

Uniwersytet Medyczny imienia Piastów Śląskich we Wrocławiu
Studium Kształcenia Podyplomowego

Trudności terapeutyczne infekcji z towarzyszącym biofilmem

Praca specjalizacyjna: Farmacja kliniczna
dr n. farm. Jakub Król

Kierownik specjalizacji: mgr farm. Anna Lipnicka

Wrocław 2022r.

1. Wstęp

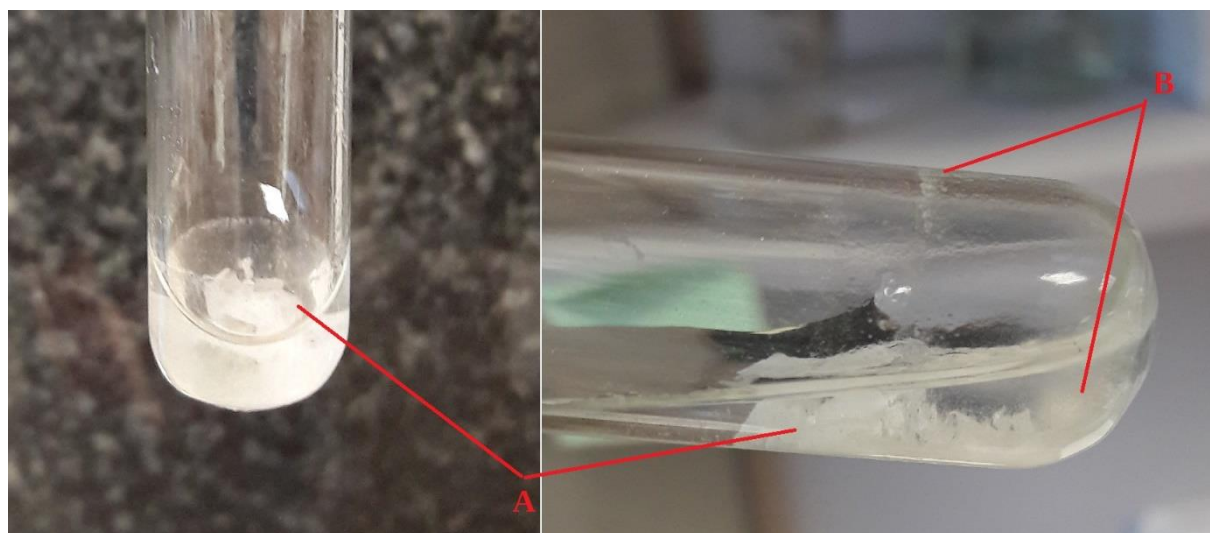
Jednokomórkowe bakterie oraz grzyby pomimo swojej samowystarczalności posiadają zdolności do tworzenia biofilmów. Biofilm to przestrzenna, trójwymiarowa społeczność połączonych ze sobą mikroorganizmów wytwarzających zewnątrzkomórkową macierz. Tego typu struktury mogą powstawać zarówno na powierzchniach abiotycznych (np. cewniki, protezy) a także biotycznych (np. błony śluzowe, kości, powierzchnie ran) [1,2]. W odróżnieniu od biofilmu, kiedy komórki nie są połączone ze sobą i stanowią luźną zawiesinę drobnoustrojów mówimy że są w formie planktonowej. Zwarta struktura biofilmu znacząco zwiększa szanse drobnoustrojów na przeżycie i zapewnia ochronę przed środowiskiem zewnętrznym. Wewnątrz struktury biofilmowej towarzyszącej infekcji, komórki są odseparowane od środowiska zewnętrznego, mniej podatne na wysychanie, oraz mniej wrażliwe na układ odpornościowy gospodarza oraz antybiotyki [1,2]. Do chorób którym towarzyszy powstawanie biofilmu możemy zaliczyć między innymi infekcje związane z ciałami obcymi np. implantami, cewnikami, czy wenflonami. W niektórych przypadkach odsetek infekcji po implantacji może dochodzić do 40% [3]. Obecność złożonych struktur drobnoustrojowych również obserwuje się w jednostkach chorobowych bez udziału ciała obcego takich jak chociażby zapalenie przyzębia, stany zapalne kości, dróg oddechowych czy układu moczowego [3]. Dojrzały biofilm poza utrzymywaniem zwartej struktury, zapewnieniem środowiska dla komórek składowych, stanowi również rezerwuuar drobnoustrojów, skąd na drodze fragmentacji biofilmu może dochodzić do rozprzestrzeniania infekcji [1-3].

