: 10-26.
49. Kramer A, Assadian O, Müller G i sur. Octenidine, chlorhexidine, iodine and iodophores. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2008.
50. Metcalf DG, Bowler PG. Biofilm delays wound healing: A review of the evidence. *Burns and trauma* 2013; 1: 1-8.
51. Uygun F, Özyurt M, Evinc R i sur. Comparison of octenidine dihydrochloride, polihexanide and povidone iodine for topical antibacterial effects in *Pseudomonas aeruginosa* - contaminated, full-skin thickness burn wounds in rats. *Cent Eur J Med* 2008; 3: 417-21.
52. Tietz A, Frei R, Marc B i sur. Octenidine hydrochloride for the care of central venous catheter insertion sites in severely immunocompromised patients. *Infec Control Hosp Epidemiol* 2005; 51: 3217-24.
53. Block SS. Disinfection, sterilization and preservation 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2001.
54. Rupf S, Balkenhol M, Sahrhage TO i sur. Biofilm inhibition by an experimental dental resin composite containing octenidine dihydrochloride. *Dent Mater* 2012; 28: 974-84.
55. Rešlinski A, Dabrowiecki S, Glowacka K, Szymkowski J. The influence of OH on bacterial biofilm on the surface of polypropylene mesh. *Med Biol Sci* 2013; 27: 41-7.
56. Junka A, Bartoszewicz M, Smutnicka D, Secewicz A, Szymczyk P. Efficacy of antiseptics containing povidone-iodine, octenidine dihydrochloride and etacridine lactate against biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* measured with the novel biofilm-oriented antiseptics test. *Int Wound J* 2014; 11: 730-4.
57. Moore K, Gray D. Using PHMD antimicrobial to prevent wound infection. *Wounds UK* 2007; 3: 96-102.
58. Lenselink E, Andriessen A. A cohort study on the efficacy of a polyhexanide-containing biocellulose dressing in the treatment of biofilms in wounds. *J Wound Care* 2011; 11: 34-9.
59. Phillips PL, Yang Q, Schultz GS. The effect of negative pressure wound therapy with periodic instillation using antimicrobial solutions on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm on porcine skin explants. *Int Wound J* 2013; 10: 48-55.
60. Cooper RA. Iodine revisited. *Int Wound J* 2007; 4: 124-37.
61. Selvaggi G, Monstrey S, Van Landuyt K i sur. The role of iodine in antiseptics and wound management; a reappraisal. *Acta Chirurgica Belgica* 2003; 3: 241-7.
62. Lipsky BA, Hoey C. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 1541-9.
63. Müller G, Kramer A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1281-7.
64. Kim PJ, Attinger CE, Steinberg JS i sur. The impact of negative-pressure wound therapy with instillation compared with standard negative-pressure wound therapy: a retrospective, historical, cohort, controlled study. *Plast Reconstr Surg* 2014; 133: 709-16.
65. Miller CN, Carville K, Newall N i sur. Assessing burden in wounds: comparing clinical observation and wound swabs. *Int Wound J* 2011; 8: 45-55.
66. Reimer K, Vogt PM, Broegmann B i sur. An innovative topical drug formulation for wound healing and infection treatment: *in vitro* and *in vivo* investigation of a povidone-iodine liposome hydrogel. *Dermatology* 2000; 201: 235-41.
67. Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 587-90.
68. Radzig MA, Nadtochenko VA, Koksharova OA i sur. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surf B* 2013; 102: 300-6.
69. Storm-Versloot MN, Vos CG, Ubbink DT, Vermeulen H. Topical silver for preventing wound infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 17: CD006478.
70. Percival SL, Bowler P, Woods EJ. Assessing the effect of an antimicrobial wound dressing on biofilms. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 52-7.
71. Lu J, Trumbull L, Burke CM i sur. Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by *Staphylococcus aureus* strains with different biofilm-forming abilities. *Peer J* 2014; 2: e 326; DOI 10.7717/peerj.326.
72. Abstract. Methylglyoxal: (Active agent of manuka honey) *in vitro* activity against bacterial biofilms. International forum of allergy and rhinology 2011; 1:348-50. DOI 10.1002/abr.20073.
73. Schultz G. Understanding biofilm-based wound care. What you need to know? *Wounds Internat Webcast* 2015; 2011 <http://bit.ly/1FWZTeA>.
74. Seth AK, Geringer MR, Gurjala AN i sur. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-infected wounds with clinical wound care strategies: a quantitative study using an *in vitro* rabbit ear model. *Plast Reconstr Surg* 2012; 129: 262e-74e.

SUMMARY

THE ROLE OF ANTISEPTICS AND STRATEGY OF BIOFILM REMOVAL IN CHRONIC WOUND

N. KUČIŠEC-TEPEŠ

Croatian Academy of Medical Sciences, Zagreb, Croatia

Chronic wound does not heal within the expected time frame because it remains in the inflammation phase of healing. The reason for this is the presence of necrotic tissue and a large number of microorganisms, primarily bacteria that secrete the biofilm, along with ischemia, hypoxia and edema. Biofilm is present in 90% of chronic wounds and 6% of the acute ones. Biofilm is a corporative association of microbes which adhere to the surface of the wound, guided by quorum sensing molecules. The association is surrounded by a moisturizing matrix of extracellular polymeric substances (slime) which protect the microbes from the impact of antibiotics, antiseptics, macro-organism defense and stress. Biofilm is the primary cause of the wound chronicity because it causes permanent inflammation, delayed granulation tissue formation and migration of epithelium cells, thus providing a reservoir of microbes that lead to infection of the chronic wound. The aim of good clinical practice is to enable healing of a chronic wound within the expected time frame. In order to achieve this aim, it is necessary to reduce and thoroughly remove the biofilm from the wound and prevent its reappearance. This is achieved by the application of active anti-biofilm compounds and procedures that disintegrate the quorum sensing molecules, degrade the extracellular polymeric substances and block adherence to the surfaces. Recent researches have shown that the application of antiseptics is effective in the prevention of infection and is a support to targeted treatment. However, the fact is that only some antiseptics are applicable to chronic wounds and can have an impact on biofilms of the primary infective agents such as *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., and *Pseudomonas aeruginosa*. Effective antiseptics are octenidine dihydrochloride, polyhexanides, povidone and cadexomer iodine, nanocrystal silver and Manuka-type honey. Immobile biofilm is a persistent problem of chronic and chronic infected wounds. In fact, there is no isolated therapeutic procedure or an individual antiseptic that can fully destroy the biofilm. For this reason, modern strategy in the management of chronic wound applies a multimodal approach which combines mechanical-chemical procedures such as debridement, antiseptics, and antimicrobial supportive compresses. Debridement creates a therapeutic 'window' for the action of antiseptics and antibiotics in a 72-hour period, which enables removal of the biofilm and active destruction of the sessile and planktonic bacteria. This approach also prevents *de novo* formation of the biofilm. The above procedures must be intensively repeated, and antiseptics and supportive compresses changed, depending on the phase of the wound bed and comorbidity factors in the patient. The results of clinical studies show that only such a proactive approach to chronic wound enables achievement of healing within the expected period of time.

Key words: chronic wound, biofilm, antiseptics

ULOGA OBLOGA ZA UNIŠTENJE I REFORMACIJU BIOFILMA U VRIJEDU

SUZANA TUNUKOVIĆ

Stoma medical d.o.o., Zagreb, Hrvatska

Primjena suportivnih obloga za rane važan je čimbenik za uspješan rezultat suvremenog liječenja kroničnog vrijeda. Pravilan odabir obloge ključan je za brži i kvalitetniji, te u konačnici i isplativiji ishod liječenja. S obzirom na izrazito veliki broj generičkih vrsta i njihovih varijanti, kao glavni element za pravilan odabir obloge najvažnije je poznavati mehanizme djelovanja i kliničke dokaze o učinkovitosti obloge, na što više lokalnih faktora u vrijedu koji odgađaju i otežavaju cijeljenje vrijeda. Pojava suportivne obloge koja ima svojstva djelovanja na klinički identificirana tri ključna lokalna faktora, koji u najvećoj mjeri otežavaju cijeljenje vrijeda, a to su eksudat, infekcija i biofilm, dobiven je značajan iskorak u stvaranju optimalnih uvjeta za brže cijeljenje kroničnog vrijeda. Nove obloge, koje objedinjavaju hidrofiber tehnologiju i Ag+ tehnologiju, omogućuju učinkovitu antimikrobnu kontrolu i istodobno preveniraju ponovno formiranje bofilma, najtvrdokornijeg čimbenika koji podržava kroničnu upalnu reakciju i time značajno odgađa cijeljenje vrijeda.

Ključne riječi: kronični vrijed, eksudat, infekcija, biofilm, hidrofiber, Ag+ tehnologija

Adresa za dopisivanje: Suzana Tunuković dr.med
Stoma medical d.o.o
Folnegovićeva cesta 1/VIII
10 000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta : stunukovic@stoma-medical.hr

UVOD

Previjanje kroničnog vrijeda potpornim oblogama danas je zlatni standard. Moderne obloge su u svakom pogledu nezamjenjiva lokalna terapija koja stvara optimalne uvjete za cijeljenje rane, a pri tome su daleko isplativije u odnosu na klasičan prijevoj gazom. U posljednjih nekoliko godina sve je veći broj referenci koje ukazuju na ključne čimbenike koji utječu na odgađanje procesa cijeljenja rana, a izdvojena su tri izrazito štetna lokalna faktora: nekontrolirani eksudat, infekcija i pojava biofilma u rani. Razvojem novih tehnologija upravo se ciljano djelovalo na sva tri ključna čimbenika i time postigao iskorak u suvremenom liječenju kroničnog vrijeda. Nastala je nova generička skupina obloga, pod nazivom „hidrofiber obloga sa srebrom i dezinficijensom“ koja svojom strukturom vlakna (hidrofiber vlakno) maksimalno upija i zadržava eksudat iz rane, zajedno sa štetnim MMP (matriks-metaloproteinazama) i ROM (reaktivnim metabolitima kisika), te istodobno sprječava isušivanje dna rane ili maceraciju okolne kože. Osim strukture vlakana koja kontrolira eksudat iz rane, prisutnost iona srebra u koncentraciji koja je citotoksična za bakterije i omo-

gućuje baktericidno djelovanje (1,2 % ionskog srebra) nije bila dovoljna za aktivniju ulogu u slučaju pojave biofilma u rani. Zbog toga je razvijena potpuno nova tehnologija koja se sastoji od kombinacije hidrofiber vlakna s ionskim srebrom te dvije vrste dezinficijensa: etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) i benzetonij klorid (BeCl). Ova višestruka kombinacija u sastavu obloge aktivno razara već stvoreni biofilm na rani, ali što je još važnije, prevenira njegovo ponovno formiranje. Kronični vrijed je s jedne strane izvor velikih troškova za zdravstveni sustav, a s druge je klinički problem, jer zahtijeva kontinuiranu primjenu novih tehnologija koje je potrebno dobro poznavati kako bi u individualnoj terapiji dobili najbrže rezultate (1).

Istraživanje provedeno na velikom uzorku od 590 000 pacijenata s kroničnim vrijedom u Velikoj Britaniji, gdje ukupno liječenje kroničnog vrijeda uzrokuje trošak od 3 % ukupnog budžeta za zdravstveno osiguranje, dovelo je do sljedećih zaključaka: jedna od četiri rane ne zacjeljuje unutar 6 mjeseci, infekcija rane je najznačajniji faktor zbog kojeg rana ne cijeli, a treći je da bilo koji razvoj komplikacija značajnije povećava troškove liječenja. Rane koje se pogoršavaju, tj. postaju

sve veće, stvaraju više eksudata, vonja ili su inficirane s komplikacijama koje zahtijevaju hospitalizaciju, koštaju 2 do 6 puta više tjedno od rana koje cijele uredno u očekivanom roku (2,3).

Jedna od tri značajne komplikacije, uz maceraciju i infekciju je i pojava biofilma na kroničnom vrijetu. Da bi potporna obloga mogla djelovati na biofilm u smislu uništenja i njegovog ponovnog formiranja, bilo je potrebno kreiranje nove tehnologije u smislu inovacije s jedne strane i sveobuhvatnosti djelovanja na više lokalnih čimbenika s druge strane. Kako bi se detaljnije objasnio mehanizam djelovanja na sva tri ključna čimbenika, potrebno je pojasniti fizikalne i kemijske principe tog djelovanja, a prije svega neophodno je diferencirati zbog čega je istodobno djelovanje na baš ta tri elementa toliko važno za zacjeljivanje kroničnog vrijeta.

KONTROLA EKSUDATA KAO ČIMBENIKA U ODGOĐENOM CIJELJENJU VRIJEDA HIDROFIBER TEHNOLOGIJOM

Eksudat iz rane je biološka tekućina koja sadrži veliki broj staničnih i enzimskih elemenata i metabolita. Veliki broj prisutnih struktura je poticajan za cijeljenje rane. Tako npr., polimorfni leukociti i makrofagi izlučuju faktore rasta koji stimuliraju angiogenezu, a zaduženi su i za imunološki odgovor na strane elemente u samoj rani. Inhibitori MMP's blokiraju njihovo štetno djelovanje na tkivo. Prisutnost glukoze izvor je energije za stanice, a anorganske soli sudionik su stvaranja pH ravnoteže. Serumski proteini poput globulina ili albumina omogućuju kontrolu osmotskog tlaka, imunološki odgovor i transportne su molekule. Osim što je eksudat rane kompleksan, po svom je sastavu istodobno i individualan, pa će tako rane koje imaju visoku koncentraciju MMP-a biti daleko dugotrajnije i kompleksnije za zacjeljivanje. Uloga eksudata je izrazito fiziološka u procesu cijeljenja rane. Pozitivna funkcija eksudata je ponajprije u preveniranju isušivanja dna rane čime se omogućuje brža i bolja migracija stanica. Eksudat pomaže imunološkom odgovoru i potiče na taj način separaciju mrtvog od oštećenog tkiva (autolitički proces). Eksudat osigurava esencijalne nutritivne sastojke za stanični rast. Ako eksudat postane neumjeren i nekontroliran, kao što je to često kod kronične rane, u tom slučaju je direktno odgovoran za maceraciju okolnog tkiva s usporenom epitelizacijom. Zbog velike koncentracije upalnih elemenata koji se zadržavaju na dnu defekta tkiva dolazi do povećane destrukcije, umjesto sinteze, i kontinuiranog oštećenja novonastalih mladih stanica.

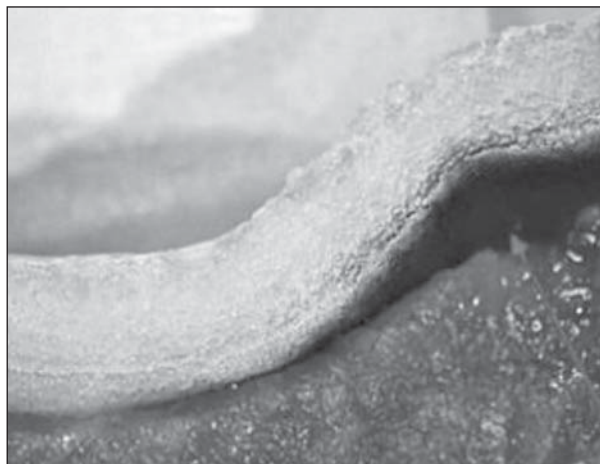
Dokazano je da u ekscesivnom eksudatu postoji fibronektin koji djeluje denaturirajuće uz visoku koncentraciju neutrofilnih elastaza i MMP-a koja mijenja i mitozu fibroblasta, a time i smanjuje mogućnost uspješne sinteze kolagena (4).

Iz svega navedenog u lokalnoj terapiji modernim oblogama izrazito je važno da struktura vlakna obloge upije višak eksudata, zadržava dno rane vlažnim i omogućuje lateralno istjecanje preko osjetljivog ruba rane.

Na primjeru hidrofiber obloge, koja upija 25 puta više od svoje težine, a istodobno je dokazano da u strukturi vlakna zadržava destruktivne enzime, upravo zbog osobine da onemogućuje širenje eksudata preko ruba rane, značajno pomaže bržem i kvalitetnijem cijeljenju rane. Vlakno takvih karakteristika ima i sposobnost prijanjanja uz dno rane ne ostavljajući mrtve prostore u kojima bi se mogle razmnožavati bakterije ili nagomilavati stanični detritus koji klinički vodi u formiranje fibrinskih naslaga i nekroza u dnu rane.

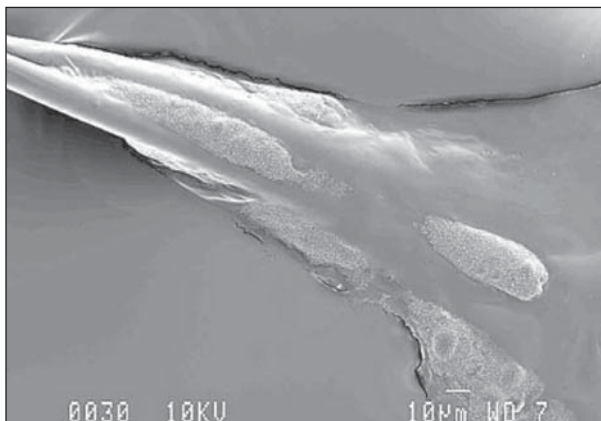


Sl. 1. Kontakt hidrofiber obloge i dna rane



Sl. 2. Mrtvi prostor ako nema kontakta obloge s dnom rane

Sl.1 pokazuje intimni kontakt hidrofiber obloge i dna rane, a sl. 2 prikazuje kako mogu postojati mrtvi prostori. ako obloga nema tu sposobnost. Hidrofiber vlakna imaju i sposobnost mehaničkog imobiliziranja bakterija u samu strukturu vlakna, čime se sa dna rane mehanički uklanja višak slobodnih bakterija, što se vidi na slikama u elektronskom mikroskopu (13).



Sl. 3. Hidrofiber vlakno s inkapsuliranim bakterijama u slici snimljenoj elektronskim mikroskopom.

Hidrofiber vlakno primjer je izvrsne kontrole eksudata čime se omogućuju optimalni vlažni uvjeti za cijeljenje rane, onemogućuje djelovanje štetnih enzima i bakterija te se na taj način smanjuje rizik od nastanka infekcija ili formiranja biofilma u rani (5,6).

KONTROLA BROJA BAKTERIJA U RANI LOKALNOM TERAPIJOM IONSKIM SREBROM

Jedna od najvažnijih uloga suvremenih obloga je i direktno djelovanje na bakterije, najčešće ionskim srebrom koje se nalazi u strukturi njihovog vlakna.

Temeljno pitanje učinkovitosti obloge sa srebrom je u mehanizmu otpuštanja ionskog srebra, antibakterijskom spektru djelovanja s jedne strane i testiranja na eventualnu citotoksičnost za fibroblaste, pojavu hiperpigmentacije i sigurnosti primjene na velikim tjelesnim površinama u smislu moguće sistemske apsorpcije (7).

Da bi suportivna obloga djelovala na biofilm u osnovi svog djelovanja, srebro mora biti dostupno na način da se otpušta kontinuirano tijekom čitavog vremena stajanja obloga na rani, da je ta koncentracija baktericidna, a nije toksična za ostale stanične elemente i da je sigurna za primjenu (8).

S obzirom na veliki javnozdravstveni problem oko rezistencije bakterija na sistemske terapije, posebice kod

kroničnih rana koje imaju i općenito lošiju perfuziju, povećan je i zahtjev da se u najnovijoj lokalnoj terapiji djeluje ne samo na bakterije već i na sam biofilm, ako je prisutan u kroničnoj rani.

Ako se lokalna terapija, u smislu održavanja stupnja čistoće dna rane i na taj način kontrole broja bakterija ne provodi na dobar način, vrlo brzo će se na dnu takvog kroničnog vrijeda formirati i biofilm. U prilog toj konstataciji je i podatak da u 60 % kroničnih rana postoji prisutnost biofilma (9). U kontroliranim studijama *in vivo* otkriveno je da biofilm usporava stvaranje i epitelizaciju granulacijskog tkiva, čime postaje i fizička barijera za cijeljenje rane.

Biofilm je i rezervoar za ponovnu disperziju mikroorganizama čime se uspostavlja zatvoren krug i značajno usporava cijeljenje rane. Nekontroliranom i prečestom primjenom sistemskih antibiotika vremenom su se razvili rezistentni sojevi bakterija koji dodatno otežavaju liječenje kroničnog vrijeda. Time je još značajnijom postala potreba za lokalnom antibakterijskom oblogom, koja zaista ima učinkovito djelovanje na široki antibakterijski spektar, s napomenom da u slučaju dokazane infekcije time nikada ne izostavljamo sistemsku antibiotsku terapiju (10,11).

