

Magdalena Maciejewska^{1,2}, Marta Bauer², Małgorzata Dawgul^{2*}

¹Laboratorium Farmaceutyczne AVENA Sp.j., Osielsko

²Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

Wpłynęło w lipcu 2014 r.

Zaakceptowano w listopadzie 2015 r.

1. Wstęp. 2. Etapy powstawania biofilmu, a oporność na antybiotyki. 3. Strategie zapobiegania tworzenia się biofilmu. 3.1. Celowanie w początkową fazę rozwoju biofilmu. 3.1.1. Związki niskocząsteczkowe (Small Molecules). 3.1.2. Ingerencja w *quorum sensing*. 3.1.3. Przeciwciała. 3.1.4. Biofilm drobnoustrojów niepatogennych. 3.2. Modyfikacja biomateriałów w celu zwiększenia ich odporności na adhezję drobnoustrojów. 3.2.1. Materiały antyadhezyjne. 3.2.2. Powłoki bakteriobójcze/bakteriostatyczne. 4. Metody eradykacji biofilmu. 4.1. Fizyczne metody eradykacji biofilmu. 4.2. Biologiczne metody eradykacji biofilmu. 4.3. Chemiczne metody eradykacji biofilmu. 5. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe. 6. Podsumowanie

Novel methods of bacterial biofilm elimination

Abstract: Bacterial biofilm is defined as a sessile, tridimensional microbial community composed of bacteria immersed in a polysaccharide matrix. The structures can grow on human tissues or medical devices resulting in biofilm related infections, which are very often impossible to treat with the commonly used antibiotics. Due to their resistance to the conventional antimicrobial therapy, efficient methods of treatment as well as prophylaxis need to be developed.

Biofilm formation can be reduced by inhibiting the process of adhesion and by interfering with *quorum sensing* system. Very promising is also the application of appropriate antibodies or use of non-pathogenic bacterial strains. Another approach focuses on the surface modifications in order to obtain the resistance to microbial colonization.

Disruption of mature structures can be achieved by several physical, chemical and biological methods. The novel approaches, which are currently being under intensive investigation, include: phage therapy, matrix targeting enzymes, photodynamic therapy and antimicrobial peptides. The above-mentioned strategies are described in the presented work with a special focus on antimicrobial peptides as the potential tool for prophylaxis as well as elimination of mature biofilms.

1. Introduction. 2. Stages of biofilm formation and the resistance to antibiotics. 3. Strategies of prevention of biofilm formation. 3.1. Targeting the initial phase of biofilm formation. 3.1.1. Small Molecules. 3.1.2. Interference in *quorum sensing*. 3.1.3. Antibodies. 3.1.4. Biofilm of non-pathogenic microorganisms. 3.2. Modification of biomaterials for increased resistance to microbial adhesion. 3.2.1. Anti-adhesive materials. 3.2.2. Bacteriostatic/bactericidal coatings. 4. Methods for biofilm eradication. 4.1. Physical methods for biofilm eradication. 4.2. Biological methods for biofilm eradication. 4.3. Chemical methods for biofilm eradication. 5. Antimicrobial peptides. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: biofilm, eradykacja biofilmu, hamowanie rozwoju biofilmu, infekcje związane z biofilmem

Key words: biofilm, biofilm elimination, biofilm growth inhibition, biofilm related infections

1. Wstęp

Istotną rolę w patogenezie zakażeń związanych ze stosowaniem biomateriałów odgrywa zdolność bakterii do tworzenia biofilmu. Biofilmem nazywane są przylegające do powierzchni stałych, zorganizowane struktury, utworzone przez otoczone warstwą egzopolisacharydu komórki drobnoustrojów należących do jednego, kilku, a nawet kilkunastu gatunków [75]. W porównaniu do komórek wolnopływających, mikroorganizmy rosnące w populacji biofilmu są znacznie mniej wrażliwe na działanie antybiotyków, antyseptyków oraz mechanizmów obronnych organizmu ludzkiego. W związku z powyższym, infekcje związane z biofilmem są przyczyną licznych komplikacji terapeutycznych. Poza tym, często przechodzą w stan przewlekły i nawracają po wyleczeniu.

Dynamiczny rozwój w dziedzinie biomateriałów znacząco przyczynił się do poprawy jakości życia pacjentów, jednakże jest także przyczyną zwiększonego ryzyka rozwoju infekcji związanych z biofilmem. Niezależnie od stopnia zaawansowania implantów biomedycznych, czy produktów inżynierii tkankowej, stanowią one potencjalną powierzchnię dla kolonizacji drobnoustrojów. Szacuje się, że ok. 60–70% zakażeń szpitalnych jest wynikiem tworzenia się biofilmu na powierzchni stosowanych materiałów medycznych, m.in. implantów sercowych, cewników, rozruszników serca, protez naczyniowych oraz ortopedycznych [10].

Zdolność do adhezji, kolonizacji powierzchni, a w konsekwencji do formowania biofilmu wykazuje szerokie spektrum drobnoustrojów. Do najpowszechniejszych szczepów tworzących biofilm na powierzchni biomateriałów zalicza się: *Enterococcus faecalis*,

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny, Hallera 107, 80-416 Gdańsk; tel.: 58 349 1488; fax: 58 349 1624; e-mail: mdawgul@gumed.edu.pl

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* i *Pseudomonas aeruginosa* [18]. *S. aureus* i *S. epidermidis* są najczęściej występującymi szczepami na implantach sercowo-naczyniowych [54, 55]. Szacuje się, że są odpowiedzialne za ok. 40–50% infekcji sercowo-naczyniowych związanych z biofilmem oraz za ok. 50–70% infekcji związanych z tworzeniem się biofilmu na cewnikach [2].

Występowanie szczepów *E. faecalis* związane jest z rozwojem infekcji u pacjentów z wkłuciem centralnym lub wentylowanych mechanicznie. Poza tym bakterie tego gatunku często są izolowane od chorych z wprowadzonymi implantami ortopedycznymi. Biofilmy formowane przez *E. faecalis* i *S. viridans* odpowiadają za występowanie zapalenia wsierdza [6]. Natomiast drobnoustroje Gram-ujemne są najczęstszymi czynnikami etiologicznymi zakażeń układu moczowego oraz infekcji związanych z wykorzystaniem cewników urologicznych [13].

2. Etapy powstawania biofilmu, a oporność na antybiotyki

Powstawanie biofilmu jest procesem złożonym i wieloetapowym (Rys. 1). Etapem inicjującym jest proces adhezji pojedynczych komórek do powierzchni biomateriałów, ciał obcych oraz tkanek. Następnie dochodzi do proliferacji kolonizujących komórek oraz produkcji pozakomórkowej substancji polisacharydowej (EPS, *extracellular polymeric substance*). Warstwa nierozpuszczalnych egzopolimerów ułatwia adhezję kolejnych bakterii do podłoża oraz stanowi barierę ochronną, zabezpieczającą mikroorganizmy przed niekorzystnymi

warunkami środowiska (np. działaniem antybiotyków) oraz odpowiedzią humoralną gospodarza.