Mnogość mechanizmów odpornościowych biofilmów przyczynia się do trudności w zwalczaniu infekcji. Do najważniejszych zaliczyć można: tworzenie zewnątrzkomórkowej macierzy otaczającej komórki, spowolnienie cyklu życiowego komórek, zmiany transkrypcyjne (np. zwiększenie ekspresji genów odpowiedzialnych za tworzenie pomp aktywnie usuwających antybiotyki poza obręb komórki), różnicowanie się komórek, czy nawet komunikowanie się drobnoustrojów wewnątrz struktury (quorum sensing) [4]. Minimalne stężenie leku które jest niezbędne do zwalczenia biofilmu może być nawet kilka rzędów wielkości większe niż stężenie skuteczne wobec komórek planktonowych (niezwiązanych w strukturze biofilmowej), w wielu przypadkach antybiotyk skuteczny w zwalczaniu komórek planktonowych jest zupełnie nieskuteczny przeciwko biofilmowi (tabela 1) [4,5]. Warty podkreślenia jest również fakt obserwowanej rosnącej liczbie zakażeń wywołanych przez szczepy odporne na stosowane antybiotyki, również szczepy wielolekooporne [6]. Lek

nieskuteczny wobec formy planktonowej patogenu, nie będzie aktywny przeciwko strukturze biofilmowej.

Lek	MIC dla planktonu [$\mu\text{g/ml}$]	MBIC dla biofilmu [$\mu\text{g/ml}$]
Gentamycyna	16	>4096
Bacytracyna	32	>4096
Nitrofurazon	4	>512
Wankomycyna	2	>4096
Enrofloksacyna	1	>4096
Ceftriakson	32	>4096
Oksacylina	8	>4096
Rifampicyna	4	>1024

Tabela 1. Porównanie minimalnego stężenia hamującego (MIC) oraz minimalnego stężenia przeciwbiofilmowego (MBIC) wybranych antybiotyków dla *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 [26] Wartości MBIC poza testowaną skalą, nie możliwe do osiągnięcia in vivo.



Zdj. 1. Przykład biofilmu *Candida tropicalis* wychodowany in vitro. Zwarta struktura drożdżaków w tym wypadku utworzyła się nie tylko na powierzchni probówki (B), ale również w postaci kłaczków (ang. floc biofilm) luźno unoszących się w roztworze pożywki (A). [ze zbiorów autora]

2. Mechanizmy związane z opornością biofilmu:

2.1 Macierz

Mikroorganizmy w biofilmach żyją otoczone samodzielnie przez nich wytworzoną matrycą, która odpowiada za spójność całej struktury. Macierz międzykomórkowa- ECM (ang. Extracellular matrix) stanowi zarówno podporę całej struktury jak i ochronę fizyczną, już od wczesnych etapów powstawania biofilmu [7]. W skład macierzy wchodzi głównie polisacharydy, białka, kwasy nukleinowe i lipidy. Ponadto wewnątrz macierzy znajdują się enzymy ułatwiające przemiany metaboliczne i trawienie składników odżywczych.