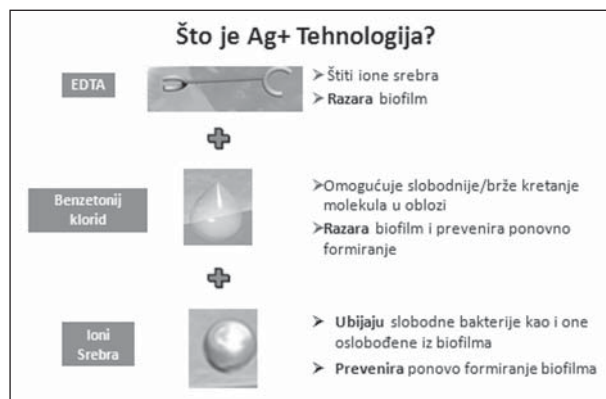
Pojava potporne obloge, koja po svojoj strukturi i sastavu mora sveobuhvatno djelovati na eksudat, infekciju i biofilm, veliki je doprinos lokalnoj terapiji kroničnog vrijeda. Kombinacijom osnovne strukture (hidrofiber vlakna) koje je dvostruko i prošiveno, ionskog srebra koje je aktivno baktericidno i djeluje do sedam dana, a dodatak od dvije supstancije: etilendiamidtetraoctena kiselina i benzetonij klorid velika su novost u suvremenom liječenju kroničnog vrijeda.

MEHANIZAM DJELOVANJA AG+ TEHNOLOGIJE U REFORMACIJI BIOFILMA U RANI

Mehanizam djelovanja hidrofiber obloge sa srebrom i dezinficijensima (EDTA i BeCl) klinički je uspješan model kombinacije kemijskih sastojaka koji zajedno omogućuju bolje i kontinuirano antibiofilm djelovanje u lokalnom tretmanu kroničnog vrijeda (sl. 4) (12).

Ag+ tehnologija djeluje na način da etilendiamintetraoctena kiselina služi kao nosač ionskog srebra koje se otpušta iz hidrofiber vlakna upijanjem eksudata iz rane. Osim toga, EDTA kao metalni kelator uklanja metale koji drže strukturu biofilma i tako razara postojeći biofilm, te omogućuje da se otpušteno ionsko srebro ne „potroši“ na ekstracelularni matriks samog biofilma. Benzetonij klorid, kao surfaktant, omoguću-

je brže kretanje tako zaštićenih molekula srebra, jer razara strukturu biofilma, tj. njegove sluzave zaštite, ekstracelularne polimerne tvari (EPS – engl. *Extracellular Polymer Substance*) i na taj način otvara put djelovanju srebra direktno na bakteriju (12-15).



Sl. 4. Shema Ag+ tehnologije (12)

Od velikog je značenja da prisutnost BeCl onemogućuje ponovno formiranje biofilma. Naime, nakon uklanjanja biofilma njegovo ponovno nastajanje počinje u vrlo kratkom vremenu, unutar 2 sata. Zbog te činjenice sve dosadašnje konzervativne, tj. mehaničke metode uklanjanja biofilma nisu bile adekvatne ni dovoljne (12,13).

Testiranjem u nezavisnom laboratoriju za medicinska istraživanja, na modelu biofilma *in vivo* s koloniziranim ranom pune debljine hidrofiber Ag+ obloga u usporedbi s antiseptičkom kontrolnom oblogom polihexametilen bigvanid (PHMB) pokazala je 95 % veće smanjenje biofilma nakon što su u 6 dana obloge mijenjali dva puta dnevno (16).

Dokaz učinkovitosti hidrofiber Ag+ obloge je široki antimikrobni spektar i vizualizacija razaranja biofilma elektronskim mikroskopom, a ono što je daleko najvažnije su klinički rezultati na kroničnom vrijedu koji nije dugotrajno zacjeljivao (17).

ZAKLJUČAK

Uloga obloga u uništenju i reformaciji biofilma moguća je ako obloga istodobno ima djelovanje i na eksudat i na infekciju, a u mehanizmu djelovanja na biofilm nije agresivna na osjetljive stanične elemente koji sudjeluju u fiziološkom procesu cijeljenja. Da bi se ostvarila učinkovitost same obloge u strukturi vlakna bile su neophodne tehnološke inovacije u smislu dodavanja dezinficijensa, čija uloga nije samo razaranje biofilma već i sprječavanje njegovog ponovnog formiranja. Time je Ag+ tehnologija ostvarila značajan pomak u

ostvarenju brzih kliničkih rezultata i smanjenju samih troškova liječenja direktnim preveniranjem komplikacija. Osim poznavanja struktura samih obloga i mehanizma djelovanja da bi se dobili optimalni rezultati u lokalnoj terapiji kroničnog vrijeda, neophodna je klinička identifikacija biofilma (primjenom postupnika), kao i pravilna primjena lokalne terapije gotovo na svakodnevnoj razini. Budućnost uspješnog liječenja kroničnog vrijeda uz primjenu suvremene hidrofилne obloge sa srebrom bit će uspješna uz individualiziranu dijagnozu prema kliničkom stanju i indikaciji čime će biti određena i adekvatna ciljana terapija.

L I T E R A T U R A

1. Chen WYJ, Rogers AA, Walker M, Waring MJ, Bowler PG, Bishop SM. A rethink of the complexity of chronic wounds – Implications for treatment. *ETRS Bulletin* 2003; 10: 65-9.
2. Harding K, Posnett J, Vowden K. A new methodology for costing wound care. *Int Wound J* 2012; doi: 10.1111/iwj.12006.
3. Drew P, Posnett J, Rusling L. The cost of wound care for a local population in England. *Int Wound J* 2007; 4: 149-55.
4. Walker M, Bowler PG, Cochrane CA. *In vitro* studies to show sequestration of matrix metalloproteinases by silver-containing wound care products. *Ostomy/Wound Manag* 2007;53: 18-25.
5. Walker M, Parsons D. Hydrofiber Technology: its role in exudate management. *Wounds UK* 2010; 6: 31-8.
6. Brunner U, Eberlein T. Experiences with hydrofibres in the moist treatment of chronic wounds, in particular of diabetic foot. *VASA* 2000;29: 253-7.
7. Parsons D, Bowler PG, Myles V, Jones SA. Silver antimicrobial dressings in wound management: A comparison of antibacterial, physical and chemical characteristics. *Wounds* 2005; 17: 222-32.
8. Bowler P, Jones S, Towers V, Booth R, Parsons D, Walker M. Dressing conformability and silver-containing wound dressings. *Wounds UK* 2010; 6:14-20.
9. James GA, Swogger E, Wolcott R i sur. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 37-44.
10. Metcalf DG, Bowler PG. Biofilm delays wound healing: a review of the evidence. *J. Burns Trauma* 2013; 1: 5-12.
11. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135-8.
12. Antimicrobial activity and prevention of biofilm reformation by AQUACEL® Ag+ EXTRA dressing. Scientific background report WHRI3857 MA236. 2013. Data on file, ConvaTec Inc.
13. Antimicrobial activity against CA-MRSA and prevention of biofilm reformation by AQUACEL® Ag+ EXTRA dressing. Scientific background report WHRI3875 MA239. 2013. Data on file, ConvaTec Inc.

14. Physical Disruption of Biofilm by AQUACEL® Ag+ Wound Dressing. Scientific Background report WHRI3850 MA232. 2013. Data on file, ConvaTec Inc.

15. Bowler PG, Welsby S, Towers V i sur. Multidrug-resistant organisms, wounds and topical antimicrobial protection. Int Wound J 2012; 9; 387-96.

16. Parsons D, Mustoe T, Seth A. A new anti-biofilm Hydrofiber™ dressing: an in vivo investigation. Presented at Wounds UK, 2013.

17. Harding K, Ivans N, Cains J, Peters K, Parsons D. A new anti-biofilm dressing – a clinical study. Poster presented at EWMA 2013.

SUMMARY

THE ROLE OF WOUND DRESSING IN BIOFILM DESTRUCTION AND REFORMATION

S. TUNUKOVIĆ

Stoma medical d.o.o., Zagreb, Croatia

Application of supportive wound dressing is an important segment for successful result of modern treatment of chronic ulcers. The right choice of dressing is the key to faster, better, and ultimately more cost-effective treatment outcome. Due to the extremely large number of generic types and variants, the main element for proper dressing selection is to know the mechanisms of action and clinical evidence of the effectiveness because of many local factors that delay ulcer healing. The advent of wound dressing that is efficient at the three clinically identified key local factors that largely impede the healing of ulcers, i.e. exudate, infection and biofilm, has made a significant step forward in the creation of optimal conditions for faster healing of chronic ulcers. The complexity of the effects of new technologies, which integrate hidrofiber technology and Ag + technology, provides effective antimicrobial control while at the same time preventing biofilm reformation.

Key words: chronic ulcers, exudate, infections, biofilm, hydrofiber, Ag technology

DEVELOPMENT OF A NEXT-GENERATION ANTIMICROBIAL WOUND DRESSING

DANIEL METCALF, DAVID PARSONS I PHILIP BOWLER

Science & Technology, ConvaTec Global Development Centre, Deeside, United Kingdom

Delayed wound healing due to infection is a burden on healthcare systems, and the patient and caregiver alike. An emerging factor in infection and delayed healing is the presence development of biofilm in wounds. Biofilm is communities of microorganisms, protected by an extracellular matrix of slime in the wound, which can tolerate host defences and applied antimicrobials such as antibiotics or antimicrobial dressings. A growing evidence base exists suggesting that biofilm exists in a majority of chronic wounds, and can be a precursor to infection while causing delayed healing itself. *In vivo* models have demonstrated that the inflammatory, granulation and epithelialization processes of normal wound healing are impaired by biofilm presence. The challenge in the development of a new antimicrobial wound dressing was to make standard antimicrobial agents more effective against biofilm, and this was answered following extensive biofilm research and testing. A combination of metal chelator, surfactant and pH control displayed highly synergistic anti-biofilm action with 1.2% ionic silver in a carboxymethylcellulose dressing. Its effectiveness was challenged and proven in complex *in vitro* and *in vivo* wound biofilm models, followed by clinical safety and performance demonstrations in a 42-patient study and 113 clinical evaluations. Post-market surveillance was conducted on the commercially available dressing, and in a 112-case evaluation, the dressing was shown to effectively manage exudate and suspected biofilm while shifting difficult-to-heal wounds onto healing trajectories, after an average of 4 weeks of new dressing use in otherwise standard wound care protocols. This was accompanied by a low frequency of dressing related adverse events. In a second evaluation, clinical signs of infection and wound dimension data, before and after the evaluations, were also available. Following an average of 5.4 weeks of dressing use, all signs of clinical infection were reduced, from an average frequency of 36% to 21%. An average of 62% wound size reduction was achieved, with 90% of wounds reducing in size and 10 wounds healing completely. The new clinical evidence for this next-generation antimicrobial wound dressing suggests it is safe and effective at managing exudate, infection and biofilm, while it can shift established, stubborn wounds onto healing trajectories. The scientific rationale for this new dressing technology is supported by *in vitro* and *in vivo* evidence, so now further comparative, randomized and outcome-based clinical studies are required to fully understand the clinical and economic benefits this new dressing technology can bring.

Key words: wound, biofilm, infection, antimicrobial dressing, anti-biofilm

Corresponding author: Daniel Metcalf, PhD
ConvaTec Global Development Centre
First Avenue, Deeside Industrial Park
Deeside, CH5 2NU, UK
Tel: +44 1244 584336
E-mail: daniel.metcalf@convatec.com

BACKGROUND

Delayed wound healing is a huge drain on healthcare budgets, and chronic wounds are estimated to account for 2-4% of global healthcare costs (1), or approximately €100-200 billion per year (2). The development of infection delays the normal wound healing process and results in increased burden on the patient and caregiver alike (3,4). Clinical infection develops

when the body's innate immune defence mechanisms respond to the presence and invasion of pathogens, including endotoxin and exotoxin produced by the microorganisms themselves (5), via local inflammatory processes (6). These result in the familiar, classic signs of wound infection – redness, heat, swelling, pain, odor, pus, as well as the more recently acknowledged additional signs, such as friable granulation tissue, discolouration, and delay to timely wound healing

(4). However, in the last 10-15 years, another factor in wound infection and delayed healing has emerged. The presence and development of microbial biofilm in wounds has been proposed (7,8), investigated (9), and then scientifically confirmed in chronic wounds (10,11).

Biofilm in wounds are communities of microorganisms adhered to each other and to wound surfaces, such as the wound bed, devitalised tissue, or dressings. The microorganisms are embedded in a matrix of extra-cellular polymeric substances (EPS), compared mainly of polysaccharides, proteins and DNA, forming a complex, three-dimensional scaffold of slime in which they are protected (12). Biofilm microorganisms are thus physically protected in the slime, and also display slower growth rates and metabolic phenotypes than their planktonic counterparts (13). As a result, biofilm microorganisms can display tolerance towards systemic antibiotics and topically-applied an-

tiseptics, such as silver or iodine (14), as well as host defence mechanisms, such as phagocytosis and enzyme-mediated microbial killing by neutrophils (15).

Figure 1 shows how planktonic, single-celled microorganisms, can attach to wound surfaces and, if not managed at this stage by an optimal host immune response or by antimicrobial agents, the microorganisms will secrete their sticky biofilm matrix. At this stage the biofilm will be microscopic but may start to illicit an inflammatory host response, and if unchecked, can develop into larger, more elaborate communities (16). At this stage, biofilm may be visible directly as slimy or milky substances on the wound bed, or indirectly *via* the signs of inflammation or infection which they illicit (17,18). Established wound biofilm therefore presents a serious infection risk, and may also seed biofilm formation elsewhere in the wound (19). As biofilm develops, so the risk of infection and delayed healing increases (Fig. 1).

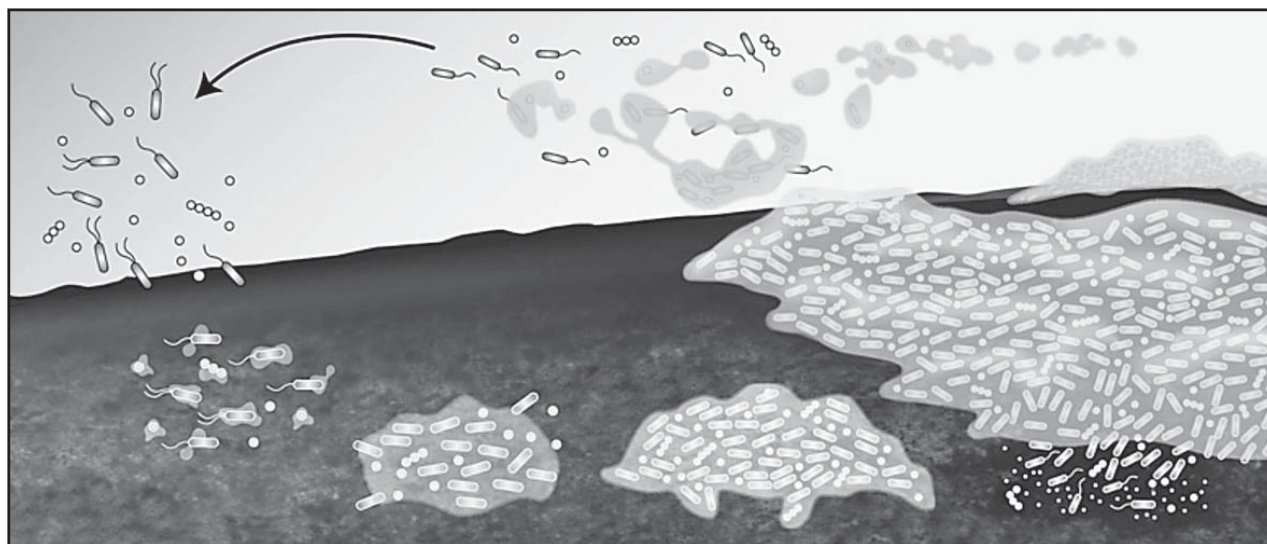


Fig. 1. Biofilm formation in wounds (originally published in (42)).

A growing body of scientific and clinical evidence now exists which suggests that wound biofilm, if not properly managed, may lead to wound infection and can delay healing (20). Dr Randall Wolcott, who practices biofilm-based wound care (BBWC) (21) in the US has stated that “*biofilms are the principle cause of wound chronicity*” (22). Whilst this statement has yet to be fully verified, the evidence that BBWC – the use of multiple, concurrent physical debridement and antimicrobial methods to target biofilm – can accelerate progression towards healing (23,24), with associated cost benefits (25), is growing. Scientific research within the last decade has confirmed that biofilm presence is correlated with wound chronicity, beginning in 2008,

when two pioneering research groups in the US (10) and Denmark (11) independently observed biofilm microscopically in 60% of chronic wound samples.

Further powerful scientific evidence comes from *in vivo* animal models, for example, by the introduction of biofilm into carefully-created acute leporine ear wounds, which can then be monitored to evaluate the efficacy of anti-biofilm approaches (26). In this model, ineffective host inflammatory responses have been observed, such as failure of neutrophils to phagocytose (26) and kill pathogens *via* the oxidative burst (27), and well as differential inflammatory responses elicited by different pathogenic biofilm species (28). The healing processes

of granulation tissue formation and epithelialization have also been shown to be retarded by the presence of biofilm in the wound bed (26,28,29). Notably, using multiple concurrent strategies to target biofilm in this model has been shown to be more effective at encouraging wound healing than individual techniques (30). The emerging problem of wound biofilm presents a significant challenge for developers of new, more effective wound dressings. The aim of this review is to summarize the development of a new dressing technology designed to be effective against wound biofilm.

DESIGNING A NEW ANTI-BIOFILM TECHNOLOGY

Formulation

The market-leading antimicrobial wound dressing, a nonwoven carboxymethylcellulose (CMC) dressing containing 1.2% ionic silver (AQUACEL™ Ag), has been on the market since 2002, before the 'biofilm era' of wound care really began (8-11). Although this dressing shows some effectiveness against biofilm in laboratory models (31,32), its silver ions, unaided, are slow to reach the microorganisms protected within the biofilm. When considering how to make ionic silver far more effective against biofilm, simply adding higher concentrations of silver would have safety implications (33) and would alter the physical attributes of the CMC dressing (exudate absorption and retention, gelling, conformability to the wound bed, etc.) (34). A comprehensive research and development program firstly focused on understanding the general structure, composition and behaviour of wound biofilm. Knowing that the complex three-dimensional matrix of EPS was generally comprised of hydrated polysaccharides, protein and DNA of microbial origin, as well as host-derived devitalised tissues (12,35), the search for safe and effective means by which to target this matrix was undertaken. The hypothesis was that if the biofilm matrix could be destabilized and the microorganisms within be exposed, then the antimicrobial activity of the silver CMC base dressing would be maximized.

Several modes of action of biofilm destabilization were theorized, such as enzymatic action, solubilization, ion exchange, metal chelation, ionic and nonionic surfactancy, and pH control. Following tens of thousands of laboratory tests using a well-characterized rapid screening assay for anti-biofilm activity (36), an optimum combination of low levels of metal chelator and a surfactant, combined with pH control was identified. When formulated with 1.2% ionic silver, this combination demonstrated highly synergistic anti-biofilm activity. The metal chelator was selected due to its ability to sequester di-

valent metal ions, such as Fe^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} , which are known to hold the polymers of the biofilm matrix scaffold together (37,38). The surfactant selected has a detergent-like action which further loosens the biofilm, reducing surface tensions within the dressing and biofilm, allowing the ionic silver to move more quickly (39). Finally, an acidic pH of 5.5 was identified as optimum in order for the other new components and ionic silver to function most effectively (40,41). Notably, the CMC remained the same, and the level of silver remained the same as in the original silver CMC dressing (1.2%).

EVIDENCE FOR A NEW ANTI-BIOFILM TECHNOLOGY

Anti-biofilm effectiveness testing

This unique formulation of anti-biofilm excipients and ionic silver was named 'Ag+ Technology', and its effectiveness was verified following manufacture into the CMC dressing form (CMC-Ag+) using a complex *in vitro* gauze biofilm model. Briefly, mature community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) or *Pseudomonas aeruginosa* biofilm was grown on gauze dressing pieces, before being transferred to agar plates (simulating the wound bed) mounted in a leather surround (simulating the peri-wound skin). The dressing was then applied to the biofilm, a secondary dressing applied, and its anti-biofilm performance assayed at frequent time points by viable counting and microscopic image analysis. Compared to the base silver CMC dressing (42), and two other commercially-available silver dressings containing 2.2% and 11.2% silver (43), the CMC-Ag+ dressing showed significantly superior effectiveness against CA-MRSA and *P. aeruginosa* biofilm, in terms of bacterial killing and prevention of biofilm re-formation following re-inoculation (Table 1). This effectiveness was subsequently confirmed in an independent model that used microcalorimetry to measure anti-biofilm activity via changes in total biofilm metabolism (44) (Table 1).

The safety and performance of the CMC-Ag+ dressing was evaluated in external toxicity and performance studies, as required by regulatory authorities, including in a well-characterized *in vivo* model (26). Briefly, *P. aeruginosa* biofilm, or *P. aeruginosa* and *S. aureus* polymicrobial biofilm, was allowed to develop in acute wounds of defined size, and the effect of the applied CMC-Ag+ was measured by viable counts and the wound closure parameters of granulation tissue formation and epithelialization. The dressing was found to be significantly superior to a polyhexanide-containing antimicrobial dressing in reducing biofilm counts and achieving wound healing progression (45) (Table 1).

Table 1.

Summary of initial *in vitro*, *in vivo* and clinical studies for the CMC-Ag+ dressing (42-47). 1: AQUACEL® Ag (ConvaTec); 2: Silvercel™ Non Adherent (Systagenix, UK); 3: Acticoat™ 7 (Smith & Nephew, UK); 4: AQUACEL® (ConvaTec); 5: Telfa™ AMD™ (Covidien, US).