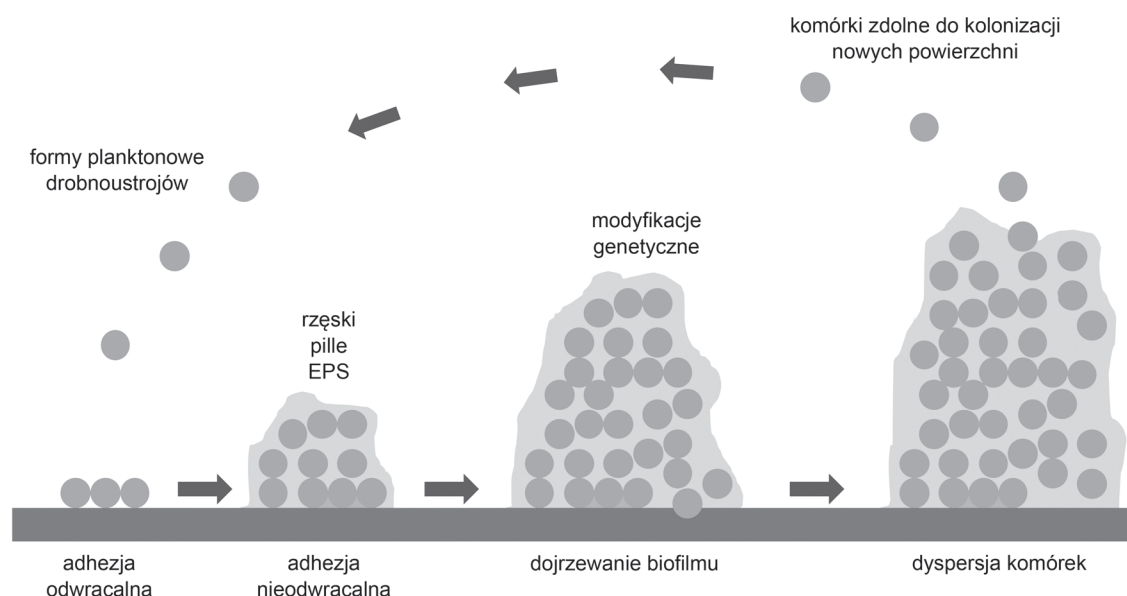
Podczas fazy dojrzewania biofilmu dochodzi do zmian ekspresji genów oraz metabolizmu drobnoustrojów położonych wewnątrz zorganizowanej populacji. Może dojść do aktywacji genów kodujących enzymy rozkładające leki lub kodujących białka wypompowujące leki z komórek bakteryjnych (*drug efflux pumps*). Maleje tempo wzrostu i metabolizm drobnoustrojów. Proces formowania biofilmu jest kontrolowany poprzez mechanizm oceny liczebności (*quorum sensing*) – unikalny system komunikacji międzykomórkowej zwiększający zdolności adaptacyjne biofilmu. W końcowym etapie dojrzewania biofilmu komórki bakteryjne odczepiają się od struktury, aby rozpocząć proces ekspansji nowych powierzchni.

Dojrzałe struktury wykazują znacznie zmniejszoną wrażliwość na stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe, a nieprawidłowo przeprowadzona antybiotykoterapia może być przyczyną rozwoju subpopulacji bakteryjnych komórek przetrwałych (*persistor cells*), które po zakończeniu leczenia umożliwiają odnowienie populacji biofilmu [38, 52].

Problemy terapeutyczne wynikające z rozwoju infekcji związanych z biofilmem są przyczyną poszukiwania i rozwoju nowych metod eliminacji, jak i profilaktyki tego typu zakażeń.

3. Strategie zapobiegania tworzenia się biofilmu

Ograniczenie ryzyka rozwoju biofilmu na powierzchni biomateriałów stanowi jeden z podstawowych celów grup badawczych poszukujących skutecznych strategii profilaktyki infekcji związanych z biofil-



Rys. 1. Etapy formowania biofilmu

mem [14, 66]. Główne podejścia zakładają modyfikacje powierzchni materiałów celem ograniczenia adhezji drobnoustrojów oraz ingerencję w początkowe fazy rozwoju biofilmu.

3.1. Celowanie w początkową fazę rozwoju biofilmu

3.1.1. Związki niskocząsteczkowe (*Small Molecules*)

W ostatnich latach wiele ośrodków naukowych skupiło swoją uwagę na związkach niskocząsteczkowych zdolnych do hamowania rozwoju biofilmu.

Zidentyfikowano m.in. szereg związków, które poprzez inhibicję genów odpowiedzialnych za ekspresję czynników wirulencji szczepów, takich jak *Streptococcus pyogenes* i *S. aureus*, powodują zahamowanie formowania się ich biofilmów [41, 66]. Wykazano, że produkowany przez szczep *P. aeruginosa*, kwas cis-2-decylenowy posiada zdolność eradykacji dojrzałego biofilmu bakterii z gatunku *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *S. pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus* i *Candida albicans* [16]. Podobne działanie wykazują produkowane przez bakterie D-aminokwasy. Mechanizm działania D-aminokwasów na rozwijający się biofilm nie został dotychczas wyjaśniony, jednak związki te okazały się skuteczne w hamowaniu tworzenia się biofilmu przez szczepy: *S. aureus* i *P. aeruginosa* [36].

Poprzez hamowanie rozwoju egzopolisacharydu N-acetylocysteina skutecznie zapobiega tworzeniu się biofilmu *S. epidermidis* [58]. Kationy metali, tj. Ca^{2+} i Mg^{2+} , biorąc udział w adhezji drobnoustrojów do powierzchni, pełnią ważną rolę w procesie formowania biofilmu. Użycie związków chelatujących umożliwia inhibicję rozwoju biofilmu [1].

Liczba aktywnych związków należących do omawianej grupy stale rośnie, w związku z czym stanowią one istotny aspekt poszukiwań nowych metod walki z biofilmem. Poza poszukiwaniem nowych cząsteczek trwają badania mechanizmu działania wyżej wymienionych substancji o potwierdzonych zdolnościach do hamowania rozwoju biofilmu. Związki poddawane są także ocenie ich właściwości farmakokinetycznych [14].

3.1.2. Ingerencja w *quorum sensing*

Quorum sensing jest chemicznym sposobem komunikacji drobnoustrojów. Mikroorganizmy wytwarzają i wydzielają do otoczenia substancje sygnałowe, które służą m.in. do skoordynowanej regulacji ekspresji genów, których produkty zaangażowane są m.in. w proces tworzenia się biofilmu [45]. W ostatnich latach podejmowane są próby ingerencji w system *quorum sensing* w celu niedopuszczenia do wytworzenia się biofilmu [25].