Macierz sama w sobie stanowi barierę dla antybiotyków utrudniając im przenikanie do wnętrza komórek i osiągnięcie odpowiedniego stężenia terapeutycznego, jednakże nie jest to główna przyczyna nieskuteczności antybiotyków przeciwko biofilmom. Warto nadmienić że różne związki charakteryzują się różną zdolnością do penetrowania biofilmów [8]. Składniki macierzy mogą wpływać w różny sposób na różne antybiotyki. Kwasy nukleinowe biorą udział w szlakach komunikacyjnych (min. Quorum sensing), mogą chelatować jony metali (głównie magnezu Mg^{2+}) co wpływa na ładunek środowiska, a także bezpośrednio reagują z cząsteczkami leków, np. z wankomycyną [4]. W zewnątrzkomórkowych kwasach nukleinowych mogą znajdować się również geny kodujące odporność na antybiotyki. Polisacharydy będące jedną ze składowych macierzy mogą inaktywować związki takie jak np. kolistyna, tobramocyna, czy aminoglikozydy, zwiększając ponadto fizyczną odporność biofilmu na polisorbaty [4]. Istotną rolę w oporności na penicyliny pełni znajdująca się w strukturze większości bakteryjnych biofilmów betalaktamaza [9]. Źródłem zarówno DNA jak i protein w macierzy międzykomórkowej jest liza komórek tworzących biofilm [10]. W macierzy znajdują się około 500 białek, z czego znaczna część ma funkcje enzymatyczne [11]. Te pozakomórkowe enzymy, pełnią kilka funkcji. Najważniejszą jest udział w dostarczaniu i trawieniu składników odżywczych. Sugeruje to że matryca może stanowić swoisty zewnętrzny układ trawienny rozkładający składniki odżywcze i dostarczać energii komórkom. Istotną korzyścią wytwarzania macierzy międzykomórkowej jest również ochrona przed układem odpornościowym gospodarza. Neutrofile są w stanie rozpoznawać infekcję, otaczać biofilm ale mają bardzo ograniczoną zdolność wyłapywania poszczególnych komórek [12].

2.2. Zmiany metaboliczne

Na przykładzie modeli biofilmów grzybiczych sekwencja RNA wykazała że w komórkach tworzących biofilm około 1600 genów ulega zwiększonej ekspresji, natomiast około 600 wyciszeniu w porównaniu z komórkami planktonowymi [13]. Odpowiada to około 1/3 wszystkich genów *Candida albicans*. Geny których ekspresja jest obniżana w trakcie fazy wzrostu stacjonarnego w biofilmach mogą być dodatkowo kilkukrotnie tłumione, bądź całkowicie wyłączone (np. w tak zwanych komórkach przetrwałych, ang. *persistor cells*). Inne geny zachowują się odwrotnie i ich ekspresja jest zwielokrotniona, np. genów odpowiadających za produkcję pomp transportowych. Istotne różnice obserwuje się nawet między komórkami którym już udało się przylgnąć do powierzchni a tymi które nie przylegają i znajdują się wewnątrz biofilmu [14]. Świadczy to o szerokich możliwościach adaptacyjnych drobnoustrojów, oraz o istnieniu dwóch trybów funkcjonowania: tryb planktonowy, gdy komórka jest niezwiązana z innymi, oraz tryb biofilmowy w którym komórka znajduje się w złożonej strukturze. W samej strukturze biofilmowej mogą znajdować się komórki na wielu różnych etapach rozwoju. Wpływa to w istotny sposób na tolerancję na antybiotyki całej mikro społeczności.

W związku z tym że biofilm jest zbitą strukturą mogą powstawać pewne dysproporcje w dystrybucji składników odżywczych i tlenu. Wykazano że komórki znajdujące się głębiej w biofilmie mogą wykazywać oznaki niedotleniania oraz być w dużo mniejszym stopniu zaopatrywane w składniki odżywcze [4]. W takich warunkach większość komórek będzie przechodziło w stan stacjonarny, czekając z podziałami na lepsze warunki. Wpływa to w istotny sposób na skuteczność terapii antybiotykowej ponieważ większość używanych obecnie środków jest najskuteczniejsza w fazie podziałów. Może to też tłumaczyć wspomniany wyżej brak aktywności leków pomimo dobrej penetracji w głąb biofilmu. Inaczej mówiąc, głód sprzyja tolerancji drobnoustrojów na antybiotyki.

Środowisko o obniżonej zawartości tlenu będzie również niwelowało niektóre mechanizmy leków związane z reaktywnymi formami tlenu. O Taki mechanizm podejrzewa się między innymi cyprofloksacynę która może aktywować wewnątrz bakterii enzym katalazę KatA zwiększającą stężenie aktywnych form tlenu u *Pseudomonas aeruginosa* [15]. Ponieważ działanie większości antybiotyków o działaniu bakteriobójczym jest w mniejszym lub większym stopniu związane z reaktywnymi formami tlenu, to w warunkach o obniżonej jego zawartości w środowisku obniży się również poziom rodników hydroksylowych co będzie przeciwdziałać aktywności bakteriobójczej.