Study type	Model	Comparators	Results	Reference
<i>In vitro</i>	Gauze biofilm model; viable biofilm counts	Silver (1.2%) CMC dressing ¹	CMC-Ag+ dressing gave 6 log ₁₀ kill of <i>P. aeruginosa</i> and CA-MRSA biofilm after 4 and 5 days; standard silver CMC did not fully eradicate either biofilm	42
<i>In vitro</i>	Gauze biofilm model; viable biofilm counts	(i) Silver (2.2%) alginate-CMC-nylon dressing ² ; (ii) nanocrystalline silver (11.2%) rayon-polyester-polyethylene dressing ³	Silver alginate-CMC-nylon dressing and nanocrystalline silver dressing did not reduce <i>P. aeruginosa</i> or CA-MRSA biofilm counts	43
<i>In vitro</i>	Agar-supported biofilm; isothermal microcalorimetry	(i) CMC dressing ⁴ ; (ii) silver (1.2%) CMC dressing ¹ ; (iii) silver nitrate solution (0.1 M); (iv) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; metal chelator); (v) benzethonium chloride (BC; surfactant)	CMC-Ag+ dressing and silver nitrate+EDTA+BC eradicated <i>S. aureus</i> biofilm; silver CMC dressing, CMC dressing, EDTA+BC, and silver nitrate alone did not eradicate the biofilm; demonstrating synergy of silver with metal chelator and surfactant	44
<i>In vivo</i>		(i) Polyhexanide gauze dressing ⁵ ; (ii) CMC dressing ⁴	CMC-Ag+ dressing gave 2 log ₁₀ reductions in <i>P. aeruginosa</i> biofilm after 4 and 6 days compared to polyhexanide gauze and CMC dressings; granulation tissue formation and epithelialization was significantly better in CMC-Ag+ dressed wounds; similar improvements in polymicrobial wounds	45
Clinical study	Clinical safety & performance in venous leg ulcers	None	Acceptable safety profile demonstrated; after 4 weeks CMC-Ag+ dressing then 4 weeks CMC 12% of wounds healed, 76% showed improvement in wound health; mean ulcer size reduction was 55%; subset of 10 infected wounds reduced in area by 70%	46
Clinical evaluations	Evaluations in chronic and acute wounds	None (previously used primary dressings were recorded)	CMC-Ag+ dressing resulted in an average wound closure of 73% after average of 4.1 weeks; 17% of wounds healed	47

Clinical assessment

The CMC-Ag+ dressing was also evaluated clinically in two separate investigations. The first was primarily a clinical safety study involving 42 patients with venous leg ulcers, of which 10 were deemed to be clinically infected. Whilst safety and progress towards wound closure was demonstrated for all wounds, in particular the 10 infected wounds, where biofilm was likely a factor, responded in more dramatic fashion, following 4 weeks of management with the CMC-Ag+ dressing then 4 weeks with the base CMC dressing (46; Table 1). Clinical evaluations on this now CE-Marked dressing were also conducted across Europe and Canada, where 113 hard-to-heal wounds were selected based on suspicion of infection (4) or biofilm (17) based on clinical signs. After an average of 4.1 weeks use of the CMC-Ag+ dressing in otherwise standard care protocols, 73% average wound closure was achieved, with 17% of wounds progressing to complete healing (47) (Table 1).

New clinical evidence

The version of this dressing designed to manage wound biofilm that is now commercially-available in Europe and Canada since 2014, AQUACEL® Ag+ EXTRA™ (CMC-Ag+E), is thicker to give improved absorption and also contains strengthening yarn to aid complete dressing removal (42). Since its launch, post-market surveillance evaluations have been conducted in the United Kingdom to further investigate the safety and effectiveness of the dressing. Clinicians in healthcare facility and community settings across the UK were invited to select challenging cases of hard-to-heal wounds that were stalled or deteriorating, and that might be compromised by infection (4) or suspected biofilm (17). Clinicians were asked to consider switching the previously used primary antimicrobial dressing to CMC-Ag+E for to 4 weeks, or as long as they considered it appropriate. All other standard local protocols were followed, and the clinicians recorded patient and various wound data throughout the evaluations on

simple forms. Two data sets emerged; the first was a 112-case population where safety and effectiveness could be examined using baseline and post-evaluation data on exudate, wound bed appearance (including suspected biofilm), wound progression, and dressing-related adverse events. A smaller data set of 29 cases where pre- and post-evaluation data on signs of infection and wound dimensions were also available.

Safety & effectiveness

Baseline and post-evaluation data from the 112-case clinical evaluation is summarized in Table 2. Most of the wounds were stagnant with over a quarter classed as deteriorating at baseline. Almost one-third were judged to be infected, and biofilm suspicion of 54% was greater than any other individual clinical sign of infection (data not shown). Duration of use of the CMC-Ag+E dressing was less than 4 weeks on av-

erage. Exudate levels, which were previously high or medium, were shifted to low or medium. Biofilm suspicion, as judged by visible or indirect signs (17), was more than halved. In terms of the wound bed appearance, before the evaluations, the main tissue type observed was suspected biofilm or slough. After use of the CMC-Ag+E dressing, this suspected biofilm and slough was reduced, while granulation tissue had become the main wound bed tissue type. Notably, these stalled and deteriorating wounds were shifted onto healing trajectories, with a majority of the wounds improving and 14 healing completely. Perhaps most importantly, there were only a small number of dressing-related adverse events. Only 3 such events were identified, and 2 of these were mild stinging which resolved quickly. There was one unexplained 'reaction' to the dressing, but overall, the CMC-Ag+E dressing was well tolerated and appeared to have an acceptable safety profile, as had been previously determined (46).

Table 2.
Summary of new clinical evidence for the CMC-Ag+E dressing.

	Data set 1	Data set 2 (48)
Baseline data		
Number of wounds	112 (111 patients)	29 (28 patients)
Median/mean duration	12 months/32 months	10 months/34 months
Wound status Stagnant	65%	72%
Deteriorating	27%	24%
Classed as clinically infected	31%	24%
Biofilm suspicion (yes/no judgment)	54%	76%
Results		
Mean dressing use duration	3.9 weeks	5.4 weeks
Exudate rating Before	54% medium, 43% high	55% medium, 34% high
After	48% low, 44% medium	41% medium, 34% low
Main wound bed tissue Before	40% suspected biofilm, 31% slough	49% suspected biofilm, 27% slough
types (% judgment) After	46% granulation tissue, 17% slough	53% granulation tissue, 24% biofilm
Biofilm coverage (% judgment) Before	40%	N/A
After	16%	N/A
Signs of infection (+ biofilm) Before	N/A	36%
(mean frequency of 9 signs) After	N/A	21%
Wound closure	65% improved, 13% healed	90% improved, 34% healed, 62% average wound closure
Adverse events	3 (2 mild stinging, 1 unknown 'reaction')	N/A

Infection and wound closure

Baseline and post-evaluation data from the 29 cases where signs of infection and wound closure data was also available is summarized in Table 2 (48). Baseline data was generally similar to the larger study, with a majority of wounds stagnant and approximately one-quarter deteriorating, although clinical infection classification was slightly lower at one-quarter of wounds, while biofilm suspicion higher at 76%. Dura-

tion of dressing usage was 5.4 weeks on average, and as in the larger study, exudate levels were reduced after the evaluations, and wound bed tissue types were shifted from suspected biofilm and slough to mainly granulation tissue. In addition to suspected biofilm, the frequency of 8 clinical signs of infection were recorded (erythema, oedema, heat/warmth, pain, odour, excessive exudate, and discoloured or friable granulation tissue) (4). For each of these signs, frequency was reduced following the dressing evaluations, with the

average frequency reducing from 36% to 21%. Wound closure data available for these 29 cases shows that 10 wounds completely healed and 90% reduced in size, with an average closure of 62% achieved. The wounds that fully healed were, on average, 14 months in duration yet it took just 6.7 weeks on average to heal these wounds using the CMC-Ag+E dressing (48). Upon investigation of 3 wounds which did not get smaller, it was found that 2 were from the same patient who was being administered systemic antibiotics, and the other was a long-standing wound of 7 years in a patient with peripheral arterial disease. This new clinical data on the effectiveness of this next-generation antimicrobial wound dressing to not only manage exudate, infection and biofilm, but to also shift challenging wounds onto healing trajectories, provides further evidence for this specifically developed new anti-biofilm technology.

CONCLUSION

The development of a next-generation antimicrobial wound dressing, based on the new field of wound biofilmology, has been shown to be effective in a number of *in vitro*, *in vivo* and clinical studies/evaluations. The dressing combines effective anti-biofilm action, enabling the activity of the well-established, safe antimicrobial agent, ionic silver, with a moist wound healing environment provided by the CMC dressing base. Emerging clinical evidence suggests that this dressing is able to shift challenging wounds onto healing trajectories where other antimicrobial therapies have not. This early promise should be investigated to understand the potential costs savings – wound care products, antibiotics (49), clinician time, clinical stay costs, etc. (50) – associated with the use of a dressing which progresses chronic wounds towards healing or resolves infected wounds. Comparative, randomized and outcome-based studies may provide even stronger clinical evidence for this new dressing technology.

REFERENCES

1. Gottrup F, Apelqvist J, Bjarnsholt T *et al.* EWMA Document: Antimicrobials and Non-healing Wounds—Evidence, Controversies and Suggestions. *J Wound Care* 2013; 22 (5 Suppl): S1-S92.
2. International Diabetes Federation Diabetes Atlas, Seventh edition, 2015. Available at: <http://www.diabetesatlas.org/> (Accessed on 1st February 2016).
3. Loewenthal J. Sources and Sequelae of Surgical Sepsis. *BMJ* 1962; 1: 1437-40.
4. Cutting KF, Harding KG. Criteria for identifying wound infection. *J Wound Care* 1994; 3: 198-201.
5. Ovington L. Bacterial toxins and wound healing. *Ostomy Wound Manage* 2003; 49(7A Suppl): 8-12.
6. European Wound Management Association (EWMA). Position Document: Identifying criteria for wound infection. London: MEP Ltd, 2005.
7. Bowler PG. 1999. The Prevalence and Significance of Anaerobic Bacteria in Wounds. MPhil Thesis; University of Wales College of Medicine.
8. Percival SL, Bowler PG. Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds* 2004; 16:234-40.
9. Serralta VW, Harrison-Balestra C, Cazzaniga AL, Davis SC, Mertz M. Lifestyles of bacteria in wounds: Presence of biofilms? *Wounds* 2001; 13: 29-34.
10. James GA, Swogger E, Wolcott R *et al.* Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 37-44.
11. Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Fazli M *et al.* Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2712-22.
12. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 623-33.
13. Percival SL, Hill KE, Malic S *et al.* Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms. *Wound Repair Regen* 2011; 19: 1-9.
14. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ *et al.* Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 2-10.
15. Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17: 91-6.
16. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9: 34-9.
17. Metcalf DG, Bowler PG, Hurlow J. A clinical algorithm for wound biofilm identification. *J Wound Care* 2014; 23: 137-142.
18. Metcalf DG, Bowler PG. Clinician perceptions of wound biofilm. *Int Wound J* 2014; doi: 10.1111/iwj.12358.
19. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49-79.
20. Metcalf DG, Bowler PG. Biofilm delays wound healing: a review of the evidence. *Burns Trauma* 2013; 1: 5-12.
21. Wolcott RD, Rhoads DD. A study of biofilm-based wound management in subjects with critical limb ischaemia. *J Wound Care* 2008; 17: 14555.
22. Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME, Wolcott BM, Gogokhia L, Costerton JW, Dowd SE. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J Wound Care* 2010; 19: 45-53.
23. Wolcott RD, Kennedy JP, Dowd SE. Regular debridement is the main tool for maintaining a healthy wound bed in most chronic wounds. *J Wound Care* 2009; 18: 54-56.
24. Wolcott RD. Disrupting the biofilm matrix improves wound healing outcomes. *J Wound Care* 2015; 24: 366-71.
25. Wolcott R. Economic aspects of biofilm-based wound care in diabetic foot ulcers. *J Wound Care* 2015; 24: 189-94.

26. Gurjala AN, Geringer MR, Seth AK *et al.* Development of a novel, highly quantitative *in vivo* model for the study of biofilm-impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen* 2011; 9: 400-10.
27. Nguyen KT, Seth AK, Hong SJ *et al.* Deficient cytokine expression and neutrophil oxidative burst contribute to impaired cutaneous wound healing in diabetic, biofilm-containing chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2013; 21: 833-41.
28. Seth AK, Geringer MR, Galiano RD *et al.* Quantitative comparison and analysis of species-specific wound biofilm virulence using an *in vivo*, rabbit-ear model. *J Am Coll Surg* 2012; 215 : 388-99.
29. Seth AK, Geringer MR, Hong SJ *et al.* Comparative analysis of single-species and polybacterial wound biofilms using a quantitative, *in vivo*, rabbit ear model. *PLoS One* 2012; 7: e42897.
30. Seth AK, Geringer MR, Gurjala AN *et al.* 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.
31. Percival SL, Bowler P, Woods EJ. Assessing the effect of an antimicrobial wound dressing on biofilms. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 52-7.
32. Percival SL, Bowler PG, Dolman J. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an *in vitro* biofilm model. *Int Wound J* 2007; 4: 186-91.
33. Lansdown ABG. Uptake and metabolism of silver in the human body. In: *Silver in healthcare: its antimicrobial efficacy and safety in use. Issues in Toxicology No 6.* Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010, 43-71.
34. Williams C. An investigation of the benefits of Aquacel Hydrofibre wound dressing. *Br J Nurs* 1999; 8: 676-80.
35. Sutherland IW. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 2011; 9: 222-7.
36. Ceri H, Olson ME, Stremick C *et al.* The Calgary Bio-film Device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities in bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1771-6.
37. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ, eds. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4th edition. The Pharmaceutical Press, 2003.
38. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3: a010306.
39. *Pharmaceutics: Basic Principles and Application to Pharmacy Practice.* Dash AK, Singh S, Tolman J. Academic Press, 2014.
40. Slone W, Linton S, Okel T *et al.* The effect of pH on the antimicrobial efficiency of silver alginate on chronic wound isolates. *J Am Coll CWS* 2010; 2: 86-90.
41. Jones EM, Cochrane CA, Percival SL. The Effect of pH on the Extracellular Matrix and Biofilms. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015; 4: 431-9.
42. Parsons D. Designing a dressing to address local barriers to wound healing. In: *Next-generation antimicrobial dressings: AQUACEL™ Ag+ Extra™ and Ribbon.* London: Wounds International, 2014 (Suppl). Available to download from: www.woundsinternational.com.
43. Parsons D, Bowler P. Design of a Next Generation Antimicrobial Hydrofiber® Dressing to Combat Wound Biofilm. Manuscript in preparation.
44. Said J, Walker M, Parsons D *et al.* An *in vitro* test of the efficacy of an anti-biofilm wound dressing. *Int J Pharm* 2014; 474: 177-81.
45. Seth AK, Zhong A, Nguyen KT *et al.* Impact of a novel, antimicrobial dressing on *in vivo*, *Pseudomonas aeruginosa* wound biofilm: quantitative comparative analysis using a rabbit ear model. *Wound Repair Regen* 2014; 22: 712-9.
46. Harding, KG, Szczepkowski M, Mikosiński J *et al.* Safety and performance evaluation of a next-generation antimicrobial dressing in patients with chronic venous leg ulcers. *Int Wound J* 2015; doi: 10.1111/iwj.12450.
47. Walker M, Metcalf D, Parsons *et al.* A real-life clinical evaluation of a next-generation antimicrobial dressing on acute and chronic wounds. *J Wound Care* 2015; 24: 11-22.
48. Metcalf D, Parsons D, Bowler P. A Real-Life Clinical Evaluation of a New Next-Generation Antimicrobial Wound Dressing in the United Kingdom. *J Wound Care* 2016; in press.
49. Gürgen M. Excess use of antibiotics in patients with non-healing ulcers. *EWMA J* 2014; 14: 17-22.
50. Harding K, Posnett J, Vowden K. A new methodology for costing wound care. *Int Wound J* 2012; 10: 623-9.

S A Ž E T A K

RAZVOJ NAJNOVIJE GENERACIJE ANTIMIKROBNE OBLOGE

D. METCALF, D. PARSONS i P. BOWLER

Znanost i tehnologija, Razvojni centar ConvaTec Global, Deeside, Ujedinjeno Kraljevstvo

Odgođeno cijeljenje rana zbog infekcije je teret zdravstvenim sustavima, a jednako tako i pacijentu i onome koji skrbi za njega. Bitan čimbenik u nastajanju infekcije i odgođenog cijeljenja je razvoj i prisutnost biofilma u ranama. Biofilm je zajednica mikroorganizama, zaštićena izvanstaničnim sluzavim matriksom u rani, koji može tolerirati obranu domaćina i primijenjena antimikrobna sredstva, kao što su antibiotici ili antimikrobne obloge. Rastući broj znanstvenih dokaza upućuje da biofilm već egzistira u većini kroničnih rana, a može biti i prethodnik infekciji dok istodobno uzrokuje odgođeno cijeljenje. *In vivo* modeli pokazali su da su upala, granulacija i epitelizacija, te procesi normalnog cijeljenja rane narušeni prisustvom biofilma. Izazov u razvoju nove antimikrobne obloge za ranu bio je da standardna antimikrobna sredstva učinimo učinkovitija protiv biofilma, a rješenje je uslijedilo nakon opsežnih istraživanja i ispitivanja biofilma. Kombinacija metalnog kelatora, površinski aktivne tvari i kontrole pH faktora pokazala je snažnu sinergističku anti-biofilm akciju u oblozi od karboksimetilceluloze sa 1,2 % ionskog srebra. Ta je učinkovitost testirana i dokazana u kompleksnim *in vitro* i *in vivo* modelima rana s biofilmom, a zatim i u klinički kontroliranim studijama, i to u studiji na 42-pacijenta i 113 kliničkih evaluacija. Naknadno ispitivanje nastavljeno je nakon dostupnosti obloge u evaluaciji na 112 slučajeva, gdje je obloga pokazala učinkovito kontroliranje eksudata i suspektnog biofilma na ranama koje teško cijele i pri tome poticanje procesa cijeljenja rana i to nakon prosječno 4 tjedna primjene nove obloge u inače standardnom protokolu njege. To je bilo popraćeno niskim brojem nuspojava. U drugoj procjeni bili su evaluirani i klinički znakovi infekcije i podatci o veličini rane, prije i nakon procjene. Nakon prosječno 5,4 tjedana uporabe obloge, svi su klinički znakovi infekcije bili reducirani, s prosječnom učestalošću od 36 % do 21 %. U prosjeku u 62 % rana postignuta je redukcija veličine, uz smanjenje veličine do 90 % i 10 potpuno zacijeljenih rana. Najnoviji klinički dokazi za novu generaciju antimikrobne obloge za ranu potvrđuju njenu sigurnost i učinkovitost u kontroli eksudata, infekcije i biofilma, a osim toga potvrđuju i zacijeljivanje rana koje dugo i teško ili uopće ne cijele. Znanstvenu potporu za najnoviju tehnologiju i generaciju antimikrobne obloge potvrđuju *in vitro* i *in vivo* dokazi, tako da su buduća komparativna i randomizirana klinička ispitivanja neophodna za potpuno razumijevanje kliničke i ekonomske učinkovitosti koju može donijeti ova najnovija tehnologija.

Ključne riječi: rana, biofilm, infekcija, antimikrobna obloga, anti-biofilm

BIOFILM AND OUR CLINICAL EXPERIENCE

TANJA PLANINŠEK RUČIGAJ

University Medical Centre Ljubljana, Department of Dermatovenereology, Ljubljana, Slovenia

Bacteria organized in biofilms are insensitive to the usual treatment with dressings or antibiotics. Most successful is surgical debridement to remove their colonies, but this option may not be possible in all environments. Dressings with silver and other antiseptics are often the only tools available to nurses at patient homes or to dermatologists at outpatient clinics. In our clinical studies conducted several years ago, we demonstrated that dressings with antiseptics were an effective tool in daily clinical practice to remove bacteria/biofilms from chronic wounds.

Key words: biofilm, clinical practice, chronic wounds, hydrofiber, silver dressings, antiseptics, polyhexamethylene biguanide (PHMB)

Corresponding author: Tanja Planinšek Ručigaj, MD
University Medical Centre
Department of Dermatovenereology
Zaloška 2
1 000 Ljubljana, Slovenia

INTRODUCTION

Biofilm is a community of microorganisms surrounded by an extracellular polymeric, polysaccharide matrix at the surface (1). Biofilms were discovered in the 1650s by van Leeuwenhoek, but it was only in 1978 that Costerton wrote about the 'Bacteria Stick'. In 1978, research on biofilm bacteria has exploded (2).

Biofilms play a significant role in a large number of infections, in particular in chronic wounds (1). Some of the frequent microorganism that make a biofilm on the wounds are *Staphylococcus (S.) epidermidis*, *S. aureus* and *Pseudomonas (P.) aeruginosa* (3,4). It was a big problem to prove the biofilm formation in wounds. Now we can identify biofilm formation by light microscopy, electron microscopy and confocal laser scanning microscopy (5). We can demonstrate extracellular polymeric, polysaccharide matrix surrounding the bacteria in biofilm by staining with ruthenium red, carbohydrate stains and concanavalin A (6). James *et al.* evaluated 16 acute and 50 chronic wounds. They found biofilms in 6% of acute and 60% of chronic wounds (7).

