



Raport Tehnico-Științific

RAPORT DE ACTIVITATE AL ETAPEI III

Contractul nr.: 52PTE/06.10.2016

Cod proiect: PN-III-P2-2.1-PTE-2016-0177

Proiectul: Hidrogeluri compozite pe bază de nanoparticule anorganice și colagen cu activitate prelungită pentru prevenirea infecțiilor de plagă

Etapa III: Caracterizarea *in-vivo* a hidrogelurilor și obținerea acestora în condiții de producție la nivel micro-pilot

Termen de realizare: 30 Noiembrie 2018

Organizațiile partenere în proiect:

- Sanimed International Impex S.R.L. (Coordonator)
- Universitatea din București (UB – Partener 1).
- Universitatea Politehnică din București (UPB – Partener 2)
- Institutul de Virusologie “Ștefan S. Nicolau” (IVN – Partener 3)



Cuprins

1. Introducere
2. Obiectivele proiectului
3. Activități asumate și realizate în etapa III (2018)
4. Concluzii
5. Diseminarea rezultatelor

1. Introducere

Vindecarea plăgilor cutanate este un proces dinamic și complex care implică matricea extracelulară, mediatorii solubili și activarea diferitelor tipuri celulare. În cadrul unui proces normal de vindecare, există o tranziție specifică de la fază inflamatorie la regenerarea tisulară urmată de angiogeneza și reorganizare tisulară (Dovi JV, Szpaderska AM 2004). Procesul de vindecare este încetinit de existența unei faze inflamatorii prelungite și a țesutului necrotic care favorizează aderența și proliferarea bacteriană, precum și formarea de biofilme (Zhao și colab., 2013). Biofilmele microbiene sunt prezente la aproximativ 6% din rănilor acute și la peste 90% din rănilor cronice (Attinger and Wolcott, 2012). În general, infecțiile cu producere de biofilme au o progresie lentă dar, odată stabilite, sunt greu de combatut (Lazăr și colab., 2010).

Managementul plăgilor cutanate rezidă în utilizarea tratamentelor locale cu scopul prevenirii / tratamentului infecțiilor de plagă și al regenerării tisulare rapide și eficiente. Structurile colagenice umede și uscate sunt considerate în prezent una dintre strategiile cele mai eficiente în tratamentul plăgilor cutanate acute și cronice (Grigore și colab., 2017).

Nanoparticulele anorganice prezintă numeroase aplicații în domeniul biomedical și în industria farmaceutică. Anumite tipuri, precum cele metalice, de argint (Ag), cupru (Cu), titan (Ti), fer (Fe) și zinc (Zn), au demonstrat activități antimicrobiene semnificative, fiind în prezent investigate pentru dezvoltarea de noi strategii antimicrobiene, ca alternative la utilizarea antibioticelor.

2. Obiectivele proiectului

Scopul declarat al proiectului NanoColaGel a fost proiectarea și obținerea hidrogelurilor colagenice ce conțin nanoparticule anorganice metalice și oxidice (Ag, ZnO și SiO₂@ZnO) și implementarea producției acestora pe echipamente de nivel industrial. Punerea pe piață a hidrogelurilor funcționalizate obținute face parte din strategia S.C. Sanimed International Impex S.R.L., subsumată extinderii ofertei proprii din gama pansamentelor colagenice înalt performante, capabile să asigure o vindecare rapidă și eficientă a rănilor cutanate și în același timp să prevină colonizarea microbiană și formarea biofilmelor, aspect frecvent incriminat de clinicieni pentru vindecarea întârziată și defectuoasă a plăgilor cronice.

3. Activități asumate și realizate în etapa III (2018)

Etapa III are ca principal obiectiv caracterizarea *in-vivo* a hidrogelurilor și obținerea acestora în condiții de producție la nivel micro-pilot.



Obținerea hidrogelurilor optimizate pe bază de collagen și Ag

În urma evaluării rezultatelor anterioare s-a constatat necesitatea perfectării parametrilor experimentali pentru obținerea hidrogelurilor compozite pe bază de collagen și argint și evaluarea din punct de vedere biologic a materialelor optimizate. În acest sens au fost obținute hidrogelurile compozite au fost obținute prin reducerea Ag^+ la Ag^0 *in-situ* (prin adăugarea reactanților în hidrogelul de collagen) denumită ulterior “într-o etapă” (1-step), respectiv obținerea în prealabil a nanoparticulelor metalice și adăugarea ulterioară a hidrogelului de collagen, denumită ulterior “în două etape” (2-step).