Strategia ta opiera się na stosowaniu naturalnych lub syntetycznych analogów substancji sygnałowych wykazujących zdolność do: hamowania ich syntezy lub uwalniania, blokowania przekazu i odbioru sygnałów

poprzez receptory wewnątrz komórek drobnoustrojów oraz ich syntetycznej lub enzymatycznej inaktywacji [30, 76]. Badania Zimmermana i wsp. wykazały zdolność laktonu N-(3-oksododekanylo)-L-homoseryny (3OC12-HSL) do stymulacji immunologicznej odpowiedzi komórkowej poprzez chemotaksję neutrofilii *in vitro*. 3OC12-HSL jest syntetyzowana przez *P. aeruginosa* i odpowiedzialna za zjawisko *quorum sensing*. Wyniki badań potwierdziły udział komunikacji międzykomórkowej w procesie tworzenia się biofilmu [78].

Hamowanie komunikacji szczepów tworzących biofilm stanowi obiecujący kierunek poszukiwań skutecznej terapii. Jednakże zastosowanie blokowania systemu QS stwarza także pewne trudności ze względu na specyfikę działania. Niskocząsteczkowe związki sygnałowe są charakterystyczne dla poszczególnych grup mikroorganizmów, a jeden szczep może wytwarzać kilka rodzajów takich cząsteczek [45]. Poza tym, inhibitory systemu QS zazwyczaj nie oddziałują na inne procesy życiowe drobnoustrojów, co znacznie ogranicza ich zastosowanie jako samodzielnej terapii. Dlatego prowadzone są badania w kierunku wykorzystania inhibitorów QS jako uzupełnienia leczenia konwencjonalnego [22].

3.1.3. Przeciwciała

Jedną z obiecujących strategii ograniczania kolonizacji biomateriałów jest stosowanie przeciwciał wiążących adhezyny produkowane przez drobnoustroje. Jak wcześniej wspomniano, jednym z najczęstszych czynników etiologicznych zakażeń spowodowanych stosowaniem materiałów medycznych jest *S. epidermidis*. Kolonizacja często jest przyczyną rozwoju trudnych w leczeniu infekcji i może prowadzić do niszczenia zaaplikowanych biomateriałów. Formowanie biofilmu przez *S. epidermidis* wymaga obecności białka AAP, tzw. białka akumulacji. W badaniach przeprowadzonych w warunkach *in vitro* wykazano, że użycie odpowiednich przeciwciał monoklonalnych efektywnie hamuje proces tworzenia się biofilmu poprzez blokowanie wyżej wymienionego czynnika [26].

Najnowsze dane dotyczące zagadnienia molekularnych mechanizmów formowania biofilmu wskazują, iż proces ten związany jest z makrocząsteczkami błony komórkowej drobnoustrojów. Uważa się, że mogą one stanowić kolejne miejsce docelowe działania przeciwciał. Przypuszczalnie ich zastosowanie zaburza interakcje na poziomie komórki drobnoustroju – powierzchnia kolonizowana oraz oddziaływania pomiędzy komórkami bakteryjnymi, co ingeruje w proces adhezji. Wykorzystanie przeciwciał nie prowadzi do śmierci drobnoustrojów, a tym samym nie indukuje silnej odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza. Zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko makrocząsteczkom błony komórkowej drobnoustrojów wydaje się więc obiecującym rozwiązaniem [65].

3.1.4. Biofilm drobnoustrojów niepatogennych

Innym sposobem zabezpieczającym przed rozwojem infekcji „odbiomateriałowych” jest zastosowanie interferencji bakteryjnej. Metoda ta jest rozpatrywana przede wszystkim pod kątem zapobiegania infekcjom układu moczowego. Głównym założeniem jest wykorzystanie szczepu niepatogennego do wytworzenia biofilmu na materiale wprowadzonym do organizmu pacjenta. Wykazano, że fragmenty cewnika urologicznego inkubowane wcześniej w zawiesinie komórek szczepu niepatogennego są odporne na kolonizację *in vitro* przez uropatogeny. Pierwsze próby przeprowadzone *in vivo* dotyczyły osób z uszkodzonym rdzeniem kręgowym, które wymagały cewnikowania. Doświadczenie polegało na wprowadzeniu niepatogennego szczepu *E. coli* do pęcherza moczowego pacjenta. Stwierdzono, że zabieg nie spowodował rozwoju infekcji, a metoda wykazała skuteczność w redukcji częstości zakażeń [68].

3.2. Modyfikacja biomateriałów w celu zwiększenia ich odporności na adhezję drobnoustrojów

3.2.1. Materiały antyadhezyjne

Właściwości fizykochemiczne wykorzystanych biomateriałów mają bardzo istotny wpływ na zdolności mikroorganizmów do tworzenia biofilmu. Zależą od nich między innymi rodzaj i liczba bakterii przylegających do powierzchni. W związku z powyższym prowadzone są intensywne badania mające na celu opracowanie materiałów o optymalnych właściwościach ograniczających ryzyko adhezji mikroorganizmów.

Właściwości powierzchni biomateriałów można modyfikować poprzez aplikację powłok antyadhezyjnych, zmianę ładunku powierzchniowego, struktury, jej chropowatości, aktywności chemicznej oraz właściwości hydrofilowych i hydrofobowych [9, 67, 69].

Istotny wpływ na przyleganie komórek do powierzchni mają właściwości hydrofobowe biomateriału. Zastosowanie nanostruktur fluorowanych koloidów krzemionkowych jako syntetycznej, silnie hydrofobowej powłoki na powierzchniach szklanych skutecznie zredukowało stopień przylegania komórek *S. aureus* i *P. aeruginosa* [59]. Niska energia powierzchniowa oraz hydrofobowość powierzchni są przyczynami zmniejszonej adsorpcji białek i adhezji drobnoustrojów. Tekstura biomateriałów również jest istotnym czynnikiem wpływającym na interakcje bakterii z kolonizowaną powierzchnią. Wyniki wielu badań potwierdziły istotny wpływ wysokiej chropowatości powierzchni biomateriałów na stopień adhezji drobnoustrojów [28, 46, 69]. Stopień adhezji i rozwój *S. epidermidis* na tytanowych szorstkich powierzchniach były znacząco wyższe w porównaniu do tych samych, ale gładkich, polerowanych powierzchni [73]. Zdolności przylegania do powierzchni o różnym stopniu gładkości są jednak zależne od gatunku drobnoustroju. W przypadku

S. aureus zaobserwowano zwiększone przyleganie do powierzchni tytanowej poddanej mechaniczno-chemicznej obróbce i polerowaniu [69].

Wiele doniesień literaturowych dotyczy wykorzystania powłok antyadhezyjnych. Znaczące zahamowanie wiązania komórek biofilmu *S. epidermidis* zaobserwowano na stalowych i tytanowych biomateriałach z nanopowłoką TMS-trimetylosilkanu, natomiast powlekanie tytanowych biomateriałów PEG (polietylenoglikolem) zredukowało adhezję szczepu *S. aureus* [24, 40].