Antiseptics are preferred to antibiotics for removal of biofilms. Silver and polyhexamethylene biguanide (PHMB) are very effective against planktonic bacteria and immature biofilms. When applied on mature biofilms, they can only inhibit further growth and prevent

bacteria from spreading beyond the biofilm but not resolve the infection (8,9). The antimicrobial efficacy of silver dressings against bacterial biofilms was investigated on *in vitro* and *in vivo* models. Hegger *et al.* showed that dressings with silver reduced biofilm less than 90% in one-week treatment in an animal model (10). However, *in vitro* studies produced better results. Percival *et al.* report that hydrofiber dressings with silver acting against bacterial biofilms proved efficient after 24-h treatment and killed total bacterial biofilm within 48 h (11).

OUR CLINICAL EXPERIENCE

Study 1. In this case study we evaluated the effects of two alginate dressings on healing during the treatment of 20 venous leg ulcers. Results: Ulcers treated with alginate with silver (Silvercel®) were smaller by 15.4% and ulcers treated with calcium-alginate without silver were larger by 0.7% (12,13).

Study 2. In a large-scale, comparative, randomized study we compared the effects on healing of foam dressing with silver (Contreet-H®) *versus* 'local-best-practice' in the treatment of 619 ulcers with delayed healing. Results: Wound-area decreased faster in patients

treated with foam dressing with silver (50% vs. 34.3% reduction). The foam dressing with silver significantly promoted positive wound progress in 67% compared to 51% using 'local-best-practice' (12,14).

Study 3. In a comparative clinical trial we compared hydrofiber dressing and ointments in changing microbial colonization and healing of 24 venous ulcers in 7 weeks. Results: The most frequently isolated bacterium in the group with hydrofiber dressing (Aquacel®) was *P. aeruginosa* (in the beginning: 44.4%; at the end: 20%), as well as in the group with ointment (in the beginning: 53.3%; at the end: 60%). The mean wound size in patients treated with hydrofiber dressing was 9.6 cm² at the beginning and 8.8 cm² at the end. The mean wound size in patients treated with ointment was 16.4 cm² at the beginning and 19.5 cm² at the end (12,15).

Study 4. This small study included five patients with no progress in venous leg ulcer healing over a mean of 5.2 years. At the beginning, their wound beds were in stage C3 and mean size 24.44 cm². Foam AMD with PHMB® were changed every 3-4 days. Treatment lasted for a mean of 44.7 days or until the wound healed. Results: One wound healed, while the rest were smaller, mean 17.69 cm² at the end. Wound beds were in stage A2 in all patients (12,16).

Study 5. In a randomized clinical study, we evaluated the effects on healing and pain in 14 venous leg ulcers with wound beds C2-3 treated with honey (Vivamel®, group 1) and 16 venous leg ulcers with wound bed C3 treated with antiseptic (AMD with PHMB®, group 2). Results: In group 1, healing results were achieved faster (after one week), but in group 2 there was no pain which persisted in group 1. After two weeks, all ulcers from both groups were in B2 stage according to Falanga's classification of wound bed (12,17).

All the above studies measured only wound size and isolated bacteria, but did not search for biofilm because at that time we did not have possibilities to do it. All the wounds had been persisting for a long time and their wound bed was slough, so the presence of biofilm was quite likely.

CONCLUSION

In our study, we demonstrated that wounds with critical colonization and probably biofilms healed faster when we used dressings with antiseptics.

REFERENCES

1. Percival SL, Bowler PG. Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds* 2004; 16:
2. Alhede MA, Alhede MO. The biofilm challenge. *EWMA J* 2014; 14: 54-8.
3. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 999-1007.
4. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2000; 2: 1051-60.
5. Kirketerp-Moller K, Jensen PO, Fazli M *et al.* Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2717-22.
6. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2:114-22.
7. James GA, Swogger E, Wolcott R *et al.* Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 37-44.
8. Bjarnsholt TK, Kirketerp-Møller S, Kristiansen R *et al.* Silver against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *APMIS* 2007; 115: 921-28.
9. Castellano JJ, Shafii SM, Ko F *et al.* Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int Wound J* 2007; 4: 114-22.
10. Heggors J, Goodheart RE, Washington J *et al.* Therapeutic efficacy of three silver dressings in an infected animal model. *J Burn Care Rehabil* 2005; 26: 53-6.
11. Percival SL, Bowler R, Woods EJ. Assessing the effect of an antimicrobial wound dressing on biofilms. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 52-7.
12. Planinšek Ručigaj T. How to choose the proper dressings for venous leg ulcers. 2nd International Summit on Clinical Pharmacy, December 02-03, 2014 San Francisco, USA. http://www.omicsonline.org/speaker/Tanja_Planinec_Ruigaj_University_Clinical_Centre_Ljubljana_Slovenia_Clinical_Pharmacy2014/
13. Wundheilung Journal of Wound Healing 2, Sonderheft 2005; 9. Kongress der DGfW Europäischer Wundkongress/European Wound Conference, Stuttgart, 15-17 September 2005. Planinšek Ručigaj T. Venous leg ulcers treatment with different alginate dressings (case study) Rucigaj TP*: [poster abstract] 159. Zeitschrift für Wundheilung, 2005, sonderheft 2, p. 276. [COBISS.SI-ID 22411832].
14. Münter KC, Beele H, Russell L *et al.* The CONTOP study: A large-scale, comparative, randomised study in patients treated with a sustained silver- releasing foam dressing, Wundheilung J Wound Healing 2, Sonderheft 2005; 9. Kongress der DGfW Europäischer Wundkongress/European Wound Conference, Stuttgart, 15-17 September 2005: 292.
15. Košček M, Planinšek Ručigaj T. A comparative clinical trial: microbial colonisation of venous leg ulcers treated with hydrofibre dressing or with ointments. V: 2nd World Union of Wound Healing Societies' Meeting, Paris, 8-13 July 2004. Abstract book. [S.l.: s.n., 2004], p. 127. [COBISS.SI-ID 19469017].

16. Planinšek Ručigaj T, Somrak J. Wound management with foam with PHMB. In: EWMA J, EWMA 2010, 26-28 May 2010, Geneva, Switzerland: Get the timing right; 2(10): 273.

17. Planinšek Ručigaj T, Kecelj N, Slana A. Naše izkušnje s prvo slovensko oblogo za zdravljenje kroničnih ran pri infi-

ciranih venskih golenjih razjedah: kontrolirana študija. V: 6. simpozij o ranah z mednarodno udeležbo, Portorož, 12-13 May 2011. Smrke D, ur. Napredno zdravljenje kronične rane in okužbe tkiv: [zbornik predavanj]. Ljubljana: Klinični oddelek za kirurške infekcije, Kirurška klinika, Univerzitetni klinični center, 2011, str. 27-28. [COBISS.SI-ID 28330713]. (in Slovenian)

SAŽETAK

NAŠA KLINIČKA ISKUSTVA S BIOFILMOM

T. PLANINŠEK RUČIGAJ

Klinički bolnički centar Ljubljana, Dermatovenerološka klinika, Ljubljana, Slovenija

Bakterije koje su organizirane u biofilmu nisu osjetljive na uobičajeno liječenje oblogama ili antibioticima. Najuspješnije uklanjamo njihove kolonije kirurškim debridmanom, ali nemamo takve mogućnosti na svakom mjestu. Obloge sa srebrom i drugim antisepticima često su jedino raspoloživo sredstvo medicinskim sestrama u bolesnikovu domu ili dermatologu u ambulantu. U našim kliničkim studijama prije nekoliko godina pokazali smo da su obloge s antisepticima bile učinkovite u svakodnevnoj kliničkoj praksi za uklanjanje bakterija/biofilмова iz kroničnih rana.

Ključne riječi: rana, biofilm, infekcija, antimikrobna obloga, anti-biofilm

KVALITETA ŽIVOTA I PSIHOLOŠKI ASPEKTI U BOLESNIKA S KOŽNIM VRIJEDOM

MIRNA ŠITUM, MAJA KOLIĆ i SANJA ŠPOLJAR

Klinika za kožne i spolne bolesti, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

Prema definiciji kožni vrijed (rana) je prekid anatomskog i funkcionalnog kontinuiteta tkiva. S obzirom na tijek cijeljenja, rane mogu biti akutne i kronične. Kada govorimo o utjecaju rane na kvalitetu života i psihološki status osobe, u prvom redu mislimo na utjecaj kronične rane (vrijeda). Kronične rane su one koje ne zarastaju unutar predviđenog razdoblja u korelaciji s etiologijom i lokalizacijom rane (najkraće razdoblje - 6 tjedana). Kronične rane su rastući socioekonomski problem u razvijenim zemljama i javljaju se u 1-2 % populacije. Procjenjuje se da će taj broj rasti s obzirom na starenje populacije te porast incidencije dijabetesa i pretilosti. Kronične rane imaju veliki utjecaj na kvalitetu bolesnika samih, ali i njihovih obitelji te uzrokuju različite psihološke i socijalne reakcije. Među najčešćim psihološkim reakcijama na kronične bolesti, pa tako i kronične rane, jesu depresivnost, anksioznost, agresivnost i frustracija. Danas se mnogo govori i o utjecaju stresa i negativnih emocija na sporije cijeljenje rana. U nekoliko istraživanja pokazano je da su depresija, anksioznost i ljutnja negativno povezani sa cijeljenjem rana, dok su prihvaćanje i aktivno suočavanje sa stresom pozitivno povezani s brzinom cijeljenja rana.

Ključne riječi: kronične rane, kvaliteta života, depresija, anksioznost

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. Mirna Šitum, dr.med.
Klinika za kožne i spolne bolesti
Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice
Vinogradska cesta 29
10 000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: majakolic@gmail.com

Prema definiciji kožni vrijed (rana) je prekid anatomskog i funkcionalnog kontinuiteta tkiva. S obzirom na tijek cijeljenja rane mogu biti akutne i kronične. Kada govorimo o utjecaju rane na kvalitetu života i psihološki status osobe u prvom redu mislimo na utjecaj kronične rane (vrijeda).

Kronične rane su one koje ne zarastaju unutar predviđenog razdoblja u korelaciji s etiologijom i lokalizacijom rane (najkraće razdoblje - 6 tjedana). Smatra se da oko 22 % kroničnih rana zacijeli za 3-6 mjeseci, 39 % za 6-12 mjeseci, 16 % za 12-24 mjeseca, a 23 % ne zacijeljuje ni za 2 ili više godina (1). Kronične rane mogu biti tipične i atipične. U tipične rane ubrajaju se ishemijske rane (potkoljenični arterijski ulkus), neurotrofičke rane (neuropatski ulkus), hipostatske rane (potkoljenični venski ulkus) te dva posebna entiteta: dekubitus i dijabetičko stopalo. Kronične rane na potkoljenicama su u oko 80 % slučajeva posljedica kronične venske insuficijencije (2), u 5-10 % su arterijske eti-

ologije, dok ostatak otpada uglavnom na neuropatske ulkuse (3). U prošlom stoljeću, a naročito u posljednja dva desetljeća, došlo je do značajnog napretka, posebno u razumijevanju procesa presudnih za cijeljenje rana, a posljedično tome i u liječenju samih ulceracija. Kronične rane su rastući socioekonomski problem u razvijenim zemljama i javljaju se u 1-2 % populacije. Procjenjuje se da će taj broj rasti s obzirom na starenje populacije te porast incidencije dijabetesa i pretilosti. Kronična rana je bolest starije populacije. Potkoljenični ulkus javlja se u 0,6-3 % osoba starijih od 60 godina, a u dobnoj skupini iznad 80 godina taj broj je veći od 5 %. S druge strane, kronične rane imaju veliki utjecaj na kvalitetu života samih bolesnika, ali i njihovih obitelji te uzrokuju različite psihološke i socijalne reakcije (4). Kada govorimo o kvaliteti života treba naglasiti da se ona sastoji od nekoliko različitih aspekata: fizičko funkcioniranje, psihološki status, međuljudski odnosi, seksualno funkcioniranje, svakodnevne aktivnosti i ekonomski status (5). Među najčešćim psihološkim

reakcijama na kronične bolesti, pa tako i na kronične rane, jesu depresivnost, anksioznost (6), agresivnost i frustracija (7). Kod bolesnika s kroničnim ranama često se javlja strah da rana neće zacijeliti, briga oko uspješnosti liječenja, osjećaj nesigurnosti zbog smanjene pokretljivosti (7). Zbog relativno konstantne boli i osjećaja bespomoćnosti bolesnici su često tužni i potišteni. Bol se javlja kod venskih ulceracija u 64-82 %, kod dekubitusa u 59 %, kod dijabetičkog stopala s ulceracijom u 48-75 % (1). Osjećaji srama i nezadovoljstva javljaju se zbog ovisnosti o drugim ljudima i zbog izgleda rane, što rezultira iskrivljenom slikom o sebi i sniženim samopoštovanjem. Zbog nemogućnosti kretanja, lošijeg psihičkog stanja i srama dolazi do socijalne izolacije (8). Takvo ponašanje može rezultirati osjećajem usamljenosti i nedostatkom socijalne podrške (9). S druge strane, kod određenog broja bolesnika kronična rana može imati specifičnu ulogu - može biti sredstvo za privlačenje pozornosti i i usmjeravanje brige okoline na bolesnika. Godine 1986. Wise je uveo termin „socijalni ulkus“ kako bi opisao ovu pojavu (4). U studijama koje su ispitivale utjecaj kroničnih rana na kvalitetu života pokazano je da kronične rane imaju veći utjecaj na kvalitetu života muškaraca nego žena (10), da se s dužinom trajanja bolesti, utjecaj na kvalitetu života postupno smanjuje, što može upućivati na navikavanje bolesnika na bolest i prihvaćanje bolesti (10), te da dolazi do značajnog poboljšanja kvalitete života nakon primjerenog liječenja (11). Danas se mnogo govori i o utjecaju stresa i negativnih emocija na sporije cijeljenje rana. U nekoliko istraživanja pokazano je da su depresija, anksioznost i ljutnja negativno povezani sa cijeljenjem rana, dok su prihvaćanje i aktivno suočavanje sa stresom pozitivno povezani s brzinom cijeljenja rana (12,13). Uz utjecaj psiholoških faktora na imunološke i endokrinološke mehanizme cijeljenja rana te utjecaj na ponašanje i navike povezane sa zdravljem, danas se ispituje i utjecaj psiholoških faktora na stanje kože. Psihološki stres utječe na funkcionalnost zaštitnog sloja kože (14) te sniženu razinu citokina i njegov sporiji oporavak (15).

Godine 2012. u Referentnom centru za kronične rane Ministarstva zdravlja u Klinici za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice provedeno je ispitivanje utjecaja kronične rane na kvalitetu života bolesnika i procjene osobne percepcije bolesti kod bolesnika s kroničnom ranom (16). U istraživanje je bilo uključeno ukupno 100 sudionika oboljelih s kroničnim ranama (s dijagonozom *Ulcus cruris* bilo koje etiologije), od kojih 59 žena i 41 muškarac, u dobi od 31 do 89 godina života. Bolesnici su ispunjavali Upitnik općih podataka o ispitaniku, Upitnik kvalitete života Svjetske zdravstvene organizacije - WHOQOL - BREF i Upitnik osobne percepcije bolesti WHOQOL BREF- IPQ. Rezultati su sljedeći: ispitanici kvalitetu života procjenjuju dobrom (3,20 na

ljestvici od 1 do 5), zadovoljstvo svojim zdravljem kao osrednje (2,88 na ljestvici od 1 do 5), najveći utjecaj bolesti vidi se kod socijalnih odnosa (3,60 na ljestvici od 1 do 5), a najmanji utjecaj bolesti na zadovoljstvo fizičkim zdravljem (3,1325 na ljestvici od 1 do 5). Nije bilo statistički značajne razlike ni u jednoj domeni kvalitete života (zadovoljstvo zdravljem, fizičko zdravlje, psihičko zdravlje, okolina, socijalni odnosi) između muškaraca i žena ni u povezanosti s dobi kod bolesnika oboljelih od kronične rane. Rezultati procjene osobne percepcije bolesti na ljestvici od 1 do 10 su sljedeći: naši bolesnici smatraju da kronična rana značajno utječe na njihov život (7,6), jako su zabrinuti zbog svoje bolesti (7,23), kroničnu ranu doživljaju kao bolest koja traje dugo (8,33), prilično dobro razumiju svoju bolest (7,64), smatraju da bolest ima mnogo simptoma koji utječu na njihov život (7,58), smatraju da imaju relativno dobru kontrolu nad svojom bolesti (6,32), bolest osrednje utječe na njihove emocije (5,84). Također, u ovom istraživanju, pokazana je razlika između muškaraca i žena u intenzitetu utjecaja bolesti na život. Bolest značajno više utječe na žene. Žene više vjeruju u uspješnost liječenja, te bolest ima značajno veći utjecaj na emocionalno stanje žena nego muškaraca (16).

Kronične rane imaju veliki utjecaj na kvalitetu života, dugotrajan su problem u bolesnikovom životu, česti su bolovi, infekcije, otežano je kretanje, bolesnici ne mogu obavljati teže fizičke aktivnosti, nisu sposobni za rad te moraju izostajati s posla, ne mogu se baviti uobičajenim poslovima i hobijima. Dosadašnje spoznaje na području psiholoških aspekata kroničnih rana upućuju na potrebu praćenja psihološkog stanja bolesnika i omogućavanja psihološke podrške i terapije bolesnicima, kako zbog ozbiljnih posljedica bolesti na psihičko stanje pojedinca, tako i zbog mogućeg utjecaja psihološkog stanja na progresiju bolesti, ali u suprotnom slučaju, pozitivnog stava na brže cijeljenje rane.

L I T E R A T U R A

1. Soldo-Belić A, Bulat V, Rajačić N, Tunuković S. Kronična rana – zdravstveni, socijalni i ekonomski problem. U: Šitum M, Soldo-Belić A, ur. Kronične rane. Zagreb: Naklada Slap, 2006, 9-17.
2. O'Brien JF, Grace PA, Perry IJ, Burke PE. Prevalence and aetiology of leg ulcers in Ireland. Ir J Med Sci 2000; 169: 110-2.
3. Lipozenčić J, Marinović Kulišić S. Kronična venska insuficijencija-skleroterapija. Zagreb: Medicinska naklada, 1974.
4. Vurnek M. Psihološki aspekti kroničnih rana. U: Šitum M, Soldo-Belić A, ur. Kronične rane. Zagreb: Naklada Slap, 2006; 205-11.

5. Fitzpatrick R, Fletcher A, Gore S, Jones D, Spiegelhalter D, Cox D. Quality of life measures in health care. I: Applications and issues in assessment. *BMJ* 1992; 305: 1074-7.
6. Dalgard FJ, Gieler U, Tomas-Aragones L i sur. The psychological burden of skin diseases: a cross-sectional multicenter study among dermatological out-patients in 13 European countries. *J Invest Dermatol* 2015; 35: 984-91.
7. Jawień A, Szewczyk MT, Kędziora-Kornatowska K i sur. Functional and biopsychosocial restrictions among patients with a venous ulcer. *Arch Med Sci* 2006; 2: 36-41.
8. Moffatt CJ, Franks PJ, Doherty DC, Smithdale R, Steptoe A. Psychological factors in leg ulceration: a case-control study. *Br J Dermatol* 2009; 161: 750-6.
9. Harper MS, ur. Management and care of the elderly: Psychosocial perspectives. Newbury park, CA: Sage, 1991.
10. Lindholm C, Bjellerup M, Christensen OB, Zederfeldt B. Quality of life in chronic leg ulcer patients. An assessment according to the Nottingham Health Profile. *Acta Derm Venerol* 1993; 73: 440-3.
11. Augustin M, Maier K. Psychosomatic Aspects of Chronic Wounds. *Dermatol Psychosom* 2003; 4: 5-13.
12. George JM, Scott DS, Turner SP, Gregg JM. The effects of psychological factors and physical trauma on recovery from oral surgery. *J Behav Med* 1980; 3: 291-310.
13. Cole-King A, Harding KG. Psychological factors and delayed healing in chronic wounds. *Psychosom Med* 2001; 63: 216-20.
14. Altemus M, Rao B, Dhabhar FS, Ding W, Granstein RD. Stress-induced changes in skin barrier function in healthy women. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 309-17.
15. Kim YK, Maes M. The role of the cytokine network in psychological stress. *Acta Neuropsychiatrica* 2003; 15: 148-55.
16. Brtan Romić R, Brtan A, Romić I, Cvitanović H, Duvančić T, Lugović-Mihic L. Quality of life and perception of disease in patients with chronic leg ulcer. *Acta Clin Croat* 2015; 54: 309-14.