În ambele cazuri probele au fost supuse omogenizării mecanice viguroase, în vederea obținerii unei distribuții cât mai uniforme a particulelor în masa polimerică. În acest sens s-a utilizat ca agent reducător $NaBH_4$, respectiv un amestec de reducere bazat pe efectul sinergetic al $NaBH_4$ și acid citric (reducător biocompatibil, de tipul antioxidanților, dar cu efect reducător cunoscut ca fiind mai redus decât cel al $NaBH_4$). Ionii citrat joacă și alte roluri în procesul de reducere a ionilor de argint, precum agent de stabilizare și de complexare. În vederea controlării morfologiei particulelor metalice obținute și menținerii acestora sub formă dispersată, în procesul de sinteză s-a folosit PVP (polivinilpirolidonă), ce favorizează obținerea de structuri plachetare, triunghiulare cu colțuri teșite. Pentru reticularea la rece timp de minim 24h a collagenului s-a utilizat o soluție diluată de glutaraldehidă. Materialele compozite rezultate sunt rezumate în tabelul 1.

Tabelul 1. Descrierea tehnică a pansamentelor collagenice cu nanoparticule de Ag obținute

Denumire probă	Nr. proba	Metoda de obținere	Agent reducător	Agent dispersant
$AgNO_3$, $NaBH_4$ + collagen	1	în două etape	$NaBH_4$	-
$AgNO_3$, collagen + $NaBH_4$	2	într-o etapă	$NaBH_4$	-
$AgNO_3$, $NaBH_4$, acid citric, PVP + collagen	3	în două etape	$NaBH_4$ +acid citric	PVP
$AgNO_3$, collagen, acid citric, PVP + $NaBH_4$	4	într-o etapă	$NaBH_4$ +acid citric	PVP

Pentru obținerea tuturor hidrogelurilor compozite s-a folosit drept precursor de argint o soluție apoasă diluată de $AgNO_3$ 10^{-4} M și borohidruură de sodiu ($NaBH_4$) 1 M. În cazul probelor cu agent reducător mixt și agent dispersant, s-au folosit acid citric 0.3M, respectiv polivinilpirolidonă (PVP) 0,007 M.

În final s-au adăugat 5 ml de apă oxigenată 30% și a fost menținută agitarea pentru aproximativ 10 minute până când s-a obținut culoarea albastru ușor închis (culoare datorată dimensiunii nanoparticulelor), etape prezentate schematic în figura 1.