2.3. Komórki przetrwałe

Ważnym czynnikiem determinującym oporność biofilmów jest również obecność tzw. komórek przetrwałych (ang. persister cells). Są to komórki bakterii bądź grzybów w stanie swoistego uśpienia, fenotypowo różne od reszty populacji, ze znacznie obniżonym metabolizmem [16]. Powstają prawdopodobnie w wyniku stresu związanego z obniżonym zasobem substancji odżywczych i tlenu w głębszych warstwach biofilmu. Ten typ komórek został po raz pierwszy zaobserwowany w 1944r. przez J. Biggera, który zauważył że dodanie wysokich dawek penicyliny do populacji *Staphylococcus aureus* zawsze skutkowało wyodrębnieniem ocalałych subpopulacji [16]. Do tej pory stwierdzono istnienie tych form u wszystkich zbadanych dotychczas bakterii i większości patogennych grzybów [17]. Tego typu komórki po pojawieniu się dogodnych warunków uaktywniają się i są w stanie odtworzyć populację. Ze względu na stagnację, komórki przetrwałe wykazują dużą odporność na stosowane leki. Powstawanie tego rodzaju form może być nawet indykowane po przez podanie antybiotyków do środowiska w którym znajdują się mikroorganizmy [16].

W przypadku infekcji grzybiczych z towarzyszącym biofilmem sytuacja wydaje się jeszcze bardziej poważna. Ze względu na i tak bardzo ograniczony arsenał dostępnych środków przeciwgrzybiczych. W zasadzie tylko amfoterycyna B oraz echinokandyny wykazują działanie grzybobójcze (azole są mykostatykami). W odpowiedzi na stres związany z dużymi dawkami leków przeciwgrzybiczych, statyczne i mało aktywne komórki przetrwałe mogą przejść aktywację o nie do końca jasnym mechanizmie polegającą na zwiększeniu ekspresji genów odpowiadających za efflux (głównie CDR1) oraz obniżenie produkcji ergosterolu (punkt uchwytu azoli). Drastycznie zwiększona produkcja białek odpowiadających za integralność ściany komórkowej utrudnia działanie amfoterycyny B [18]. Lek ten jest w stanie spowodować liżę znacznej części biomasy biofilmu, jednak komórkom przetrwałym w wyniku opisanych mechanizmów udaje się przeżyć. Komórki przetrwałe są zdolne do powrotu do normalnego metabolizmu i biofilm w ciągu kilkunastu godzin może odrodzić się na nowo. Ilość komórek przetrwałych w biofilmie grzybiczym zależy od wielu czynników i wynosi od 0.9 do 9% ogólnej biomasy [19].

2.4. Modyfikacja ściany komórkowej

Dodatek leku przeciwgrzybiczego do środowiska z biofilmem indukuje wiele szlaków metabolicznych i ekspresję genów związanych z odpornością. Jednym z mechanizmów oporności na azole jest zwielokrotnienie intensywności procesów związanych z syntezą ergosterolu. Nadekspresja genów ERG1, ERG3, ERG11 i ERG25 jest większa w biofilmie niż w komórkach planktonowych. Ponadto czas odpowiedzi na azole jest krótszy, co może mieć związek z zagęszczeniem komórek [12].

Również zmniejszenie ilości ergosterolu w dojrzewających oraz dojrzałych biofilmach obniża ilość punktów uchwytu dla amfoterycyny. Zawartość β -1,3-glukanu w macierzy międzykomórkowej w istotnym stopniu wpływa na oporność biofilmu na antymikotyki. Ściana komórkowa komórek tworzących biofilm zawiera więcej β -1,3-glukanu w porównaniu do planktonu [12].

W testach laboratoryjnych upośledzenie genów związanych z budową ściany komórkowej u szczepów z rodzaju *Streptococcus* powodowało ośmiokrotnie większą podatność na gentamycynę w porównaniu do szczepu dzikiego gdy te tworzyły biofilm [4]. W formach planktonowych różnica w oporności między mutantami oraz szczepami bez modyfikacji różnice były niewielkie. Modyfikacje ściany komórkowej mogą również mieć bezpośredni wpływ na zwiększoną tolerancję na wankomycynę oraz polimyksynę [4].