SUMMARY

QUALITY OF LIFE AND PSYCHOLOGICAL ASPECTS IN PATIENTS WITH CHRONIC LEG ULCER

ŠITUM M¹, KOLIĆ M¹, ŠPOLJAR S¹

¹*Clinical Hospital Center "Sestre milosrdnice", Vinogradska cesta 29, 10000 Zagreb, Croatia*

Wound represents a disruption of anatomic and physiologic continuity of the skin. Regarding to the healing process, wounds can be classified as acute or chronic wounds. Quality of life is primarily concerned with the impact of chronic wounds. A wound is considered chronic if healing does not occur within expected period of time regarding to its etiology and localization. Chronic wounds can be classified as typical and atypical. The majority of wounds (95 percent) are typical ones which include ischaemic, neurotrophic and hypostatic ulcer and two separate entities: diabetic foot and decubital ulcers. An 80 percent of chronic wounds localized on lower leg are result of chronic venous insufficiency, in 5-10 percent cause is of arterial etiology, whereas the remainder is mostly neuropathic ulcer. Chronic wounds represent a significant burden to patients, health care professionals and the entire health care system. Chronic wounds affect the elderly population and it is estimated that 1-2 percent of western population suffer from it. This estimate is expected to rise due to an increasing population of the elderly and the diabetic and obesity epidemic. The WHO definition of health is "A state of complete physical, mental and social well-being and not merely the absence of disease or infirmity". Based on this definition, quality of life in relation to health may be defined as "the functional effect of an illness and its consequent therapy upon a patient, as perceived by the patient". The domains that contribute to this effect are physical, psychological and social functioning. The patient's own perceptions of an illness were found to play an important role in explaining quality of life. Chronic wounds significantly decrease the quality of life in a number of ways such as reduced mobility, pain, unpleasant odor, sleep disturbances, social isolation and frustration, and inability to perform everyday duties. Among the most common psychological reactions to chronic diseases, including chronic wounds, are depression, anxiety, aggression and frustration. Psychological factors may not only be a consequence of delayed healing, but may also impact on wound healing. Anxiety and depression have direct influences on endocrine and immune function. About the impact of disease on quality of life and individuals' perceptions of illness, there are questionnaires and methods to analyze this, but the challenge is to move from a focus on wound management to understanding the specific needs of each individual within the context of their life.

Key words: chronic wounds, quality of life, depression, anxiety

UČINCI PRIMJENE PLAZME BOGATE TROMBOCITIMA (PRP) U LIJEČENJU KRONIČNOG VRIJEDA

ZRINJKA PAŠTAR i SANDRA MARINOVIĆ KULIŠIĆ¹

MORH, Zagreb; Sveučilište u Zadru, Odjel za zdravstvene studije, Zadar i

¹Klinički bolnički centar Zagreb, Klinika za dermatologiju i venerologiju, Zagreb, Hrvatska

Venski vrijed je područje diskontinuiteta kože najčešće smješteno u distalnim dijelovima potkoljenica, a posljedica je kronične venske bolesti - venske hipertenzije. Različite je veličine i oblika; može obuhvaćati i cijelu cirkumferenciju ekstremiteta. Terapijski, uz osnovne terapijske mogućnosti, na raspolaganju je mnoštvo različitih obloga. Za pravi izbor obloge potrebno je dobro poznavati generičke skupine obloga, njihovo djelovanje na proces cijeljenja rane, te odstranjenje biofilma u vrijedu koji je odgovoran za komplikacije i necijeljenje vrijeda. Jedna od dodatnih terapijskih opcija je i plazma bogata trombocitima. Plazma bogata trombocitima je terapijski pripravak u području bioregeneracije u medicini uključujući dermatologiju – području koje se razvija i među kliničarima i znanstvenicima. Autologna plazma bogata trombocitima s faktorima rasta i proteinima potiče bioregeneraciju, ali su radi boljeg razumijevanja mehanizama djelovanja i standardizacije protokola potrebna daljnja istraživanja u velikim i dobro dizajniranim studijama.

Ključne riječi: dermatološke indikacije za plazmu bogatu trombocitima, plazma bogata trombocitima, ulkusi

Adresa za dopisivanje: Doc. dr. sc. Zrinjka Paštar, dr. med.
MORH
Av. Gojka Šuška 6
10 000 Zagreb, Hrvatska
i
Odjel za zdravstvene studije
Sveučilište u Zadru, Splitska 1
57 000 Zadar, Hrvatska
E-pošta: : zpastar@hotmail.com

UVOD

Venski vrijed je područje diskontinuiteta kože, najčešće smješteno u distalnim dijelovima potkoljenica, a posljedica je kronične venske bolesti - venske hipertenzije. Različite je veličine i oblika, ponekad obuhvaća i cijelu cirkumferenciju ekstremiteta.

U posljednjem desetljeću istraživanjem kronične venske bolesti (KVB) došlo se do novih spoznaja o upalnom procesu: migracija leukocita, aktivacija plazma stanica i granulocita te povišena aktivnost metaloproteinaze – što sve zajedno uzrokuje oštećenje venskih zalistaka. Drugi važan čimbenik uključen u patofiziologiju venskog vrijeda je oštećena mišićna aktivnost. Mišićna funkcija u potkoljenici zdrave populacije povećava brzinu protoka krvi i održava ravnotežu tekućine u cirkulaciji. U bolesnika s nepravilnom mišićnom funkcijom često nastaju promjene na koži i teži stadij KVB te nastanak vrijeda.

Epidemiološki gledano, učestalost venskog vrijeda, kao najteže manifestacije kronične venske bolesti, značajno raste s dobi populacije. Venski vrijed najčešće ne nastaje prije 60. godine života, a iznosi 0,7 % kod osoba starijih od 70 godina. Broj pacijenata koji pate od KVB je potcijenjen, jer je teško definirati bolest. Iako je klinički tijek KVB postepen, ipak tijekom vremena vrijed i KVB negativno utječu na zdravlje i kvalitetu života (1,2).

Suportivne obloge u liječenju vrijeda su važan dio skrbi za bolesnike. Za pravi izbor obloge potrebno je dobro poznavanje generičke skupine obloga, njihovo djelovanje na proces cijeljenja rane, te odstranjenje biofilma u vrijedu koji je odgovoran za komplikacije i necijeljenje vrijeda. Svakako uz osnovnu terapiju jedna od dodatnih opcija je i plazma bogata trombocitima (engl. *Platelet-Rich Plasma*) (PRP).

PRP je frakcija plazme s koncentracijom trombocita tri do pet puta većom od normalne koncentracije

odnosno volumen autologne plazme koji sadrži koncentraciju trombocita iznad bazične koncentracije od 150 000-350 000/mL (1-8). PRP se dobije u određenoj/ maloj količini autologne plazme nakon centrifugiranja prema točno određenom protokolu pri čemu se druge stanice odvajaju od plazme (1-3).

PRP je u primjeni u medicini od osamdesetih godina prošlog stoljeća nakon otkrića oslobađanja bioaktivnih molekula i faktora rasta kao promotora regeneracije tkiva odnosno bioregeneratora dokazanih u studijama *in vitro* i *in vivo*. Prva primjena se opisuje u zacjeljivanju i epitelizaciji rana i ulkusa, a potom su se indikacije u regenerativne svrhe razvile i u ostalim granama medicine (1-12). Posljednjih godina indikacije su se proširile na estetsku medicinu i to naročito za rejuvinaciju kože, posebice kože lica. Prema navedenom, indikacije za primjenu su široke, a važno je napomenuti ograničene znanstvene dokaze za navedene indikacije s obzirom na nedostatak dobro dizajniranih studija koje analiziraju učinkovitost PRP i nedostatak standardizacije protokola korištenja PRP, dok istodobno postoji veliki broj objavljenih prikaza slučajeva i malih studija (3,10,12).

PRP se dijeli na PRP, plazmu bogatu faktorima rasta (engl. *Plasma-Rich Growth Factors*) (PRGF), plazmu bogatu trombocitima i faktorima rasta (engl. *Platelet-Rich Plasma and Growth Factors*) (PRPGF), trombocitima siromašnu plazmu (engl. *Platelet-Poor Plasma*) (PPP), leukocitima bogatu PRP (engl. *Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma*) (LR-PRP) i leukocitima siromašnu PRP (engl. *Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma*) (LP-PRP) (3). Koncentracije trombocita, leukocita i faktora rasta ovise o koncentraciji trombocita u preparatu. Važno je naglasiti da uz te varijacije na tržištu postoji najmanje šesnaest različitih komercijalnih PRP proizvoda.

MEHANIZAM DJELOVANJA

PRP ima direktan učinak na različite faktore rasta kao i učinak na ekstracelularni matriks u smislu stimulacije, regeneracije i reparacije tkiva (3,6,13,14). U učinku na faktore rasta važnu ulogu imaju trombociti koji osim dobro poznate uloge u hemostazi imaju esencijalnu ulogu u bioregeneraciji. Trombociti su biokemijski bogati regulatornim i signalizirajućim molekulama kao i faktorima rasta koji sudjeluju u poticanju fizioloških procesa obnavljanja, zacjeljivanja i reparacije tkiva kao odgovora na ozljedu. Naime, aktivirani trombociti se agregiraju kao dio homeostatske funkcije pri čemu luče proteine i druge biološki aktivne molekule s poticanjem kaskade sekundarnih signalnih molekula što je posebno izraženo pri koncentraciji trombocita iznad

normalnih vrijednosti (6,13,14). U PRP se nalaze bioaktivne molekule s različitim preklapajućim funkcijama angiogeneze, proliferacije, migracije i diferencijacije stanica u bioregeneraciji. Bioaktivne molekule su faktori rasta iz trombocita (engl. *Platelet-Derived Growth Factor*), transformirajući faktori rasta (engl. *Transforming Growth Factor*), trombocitni faktor 4 (engl. *Platelet Factor 4*), interleukin 1, trombocitni faktor angio-geneze (engl. *Platelet-Derived Angiogenesis Factor*), vaskularni endotelijalni faktor rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*), epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal Growth Factor*), trombocitni endotelijalni faktor rasta (engl. *Platelet-Derived Endothelial Growth Factor*), faktor rasta epitelijalnih stanica (engl. *Epithelial Cell Growth Factor*), faktor rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast Growth Factor*) i faktor rasta poput inzulina (engl. *Insulin-like Growth Factor*).

Epidermalni faktor rasta (EGF) nastaje u trombocitima i makrofazima i stimulira fibroblaste na izlučivanje kolagenaze koja razgrađuje matriks u fazi remodelacije.

Transformirajući faktor rasta (TGF) se nalazi u trombocitima, makrofazima, limfocitima i hepatocitima.

Vaskularno endotelni faktor rasta (VEGF) stvaraju endotelne stanice i glavna funkcija je angiogeneze za vrijeme tkivne hipoksije.

Fibroblastni faktor rasta (FGF) nalazi se u makrofazima, mastocitima i T-limfocitima; potiče angiogenezu, granulaciju i epitelizaciju.

Trombocitno derivirajući faktor rasta (PDGF) sadržavaju trombociti, a također i makrofazi i endotelne stanice. Taj faktor privlači makrofage i fibroblaste na mjestu oštećenja tkiva, a pospješuje i sintezu kolagena.

Keratinocitni faktor rasta izlučuju fibroblasti, a stimuliraju migraciju keratinocita i njihovu diferencijaciju i proliferaciju.

Faktori rasta su neka vrsta međustanične signalizacije koja uređuje i usmjeruje cijeli kompleks tijekom stanične diobe, migracije, diferencijacije i produkcije različitih proteina tijekom cijeljenja rane. Taj je proces reguliran inhibitorom metaloproteinaze 1 (TIMP-1), koji sprječava nepotrebno oštećenje zdravog tkiva. (15-22).

Antibakterijska uloga PRP se odvija preko proteina trombocita, posebno trombocidina s baktericidnim i fungicidnim svojstvima, te leukocitnim funkcijama. PRP nadalje utječe na ekstracelularni matriks putem fibrina, fibronektina i vitronektina koje su, osim trombocita, druge esencijalne komponente PRP. Radi se o

proteinima koji potiču adheziju stanica što daje osnovu za strukturnu potporu esencijalnu za migraciju stanica, proliferaciju i trodimenzionalni rast tkiva oko ovih struktura. Sveukupni učinak se sastoji od migracije nediferenciranih stanica u novostvoreni matriks i poticanje diferencijacije stanica, supresije lučenja upalnih citokina i ograničavanja upale, migracije makrofaga koji sudjeluju u reparaciji tkiva, angiogenezi i poticanju epitelizacije (3,6,13,14).

Neki sistemi PRP koriste kao aktivatore trombin ili kalcij-klorid pri čemu dolazi do bržeg otpuštanja bioregeneracijskih molekula. Neki autori dovode u pitanje i učinkovitost ovih sistema, posebno u dermatološkoj primjeni s obzirom da se neaktivirani trombociti aktiviraju u tkivu te tako postepeno otpuštaju bioregeneracijske molekule tijekom sljedećih sedam dana koji tijekom sljedećih šest tjedna djeluju na ciljane molekule. Trenutno nema dokaza o onkogenom potencijalu PRP kao ni sistemskog učinka nakon lokalne primjene (15). S obzirom na način pripreme i primjene potrebni su sterilni uvjeti, kontrolni pregledi pacijenta te korištenje komercijalnih kitova s oznakom CE. Ako se plazma dobiva manualno, potrebno je učiniti test sterilnosti (3).

Najčešće nuspojave uz infekcije su hematomi, bolnost na mjestu aplikacije, diskoloracija kože, a očekivani eritem i žarenje kože traju do 24 h.

Kontraindikacije su trombocitopenija, anemija, hipofibrinogenemija, hemodinamska nestabilnost, sepsa, akutne i kronične infekcije, kronična bolest jetre, anti-koagulacijska terapija, tumori, autoimune bolesti, nestabilna angina, metaboličke bolesti, sistemske bolesti, porfirija, alkoholizam, ovisnost o nikotinu i drogama (1).

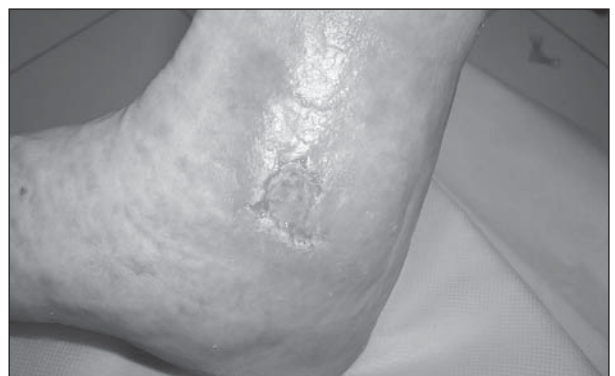
PRP I KRONIČNE ULCERACIJE

Prva uloga PRP bila je upravo u liječenju kroničnih ulkusa koji su najčešće vaskularne etiologije kod dijabetičara ili dekubitusa koje karakterizira produljena upalna faza s brojnim proupalnim citokinima u usporedbi s akutnim ulkusima i nedostatkom faktora rasta koji se razgrađuju pod utjecajem bakterija, proteaza i deficitom fibrina (3,8-10,14,23). Prevalencija potkoljeničnog vrijeda varira od 0,1 % do 0,6 % ukupne populacije, a 1 % populacije tijekom života barem jednom oboli od potkoljeničnog vrijeda (22). Incidencija venskih ulkusa je 72 %, arterijskih 23 %, dekubitusa 4 % te 1 % ostalih etiologija (21,22). Prvi preparati su bili topički s kolagenom uloženim u protein trombocita, tzv. trombocitna formula zacjeljivanja (engl. *Platelet-derived Wound Healing Formula*) (20). Od tada su

razvijeni različiti pripravci kao solucije, gelovi i injekcije). PRP se također koristi kao adjuvantna terapija pri presađivanju kod liječenja rezistentnih ulkusa (18-22). Prema literaturi, većinom se radi o prezentaciji slučajeva ili malim studijama s različitom etiologijom ulkusa i načinom primjene PRP te su svakako potrebne daljnje studije sa statističkom značajnošću za potvrdu uloge PRP kod kožnih ulkusa (8-10,22). PRP se u navedenoj indikaciji može aplicirati sam (solucija, gel, injekcije) ili u kombinaciji sa suportivnim bio-okluzivnim oblogama. Vrijed ne smije imati znakove kliničke infekcije te prema protokolu za rane mora biti u fazi granulacijskog tkiva (sl. 1 i 2). Najčešće se PRP primijenjuje svakih šest tjedana najmanje tri puta.



Sl. 1. Izgled ulkusa prije terapije.



Sl. 2. Izgled ulkusa tri tjedna nakon primjene PRP: vidi se početna epitelizacija uz granulacijsko tkivo.

Premda je autologna primjena PRP skupa, omjer troška i koristi ("cost-benefit") je evidentan u terapiji ulkusa i rana općenito.

CILJANI MEHANIZMI DJELOVANJA PRP I FAKTORA RASTA KOD ULKUSA

Prednost PRP pred drugim terapijama je akceleriranje regenerativnih procesa općenito putem gore navedenih faktora rasta iz trombocita.

Zacjeljivanje rana i ulkusa PRP potiče se u prvom redu putem sedam faktora rasta: PDGF- $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, FGF, VEGF, EGF i TGF (8,10). Navedeni faktori rasta su esencijalni u moduliranju aktivacije mezenhimnih stanica, proliferaciji i sintezi ekstracelularnog matriksa u procesu zacjeljivanja. *In vitro* je dokazano da PDGF stimulira kemotaksiju, proliferaciju i ekspresiju novih gena ponajprije na monocitima, makrofazima i fibroblastima odnosno na stanicama koje su esencijalne u procesu zacjeljivanja (8,10,20). Nadalje, važno je naglasiti ulogu TGF- β koji, uz stimulaciju proliferacije stanica, sinteze proteina i kolagena, inhibira i rast brojnih epitel-nih tumorskih stanica kod dugotrajnih ulkusa i rana.

U angiogenezi, osim VEGF, i polipeptidni trombocitni faktor angiogeneze stimulira rast novih kapilara inducirajući migraciju endotel-nih stanica.

EGF, kao osnovni mitogen za brojne stanice uključujući epitelne stanice i fibroblaste, dijelom je odgovoran za inicijalnu infiltraciju neutrofila u ranu. Smatra se da taj mehanizam putem faktora rasta trombocita utječe na angiogenezu i revaskularizaciju te da potiče granulaciju (8,20).

Uz ove faktore, leukociti koji se nalaze u preparatima PRP, imaju uz važnu i nepobitnu protuupalnu ulogu i ulogu u zacjeljivanju i epitelizaciji ulkusa (8,20).

S obzirom na sastav PRP, a to se posebno odnosi na količinu i trombocita i leukocita, te s obzirom na različite preparate dostupne na tržištu te na činjenicu da neke ustanove rade i same svoje vlastite autologne PRP preparate (koji nisu apsolutno kontrolirani s obzirom na sastav i učinkovitost i nedostatak CE certifikata) te nepostojećeg konsenzusa o terapiji ulkusa PRP-om, potrebne su daljnje studije radi standardizacije preparata i protokola korištenja PRP u terapiji ulkusa.

DRUGE DERMATOLOŠKE INDIKACIJE

PRP i alopecije

Uloga PRP u porastu kose kod androgene alopecije muškaraca i žena je demonstrirana *in vitro* putem navedenih faktora rasta. Posebice je dokazan učinak folikularnog faktora rasta 7 i katenina s aktivacijom ekstracelularne kinaze i Akt-ovisnog signalnog puta i Ki-67 koji sudjeluju u regulaciji folikularnog ciklusa kontrolirajući aktivnu fazu rasta dlake i koji potiču katarogenu ili telogenu indukciju, ali i putem angiogenih faktora. Povoljan učinak *in vivo* dokazan je stimulacijom rasta kose i povećanjem gustoće kose pri tretmanu PRP prije transplantacije kose, putem dermoskopske analize nakon tretmana, smanjenjem pečenja ili svrbeža vlasišta, patohistološke evaluacije i povećanja

debljine epidermisa i broju folikula dva tjedna nakon zadnje aplikacije PRP u usporedbi s početnim nalazima (17,18,24-29).

PRP se u navedenim indikacijama može aplicirati sam ili u kombinaciji s mezoterapijom. Aplikacija se može provesti ubodima igle, dermarolerom i/ili *microneedling*-om.

Vlastito iskustvo s dva pacijenta kojima je provedena primjena PRP u kombinaciji s mezoterapijom XL HAIR® 5ml i RRS® SILISORG 5ml SKIN TECH svakih 3 tjedna kombinacijom tehnike ubodima igle i *microneedling*-a "Amira" s tri igle, a između toga 1 x tjedno mezoterapijom XL HAIR® 5 mL i RRS® SILISORG 5 mL SKIN TECH kombinacijom tehnike ubodima igle i *microneedling*-a s tri igle ukazuje na početni porast kose nakon tri mjeseca.

OSTALE INDIKACIJE

U dermatologiji se PRP koristi u procesu rejuvinacije, najčešće u kombinaciji s drugim metodama; nakon tretmana ablativnim laserima radi brže regresije edema i eritema uz istodobni klinički učinak na izgled kože, pri liječenju ožiljaka akne i posttraumatskih ožiljaka u kombinaciji s drugim metodama kao frakcijskim laserom i centrifugiranim masnim tkivom; kod hidradenitis suppurativa rezistentnog na druge tretmane u kombinaciji s kirurškim liječenjem i hijalomatriksom odnosno sa sistemom koji oslobađa hijaluronsku kiselinu; kod venskih, arterijskih, dijabetičkih ulkusa i dekubitusa (3,8-12,16-25).