Xu i wsp. wykazali, że submikronowa (400–500 nm) warstwa poli(uretano-mocznika) ogranicza powierzchnię biomateriałów dostępną dla bakterii, zmniejszając w ten sposób prawdopodobieństwo rozwoju biofilmu, zwłaszcza *S. epidermidis* i *S. aureus* [74].

Obiecującą strategią zabezpieczającą przed tworzeniem się biofilmu jest pokrycie powierzchni biomateriałów tzw. szczotkami polimerowymi. Powłokę tworzą długie łańcuchy hydrofilowych polimerów związanych z powierzchnią i eksponowanych do otoczenia [11, 63]. Najczęściej stosowanymi powłokami tego typu są szczotki wykonane z politlenku etylenu (PEO) [27]. Wyniki badań wykazały znaczące zmniejszenie adsorpcji protein i przylegania bakterii, potwierdzając tym samym ich skuteczność w profilaktyce rozwoju biofilmu [61, 62]. W warunkach *in vivo* wyniki z użyciem PEO nie były zadowalające ze względu na niską trwałość materiału oraz na wysoką podatność na uszkodzenia oksydacyjne. Cechy te uniemożliwiają zastosowanie powłok PEO w obecnej formie w warunkach *in vivo* [63].

Lellouche i wsp. wykazali, że powlekanie fragmentów cewnika Foley'a za pomocą fluorku itru pozwala ograniczyć adhezję i wpływa na redukcję dojrzałego biofilmu tworzonego przez szczepy *E. coli* i *S. aureus*. Stwierdzono istotny wpływ wielkości cząsteczek zastosowanego związku chemicznego na jego właściwości przeciwbakteryjne. Największą efektywność działania uzyskano stosując powlekanie fluorkiem itru w postaci nanocząstek [39].

Zastosowanie powłok antyadhezyjnych jest bardzo skuteczną metodą zapobiegania tworzenia się biofilmu *in vitro* na wczesnych etapach jego rozwoju. W warunkach *in vivo* skuteczność tego typu powłok jest uzależniona od złożonych interakcji między powierzchnią biomateriału, a komórkami drobnoustrojów oraz organizmu ludzkiego, które mogą obniżyć efektywność stosowanej metody. W związku z powyższym niezbędna jest kontynuacja badań mających na celu optymalizację powłok i ostatecznie umożliwienie wykorzystania tej obiecującej strategii zapobiegania rozwojowi infekcji związanych z biofilmem [14].

3.2.2. Powłoki bakteriobójcze/bakteriostatyczne

Obiecującą strategią stosowaną w walce z zakażeniami towarzyszącymi stosowaniu biomateriałów jest stosowanie powłok wykazujących właściwości bakte-

riostatyczne lub bakteriobójcze [57]. Do impregnacji materiałów biomedycznych wykorzystywano między innymi konwencjonalne antybiotyki. Wykazano, że powierzchnie tytanowe biomateriałów kowalencyjnie związane z wankomycyną skutecznie hamują rozwój biofilmu *S. epidermidis* [5]. *S. aureus* natomiast był skutecznie eliminowany z powlekanych gentamycyną protez bezcementowych stosowanych w arteroplastyce [52]. Powlekanie materiałów medycznych antybiotykami może stanowić skuteczną profilaktykę zakażeń towarzyszących stosowaniu biomateriałów. Należy jednak pamiętać, że stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania niesie za sobą ryzyko rozwoju szczepów wieloopornych.

Rozwiązaniem alternatywnym jest stosowanie powłok wykonanych z metali szlachetnych. Wykazano, że pokrycie zaczepek aparatów ortodontycznych jonami srebra skutecznie hamuje wzrost drobnoustrojów odpowiedzialnych za rozwój próchnicy zębów i paradontoz w warunkach *in vitro*. Poza tym, powłoka spowodowała redukcję ilości komórek tworzących biofilm *Streptococcus sorbinus* na fragmentach zaczepek [47]. Komercyjnie dostępne są cewniki urologiczne powlekane srebrem. Wyniki badań sprzed kilku lat sugerowały ich wysoką skuteczność przeciwdrobnoustrojową i odporność na kolonizację bakteryjną. Ostatnie doniesienia wskazują jednak, że zastosowanie powłoki srebrowej nie powoduje statystycznie istotnej redukcji częstości infekcji związanych z wykorzystaniem cewników [60].

4. Metody eradykacji biofilmu

W sytuacjach, kiedy profilaktyka zawodzi, dochodzi do kolonizacji stosowanych biomateriałów i rozwoju infekcji związanych z biofilmem. W związku z tym, że wiele, do tej pory rutynowo stosowanych środków przeciwdrobnoustrojowych jest nieskutecznych w zwalczaniu tego typu infekcji, stanowią one bezpośrednie zagrożenie dla życia pacjentów. Stwarza to potrzebę rozwoju nowych strategii zwalczania zakażeń związanych z biofilmem. Dotychczas stosowane i opracowywane metody mające na celu eradykację biofilmu bakteryjnego można zaklasyfikować do 3 grup: metod fizycznych, biologicznych oraz chemicznych.

4.1. Fizyczne metody eradykacji biofilmu

Podstawową metodą fizyczną, która wykazuje wysoką skuteczność, jest mechaniczne niszczenie struktury biofilmu. Oczyszczanie powierzchni można przeprowadzić poprzez szorowanie lub skrobanie. Wadą tych działań jest niewielka uniwersalność zastosowania wynikająca z różnej budowy kolonizowanych materiałów i urządzeń.

Inną metodą fizyczną jest zastosowanie wysokiej temperatury. Potwierdzono, że biofilm poddany działaniu temperatury powyżej 95°C przez 100 min. ulega całkowitemu zniszczeniu. Podobną efektywność uzyskuje się poprzez wykorzystanie niskich temperatur. Cykl trzykrotnego zamrażania (-12°C) i rozmrażania struktury bakteryjnej powoduje jej eliminację.

Prowadzone są badania nad możliwością zastosowania fal ultradźwiękowych. Do tej pory wiadomo, że ich działanie polega głównie na redukcji ilości komórek bakteryjnych, które uległy adhezji [7, 50].

Podjęmowane są także próby eliminacji biofilmu przez zastosowanie pola elektrycznego. Według literatury wykorzystanie prądu o niskim natężeniu, generowanego przez elektrody przewodzące, zwiększa przepuszczalność błony komórkowej bakterii dla substancji przeciwdrobnoustrojowych. Dodatkowo, potwierdzono hamujący wpływ pola elektrycznego na wzrost mikroorganizmów. Testy z zastosowaniem pola elektrycznego o niskim natężeniu dały obiecujące wyniki w stosunku do szczepów *S. aureus* i *P. aeruginosa* [21].