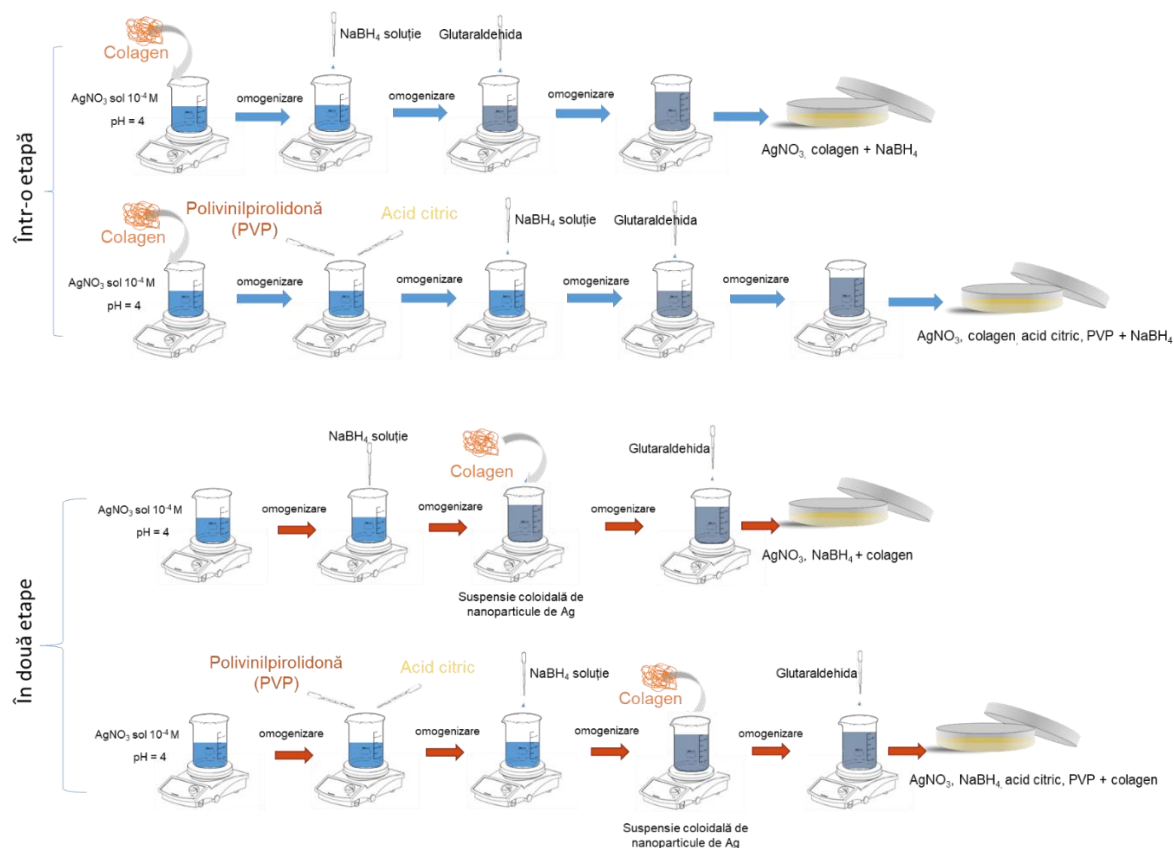


Figura 1. Modul de obținere a pansamentelor colagenice cu nanoparticule de Ag (obținute în una sau două etape)

Obținerea hidrogelurilor la nivel micro-pilot

În vederea obținerii hidrogelurilor în condiții de producție la nivel micro-pilot, s-au utilizat matrici de colagen comerciale SANIMED care au fost funcționalizate cu nanoparticule de Ag (sintetizate în prealabil) și ZnO (precipitat *in-situ*).

Pentru obținerea a 500 ml argint coloidal de concentrație 100 ppm, s-a utilizat drept precursor de argint o soluție apoasă de AgNO₃ 10⁻⁴ M, peste care s-au adăugat 30 ml soluție citrat de sodiu (C₆H₅O₇Na) 0,3 M, sub continuă agitare. După 12 minute s-au adăugat 30 ml soluție polivinilpirolidonă (PVP) 0,007 M și 5 ml borohidruă de sodiu (NaBH₄) 1 M, în vederea reducerii Ag⁺ la nanoparticule de Ag⁰. În final s-au adăugat 5 ml de apă oxigenată 30% și a fost menținută agitarea pentru aproximativ 10 minute, până când s-a obținut culoarea albastru ușor închis.

Matricile de colagen produse și comercializate de SANIMED au fost cântărite și apoi supuse procesului de reticulare cu soluție apoasă de glutaraldehidă 1%. În funcție de masa matricilor de colagen s-a stabilit cantitatea de glutaraldehidă necesară pentru reticulare, reprezentând 0,5 % față de masa de substanță uscată. Procesul de reticulare a implicat plasarea matricilor de colagen la frigider timp de 24h. După reticulare, matricile de colagen au fost tratate diferențiat, în vederea obținerii unor hidrogeluri compozite cu conținut variabil de ZnO



(2%, 3%, 5%), respectiv Ag. În cazul probei cu Ag, peste matricea de colagen s-au adăugat 50 ml suspensie coloidală Ag 100 ppm și s-a completat cu 50 ml apă distilată, în vederea imersării complete a pansamentului în lichid. Pentru probele cu un conținut de ZnO, s-a utilizat ca precursor de zinc $ZnCl_2$, care a fost solubilizată în câte 100 ml apă distilată și adăugată în cantități diferite în funcție de masa de substanță uscată din fiecare matrice de colagen, în vederea obținerii unor concentrații de 2%, 3%, 5% ZnO în materialele finale. Peste matricile de colagen imersate complet în soluția de precursor de Zn^{2+} s-a picurat soluție amoniacală 25% pentru a avea loc procesul de precipitare *in-situ*. Matricile obținute au fost menținute la rece timp de 24h pentru definitivarea reacțiilor și o distribuție mai bună a nanoparticulelor în toată masa colagenică, și ulterior supuse procesului de liofilizare (înghețare la 55° C timp de 12 h, vidare la 0,001 mbari timp de 12 h și încălzire sub vid timp de 24 h până la 35° C). Pentru evidentiarea efectului antimicrobian al pansamentelor colagenice nanomodificate ce contin nanoparticule de argint, obtinute la scara micropilot s-au utilizat urmatoarele tulpini: *Pseudomonas aeruginosa* (2 tulpini multirezistente izolate din secreție plagă: *P. aeruginosa* 23 și *P. aeruginosa* 20) ; *Staphylococcus aureus* (2 tulpini multirezistente izolate din secreție plagă: MRSA1495 și MRSA 963). Aceste tulpini au fost selectate pentru evaluarea efectului antimicrobian in vitro al pansamentelor colagenice produse la scara micropilot pe tulpini clinice, multirezistente. Rezultatele obtinute pe tulpini de laborator au fost prezentate in raportul stiintific anterior.