Prema studijama *in vivo* mehanizam bioregeneracije kože PRP podrazumijeva stimulaciju proliferacije fibroblasta s povećanjem protuupalnih i angiogenih faktora te proteina ekstracelularnog matriksa kao što su prokolagen I, hijaluronska kiselina, inhibitori tkivne metalopeptidaze 1 (3,11,13). Prokolagen 1 povećava dermalnu rezistenciju; hijaluronska kiselina kao hidratantna molekula pojačava tonus kože i koristi kao lubrificirajuća komponenta između kolagenih vlakana; inhibitor tkivne metalopeptidaze stabilizira ekstracelularni matriks.

ZAKLJUČAK

PRP kao autologni bioregenerator sudjeluje u stimulaciji regeneracije tkiva. Mehanizam djelovanja temelji se na velikom broju raznovidnih i multifunkcionalnih faktora rasta i proteina koji potiču fiziološke procese zacjeljivanja i reparacije.

Primjena PRP je u raznolikim područjima medicine, od kirurgije, ortopedije, dentalne medicine, plastične i maksilofacijalne kirurgije do dermatoloških indikacija, posebno u području ulkusa. Premda se PRP kod ulkusa primijenjuje svakih šest tjedana najmanje tri puta, naglašavamo nepostojeći konsenzus o terapiji ulkusa PRP-om, samostalnom ili u kombinaciji sa suportivnim bio-okluzivnim oblogama. U literaturi se većinom radi o prezentaciji slučajeva ili malim studijama s različitom etiologijom ulkusa i načinom primjene PRP, te su stoga potrebne daljnje dobro dizajnirane studije radi standardizacije preparata i formulacije PRP te protokola korištenja PRP u terapiji ulkusa sa statističkom značajnošću za potvrdu uloge PRP kod kožnih vrijedova uz podrobno poznavanje mehanizama djelovanja PRP na molekularnoj razini u bioregeneraciji (8-10,22).

L I T E R A T U R A

1. Harmon K, Hanson R, Bowen J i sur. The International Cellular Medical Society: Guidelines for the Use of Platelet Rich Plasma. *Br J Sports Med* 2011; 44: 616-17.
2. Arshdeep K, Kumaran MS. Platelet-rich plasma in dermatology: Boon or a bane? *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2014; 80: 5-14.
3. Conde Montero E, Fernández Santos ME, Suárez Fernández R. Platelet-Rich Plasma: Applications in Dermatology. *Actas Dermosifiliogr* 2015; 106: 104-11.
4. Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ i sur. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 12: CD010071.
5. Wroblewski AP, Melia HJ, Wright VJ. Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair. *Oper Tech Orthop* 2010; 20: 98-105.
6. Wasterlain AS, Braun HJ, Dragoo JL. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Oper Tech Orthop* 2012; 22: 33-42.
7. Jeong KH, Shin MK, Kim NI. Refractory lipodermatosclerosis treated with intralesional platelet-rich plasma. *J Am Acad Dermatol* 2011; 65: e157-8.
8. Ficarelli E, Bernuzzi G, Tognetti E i sur. Treatment of chronic venous leg ulcers by platelet gel. *Dermatol Ther* 2008; 21: S13-7.
9. Bernuzzi G, Tardito S, Bussolati O i sur. Platelet gel in the treatment of cutaneous ulcers: The experience of the immunohaematology and transfusion center of Parma. *Blood Transfus* 2010; 8: 237-47.
10. Driver VR, Hanft J, Fylling CP, Beriou JM, Autologous Diabetic Foot Ulcer Study Group. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers. *Ost Wound Manage* 2006; 52: 68-87.
11. Kim DH, Je YJ, Kim CD i sur. Can platelet-rich plasma be used for skin rejuvenation? Evaluation of effects of platelet-rich plasma on human dermal fibroblast. *Ann Dermatol* 2011; 23: 424-31.
12. Redaelli A, Romano D, Marciano A. Face and neck revitalization with platelet-rich plasma (PRP): Clinical outcome in a series of 23 consecutively treated patients. *J Drugs Dermatol* 2010; 9: 466-72.
13. Park HB, Yang JH, Chung KH. Characterization of the cytokine profile of platelet rich plasma (PRP) and PRP-induced cell proliferation and migration: Upregulation of matrix metalloproteinase-1 and-9 in HaCaT cells. *Korean J Hematol* 2011; 46: 265-73.
14. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91: 4-15.
15. Martinez-González JM, Cano-Sanchez J, Gonzalo-La-fuente JC i sur. Do ambulatory- use platelet-rich plasma (PRP) concentrates present risks? *Med Oral* 2002; 7: 375-90.
16. Na JI, Choi JW, Choi HR i sur. Rapid healing and reduced erythema after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing combined with the application of autologous platelet rich plasma. *Dermatol Surg* 2011; 37: 463-8.
17. Mehryan P, Zartab H, Rajabi A i sur. Assessment of efficacy of platelet-rich plasma (PRP) on orbital dark circles and crow's feet wrinkles. *J Cosmet Dermatol* 2014; 13: 72-8.
18. Fabi S, Sundaram H. The potential of topical and injectable growth factors and cytokines for skin rejuvenation. *Facial Plast Surg* 2014; 30: 157-71.
19. Cervelli V, Garcovich S, Bielli A. The Effect of Autologous Activated Platelet Rich Plasma (AA-PRP) Injection on Pattern Hair Loss: Clinical and Histomorphometric Evaluation. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 760709.
20. Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD, Schummerth S, Butler E, Cerra F. Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obst* 1990; 170: 56-60.
21. Chen TM, Tsai JC, Burnouf T. A novel technique combining platelet gel, skin graft, and fibrin glue for healing recalcitrant lower extremity ulcers. *Dermatol Surg* 2010; 36: 453-60.
22. Marinović Kulišić S. Prevencija potkoljeničnog vrijeda. *Acta Med Croatica* 2013; 67 (Supl. 1): 45-50.
23. Li ZJ, Choi HI, Choi DK i sur. Autologous platelet-rich plasma: A potential therapeutic tool for promoting hair growth. *Dermatol Surg* 2012; 38: 1040-6.
24. Kang JS, Zheng Z, Choi MJ i sur. The effect of CD34+ cell-containing autologous platelet-rich plasma injection on pattern hair loss: A preliminary study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; 28: 72-9.
25. Lee JW, Kim BJ, Kim MN, Mun SK. The efficacy of autologous platelet rich plasma combined with ablative carbon dioxide fractional resurfacing for acne scars: A simultaneous split-face trial. *Dermatol Surg* 2011; 37: 931-8.

26. Nicoli F, Balzani A, Lazzeri D i sur. Severe hidradenitis suppurativa treatment using platelet- rich plasma gel and Hyalomatrix. *Int Wound J* 2015; 12: 338-43.

27. Kang BK, Kang IJ, Jeong KH i sur. Treatment of glabella skin necrosis following injection of Hyaluronic acid-filler using platelet-rich plasma. *J Cosmet Laser Ther* 2015; 8: 1-5.

28. Diaz-Ley B, Cuevas J, Alonso-Castro L i sur. Benefits of plasma rich in growth factors (PRGF) in skin photodamage: Clinical reapse and histological assessment. *Dermatol Ther*. 2015; [Epub ahead of print].

29. Yuksel EP, Sahin G, Aydin F i sur. Evaluation of effects of platelet-rich plasma in human facial skin. *J Cosmet Laser Ther* 2014; 16: 206-8.

SUMMARY

EFFECTS OF PLATELET-RICH PLASMA IN THE TREATMENT OF CHRONIC ULCER

Z. PAŠTAR and S. MARINOVIĆ KULIŠIĆ¹

Ministry of Defence Republic of Croatia and Department of Health Studies, University of Zadar, Zadar;
¹Zagreb Clinical Hospital Center, Clinical Department of Dermatovenereology, Zagreb, Croatia

A venous ulcer is area of discontinuity of the skin, usually localised in distal parts of the lower legs. The aetiology is associated with chronic venous disease-venous hypertension. The size and shape of venous ulcer can be different and it may even cover all circumferential of extremity. Additionally, along with basic therapy possibilities, there are many different dressings. Therefore the knowledge of each characteristic of dressing on process of epithelisation is essential as well as treating the biofilm that is responsible for complications and persistence of ulcer. One of additional therapy possibility is platelet-rich plasma.

Platelet-rich plasma is a developing area for clinicians and researchers for bioregeneration in multiple fields of medicine including dermatology. Autologous platelet-rich plasma with its growth factors and proteins accelerates bioregeneration. However, better understanding of the mechanisms and development of standardized protocols with well-designed studies are needed.

Key words: platelet-rich plasma, ulcers, dermatologic indications

ZAKLJUČNE SPOZNAJE O BIOFILMU I ANTIMIKROBNIM OBLOGAMA

JASNA LIPOZENČIĆ, SUZANA TUNUKOVIĆ, JASENKA ŠKRLIN, SANDRA MARINOVIĆ KULIŠIĆ, TANJA PLANINŠEK RUČIGAJ I NASTJA KUČIŠEC TEPEŠ

Akademijin znanstveni simpozij „Uloga biofilma u liječenju vrijeda“ uz potporu *Stoma Medical* dokazuje svoju edukativnu ulogu. U ovom broju AMC donosimo suvremene spoznaje o kroničnoj venskoj bolesti (KVB) koje trebaju poznavati liječnici različitih specijalnosti: dermatovenerolozi, mikrobiolozi, plastični kirurzi, liječnici obiteljske medicine i drugi. U razvijenim zemljama oko 1-2 % stanovništva boluje od KVB tijekom života (1,2). U Velikoj Britaniji trošak za kronične rane iznosi 2,3-3,1 milijardu funti godišnje (3). Stoga, ovaj Simpozij ima i farmakoeкономsku ulogu. Iz radova predavača naglašene su spoznaje koje navodimo:

1. Kronični vrijed (KV) treba razmatrati prema etiološkoj, anatomske i patofiziološke klasifikaciji prema *American Vascular Forum* (AVF), a također i prema kliničkoj klasifikaciji (CEAP). Bakterije u ranama podržavaju već prisutnu kroničnu upalnu reakciju čime potiču otpuštanje enzima, uništavaju proteine i reaktivne metabolite spojeva kisika, tkivo, povećava se eksudat i propusnost kapilara, javlja se bolnost, daljnja maceracija i nastaje vrijed. Prisutnost mikroba potiče i podržava daljnje oštećenje tkiva. Nekontrolirani eksudat, kronična upala s vremenom dovodi do daljnjeg pogoršanja kroničnog vrijeda koje povećava troškove liječenja. Posljednjih godina je istraživanje mikroorganizama u vrijedu istaknulo postojanje biofilma kao uzroka necijeljenja vrijeda (1).
2. Dijagnozu KV treba temeljiti na anamnezi, fizikalnom statusu i laboratorijskoj obradi: mikrobiološka, biokemijska, patohistološka, radiološka snimanje, oksimetrija i gležnanski indeks – ABPI (4-6).
3. Neophodna je primjena postupnika prema Metcalfu, Bowleru i Hurolwu „*A clinical algorithm for wound biofilm identification*“, koji prikazujemo uz dopuštenje autora u cijelosti (5).
4. Prevencija i liječenje bolesnika s KVB danas je dostupna svim bolesnicima od primjene: sistemske farmakoterapije, kompresivne terapije (kratkoelastični, dugoelastični zavoji, kompresivne čarape), fizikalne medicine i elektrostimulacije (6). Ipak, čim se ranije dijagnosticira, bolja je prognoza i smanjenje postotka oboljelih od KV.
5. Uništenje i sprječavanje reformacije biofilma, te djelovanje na eksudat i infekciju, prednosti su uspješnog djelovanja antimikrobnih obloga s ionskim srebrom i dezinficijensima (7-11).
6. Najnovija tehnologija antimikrobnih obloga sa srebrom i dezinficijensima dokazala se u kliničkim studijama *in vitro* i *in vivo* (11). U SAD-u se procjenjuje da je 17 milijuna ljudi godišnje pogođeno kroničnim

infekcijama uzrokovanim biofilmom, što iznosi od prilike 94 milijarde dolara (1), tako da će se zasigurno u budućnosti prikazati značajna farmakoeкономska isplativost nove tehnologije obloga.

7. KVB u 21. stoljeću predstavlja značajan javno-zdravstveni problem koji narušava kvalitetu života bolesnika ne samo treće životne dobi (12). Stoga treba ubrzano pristupiti primjeni antimikrobnih obloga najnovije generacije. One su idealne obloge, jer kontroliraju lokalne prepreke u liječenju rane – višak eksudata, infekciju, biofilm te pružaju zaštitu rane i okolne kože te na taj način potiču cijeljenje.
8. Ovaj tematski broj o kroničnom vrijedu u Akademijinom glasilu *Acta Medica Croatica* doprinos je stalnoj medicinskoj edukaciji što je zadaća Akademije medicinskih znanosti Hrvatske.

L I T E R A T U R A

1. Parsons D, Metcalf DG. Next-generation antimicrobial dressings: AQUACEL[®] Ag+ Extra[™] and Ribbon. Wounds International 2014 (Suppl). Available to download from: www.woundsinternational.com
2. Gottrup F. A specialized wound-healing centre concept: importance of a multidisciplinary department structure and surgical treatment facilities in the treatment of chronic wounds. *Am J Surg* 2004; 187 (5A): 385-435
3. Posnett J, Franks PJ. The burden of chronic wounds. *A the UK Nurs Times* 2008; 104: 44-5.
4. Marinović Kulišić S, Lipozenčić J. Antimikrobne obloge za inficirani vrijed i kliničke spoznaje biofilma. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 23-8
5. Metcalf DG, Bowler PG, Hurlow J. A clinical algorithm for wound biofilm identification *JWC* 2014; 23: 137-43; *AMC* 2016; 70: 73-9
6. Marinović Kulišić S. Kronični vrijed – nove spoznaje o etiopatogenezi i suvremeni terapijski postupak. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 5-18
7. Škrilin J. Utjecaj biofilma na cijeljenje rane i postupak za identifikaciju biofilma u rani. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 29-32
8. Kučičec-Tepeš N. Uloga antiseptika i strategija uklanjanja biofilma kronične rane. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 33-42
9. Planinšek-Ručigaj T. Biofilm i naša klinička iskustva. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 57-60
10. Metcalf D, Parsons D, Bowler P. Razvoj najnovije generacije antimikrobnih obloga za rane. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 49-56
11. Tunuković S. Uloga obloga za uništenje i reformaciju biofilma u vrijedu. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 43-7
12. Šitum M. Kvaliteta života i psihološki aspekti u bolesnika s kožnim vrijedom. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 61-4

SYMPOSIUM CONCLUSIONS

CONCLUSIVE NOTES ON BIOFILM AND ANTIMICROBIAL DRESSINGS

J. LIPOZENČIĆ, S. TUNUKOVIĆ, J. ŠKRILIN, S. MARINOVIĆ KULIŠIĆ, T. PLANINŠEK RUČIGAJ
and N. KUČIŠEC TEPEŠ

The scientific symposium entitled *The Role of Biofilm in the Treatment of Chronic Ulcer*, organized by the Croatian Academy of Medical Sciences with support from Stoma Medical has demonstrated its educational role. This issue of *Acta Medica Croatica* (AMC) brings current concepts on chronic venous disease (CVD), which should be acquired by physicians of various specialties, e.g., dermatovenereologists, microbiologists, plastic surgeons, family physicians, and others. In industrialized countries, 1%-2% of the population suffer from CVD in lifetime (1,2). In Great Britain, health care cost for chronic wound treatment amounts to 2.3-3.1 billion pounds *per year* (3). Therefore, this Symposium also has a pharmacoeconomic role. The following concepts have been extracted from the papers presented at the Symposium:

1. Chronic ulcer (CU) should be approached according to the etiologic, anatomic and pathophysiological classification of the American Venous Forum (AVF) and clinical classification (CEAP). The bacteria present in the wound favor the already existing chronic inflammatory reaction, thus stimulating the release of enzymes, destroying proteins and reactive metabolites of oxygen compounds, as well as the tissue, increasing the exudate and capillary permeability; all this leads to pain, further maceration, and eventually ulceration. The presence of microbes stimulates and sustains further tissue damage. Uncontrolled exudate and chronic inflammation with time lead to further aggravation of chronic ulcer, which greatly increases the cost of treatment. Recent research of the microorganisms present in the wound has highlighted the existence of biofilm as the cause of ulcer non-healing (1).
2. The diagnosis of CU should be based on the history, physical status and laboratory work-up including microbiology, biochemistry, histopathology, radiology, oxymetry and ankle index (ABPI) (4-6).
3. Use of the protocol according to Metcalf, Bowler and Hurlow, *A clinical algorithm for wound biofilm identification*, presented in the whole with the authors' permit, is necessary (5).
4. Prevention and treatment of CVD is nowadays available to all patients, from systemic pharmacotherapy, compressive therapy (short-elastic and long-elastic bandages, compressive stockings), physical medicine and electrical stimulation (6). Yet, the earlier the diagnosis is made, the better is the prognosis and reduction in the number of CU patients.
5. Destruction and prevention of biofilm re-formation, along with acting upon the exudate and infection, are the advantages achieved by the efficient action of antimicrobial dressings with silver ions and disinfectants (7-11).

6. The latest technology of antimicrobial dressings with silver and disinfectants has proved useful in clinical trials *in vitro* and *in vivo* (11). In the USA, it is estimated that 17 million people per year are affected with chronic infections caused by biofilm, entailing a cost of approximately 94 billion USD (1); therefore, significant pharmacoeconomic cost effectiveness of this new technology dressings will certainly be reported in the near future.
7. In the 21st century, CVD poses a major public health problem that considerably reduces the quality of life of not only elderly patients (12). Thus, the use of the latest generation antimicrobial dressings should be quickly introduced. These are optimal dressings because they regulate local obstacles in the wound management, e.g., excessive exudate, infection and biofilm, by providing protection of the wound and adjacent skin, thus favoring wound healing.
8. This thematic AMC issue on chronic ulcer contributes to continuous medical education, which is the task of the Croatian Academy of Medical Sciences.

REFERENCES

1. Parsons D, Metcalf DG. Next-generation antimicrobial dressings: AQUACEL[®] Ag+ Extra[™] and Ribbon. Wounds International 2014 (Suppl). Available to download from: www.woundsinternational.com
2. Gottrup F. A specialized wound-healing centre concept: importance of a multidisciplinary department structure and surgical treatment facilities in the treatment of chronic wounds. *Am J Surg* 2004; 187 (5A): 385-435.
3. Posnett J, Franks PJ. The burden of chronic wounds. *A the UK Nurs Times* 2008; 104: 44-5.
4. Marinović Kulišić S, Lipozenčić J. Antimikrobne obloge za inficirani rani i kliničke spoznaje biofilma. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 23-8.
5. Metcalf DG, Bowler PG, Hurlow J. A clinical algorithm for wound biofilm identification JWC 2014; 23: 137-43; AMC 2016; 70: 73-9
6. Marinović Kulišić S. Kronični rane – nove spoznaje o etiopatogenezi i suvremeni terapijski postupak. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 5-18.
7. Škrilin J. Utjecaj biofilma na cijeljenje rane i postupak za identifikaciju biofilma u rani. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 29-32.
8. Kučišec-Tepeš N. Uloga antiseptika i strategija uklanjanja biofilma kronične rane. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 33-42.
9. Planinšek-Ručigaj T. Biofilm i naša klinička iskustva. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 57-60.
10. Metcalf D, Parsons D, Bowler P. Razvoj najnovije generacije antimikrobnih obloga za rane. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 49-56.
11. Tunuković S. Uloga obloga za uništenje i reformaciju biofilma u vrijeđu. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 49-56.
12. Šitum M. Kvaliteta života i psihološki aspekti u bolesnika s kožnim vriedom. *Acta Med Croatica* 2016; 70: 61-4.

A clinical algorithm for wound biofilm identification

D.G. Metcalf,¹ PhD, Senior Research Advisor;

P.G. Bowler,¹ MPhil, Vice President;

J. Hurlow,² GNP, CWOCN;

¹ Science & Technology R&D, ConvaTec Ltd. UK;

² Wound Practitioner LLC, Memphis, US.

Email: daniel.metcalf@convatec.com

A clinical algorithm for wound biofilm identification

Recognition of the existence of biofilm in chronic wounds is increasing among wound care practitioners, and a growing body of evidence indicates that biofilm contributes significantly to wound recalcitrance. While clinical guidelines regarding the involvement of biofilm in human bacterial infections have been proposed, there remains uncertainty and lack of guidance towards biofilm presence in wounds. The intention of this report is to collate knowledge and evidence of the visual and indirect clinical indicators of wound biofilm, and propose an algorithm designed to facilitate clinical recognition of biofilm and subsequent wound management practices.

wound biofilm; identification; algorithm; clinical assessment

D.G. Metcalf,¹ PhD,
Senior Research Advisor;
P.G. Bowler,¹ MPhil, Vice
President;
J. Hurlow,² GNP,
CWOCN;
¹ Science & Technology
R&D, ConvaTec Ltd. UK;
² Wound Practitioner
LLC, Memphis, US.
Email: daniel.metcalf@
convatec.com

Declaration of interest

D. Metcalf and P. Bowler are employed by ConvaTec Ltd. but have no other conflict of interest to declare. J. Hurlow is owner of Wound Practitioner LLC but has no other conflict of interest to declare.