Duże nadzieje pokłada się w metodach wykorzystujących zimną plazmę będącą mieszaniną wolnych rodników, jonów, wzbudzonych cząsteczek i promieniowania UV. Dokładny mechanizm oddziaływania strumienia plazmy z komórką bakteryjną nie został jeszcze poznany. Przypuszcza się, że istnieją 3 główne drogi działania: dezorganizacja błony komórkowej, niszczenie białek wewnątrzkomórkowych i niszczenie struktury DNA [42]. Interesującą alternatywą jest także terapia fotodynamiczna. Jej działanie polega na zastosowaniu związków fotouczulających, które po aktywacji światłem wykazują działanie cytotoksyczne poprzez generowanie reaktywnych form tlenu. Terapia fotodynamiczna wykazała wysoką skuteczność w zwalczaniu infekcji przyzębia [8]. Efektywność terapii potwierdzono także w stosunku do szczepów z rodzaju *Enterococcus*, *Escherichia*, *Staphylococcus* i *Klebsiella* wyizolowanych od pacjentów z głębokimi ropniami tkanek [23]. Terapia fotodynamiczna okazała się również dobrym narzędziem w eradykacji *in vitro* metycyloopornych szczepów *S. aureus* [77]. Prowadzone są również badania nad zmniejszaniem szkodliwości terapii fotodynamicznej. Dobrym rozwiązaniem wydaje się być zastosowanie terapii fotodynamicznej w kombinacji z nanocząsteczkami srebra. Metoda efektywnie redukowała ilość komórek *S. aureus* w testach *in vitro* [51].

4.2. Biologiczne metody eradykacji biofilmu

Spośród intensywnie badanych metod biologicznych eradykacji biofilmu najbardziej obiecującą wydaje się fagoterapia, polegająca na wykorzystaniu wirusów atakujących bakterie. Potwierdzono wysoką aktywność bakteriofagów w stosunku do drobnoustrojów

Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Z powodzeniem od lat wykorzystywane są w leczeniu eksperymentalnym zakażeń szczepami m.in. z rodzaju *Salmonella*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia* i *Enterobacter*. Doświadczenie przeprowadzone na modelu zwierzęcym z rozwiniętą infekcją *E. coli* wykazało wyższą skuteczność jednorazowego podania fagów niż serii dawek antybiotyku.

Fagoterapia ma największe znaczenie w przypadku eliminacji bakterii wielolekoopornych. Potwierdzono jej efektywność wobec szczepów gronkowca złocistego opornego na metycylinę i wankomycynoopornych enterokoków [44]. Badano także możliwość stosowania bakteriofagów w leczeniu infekcji płuc wywołanych przez *P. aeruginosa* u chorych na mukowiscydozę. Wykazano skuteczność bakteriofagów w stosunku do szczepów klinicznych zarówno w formie planktonowej, jak i tworzących zorganizowane skupiska [3].

Inną strategią biologicznej walki z biofilmem jest stosowanie enzymów skierowanych wobec macierzy polisacharydowej (*matrix-targeting enzymes*). Ingerencja w strukturę lub degradacja zewnątrzkomórkowej macierzy polimerowej biofilmu może skutecznie go osłabić lub prowadzić do jego rozproszenia.

Przeprowadzono szereg badań nad zdolnością związków do degradacji składników macierzy, takich jak polisacharydu, zewnątrzkomórkowego genomowego DNA (eDNA) i białek [34]. Wykazano, że Dyspersyna B, produkowana przez Gram-ujemne bakterie jamy ustnej *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, zakłóca strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej biofilmu innych szczepów. Związek wpływa m.in. na strukturę zewnątrzkomórkowej macierzy biofilmu *S. epidermidis* prowadząc do jego rozproszenia [14, 33]. Zastosowanie enzymu DNAzy okazało się skuteczne w eliminacji biofilmu *S. aureus* [43, 29]. Podobne właściwości wobec biofilmu *S. aureus* wykazały proteinaza K i trypsyna [12].

Skuteczność enzymów wobec matrix nie została jednak jeszcze potwierdzona w testach *in vivo*. Istnieje wiele ograniczeń w tego typu podejściu, jednym z nich jest ryzyko wystąpienia reakcji zapalnych i alergicznych [12, 14].

4.3. Chemiczne metody eradykacji biofilmu

Aktywność wielu dostępnych związków przeciwdrobnoustrojowych w stosunku do biofilmu jest znacznie ograniczona w porównaniu do aktywności tych substancji wobec komórek wolnopływających tych samych szczepów drobnoustrojów. Wynika to przede wszystkim z warstwowej budowy biofilmu oraz obecności macierzy polisacharydowej, co utrudnia penetrację związków do wnętrza struktury. Poza tym dochodzi do zmian ekspresji genów oraz metabolizmu komórek

drobnoustrojów położonych w głębszych warstwach struktury, prowadzących do obniżonej wrażliwości na wiele substancji przeciwdrobnoustrojowych [37].

Wykorzystywane metody chemiczne opierają się głównie na zastosowaniu substancji utleniających, np. chloru i jego związków, które powodują degradację budowy przestrzennej. W stosunku do biofilmu skuteczny jest także formaldehyd i czwartorzędowe sole amoniowe. Pozytywne wyniki w eradykacji biofilmu uzyskuje się również dzięki zastosowaniu surfaktantów, których mechanizm działania polega na zaburzaniu integralności struktury. Zastosowanie wyżej wymienionych związków chemicznych ogranicza się do procesów dezynfekcji powierzchni [50].

Do najskuteczniejszych, obecnie stosowanych antyseptyków należy chlorowoderek oktenidyny. Związek został wprowadzony do powszechnego użytku ponad dwie dekady temu i do tej pory stanowi najlepsze rozwiązanie w zapobieganiu i terapii infekcji ran. Potwierdzono jego wysoką skuteczność w stosunku do drobnoustrojów Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych oraz grzybów. Ponadto, jest aktywny wobec szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę. Oktenidyna jest również skuteczna w zwalczaniu biofilmu bakteryjnego. Wykazano między innymi, że preparat zawierający dichlorowoderek oktenidyny skuteczniej eliminuje biofilmy tworzone przez *S. aureus* i *P. aeruginosa* w porównaniu do mleczanu etakrydyny i jodopowidonu [31, 48].

5. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe

Obiecującą grupą związków o potencjalnym zastosowaniu do walki z biofilmem wydają się być peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP, *Antimicrobial Peptides*), charakteryzujące się silnymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi oraz szerokim spektrum działania [17, 35]. Stanowią one istotną część wrodzonej odporności, a ze względu na wysoką aktywność wobec biofilmu i niskie ryzyko rozwoju oporności w porównaniu do konwencjonalnych antybiotyków ich potencjalne zastosowanie w terapii zakażeń wydaje się uzasadnione [64].

Wyniki licznych badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* i *in vivo* potwierdzają zdolność AMP do eliminacji oraz zapobiegania tworzenia się struktur biofilmu.