Evaluarea calitativa a efectului antimicrobian

Tulpinile au fost menținute pe bulion nutritiv cu 20% glicerol la -80°C. Pentru testele antimicrobiene microorganismele au fost însămânțate pe geloză nutritivă (tulpinile bacteriene). Coloniile obținute au fost utilizate pentru obtinerea de suspensii în AFS (apă fiziologică sterilă) de densitate optică 0,5 Mc Farland (1-3x10⁸ UFC/mL).

Pentru a realiza **analiza calitativa a efectului antimicrobian**, s-a utilizat o metoda derivata de la metoda standardizată a antibiogrammei (Kirby Bauer). Pe un mediu agarizat turnat în placi Petri se însămânțează microorganismul de testat în pânză cu tamponul. Ulterior se dispun la distanțe egale (aprox 3cm) eşantioanele de pansamente de colagen deshidratate, taiate sub forma unor discuri cu diametrul de 6mm și grosime aprox. 3mm, sterilizate în prealabil prin expunere la UV timp de 20 min pe fiecare parte. Plăcuțele Petri se incubează timp de 18 - 20h la 37°C și ulterior se analizează dimetrele zonelor de inhibiție a creșterii apărute în jurul discurilor de colagen ce conțin diferite tipuri de nanoparticule. Se analizeaza ulterior la lupa binocular (marire 10X) detectia prezentei coloniilor microbiene dezvoltate sub discurile de colagen.

Analiza cantitativa a efectului antimicrobian- Creșterea microorganismelor planctonice (plutoare) în prezența materialelor. Pentru testarea efectului materialelor obținute asupra creșterii microorganismelor în mediu lichid (culturi planctonice), materialele obținute au fost tăiate sub forma unor discuri cu diametrul de 6mm și grosime aprox. 3mm și sterilizate prin expunere la radiații UV timp de 20 min pe fiecare parte. Câte un fragment de material steril a fost depus individual într-un godeu al unei placi cu 24 godeuri sterile. Peste materialele depuse, în godeuri s-a adăugat 1mL mediu lichid (bulion simplu) și ulterior 10 μL suspensie microbială de densitate 0.5 McFarland (bacterii), pregătită în AFS (apă fiziologică

sterilă, sol NaCl 0,9%). Plăcile cu 24 godeuri astfel pregătite, au fost incubate la 37°C timp de 24h. După expirarea timpului de incubare 200 µL din suspensiile microbiene obținute au fost transferați în plăci cu 96 godeuri sterile și turbiditatea culturilor microbiene (absorbanta) a fost măsurată spectrofotometric la 600nm.

Evaluarea aderenței și a formării de biofilme. Pentru testarea efectului pansamentelor de collagen asupra capacității de aderență și a producerii de biofilme, materialele obținute au fost tăiate sub forma unor discuri cu diametrul de 6 mm și grosime aprox. 3mm și sterilizate prin expunere la radiații UV timp de 20 min pe fiecare parte. Câte un fragment de material steril a fost depus individual într-un godeu al unei plăci cu 24 godeuri sterile. Peste materialele depuse, în godeuri s-a adăugat 1 mL mediu lichid (bulion simplu) și ulterior 10 µL suspensie microbiană de densitate 0.5 McFarland, pregătită în AFS (apă fiziologică sterilă, sol NaCl 0,9%). Plăcile cu godeuri astfel pregătite, au fost incubate la 37°C timp de 24 h. După incubare materialele au fost spalate cu AFS și mediul a fost schimbat, pentru dezvoltarea biofilmelor pe suprafața acestora. Plăcuțele au fost incubate pentru 24h. După expirarea perioadei de incubare, eșantionul pe care s-a dezvoltat biofilmul a fost spălat cu AFS și depus într-un tub Eppendorf steril într-un mL AFS. Tubul a fost vortexat energic timp de 30 s și sonicat 10 s pentru desprinderea celulelor din biofilm. Suspensia celulară obținută a fost diluată și diferite diluții au fost însămânțate pe plăci cu mediu de cultură solidificat în vederea obținerii și cuantificării numărului de unități formatoare de colonii (UFC)/ mL.