Chronic wounds are defined by prevention or delay of the normal wound healing process. While underlying etiologies, such as venous insufficiency, ischaemia and hypoxia have a major impact on wound chronicity, microorganisms can also play a significant role.¹ Recent scientific studies have identified the presence of surface-associated bacterial communities in the form of biofilm in chronic wounds.²⁻⁹ Specifically, independent research groups in the US² and Europe³ used specialist microscopic techniques to examine debridement and biopsy samples; both groups observed biofilm microscopically in approximately 60% of all chronic wounds. Subsequent *in vivo* studies using a number of controlled animal models have confirmed that the presence of biofilm in wounds delays healing by interfering with granulation tissue formation, epithelialisation¹⁰⁻¹³ and host defences.¹⁴⁻¹⁹ Additionally, case studies and retrospective clinical studies in patients have demonstrated that biofilm-targeting treatment regimes, including sharp debridement, antibiotics, cleansers and some antimicrobial dressings, improved wound healing outcomes compared to standard care.²⁰⁻²³ This body of evidence now strongly supports the notion that wound biofilm plays a significant role in delaying wound healing.²⁴ Moreover, it is now accepted that biofilm exists in a majority of chronic wounds,²⁻³ is implicated in at least 80% of all human bacterial infections,²⁵⁻²⁶ and is a key risk factor for wound infection.²⁷

In the context of wound care, biofilm may be defined as communities of microorganisms attached to a surface (e.g. wound tissue, wound dressings), embedded within a hydrated matrix of extracellular polymeric substances (EPS; or slime), that provides protection against antimicrobial agents and host defenses. EPS is considered to be predominantly polysaccharide-based (although variable between bacteria),²⁸⁻³⁰ with protein, lipids and DNA also involved.³¹ In most locations where it can develop in the human body (e.g. lungs,³² indwelling devices,³³ catheters³⁴) biofilm is not apparent to the naked eye, either due to its internal location, or due to its microscopic nature. However, in some instances biofilm can exist as a macroscopic and visible structure, for example as a dental plaque in individuals with poor oral hygiene.³⁵ A number of clinicians have recently described what they consider to be visible biofilm in chronic wounds, in the form of translucent, slimy patches or layers,³⁶ or more opaque, green-yellow substance on the wound surface.²⁰ This suspected biofilm is tolerant to many antimicrobial interventions and can re-form quickly after debridement unless managed with effective antimicrobial agents and appropriate dressing technologies.²⁰⁻²¹ Following debridement, exposed bacteria remaining in the wound can re-establish biofilm quickly, often within 24 hours,²⁰ in order to evade host responses and antimicrobial therapies.³⁷ This is in contrast to devitalised host tissue such as slough or fibrin which is much slower to re-form,²⁰ but can itself be a sub-



Fig 1. CLSM images of fluorescent *Pseudomonas aeruginosa* biofilm cultured on membrane filters.⁴³ (A) Fluorescence of the biofilm bacteria. (B) Fluorescence of the dye that stains EPS and bacteria. (C) Fluorescence images of (A) and (B) overlaid.

strate for biofilm formation. Whereas biofilm on the wound surface may be reasonably easy to remove atraumatically using debridement methods such as swabs, fabric pads or curettage, slough is more contiguous with the underlying wound tissue and can be more difficult to remove.²⁰⁻²¹ In addition, proteinaceous, devitalised host tissue may be more responsive to enzymatic or autolytic debridement than the complex EPS of biofilm,²⁰ which may be a way to distinguish between slough and biofilm.

Identification of biofilm

Whether the material frequently observed by clinicians is actually biofilm rather than slough, fibrin or a combination of devitalised host tissue and biofilm is the subject of debate in the scientific and clinical communities.³⁸⁻⁴¹ In the absence of a routine test for the presence and location of wound

biofilm,⁴² this distinction is difficult to confirm. Recently, there have been calls for point-of-care wound biofilm detection methods,^{25,39,41} which, in the future may be useful to guide effective wound bed preparation and dressing selection. In our own laboratories, we have demonstrated how biofilm cultured *in vitro* can be rapidly and specifically stained. Using a membrane filter substrate,⁴³ biofilm of a fluorescent strain of *Pseudomonas aeruginosa* was cultured. The biofilm was then stained with a photosensitive dye, based on dental plaque disclosing agents, that stains EPS and bacteria and fluoresces at a different wavelength to the bacterial fluorescence. This allowed imaging of the biofilm (Figure 1A) and dye location (Figure 1B) separately, by confocal laser scanning microscopy (CLSM). By overlaying these images, the intimate correlation between the biofilm bacteria, surrounding EPS and the dye was apparent (Figure 1C), confirming that

Table 1. Indirect clinical indications of wound biofilm by routine clinical assessment.

Clinical observation	Clinical and scientific commentary
Excessive moisture	Bacteria thrive in a moist environment; excessive moisture is likely to encourage biofilm development. ²¹
Poor-quality granulation tissue e.g. friable, hypergranular	Biofilm may be implicated in friable granulation tissue that has been associated with wound infection. ⁴⁴
Signs of local infection (redness, heat, swelling, pain, odour)	Biofilm is a precursor to infection, ²⁷ and may trigger early warning signs of infection.
History of antibiotic failure or persistent or recurring infection, despite choice of antimicrobial therapy	Biofilm bacteria often evade the action of antibiotics. In the event of antibiotic success, return of an infection following cessation of antibiotics is a sign of continued biofilm presence. ²⁵ Biofilm may contain populations of bacterial persister cells that can survive antimicrobial therapies. They may re-emerge once therapy ceases, acting as seeding agents and recruiters for subsequent biofilm re-formation. ⁴⁵
Culture-negative results despite signs of bacterial colonisation or a high suspicion of clinical infection	Biofilm bacteria metabolise more slowly, reproduce less frequently and show different traits (phenotypes) than planktonic bacteria, and standard microbiological culture techniques are incapable of identifying all species present in wound samples. ⁴⁶ As a result, wound biofilm bacteria are often difficult or impossible to culture. ⁴⁷
Wound remains recalcitrant even though all obvious underlying comorbidities have also been addressed	There is another factor keeping the wound in a chronic state, and this factor, even though it is not always visible, may be biofilm.

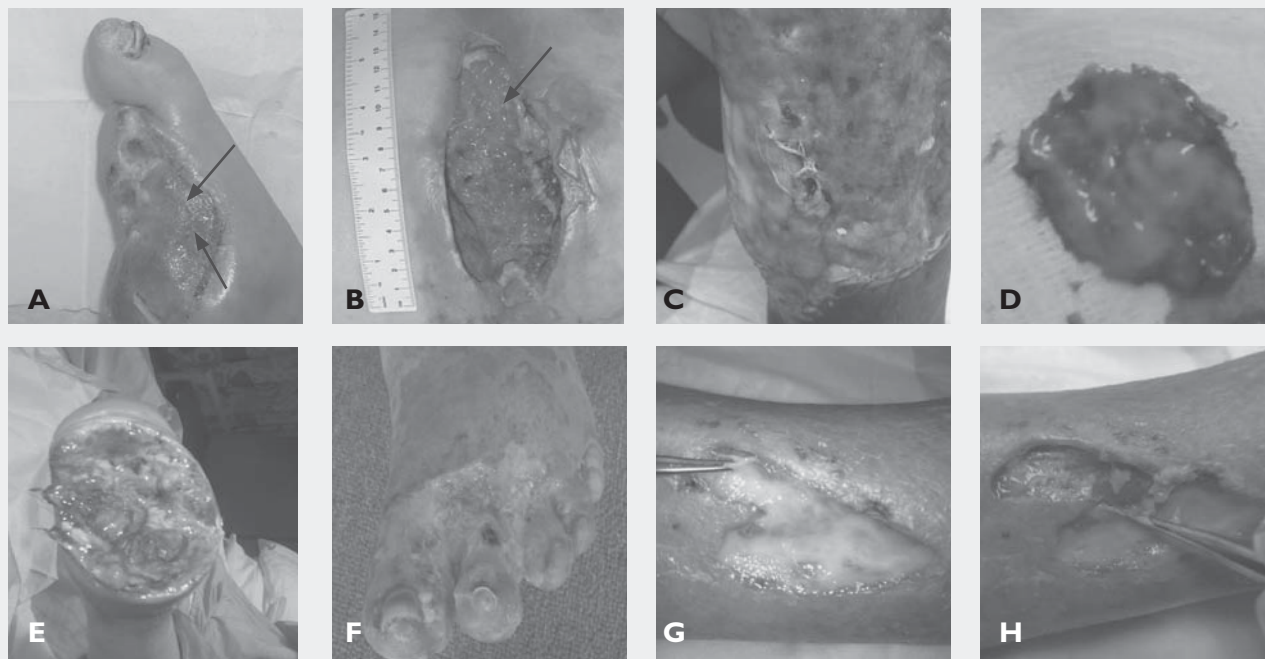


Fig 2. Visual indicators of wound biofilm; (A) a static, non-progressing wound on a stable diabetic patient that had amputation of four toes. The shiny appearance of parts of the wound bed may be biofilm (as indicated by arrows); (B) a stage IV pressure ulcer with a heavily colonised wound bed. There may be a layer of suspected biofilm over some of the wound bed, particularly on the right side of the wound where this substance appears to be slightly thicker and opaque (as indicated by arrow); (C) an ischaemic and infected wound with suspected biofilm forming through and over a previously-applied gauze dressing; (D) green-pigmented suspected biofilm formed within 24 hours in a chronic wound beneath, and on, a silver alginate dressing; (E) forefoot amputation with bone exposure. Viscous, pale, green-blue, slimy suspected biofilm covered most of the wound bed; (F) surgical wound, post-necrotising fasciitis. The subsequent skin graft failed to take, and the wound had been static with minimal progress. The wound surface exhibited yellow suspected biofilm, possibly mixed with slough, with granulation tissue attempting to form beneath; (G) an ischaemic wound exhibiting signs of infection. This suspected biofilm re-formed quickly over granulation tissue despite antibiotic usage; (H) the suspected biofilm could be removed atraumatically using forceps to reveal the granulation tissue beneath.

the fluorescent dye was capable of staining biofilm. The technique of fluorescence detection offers one potential route towards a point-of-care wound biofilm detection method, perhaps using a biofilm stain and a hand-held inspection device. Such a device could be used to inspect wounds for biofilm to aid effective debridement and cleansing and to monitor wound status over time, although this might be limited to detecting surface-associated biofilm rather than any invasive, sub-surface biofilm.

However, even in the absence of a point-of-care biofilm visualisation technique, it is possible to compile clinical indicators and conditions that can facilitate judgement on the presence or absence of wound biofilm, based on current understanding of biofilm formation, composition, appearance, behaviour and treatment strategies. The intention of the current work is to consider ways in which wounds can be assessed for biofilm, and to propose a clinical algorithm that is designed to help clinicians to determine the presence of biofilm.

Visual indicators of wound biofilm

In some established chronic wounds, biofilm formation may progress to a stage where it is macroscopic and visible to the experienced naked eye. For example, a shiny, translucent substance on the surface of the wound (Fig 2A) may be indicative of thin but observable biofilm, careful debridement of which may reveal a healthier wound bed.²⁰ At this stage, the wound may be cleansed and covered with an appropriate dressing that minimises the opportunity for remaining bacteria to re-form biofilm. Wound biofilm may also present as opaque, loosely-attached patches in some parts of the wound (Fig 2B), that can be carefully and atraumatically dislodged using standard debridement methods.²¹ Viscous, slimy or gel-like substances can form on, beneath or even within some dressings (Fig 2C), including some antimicrobial dressings (Fig 2D). In some instances, the proliferation of certain bacterial species can result in the secretion of pigments, and in the case of two common wound-associated pathogens, *Pseudomonas aeruginosa*

References

- 1 Edwards, R., Harding, K.G. Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17: 2, 91–96.
- 2 James, G.A., Swogger, E., Wolcott, R., et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 1, 37–44.
- 3 Kirketerp-Møller, K., Jensen, P.O., Fazli, M., et al. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 8, 2717–2722.
- 4 Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jensen, P.O., et al. Why chronic wounds will not heal: A novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 1, 2–10.
- 5 Fazli, M., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., et al. Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 12, 4084–4089.
- 6 Fazli, M., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., et al. Quantitative analysis of the cellular inflammatory response against biofilm bacteria in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2011; 19: 3, 387–391.
- 7 Kennedy, P., Brammah, S., Wills, E. Burns, biofilm and a new appraisal of burn wound sepsis. *Burns* 2010; 36: 1, 49–56.
- 8 Han, A., Zenilman, J.M., Melendez, J.H., et al. The importance of a multifaceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2011; 19: 5, 532–541.
- 9 Neut, D., Tjidsen-Creusen, E.J., Bulstra, S.K., et al. Biofilms in chronic diabetic foot ulcers – a study of 2 cases. *Acta Orthopaedica* 2011; 82: 3, 383–385.
- 10 Schierle, C.F., de la Garza, M., Mustoe, T.A., et al. Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair Regen* 2009; 17: 3, 354–359.

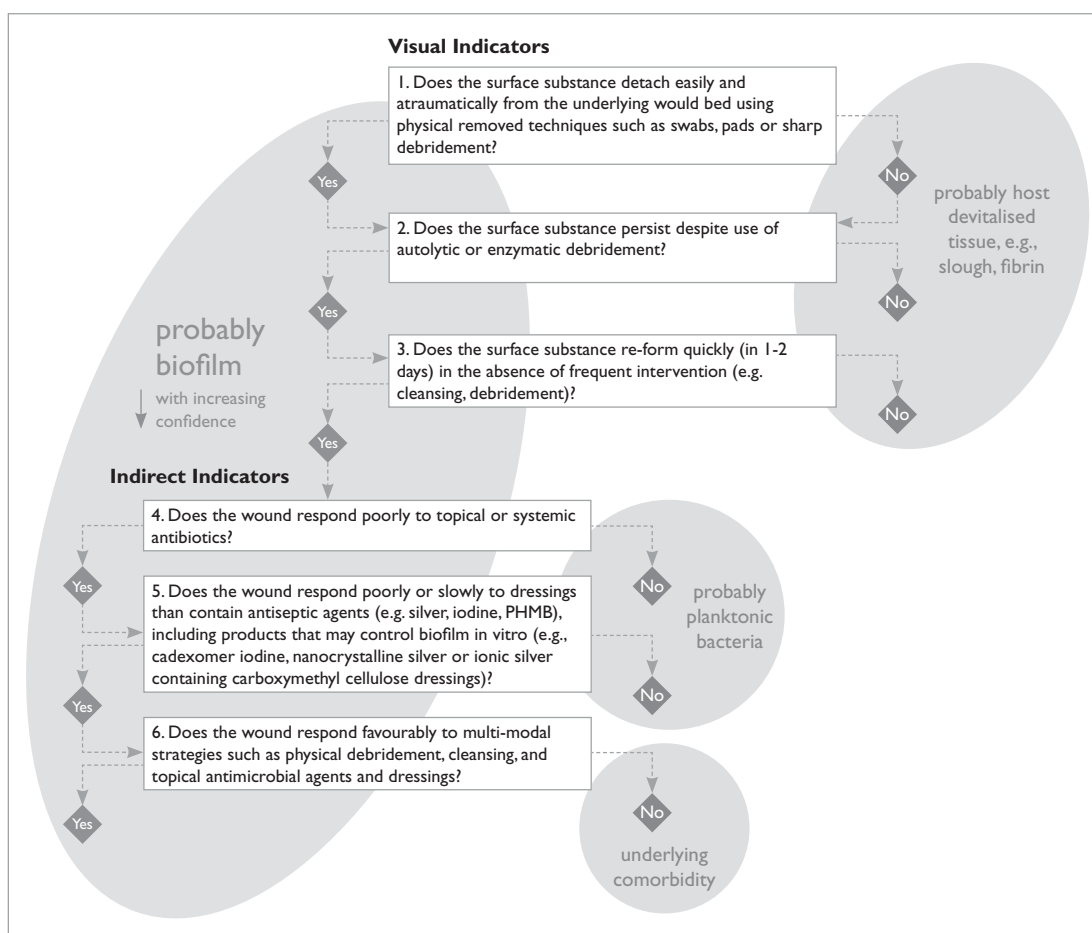


Fig 3. Clinical algorithm for wound biofilm identification.

nosa and *Staphylococcus aureus*, this may result in pale green or pale yellow biofilm, due to the production of pyocyanin (green-blue; Figure 2E) or staphyloxanthin (golden; Figure 2F), respectively. However, this coloured substance may be difficult to visibly distinguish from slough. While it may resemble host devitalised tissue, it behaves differently than slough or fibrin in that it can be more easily removed but re-forms quickly – a key indicative sign of wound biofilm. This substance may lie on the wound surface, rather than being contiguous with the underlying wound tissue (Figure 2G), and may be carefully removed, for example by forceps, to reveal cleaner granulation tissue beneath (Figure 2H).

Indirect clinical indicators of biofilm

In many instances where wound biofilm is not clearly distinguishable to the experienced naked eye, other clinical cues may indicate the presence of biofilm. Table 1 summarises some of these indirect clinical indicators of biofilm presence which should be considered during routine clinical assessment.

A clinical algorithm

By combining the above visual (Fig 2) and indirect indicators of wound biofilm (Table 1), an algorithm is proposed that may assist clinicians in confirming wound biofilm and subsequently taking appropriate measures to manage it (Fig 3). This algorithm poses questions around the appearance of substances in the wound and their response to wound bed preparation techniques, then considers the wound's behaviour to antimicrobial agents. It may be started at question 1 or question 4, depending on the appearance of the wound. This algorithm may thus facilitate clinical judgement of the likely substances involved (e.g. biofilm – viable, bacteria-derived tissue; slough – non-viable, host tissue) and the predominant mode of bacterial existence (i.e. biofilm or planktonic). This algorithm is concerned with local wound factors and should be considered only once other, endogenous pathophysiological factors, e.g. hypoxia or ischaemia, and external factors, e.g. pressure or lifestyle, have been addressed and minimised. With an increasing number of affirmative answers in the algorithm,

there will be a likewise increase in the probability of biofilm presence and its involvement in wound recalcitrance.

Conclusion

Through a review of the literature and our current understanding of wound biofilm, it has been possible to collate a variety of visual indicators that may

directly indicate the presence of biofilm, together with other indirect clinical indicators, which have collectively enabled the development of a clinical algorithm for wound biofilm presence. While much-needed wound biofilm research and guidance is being published at a great pace,⁴⁸ this algorithm will hopefully facilitate clinical recognition of biofilm and subsequent optimal wound management. ■

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Rowland Lees, BSc for the CLSM images in Figure 1, and Dale Copson MSc, RN and Lisa Wood, BSc, RN, Medical Affairs Specialists, ConvaTec Ltd., for the images and descriptions of wounds in Fig 2A-B and 2E-F.