Wykazano między innymi, że ludzka katelicyna LL-37 hamuje proces formowania się biofilmu oraz powoduje jego eradykację w stężeniach znacznie niższych niż stężenia hamujące wzrost komórek planktonowych [56, 70]. Już w stężeniu 0,5 µg/ml, LL-37 wykazuje silną aktywność antybiofilmową w stosunku do *P. aeruginosa*, głównego czynnika etiologicznego zapalenia płuc u chorych na mukowiscydozę oraz

wobec szczepu *Francisella novicida* odpowiedzialnego za rozwój tularemii [4].

Sugeruje się możliwość zastosowania wytwarzanej przez neutrofile laktoferyny (LF) w terapii stomatologicznej. Związek ten naturalnie występuje także w ślinie, łzach, mleku, nasieniu oraz w śluzowo-surowiczej wydzielinie okrężnicy. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe laktoferyny wynikają z jej zdolności do wiązania jonów Fe^{3+} . Potwierdzono zdolność związku do hamowania i zapobiegania tworzeniu się biofilmów szczepów *Porphyromonas gingivalis* i *Prevotella intermedia*, odpowiedzialnych za powstawanie biofilmu na blaszkach poddziąsłowych [71].

Powlekanie biomateriałów za pomocą AMP stanowi obiecującą opcję profilaktyki zakażeń związanych z biofilmem. Przykładem zastosowania AMP do tego celu jest powlekanie powierzchni soczewek kontaktowych Meliminą, zbudowaną z fragmentów Mellityny i Protaminy. Peptyd ten skutecznie zapobiega adhezji komórek *P. aeruginosa* i *S. aureus*, natomiast wyniki przeprowadzonych testów toksyczności sugerują także bezpieczeństwo w stosunku do ludzkiego organizmu [19, 72]. Badania *in vivo* przeprowadzone na królikach i świnkach morskich, u których wywołano owrzodzenie oka i zapalenie spojówek, wykazały, że stosowanie soczewek kontaktowych pokrytych peptydem znacznie redukuje objawy zakażenia [15].

Liczne badania *in vivo* potwierdzają zdolność innych AMP do zapobiegania, a także eliminacji infekcji związanych z biofilmem. Potwierdzono między innymi skuteczność Citropiny 1.1, Temporyny A oraz IB-367 na zwierzęcych modelach infekcji wywołanych przez *S. aureus* [32]. Ponadto, Temporyna A skutecznie zapobiega adhezji komórek *S. epidermidis* do protezy naczyniowej na modelu szczurzym [20]. Peptyd IB-367 okazał się skuteczny w redukcji mikroflory jamy ustnej będącej potencjalnym czynnikiem etiologicznym zapalenia błony śluzowej. Zaobserwowano redukcję kolonizacji przez bakterie Gram-ujemne, szczepy z rodzaju *Staphylococcus* oraz całkowitą eradykację grzybów [49]. Wyniki dotychczasowych doświadczeń przeprowadzonych z wykorzystaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych czynią z nich doskonałą matrycę do projektowania nowych związków przeciwdrobnoustrojowych oraz zachęcają do kontynuacji badań naturalnych AMP.

6. Podsumowanie

Złożoność struktury biofilmu i jego wysoka oporność wobec konwencjonalnych antybiotyków są przyczynami trudności napotykanymi podczas terapii infekcji związanych z biofilmem. Pogłębianie wiedzy na temat tworzenia się, funkcjonowania i struktury biofilmu stanowią podstawę dla poszukiwania alternatyw-

nych metod profilaktyki i leczenia zakażeń związanych z jego występowaniem.

Opisane dotychczas strategie mające na celu zmniejszenie ryzyka kolonizacji powierzchni przez drobnoustroje chorobotwórcze obejmują między innymi zastosowanie niskocząsteczkowych molekuł oraz ingerencję w procesy *quorum sensing*. Bardzo obiecującym rozwiązaniem jest także zastosowanie przeciwciał wiążących adhezyny bakteryjne oraz użycie biofilmu drobnoustrojów niepatogennych.

Inne metody mające zapobiegać procesowi rozwoju biofilmu dotyczą modyfikacji powierzchni biomateriałów. Prowadzone badania mają na celu opracowanie materiału odpornego na kolonizację i jednocześnie bezpiecznego dla ludzkiego organizmu. Modyfikacje obejmują zmiany ładunku powierzchniowego, zmniejszenie energii powierzchniowej oraz zwiększenie hydrofobowości materiałów medycznych. Istotnym podejściem jest także powlekanie biomateriałów za pomocą związków prezentujących właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

W przypadku niepowodzenia profilaktyki dochodzi do kolonizacji tkanek, bądź powierzchni biomateriałów, co często skutkuje rozwojem zakażenia. W związku z niską skutecznością antybiotykoterapii, możliwości terapii infekcji związanych z biofilmem są bardzo ograniczone. Dostępne fizyczne metody eliminacji biofilmu ograniczają się głównie do usuwania biofilmu z powierzchni nieożywionych. Zastosowanie związków o właściwościach utleniających lub surfaktantów także ogranicza się głównie do procesów dezynfekcji. Spośród antyseptyków stosowanych w leczeniu największą skuteczność w eradykacji biofilmu wykazuje chlorowoderek oktenidyny. Do obiecujących metod alternatywnych należą terapia fotodynamiczna, fagoterapia oraz terapia z wykorzystaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych.

Piśmiennictwo

1. Abraham N.M., Lamlertthon S., Fowler V.G., Jefferson K.K.: Chelating agents exert distinct effects on biofilm formation in *Staphylococcus aureus* depending on strain background: Role for clumping factor B. *J. Med. Microbiol.* **61**, 1062–1070 (2012)
2. Agarwal A., Singh K.P., Jain A.: Medical significance and management of staphylococcal biofilm. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **58**, 147–160 (2010)
3. Alemayehu D., Casey P.G., McAuliffe O., Guinane C.M., Martin J.G., Shanhan F., Coffey A., Ross R.P., Hill C.: Bacteriophages ϕ MR299-2 and ϕ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. *MBio*, **3**, (2012)
4. Amer L.S., Bishop B.M., Hoek van M.L.: Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 246–251 (2010)