Efectul antimicrobian al acestor pansamente s-a dovedit a fi mai pronunțat pe patogenul oportunist Gram negativ *P. aeruginosa*, și mai puțin eficient asupra speciei Gram pozitive *S. aureus* (fig 2A). În ambele cazuri s-a observat un efect antimicrobian mai redus, comparativ cu cel obținut în cazul tulpinilor de laborator, sensibile la antibiotice. Aceste rezultate sugerează ca mecanismele de rezistență la antibiotice ale acestor tulpini microbiene ar putea reduce eficiența antimicrobiană a pansamentelor colagenice ce conțin nanoparticule de argint, metoda de obținere a acestora fiind deosebit de importantă în dezvoltarea efectului antimicrobian.

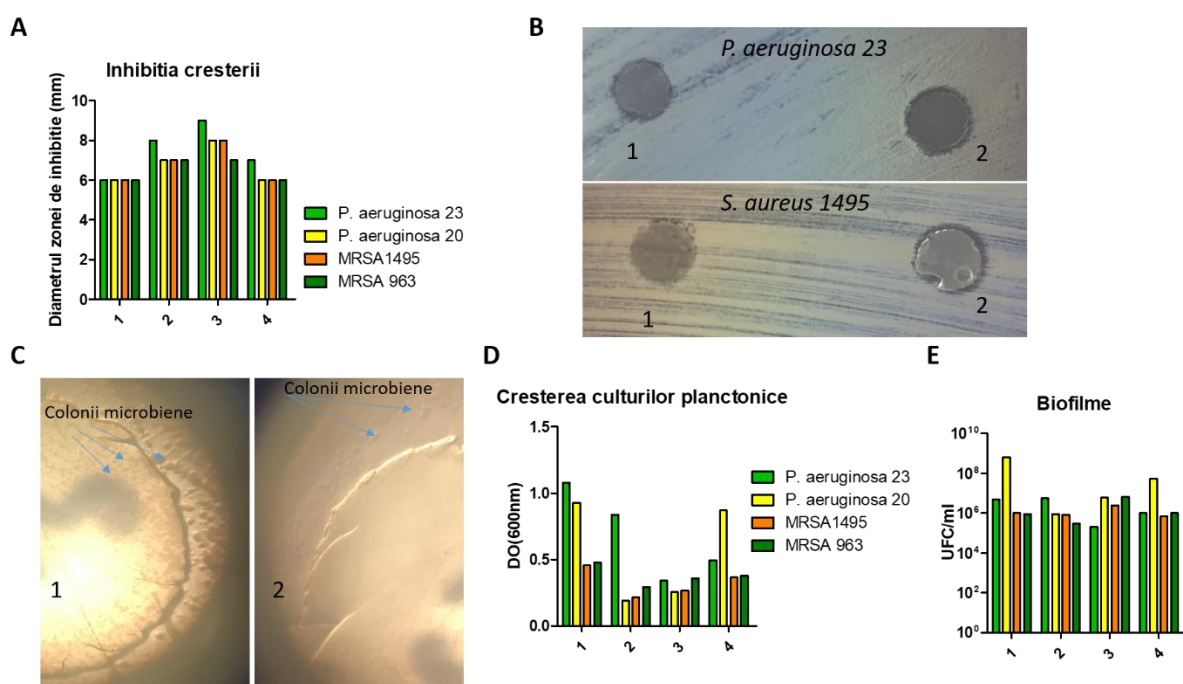




Figura 2. Analiza efectului antimicrobian al hidrogelurilor pe baza de argint. **A.** Evaluarea efectului antimicrobian calitativ (zonele de inhibiție a creșterii microbiene), în prezența materialelor colagenice dezvoltate. **B.** Aspectul creșterii microorganismelor în prezența plansamentelor colagenice (variantele 1 și 2) pe mediu solidificat, timp de 20h, la 37°C. **C.** Aspectul sub lupa binocular (10x magnificare) al pansamentelor colagenice testate (variantele 1 și 2), unde se pot observa colonii de *S. aureus* 1495 dezvoltate sub disc și în imediata vecinătate a discului (1), sau absența dezvoltării coloniilor sub disc și în imediata vecinătate a pansamentului (2). **D.** Reprezentare grafică a Absorbantelor culturilor planctonice cultivate în prezența materialelor testate timp de 24h la 37°C. **E.** Reprezentare grafică a numărului de colonii microbiene obținute din dizlocarea celulelor incluse în biofilme ce reflectă gradul de dezvoltare a acestora pe esantioanele colagenice testate

În toate cazurile analizate însă, nu s-au putut observa colonii microbiene dezvoltate sub pansamentele ce conțin nanoparticule de Ag (cu excepția probei 1 pentru tulpina *S.aureus* 1495), spre deosebire de proba control, ce conține collagen fără nanoparticule (fig 2B,C). Aceste rezultate sugerează că pansamentele dezvoltate pot inhiba colonizarea cu microorganisme la nivel local, pe regiunea cutanată pe care sunt aplicate, ideea urmând să fie confirmată *in vivo*.