- 11 Dalton, T., Dowd, S.E., Wolcott, R.D., et al. An *in vivo* polymicrobial biofilm wound infection model to study interspecies interactions. *PLoS ONE* 2011; 6: e27317.
- 12 Seth, A.K., Geringer, M.R., Gurjala, A.N., et al. 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: 2, 262e–274e.
- 13 Pastar, I., Nusbaum, A.G., Gil, J., et al. Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLoS ONE* 2013; 8: e56846.
- 14 Davis, S.C., Ricotti, C., Cazzaniga, A., et al. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization *in vivo*. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 1, 23–29.
- 15 Zhao, G., Hochwalt, P.C., Usui, M.L., et al. Delayed wound healing in diabetic (db/db) mice with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm challenge: A model for the study of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2010; 18: 5, 467–477.
- 16 Gurjala, A.N., Geringer, M.R., Seth, A.K., et al. Development of a novel, highly quantitative *in vivo* model for the study of biofilm-impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen* 2011; 19: 3, 400–410.
- 17 Seth, A.K., Geringer, M.R., Galiano, R.D., et al. Quantitative comparison and analysis of species-specific wound biofilm virulence using an *in vivo*, rabbit ear model. *J Am Coll Surg* 2012; 215: 3, 388–399.
- 18 Seth, A.K., Geringer, M.R., Hong, S.J., et al. Comparative analysis of single-species and polybacterial wound biofilms using a quantitative, *in vivo*, rabbit ear model. *PLoS ONE* 2012; 7: e42897.
- 19 Nguyen, K.T., Seth, A.K., Hong, S.J., et al. Deficient cytokine expression and neutrophil oxidative burst contribute to impaired cutaneous wound healing in diabetic, biofilm-containing chronic wounds. *Wound Repair Regen* 2013; doi: 10.1111/wrr.12109.
- 20 Hurlow, J., Bowler, P.G. Clinical experience with wound biofilm and management: a case series. *Ostomy Wound Manage* 2009; 55: 4, 38–49.
- 21 Hurlow, J., Bowler, P.G. Potential implications of biofilm in chronic wounds: a case series. *J Wound Care* 2012; 21: 3, 109–115.
- 22 Wolcott, R.D., Rhoads, D.D. A study of biofilm-based wound management in subjects with critical limb ischaemia. *J Wound Care* 2008; 17: 4, 145–153.
- 23 Wolcott, R.D., Cox, S. More effective cell-based therapy through biofilm suppression. *J Wound Care* 2012; 22: 1, 26–31.
- 24 Metcalfe, D.G., Bowler, P.G. Biofilm delays wound healing: a review of the evidence. *Burns Trauma* 2013; 1: 1, 5–12.
- 25 Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., Kathju, S., et al. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med. Microbiol* 2012; 65: 2, 127–145.
- 26 Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 2, 114–122.
- 27 Percival, S.L., Bowler, P.G. Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds* 2004; 16: 7, 234–240.
- 28 Steinberger, R.E., Holden, P.A. Macromolecular composition of unsaturated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with time and carbon source. *Biofilms* 2004; 1: 1, 37–47.
- 29 Jiao, Y., Cody, G.D., Harding, A.K., et al. Characterization of extracellular polymeric substances from acidophilic microbial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 9, 2916–2922.
- 30 Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., et al. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 223: 2, 287–292.
- 31 Branda, S.S., Vik, A., Friedman, L., et al. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005; 13: 1, 20–26.
- 32 Costerton, J.W. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol* 2001; 9: 2, 50–52.
- 33 Adair, C.G., Gorman, S.P., Feron, B.M., et al. Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 1999; 25: 10, 1072–1076.
- 34 Trautner, B.W., Darouiche, R.O. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am J Infect Control* 2004; 32: 3, 177–183.
- 35 Marsh, P.D., Bradshaw, D.J. Dental plaque as a biofilm. *J. Industr Microbiol* 1995; 15: 3, 169–175.
- 36 Lenselink, E., Andriessen, A.A. A cohort study on the efficacy of polyhexanide-containing bioadhesive dressing in the treatment of biofilms in wounds. *J Wound Care* 2011; 20: 11, 534–538.
- 37 Wolcott, R.D., Rumbaugh, K.P., James, G. et al. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window. *J Wound Care* 2010; 19: 8, 320–327.
- 38 Cowan, T. Wound biofilms – a controversial issue. *J Wound Care* 2012; 21: 3, 106.
- 39 White, R.J., Cutting, K.F. Wound biofilms – are they visible? *J Wound Care* 2012; 21: 3, 140–141.
- 40 Hurlow, J. Response to White and Cutting critique. *J Wound Care* 2012; 21: 4, 981.
- 41 Leaper, D.J., Schultz, G., Carville, K., et al. Extending the TIME concept: what have we learned in the past 10 years? *Int. Wound J* 2012; 9: Suppl. 2, 1–19.
- 42 Hess, C.T., Kirsner, R.S. Understanding the presence of biofilms in wound healing: opportunities for prevention. *Today's Wound Clinic* 2012; 6: 3, 12–18.
- 43 Kirker, K.R., Secor, P.R., James, G.A., et al. Loss of viability and induction of apoptosis in human keratinocytes exposed to *Staphylococcus aureus* biofilms *in vitro*. *Wound Repair Regen* 2009; 17: 5, 690–699.
- 44 Cutting, K.F., Harding, K.G. Criteria for identifying wound infection. *J Wound Care* 1994; 3: 4, 198–201.
- 45 Percival, S.L., Hill, K.E., Malic, S., et al. Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms. *Wound Repair Regen* 2011; 19: 1, 1–9.
- 46 Davies, C.E., Hill, K.E., Wilson, M.J., et al. Use of 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the microfloras of healing and nonhealing chronic venous leg ulcers. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 8, 3549–3557.
- 47 Dowd, S.E., Sun, Y., Secor, P.R., et al. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol* 2008; 8: 43.
- 48 Dowsett, C. Biofilms: A practice-based approach to identification and treatment. *Wounds UK* 2013; 9: 2, 68–72.

SAŽETAK

KLINIČKI POSTUPNIK ZA PREPOZNAVANJE BIOFILMA U VRIJEDU

D. G. METCALE, P. G. BOWLER i J. HURLOW¹

Science & Technology R&D, ConvaTec Ltd., UK i ¹Wound Practitioner LLC, Memphis, US

Broj publiciranih referenci koje ukazuju na prisutnost biofilma u kroničnim ranama je u porastu. Sve je veći broj dokaza koji potvrđuju da biofilm značajno sudjeluje u nezacjeljivanju rane i u bakterijskim infekcijama. Iz navedenih razloga postavlja se pitanje nedostatka postupnika o dokazima prisutnosti biofilma u rani. Namjera je ovog rada specificirati vidljive dokaze i indirektno dati kliničke smjernice tretmana biofilma u rani, te predložiti određeni postupnik za olakšanje kliničkog prepoznavanja biofilma da bi se potom promijenilo ciljano liječenje vrijeda.

Ključne riječi: biofilm rane; prepoznavanje; postupnik; klinička procjena

Ovaj je postupnik preisak rada iz časopisa *Journal of Wound Care* 2014; 23(3) s dozvolom od 10. veljače 2016. godine.

IVO DESPOT

(1930. – 2015.)

Uvaženi član AMZH, prof. dr. sc. Ivo Despot, primarijus, redoviti član AMZH od 1996. godine, redoviti profesor Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, specijalist opće kirurgije; uža specijalizacija: vaskularna kirurgija, napustio nas je u prosincu 2015. godine u Zagrebu. Bio je aktivan član Flebološkog društva HLA-a gdje je svojim radom dao značajan doprinos kao i u Hrvatskom društvu vaskularnih kirurga HLZ-a. Bio je jedan od najuspješnijih voditelja Odjela za vaskularnu kirurgiju Kirurške klinike KBC-a „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu do umirovljenja.

Rođen je 9. srpnja 1930. godine u Šibeniku. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1957. Doktorat znanosti stekao je 1977. g. Specijalist opće kirurgije postao je 1967., subspecijalist vaskularne kirurgije u Milanu 1971., a primarijus 1978. godine.

Bio je sudionik više svjetskih kongresa angiologije i vaskularnih kirurgija. Od 1962. g. do umirovljenja radio je u Klinici za kirurgiju KBC-a „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu. Publicirao je udžbenik „Moždani krvotok – klinički pristup“ 1994. g. Objavio je 25 znanstvenih i 48 stručnih radova u zemlji i inozemstvu.

Član je HLZ-a i počasni član Angiološkog društva Francuske.

Medicinski interesi bili su mu vaskularna kirurgija i kirurško liječenje ekstrakranijskih cerebralnih arterija.

Njegov lik aktivnog člana Akademije medicinskih znanosti Hrvatske zadržat ćemo u trajnoj uspomeni.

JASNA LIPOZENČIĆ

UPUTE AUTORIMA

Časopis ACTA MEDICA CROATICA objavljuje uvodnike, izvorne radove, preglede, klinička zapažanja, osvrt, primjere iz kontinuirane medicinske edukacije, sažetke radova s kongresa i simpozija, pisma uredništvu, prikaze knjiga i drugo. Objavljuje i tematske brojeve časopisa uz gost-urednika. Prihvatanje kategoriziranog članka obvezuje autora da isti članak ne smije objaviti na drugome mjestu bez dozvole Uredništva.

Upute autorima u skladu su s tekstom International Committee of Medical Journals of Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (N Engl J Med 1997; 336: 305-15).

Oprema rukopisa

Članci i svi prilozi dostavljaju se na hrvatskom jeziku u tri istovjetna primjerka i na disketi u Wordu. Rad ne smije imati više od 20 stranica, tipkanih dvostrukim proredom (najviše 30 redaka na jednoj stranici). S obje strane teksta valja ostaviti bijeli rub širine 3,6 cm.

Izvorni radovi sadrže ove dijelove: uvod, cilj rada, metode rada, rezultati, rasprava i zaključci. Uvod je kratak i jasan prikaz problema, cilj sadrži kratak opis svrhe istraživanja. Metode se prikazuju tako da čitatelju omoguće ponavljanje opisane istraživanja. Poznate se metode ne opisuju, nego se navode izvorni literaturni podaci. Ako se navode lijekovi, rabe se njihova generička imena (u zagradi se može navesti njihovo tvorničko ime). Rezultate treba prikazati jasno i logički, a njihovu značajnost dokazati odgovarajućim statističkim metodama. U raspravi se tumače dobiveni rezultati i uspoređuju s postojećim spoznajama na tom području. Zaključci moraju odgovoriti postavljenom cilju rada.

Naslov rada, puna imena i prezimena autora, ustanova u kojoj je rad napravljen te adresa prvoga autora dostavljaju se na posebnom listu papira.

Sažetak na hrvatskom jeziku prilaže se u obimu od najviše 200 riječi na posebnom listu papira.

Prilog radu je i prošireni strukturirani sažetak (cilj, metode, rezultati, rasprava, zaključak) na engleskom jeziku (Summary) (500-600 riječi) uz naslov rada, inicijale imena i prezime autora te naziv ustanova na engleskom jeziku.

Ispod sažetka (i summary-ja) navode se ključne riječi koje su bitne za brzu identifikaciju i klasifikaciju sadržaja rada. Tablice se prikazuju na posebnom listu papira. Moraju imati redni broj koji ih povezuje s tekstom i naslov. I svaka slika treba imati svoj redni broj prema redosljedu kojim se pojavljuje u tekstu i ime prvog autora rada. Opis slika (legenda) tiska se također na posebnom listu papira prema svom rednom broju. Fotografije se primaju crno-bijele na sjajnom papiru. Crteži se mogu izraditi tušem na bijelom papiru ili otisnuti na računalnom laserskom ili tintanom štampaču grafičkim tehnikama visoke rezolucije.

Popis literature

Piše se na posebnom papiru s rednim brojevima prema redosljedu kojim se citat pojavljuje u tekstu. Literatura se citira prema dogovoru postignutom u Vancouveru, a za naslo-

ve časopisa treba rabiti kraticu navedenu u Index medicus. Uz rad je obvezno priložiti izjavu o suglasnosti koautora o publiciranju rada te o nepostojanju sukoba interesa. *Članak u časopisu* (navedite sve autore ako ih je 6 ili manje; ako ih je 7 ili više, navedite prva tri i dodajte: i sur.:

Smerdelj M, Pećina M, Hašpl M. Surgical treatment of infected knee contracture after war injury. Acta Med Croatica 2000; 53: 151-5.

Suplement časopisa

Djelmiš J, Ivanišević M, Mrzljak A. Sadržaj lipida u placenti trudnica oboljelih od dijabetesa. Acta Med Croatica 2001; 55 (Supl. 1): 47-9.

Knjige i monografije

Mould RF. Introductory medical statistics. Turnbridge Wells: Pitman Medical, 1976.

Guluyer AY, ur. Health indicators. An international study for the European Science Foundation. Oxford: M. Robertson, 1983.

Poglavlje u knjizi

Weinstein I, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. U: Sodeman WA, ur. Pathologic physiology: mechanism of disease. Philadelphia: WB Saunders, 1974, 457-72.

Disertacija ili magistarski rad

Cigula M. Aktivnosti nekih enzima u humanom serumu kao pokazatelji apsorpcije žive (disertacija). Zagreb: Medicinski fakultet, 1987, str. 127.

Citiranje literature objavljene u elektroničkom formatu Web

Hoffman DI, St John's Wort. 1995; [4 stranice]. Dostupno na URL adresi: <http://www.healthy.net/library/books/hoffman/materiamedical/stjhns.htm>. Datum pristupa informaciji: 16. srpnja 1998.

Morse SS. Factors in the emergence of infectious disease. Emerg Infect Dis [elektronički časopis na internetu] 1995; [24 ekrana/stranice] Dostupno na URL adresi: <http://www/cdc/god/nsidoc/EID/eid.htm>. Datum pristupa informaciji 26. prosinca 1999. Knjiga na CD-ROM-u

The Oxford English dictionary [knjiga na CD-ROMu]. II. izdanje. New York, N. Y: Oxford University Press, 1992.

Gershon ES. Antisocial behavior. Arch Gen Psychiatry [časopis na CD-ROM-u]. 1995; 52: 900-1.

Softver (program)

Epi Info [kompjutorski program]. Verzija 6. Atlanta, GA. Center for Disease Control and Prevention, 1994.

Radovi se šalju na adresu Uredništva časopisa. Urednički odbor šalje prispjeli rad na anonimnu recenziju (dva recenzenta). Ako recenzent predlaže promjene ili dopune rada, kopija recenzije dostavlja se autoru radi konačne odluke i ispravka teksta. Autor dobiva probni otisak rada na korekturu. Uredništvo ne mora radove objavljivati onim redom kojim pristižu.

Rukopisi se ne vraćaju.

NOTES FOR CONTRIBUTORS

ACTA MEDICA CROATICA publishes leading articles/editorials, original articles, reviews, case reports, annotations, examples of continuing medical education, abstracts from congresses and symposia, letters to the Editor, book reviews and other contributions. Issues dedicated to a topic chosen by guest-editors are also published. All manuscripts should be written in Croatian. Acceptance of a categorized manuscript precludes its submission/ publication elsewhere.

Manuscript preparation

All manuscripts should be submitted in Croatian in three hard copies and on diskette in Word. Original papers should not exceed 20 double space pages (maximum 30 lines *per* page).

Original papers should contain: Introduction, Objective(s), Methods, Results, Discussion and Conclusions. In the Introduction section, the issue should be clearly and concisely presented. In Objective(s), the aim of the study is briefly described. In the Methods section, the methodology, apparatus and procedures used in the study should be identified in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Widely known methods need not be described but original references should be used. For drugs, generic names should be used (trade names can be mentioned in parentheses). Results should be clearly and logically presented, and their significance should be demonstrated by appropriate statistical methods. In Discussion the results obtained are discussed against the existing state of the art. Conclusions should correspond with the aim(s) set in the Objective(s).

The title, first and last name(s) of the author(s), institution(s) and address of the corresponding author should be submitted on a separate sheet of paper. Synopsis written in Croatian should contain maximum 200 words on a separate sheet of paper.

Typescript should contain extended structured [Objective(s), Methods, Results, Discussion, Conclusion(s)] abstract (500-600 words) with title of the manuscript, initials of authors' first name(s), full last name(s) and institution(s) in English.

Below the Abstract, key words that will assist indexers in cross indexing the article should be provided.

Each table is presented on a separate sheet. Number tables consecutively in the order of their first citation in the text and supply a brief title for each. The same applies to figure legends. On the back of each figure put the name of the first author, the figure number and the «top», preferably with a soft pencil. Black-and-white glossy photographs should be submitted. Drawings should be made by Indian ink on white paper or printed by laser or ink jet printer using high resolution graphic techniques.

References are submitted on separate pages in the numbered sequence following their mention in the text. References are cited according to the «Vancouver style» proposed by the International Committee of Medical Journals Editors (N Engl J Med 1991; 324: 421-8 and BMJ 1991; 302: 338-41). The titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus.

The manuscript must be accompanied by a statement on all authors' agreement on paper publication as well as on nonexistence of conflict of interest. *Article in the journal* (if where are six or less authors, they should all be mentioned; if there are seven or more authors, the first three should be mentioned and the «*et al.*» should be added).

Example: Smerdelj M, Pećina M, Hašpl M. Surgical treatment of infected knee contracture after war injury. Acta Med Croatica 2000; 53: 151-5.

Supplement

Djelmiš J, Ivanišević M, Mrzljak A. Sadržaj lipida u placenti trudnica oboljelih od dijabetesa. Acta Med Croatica 2001; 55 (Supl. 1): 47-9.

Books and monographs

Mould RF. Introductory medical statistics. Turnbridge Wells: Pitman Medical, 1976.

Guluyer AY, ur. Health indicators. An international study for the European Science Foundation. Oxford: M. Robertson, 1983.

Chapter (of a book)

Weinstein I, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. U: Sodeman WA, ur. Pathologic physiology: mechanism of disease. Philadelphia: WB Saunders, 1974, 457-72.

Disertation or MA Thesis

Cigula M. Aktivnosti nekih enzima u humanom serumu kao pokazatelji apsorpcije žive (disertacija). Zagreb: Medicinski fakultet, 1987, str. 127.

Citation of literature published in electronic format Web, Electronic journal, Book on CD-ROM, Journal on CD-ROM, Softver (program)

Examples done in Notes for Contributors in Croatian (preceding page).

Manuscripts should be sent to the Address of the Editorial Board. Upon the receipt, the manuscript is forwarded by Editorial Board for anonymous review (two reviewers). If changes or ammendments of the manuscript are proposed by the reviewer(s), a copy of the reviewer's report is sent to the author for final correction of the text. Galley proofs are sent to the author for correction.

The Editorial Board is not obliged to publish the manuscripts in order of their receipt and acceptance.

Manuscripts are not returned to the authors.

20 godina unatrag u liječenju rana pokrenuli smo **REVOLUCIJU**



Kako su vaši izazovi sve veći, tako su i naše inovacije sve naprednije

20 godina je otkako smo lansirali AQUACEL® oblogu u čijem srcu je sadržana snaga Hydrofiber® Tehnologije. Ovo su bila dva desetljeća suradnje i inovacija nadahnutih od vas - zato, pridružite nam se u našem slavlju da s radošću iščekujemo nastavak budućeg zajedničkog uspjeha u liječenju rana.

20 godina inovacija, 20 godina liječenja rana



STOMAMEDICAL



ConvaTec

**Za sve informacije molimo nazovite besplatni telefon 0800 8000
ili pošaljite upit e-mailom: stomam@stoma-medical.hr**

acta medica croatica

The Journal of the Academy of Medical Sciences of Croatia

Acta Med. Croatica • Vol. 70 No. 1 • pp 1-84 • Zagreb, March 2016.

Table of Contents

3	Opening Remarks <i>S. Marinović Kulišić, J. Lipozenčić</i>
	Leading Article
5	Chronic wound - a new etiopathogenetic state and modern therapeutic approach <i>S. Marinović Kulišić</i>
	Reviews
19	Surgical experiences in the treatment of ulcer complications <i>R. Žic, B. Gorjanc, Z. Stanec, S. Budi, R. Milanović, Z. Vlajčić, F. Rudman, K. Martić, Ž. Roje, R. Held</i>
23	Antimicrobial dressings for infected ulcer and clinical comprehension of biofilm <i>S. Marinović Kulišić, J. Lipozenčić, S. Tunuković</i>
29	Impact of biofilm on healing and a method for identifying it in the wound <i>J. Škrlin</i>
33	The role of antiseptics and the strategy of removing biofilm of chronic wound <i>N. Kučišec Tepeš</i>
43	The role of the wound dressing in the destruction and reformation of biofilm <i>S. Tunuković</i>
	Clinical Observations
49	Development of a next-generation antimicrobial wound dressing <i>D.G. Metcalf, D. Parsons, P.G. Bowler</i>
57	Biofilm and our clinical experience <i>T. Planinšek Ručigaj</i>
	Short Annotations
61	Quality of life and psychologic aspects of patients with chronic wound <i>M. Šitum, M. Kolić, S. Špoljar</i>
65	Effects of platelet-rich plasma in the treatment of chronic ulcer <i>Z. Paštar, S. Marinović Kulišić</i>
	Symposium Conclusions
71	Conclusive notes on Biofilm and Antimicrobial Dressings <i>J. Lipozenčić, S. Tunuković, J. Škrlin, S. Marinović Kulišić, T. Planinšek Ručigaj, N. Kučišec Tepeš</i>
	Algorithm
73	Clinical algorithm for wound biofilm identification <i>D. G. Metcalf, P. G. Bowler, J. Hurlow</i>
	Obituary
80	Professor Ivo Despot, MD, PhD <i>J. Lipozenčić</i>
82	Notes for Contributors

acta medica croatica

Časopis Akademije medicinskih znanosti Hrvatske
Acta Med. Croatica • Vol. 70 No. 1 • str. 1-84 • Zagreb, ožujak 2016.

Sadržaj

- 3 Uvodna riječ**
S. Marinović Kulišić, J. Lipozenčić
- 5 Uvodnik**
Kronični vrijed – nove spoznaje o etiopatogenezi i suvremeni terapijski postupak
S. Marinović Kulišić
- Pregledi**
19 Kirurška iskustva u liječenju komplikacija vrijeda
R. Žic, B. Gorjanc, Z. Stanec, S. Budi, R. Milanović, Z. Vlajčić, F. Rudman, K. Martić, Ž. Roje, R. Held
- 23 Antimikrobne obloge za inficirani vrijed i kliničke spoznaje o biofilmu**
S. Marinović Kulišić, J. Lipozenčić, S. Tunuković
- 29 Utjecaj biofilma na cijeljenje rane i postupak za identifikaciju biofilma u rani**
J. Škrlin
- 33 Uloga antiseptika i strategija uklanjanja biofilma kronične rane**
N. Kučičec Tepeš
- 43 Uloga obloga za uništenje i reformaciju biofilma u vrijedu**
S. Tunuković
- Klinička zapažanja**
49 Razvoj nove generacije antimikrobnih obloga za rane (na engleskom)
D.G. Metcalf, D. Parsons, P.G. Bowler
- 57 Biofilm i naša klinička iskustva (na engleskom)**
T. Planinšek Ručigaj
- Kratki osvrti**
61 Kvaliteta života i psihološki aspekti bolesnika s kroničnim vrijedom
M. Šitum, M. Kolić, S. Špoljar
- 65 Učinci primjene plazme bogate trombocitima (PRP) u liječenju kroničnog vrijeda**
Z. Paštar, S. Marinović Kulišić
- Zaključci Simpozija**
71 Zaključne spoznaje o biofilmu i antimikrobnim oblogama
J. Lipozenčić, S. Tunuković, J. Škrlin, S. Marinović Kulišić, T. Planinšek Ručigaj, N. Kučičec Tepeš
- Postupnik**
73 Klinički algoritam za identifikaciju biofilma u vrijedu (na engl.)
D. G. Metcalf, P. G. Bowler, J. Hurlow
- In memoriam**
80 Prof. dr. sc. Ivo Despot
J. Lipozenčić
- 81 Upute autorima**