5. Antoci Jr V, Hickok N.J. i wsp.: The inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by vancomycin-modified titanium alloy and implications for the treatment of periprosthetic infection. *Biomaterials*, **29**, 4684–4690 (2008)
6. Arciolo C.R., Baldassarri L., Campoccia D., Creti R., Pirini V., Huebner J., Montanaro L.: Strong biofilm production, antibiotic multi-resistant and high gelE expression in epidemic clones of *Enterococcus faecalis* from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*, **29**, 580–586 (2008)
7. Axelsson L., Holch A., Rud I., Samah D., Tierce P., Favre M., Kure C.F.: Cleaning of conveyor belt materials using ultrasound in thin layer of water. *J. Food. Prot.* **76**, 1401–1407 (2013)
8. Betsy J., Prasanth C.S., Baiju K.V., Prasanthila J., Subhash N.: Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* **41**, 573–581 (2014)
9. Boks N.P., Kaper H.J., Norde W., Mei van der H.C., Busscher H.J.: Mobile and immobile adhesion of staphylococcal strains to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **331**, 60–64 (2009)
10. Bryers J.D.: Medical Biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* **1**, 1–18 (2008)
11. Busscher H.J., Rinastiti M., Siswomihardjo W., Mei van der H.C.: Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J. Dent. Res.* **89**, 657–665 (2010)
12. Chaignon P., Sadovskaya I., Ragunah C., Ramasubbu N., Kaplan J.B., Jabbouri S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 125–132 (2007)
13. Chatterjee S., Maiti P., Dey R., Kundu A., Dey R.: Biofilms on indwelling urologic devices: microbes and antimicrobial management prospect. *Ann. Med. Health Sci. Res.* **4**, 100–104 (2014)
14. Chen M., Yu Q., Sun H.: Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 18488–18501 (2013)
15. Cole N., Hume E.B.H., Vijay A.K., Sankaridurg P., Kumar N., Willcox M.D.P.: *In vivo* performance of Melimine as an antimicrobial coating for contact lenses in models of CLARE and CLPU. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 390–395 (2010)
16. Davies D.G., Marques C.N.: A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. Bacteriol.* **191**, 1393–1403 (2009)
17. Dawgul M., Barańska-Rybak W., Bielińska S., Nowicki R., Kamysz W.: Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych na biofilm *Candida*. *Alergia Astma Immunologia*, **15**, 220–225 (2010)
18. Donlan R.M.: Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 277–281 (2001)
19. Dutta D., Cole N., Kumar N., Willcox M.D.P.: Broad spectrum antimicrobial activity of Melimine covalently bound to contact lenses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 175–182 (2013)
20. Ghiselli R., Giacometti A., Cirioni O., Mocchegini F., Orlando F., Kamysz W., Del Prete M. S., Lukasiak J., Scalise G., Saba V.: Temporalin A as a prophylactic agent against methicillin-sodium susceptible and methicillin sodium-resistant *Staphylococcus epidermidis* vascular graft infection. *J. Vasc. Surg.* **36**, 1027–1030 (2002)
21. Gilodi M. Porat X., Blatt A., Wasserman Y., Kirson E.D., Dekel E., Palti Y.: Microbial growth inhibition by alternating electric fields. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3517–3522 (2008)
22. Gospodarek E., Zalas P.: Ingerencja człowieka w komunikowanie się drobnoustrojów. *Post. Mikrobiol.* **47**, 365–370 (2008)
23. Haidaris C.G., Foster T.H., Waldman D.L., Mathes E.J., McNamara J., Curran T.: Effective photodynamic therapy against microbial populations in human deep tissue abscess. *Laser. Surg. Med.* **45**, 509–516 (2013)
24. Harris L.G., Tosatti S., Wieland M., Textor M., Richards R.G.: *Staphylococcus aureus* adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials*, **25**, 4135–4148 (2004)
25. Hogan D.A.: Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot. Cell*, **5**, 613–619 (2006)
26. Hu J., Xu T., Zhu T., Wang X., Wu Y., Huang R., Liu J., Liu H., Yu F., Ding B., Huang Y., Tong W., Qu D.: Monoclonal antibodies against accumulation-associated protein affect EPS biosynthesis and enhance bacterial accumulation of *S. epidermidis*. *PLoS One*, **6** (2011)
27. Huang N.P., Michel R., Voros J., Textor M., Hofer M., Rossi A., Elbert D.L., Hubbell J.A., Spencer N.D.: Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) layers on metal oxide surfaces: Surface-analytical characterization and resistance to serum and fibrinogen adsorption. *Langmuir*, **17**, 489–498 (2001)
28. Ivanova E.P., Mitik-Dineva N., Wang J., Pham D.K., Wright J.P., Nicolau D.V., Mocanaru R.C., Crawford R.J.: *Staleyia guttiformis* attachment on poly(tert-butylmethacrylate) polymeric surfaces. *Micron*, **39**, 1197–12104 (2008)
29. Izano E.A., Amarante M.A., Kher W.B., Kaplan J.B.: Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 470–476 (2008)
30. Jabra-Rizk M.A., Shirtliff M., James C., Meiller T.: Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm. *FEMS Yeast Res.* **6**, 1063–1073 (2006)
31. Junka A., Bartoszewicz M., Smutnicka D., Secewicz A., Szymczak P.: Efficacy of antiseptics containing povidone-iodine, octenidine dihydrochloride and ethacridine lactate against biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* measured with the novel biofilm-oriented antiseptic test. *Int. Wound J.* **11**, 730–734 (2013)
32. Kamysz W., Nadolski P.: Przeciwbakteryjna aktywność peptydów ze skóry płazów. *Ann. Acad. Med. Gedan.* **35**, 29–34 (2005)
33. Kaplan J.B., Ragunath C., Velliyagounder K., Fine D.H., Ramasubbu N.: Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2633–2636 (2004)
34. Kiedrowski M.R., Horswill A.R.: New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1241**, 104–121 (2011)
35. Koczulla A.R., Bals R.: Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs*, **63**, 389–406 (2003)
36. Kolodkin-Gal I., Romero D., Cao S., Clardy J., Kolter R., Losick R.: D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*, **328**, 627–629 (2010)
37. Kołwzan B.: Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstania i funkcjonowania. *Ochrona środowiska*, **33**, 3–14 (2011)
38. LaFleur M., Kumamoto C.A., Lewis K.: *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3839–3846 (2006)
39. Lellouche J., Friedman A., Banin E.: Antimicrobial and antibiofilm properties of yttrium fluoride nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*, **7**, 5611–5624 (2012)
40. Ma Y., Chen M., Jones J. E., Ritts A.C., Yu Q., Sun H.: Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm by trimethylsilane plasma coating. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 5923–5937 (2012)
41. Ma Y., Xu Y., Yestrepky B.D., Sorenson R.J., Chen M., Larsen S.D., Sun H.: Novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* virulence gene expression and biofilm formation. *PLoS One*, **7**, 47255 (2012)
42. Mai-Prochnow A., Murphy A.B., McLean K.M., Hong M.G., Ostrikov K.: Atmospheric pressure plasmas: infection control