Aspectul observat în cazul testelor calitative este confirmat și de rezultatele testelor cantitative, și anume cel mai eficient efect antimicrobian este observat în cazul probelor 2 și 3 (fig 2D.). Pentru tulpinile de *P. aeruginosa* testate, s-au observat diferențe evidente ale inhibiției creșterii și multiplicării culturilor planctonice care aparțin tulpinilor testate, dar și între acestea și cele de *S.aureus*, cele din urmă prezentând o inhibiție a creșterii mai redusă. Analiza capacității de aderență și dezvoltare a biofilmelor microbiene pe suprafața esantioanelor de collagen obținute arată că acest fenotip este semnificativ redus pe suprafața hidrogelurilor deshidratate ce conțin nanoparticule de Ag, obținute prin procedeul obținut în variantele experimentale 1 și 2 (fig 2E).

Analiza *in vivo* a eficienței antibacteriene a materialelor colagenice cu Ag

Pentru studierea proceselor reparatorii și eficienței antibacteriene a materialelor nanostructurate s-a utilizat modelul rănirii excizionale. Experimentele utilizând șoareci albi de laborator CD1 (*Mus musculus*) au fost avizate de către Direcția Sanitar Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor (Autorizație nr. 310 din 31.10.2016 /proiect NanoColaGel).

Protocolul de implantare a materialului nanostructurat a presupus parcurgerea următoarelor etape: anestezia și prepararea pentru operație: animalele au fost anesteziate prin injectarea intraperitoneală a unui amestec de silazină 10mg/Kgc și ketamina 80-100 mg/Kgc asigurându-se faptul că reflexele membrelor sunt supresate. S-a așezat șoarecele în poziția pentru experiment și ulterior a fost pregătită regiunea unde urma să aibă loc incizia: părul a fost tuns cu mașina de tuns, s-a aplicat cremă epilatoare aprox 3 minute, iar după îndepărtarea acesteia pielea a fost dezinfectată cu alcool 70%. A fost realizată o dublă excizie la nivelul părții dorsale a șoarecelui utilizând o preducea cu diametru de 8mm, care se întinde până la nivelul mușchiului *paniculosus carnosus*.

Pentru evaluarea eficienței antibacteriene, un inocul de 50 μl de cultură bacteriană (*Staphylococcus aureus*) de 24 de ore de densitate 1McFarland a fost administrat la nivelul fiecărei excizii. După perioada de adsorbție a inoculului, la nivelul fiecărei excizii a fost aplicat filmul de material colagenic cu Ag care a fost cusut cu fir resorbabil în puncte. După operație, animalele au fost menținute în cuști individuale, la căldură și monitorizate zilnic, pentru diverse semne clinice, pierderea în greutate și închiderea ranilor. Prelevarea probelor s-a realizat la 4 zile de la operație, când șoarecii au fost sacrificați prin dislocare cervicală, după anesteziere cu

dioxid de carbon (CO₂). S-a realizat o incizie în jurul răni și s-a prelevat țesut pentru analizele de biologie moleculară cu înghețare rapidă la -80°C). ARN total a fost extras cu reactivul *Trizol* și revers-transcris folosindu-se kit-ul *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor* conform protocoalelor prezentate anterior. Reacția qPCR s-a realizat utilizând SYBR Green și primeri specifici. Rezultatele obținute demonstrează faptul că răspunsul inflamator indus de infecția bacteriană (nivelul mL-1) este mult diminuat în prezența AgNO₃, NaBH₄ + colagen. O diminuare mai slabă a răspunsului pro-inflamator mediat de IL-1 a fost observat de asemenea și în cazul materialului AgNO₃, colagen +NaBH₄.

Analiza histopatologica (coloratie hematoxilina-eozina) demonstrează existența unui răspuns inflamator accentuat în cazul loturilor control (colagen + infecție). Pentru lotul control, la situsul exciziei s-a identificat o arie supurativă cu abundanț exsudat purulent (puroi) care include resturi de rețea de fibrina, neutrofile întegre și alterate, resturi celulare și colonii microbiene (Figura 3). Este de remarcat efectul anti-inflamator foarte intens exercitat de materialul AgNO₃, NaBH₄ + colagen în absența infecției, ceea ce demonstrează utilitatea acestuia în managementul anumitor tipuri de plăgi cronice, caracterizate prin prelungirea excesivă a fazei inflamatorii (figura 4). Analiza histopatologica (coloratie hematoxilina-eozina) a confirmat existența unui proces inflamator redus în cazul probei AgNO₃, colagen +NaBH₄ (figura 4).

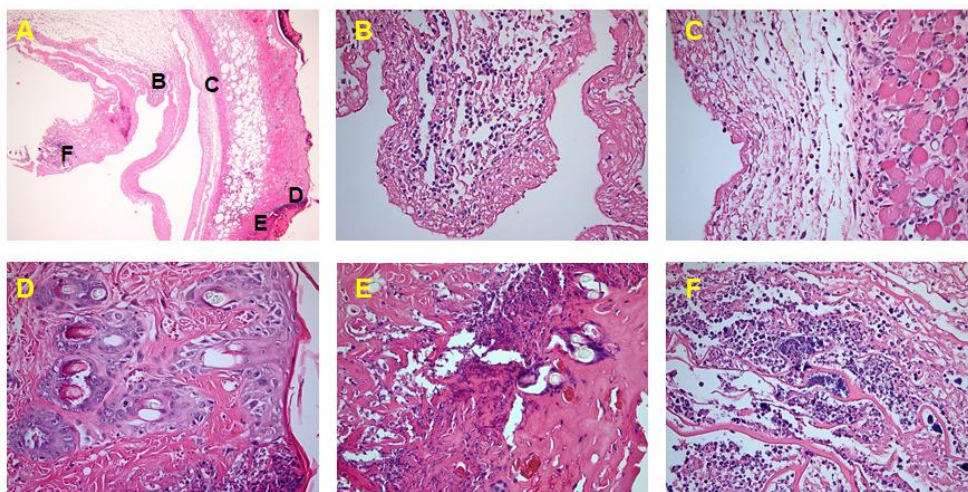


Figura 3. Fragment tisular alcătuit din țesut muscular striat și adipos bordat în suprafața de tegument care prezintă pe fața internă țesut de granulație cu exsudat fibrinoleucocitar (A). În țesutul de granulație se identifică numeroase neutrofile (B). Epidermul prezintă modificări regenerative (C) adiacent ariei de lipsă de substanță și focal arii de necroză (D). În profunzime se identifică arie supurativă cu abundanț exsudat purulent (puroi) care include resturi de rețea de fibrina, neutrofile întegre și alterate, resturi celulare și colonii microbiene (E). În masa de puroi se identifică structuri anhistice, acelulare, omogene, eozinofile – material exogen. Foto A-E HE x 400