- and bacterial responses. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **43**, 508–516 (2014)
43. Mann E.E., Rice K.C., Boles B.R., Endres J.L., Ranjit D., Chandramohan L., Tsang L.H., Smeltzer M.S., Horswill A.R., Bayles K.W.: Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*, **4**, 5822 (2009)
 44. Międzybrodzki R., Borysowski J., Fortuna W., Dąbrowska-Weber B., Górski A.: Terapia fagowa jako alternatywa w leczeniu zakażeń wywołanych przez bakterie antybiotykooporne. *Kardiochir. Torakochir. Pol.* **3**, 201–205 (2006)
 45. Miller M.B., Bassler B.L.: Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 165–199 (2001)
 46. Mitik-Dineva N., Wang J., Truong V.K., Stoddart P., Malherbe F., Crawford R.J., Ivanova E.P.: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* attachment patterns on glass surfaces with nanoscale roughness. *Curr. Microbiol.* **58**, 268–273 (2009)
 47. Morita Y., Imai S., Hanyuda A., Matin K., Hanada N., Nakamura Y.: Effect of silver ion coating of fixe orthodontic retainers on the growth of oral pathogenic bacteria. *Dent. Mater J.* **33**, 268–274 (2014)
 48. Moritz S., Wiegand C., Wesarg F., Hessler N., Müller F., Kralisch D., Hipler U., Fischer D.: Active wound dressing based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine. *Int. J. Pharm.* **471**, 45–55 (2014)
 49. Mosca D.A., Hurst M.A., So W., Vijar B.S.C., Fujii C.A., Falla T.J.: IB-367, a protegrin peptide with *in vitro* and *in vivo* activities against the microflora associated with oral mucositis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1803–1808 (2000)
 50. Myszka K., Czarczyk K.: Metody usuwania biofilmów bakteryjnych z powierzchni stałych. *Przemysł Spożywczy*, **2**, 18–21 (2007)
 51. Nakonieczna J., Rapacka-Zdonczyk A., Bielawski K.P., Grinholc M.: Sub-lethal photodynamic inactivation renders *Staphylococcus aureus* susceptible to silver nanoparticles. *Photochem. Photobiol. Sci.* **12**, 1622–1627 (2013)
 52. Neut D., Dijkstra R.J.B., Thompson J.I., Mei van der H.C., Busscher H.J.A gentamycin-releasing coating for cementless hip prostheses-longitudinal evaluation of efficacy using *in vivo* bio-optical imaging and its wide-spectrum antimicrobial efficacy. *J. Biomed. Mater Res.* **12**, 3220–3226 (2012)
 53. Nobile C.J., Mitchell A.P.: Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.* **8**, 1382–1391 (2006)
 54. Otto M.: Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**, 207–228 (2008)
 55. Otto M.: *Staphylococcus epidermidis*- the “accidental” pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 555–567 (2009)
 56. Overhage J., Campisano A., Bains M., Torfs E.C.W., Rehm B.H.A., Hancock R.E.W.: Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect. Immun.* **76**, 4176–4182 (2008)
 57. Pavithra D., Doble M.: Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants-issues and prevention. *Biomed. Mater.* **3**, 034003 (2008)
 58. Perez-Girardo C., Rodriguez-Benito A., Moran F.J., Hurtado C., Blanco M.T., Gomez-Garcia A.C.: Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**, 643–646 (1997)
 59. Privett B.J., Youn J., Hong S.A., Lee J., Han J., Shin J.H., Schoenfisch M.H.: Antibacterial fluorinated silica colloid superhydrophobic surfaces. *Langmuir*, **27**, 9597–9601 (2011)
 60. Regev-Shoshani G., Ko M., Crowe A., Av-Gay Y.: Comparative efficacy of commercially available and emerging antimicrobial urinary catheters against bacteriuria caused by *E. coli in vitro*. *Urology*, **78**, 334–339 (2011)
 61. Roosjen A., Kaper H.J., Mei van der H.C., Norde W., Busscher H.J.: Inhibition of adhesion of yeasts and bacteria by poly(ethylene oxide)-brushes on glass in a parallel plate flow chamber. *Microbiology*, **149**, 3239–3246 (2003)
 62. Roosjen A., Mei van der H.C., Busscher H.J., Norde W.: Microbial adhesion to poly(ethylene oxide) brushes: Influence of polymer chain length and temperature. *Langmuir*, **20**, 10949–10955 (2004)
 63. Roosjen A., Norde W., Mei van der H.C., Busscher H.J.: The use of positively charged or low surface free energy coatings versus polymer brushes in controlling biofilm formation. *Prog. Colloid. Polym. Sci.* **132**, 138–144 (2006)
 64. Rossi L.M., Rangasamy P., Zhang J., Qiu X.Q., Wu G.Y.: Research advances in the development of peptide antibiotics. *J. Pharm. Sci.* **97**, 1060–1070 (2008)
 65. Sun D., Accavitti M.A., Bryers J.D.: Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **12**, 93–100 (2005)
 66. Sun H., Ginsburg D. i wsp.: Inhibitor of streptokinase gene expression improves survival after group A streptococcus infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 3469–3474 (2012)
 67. Tang H., Cao T., Liang X., Wang A., Salley S.O., McAllister J., Ng K.Y.: Influence of silicone surface roughness and hydrophobicity on adhesion and colonization of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Biomed. Mater. Res.* **88**, 454–463 (2009)
 68. Trautner B.W., Hull R.A., Darouiche R.O.: Prevention of catheter-associated urinary tract infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**, 37–41 (2005)
 69. Truong V.K., Lapovok R., Estrin Y.S., Rundell S., Wang J.Y., Fluke C.J., Crawford-Ivanova E.P.: The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion ultrafine-grained titanium. *Biomaterials*, **31**, 3674–3683 (2010)
 70. Varra M.: New approaches in peptide antibiotics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 571–576 (2009)
 71. Wakabayashi H., Yamauchi K., Kobayashi T., Yaeshima T., Iwatsuki K., Yoshie H.: Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 3308–3316 (2009)
 72. Willcox M.D.P., Hume E.B.H., Aliwarga Y., Kumar N., Cole N.: A novel cationic-peptide coating for the prevention of microbial colonization on contact lenses. *J. App. Microbiol.* **105**, 1817–1825 (2008)
 73. Wu Y., Zitelli J.P., Ten-Huisen K.S., Yu X., Libera M.R.: Differential response of *Staphylococci* and osteoblasts to varying titanium surface roughness. *Biomaterials*, **32**, 951–960 (2010)
 74. Xu L.C., Siedlecki C.A.: Submicron-textured biomaterial surface reduces staphylococcal bacterial adhesion and biofilm formation. *Acta Biomater.* **8**, 72–81 (2012)
 75. Yount N.Y., Yeaman M.R.: Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7363–7368 (2004)
 76. Zhang L.H., Dong Y.H.: Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol. Microbiol.* **53**, 1563–1571 (2004)
 77. Zhao Z., Li Y., Meng S., Li S., Wang Q., Lin T.: Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to photodynamic antimicrobial chemotherapy with α -D-galactopyranosyl zinc phthalocyanines: *in vitro* study. *Lasers Med. Sci.* **29**, 1131–1138 (2014)
 78. Zimmermann S., Wagner C., Müller W., Brenner-Weiss G., Hug F., Prior B., Obst U., Hänsch G.M.: Induction of neutrophil chemotaxis by the quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect. Immun.* **74**, 5687–5692 (2006)