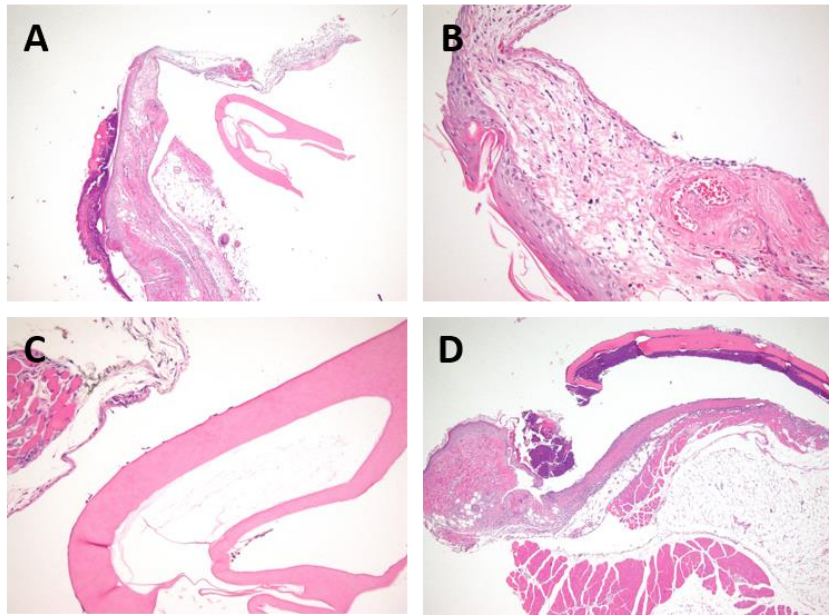


Figura. 4. Analiza histologica la nivelul plagii (proba AgNO_3 , collagen + NaBH_4). A. Fragment de tegument si tesut adipos care bordeaza cavitate in care se identifica material eozinofil, omogen, anhist (HE x 100). B. Minim infiltrat inflamator limfomonocitar cu foarte rare PMN in derm (HE x 200). C. Membrana anhistra fara infiltrat inflamator (HE x 200). D. Fragment de tegument si tesut adipos cu mici ulceratii epidermice acoperite de depozite fibrinoleucocitare. Minim infiltrat inflamator dermic. (HE x 100).

4. Concluzii

În etapa a III a acestui proiect au fost realizate toate activitățile asumate în cererea de finanțare. În cadrul etapei, coordonatorul de proiect SANIMED INTERNAȚIONAL IMPEX SRL a realizat un ansamblu coerent de acțiuni pentru obținerea hidrogelurilor nanostructurate la nivel micro-pilot în colaborare cu P2 (Universitatea Politehnică București). Rezultatele testelor antimicrobiene (realizate de către P1- Universitatea București) au arătat că hidrogelurile de collagen obținute prezintă activitate antimicrobiană și inhibitorie a colonizării cu specii de bacterii și levuri de interes medical și de cercetare. Efectele de inhibiție a creșterii și multiplicării microorganismelor testate au fost diferite în funcție de tipul de material utilizat, de tipul de nanoparticule și de cantitatea acestora, precum și de particularitățile microorganismelor testate. Rezultatele obținute *in vitro* au fost completate de rezultatele *in vivo* realizate de P3 (Institutul de Virusologie Ștefan S Nicolau). Astfel, că răspunsul inflamator indus de infecția cu *S. aureus* este mult diminuat în prezența AgNO_3 , NaBH_4 + collagen. Rezultatele obținute în cadrul proiectului s-au concretizat și prin depunerea unei cereri de brevet la OSIM București (Nr. Înregistrare A1009/29.11.2018) cu titlul ‘*Procedeu de obținere a unor hidrogeluri compozite pe bază de collagen și nanoparticule de argint pentru prevenirea infecțiilor de plagă*’



Bibliografie

- Attinger, Christopher and Randy Wolcott. 2012. “Clinically Addressing Biofilm in Chronic Wounds.” *Advances in Wound Care* 1(3):127–32.
- Dovi JV, Szpaderska AM, DiPietro LA. 2004. “Neutrophil Function in the Healing Wound: Adding Insult to Injury?” *Thromb Haemost.* 92(2):275–80.
- Lazăr V, Chifiriuc MC. Architecture and physiology of microbial biofilms. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 2010 Apr-Jun;69(2):95-107
- Mădălina Elena Grigore, Alexandru Mihai Grumezescu, Alina Maria Holban , George Dan Mogoșanu, Ecaterina Andronescu. Collagen-Nanoparticles Composites for Wound Healing and Infection Control. *Metals* **2017**, 7(12), 516; <https://doi.org/10.3390/met7120516>
- Zhao, Ge et al. 2013. “Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds.” *Advances in Wound Care* 2(7):389–99.