2.5. Efflux. Aktywne usuwanie leku poza obręb komórki

Zwiększenie tolerancji na antybiotyki wśród bakterii oraz grzybów (zwłaszcza w młodych biofilmach) jest również związana ze zwiększoną ekspresją genów odpowiedzialnych za transport substancji przez ścianę komórki oraz za tzw. efflux. Aktywne usuwanie leku z wnętrza komórki zapobiega jego kumulacji i gromadzeniu szkodliwych działań. Zwiększona ilość oraz aktywność niektórych pomp jest obserwowana we wczesnej fazie tworzenia biofilmu już kilka godzin po kolonizacji [12, 18, 21]. O tym jak istotna z punktu widzenia drobnoustrojów jest efektywna gospodarka odpadami i niechcianymi substancjami może świadczyć fakt że prawie 1/5 genów z nadekspresją w formie biofilmowej może być związana z effluxem. W licznych badaniach min. na szczepach *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, czy *Salmonelli* spp. wykazano że sztuczne zatrzymanie nawet nielicznych mechanizmów związanych z aktywnym usuwaniem leku z komórki znacząco podnosi wrażliwość bakterii na

antybiotyki. Spadała również zdolność do tworzenia zwartych struktur biofilmowych [18]. Również bakterie gram dodatnie mają wiele genów odpowiedzialnych za pompy i systemy transferów substancji. Na przykładzie *Pseudomonas aeruginosa* odnotowano że ekspresja genów kodujących efflux jest kilku- kilkunastokrotnie większa w komórkach tworzących biofilm w porównaniu do planktonowych, co w bezpośredni sposób wpływa na zwiększenie oporności na antybiotyki. Mnogość mechanizmów efluxowych i związanych z aktywnym transportem może powodować różnice w obserwacji różnych populacji biofilmów. Wszystko wskazuje na to że drobnoustroje mogą regulować fizjologiczne potrzeby związane z tymi mechanizmami zależnie od środowiska [18].

W przypadku zakażeń grzybiczych efektywniejsze działanie mechanizmów związanych z effluxem zdaje się nie mieć znaczenia w kontekście oporności na echinokandyny, ale odgrywa istotną rolę w występowaniu oporności krzyżowej na amfoterycynę B. Większa ilość pomp na powierzchni komórek, jest charakterystyczna dla komórek stanowiących biofilm. Podobnie jak u bakterii ma to charakter fizjologiczny gdyż ilość utworzonych pomp nie zwiększa się znacznie w obecności leku przeciwgrzybiczego [12, 17,]. Nieco odmienny mechanizm zauważono u szczepów z rodzaju *Burkholderia cepacia* bakterii związanej z mukowiscydozą. Wystawienie bakterii *Burkholderia cepacia* na działanie chlorheksydydy powoduje znaczący wzrost transkrypcji genów kodujących pompy usuwające lek poza obręb komórki [21].

2.6. Quorum sensing

Quorum sensing (pol. wyczuwanie kworum) jest to sposób komunikacji międzykomórkowej drobnoustrojów mającej na celu koordynację zmian zależnych od gęstości populacji [21]. Komunikacja ta odbywa się za pomocą małych cząsteczek sygnałowych wydzielanych przez komórkę które są w stanie wpływać na jej aktywność i zachowanie. Quorum sensing ma istotne znaczenie w morfogenezie grzybów, zakładaniu i dojrzewaniu biofilmu, kontrolowaniu populacji komórek, oraz rozdysponowywaniu składników odżywczych, a także może odgrywać rolę w apoptozie [21-24]. Komórki stale wydzielają różne cząsteczki spełniające role sygnalizacyjne, wraz ze wzrostem ich wydzielania, stężenie sygnału rośnie powyżej punktu progowego i dochodzi do inicjacji odpowiedzi. Zależnie od gatunków drobnoustrojów różne rodzaje cząstek są wykorzystywane jako sygnał [21]. W środowisku antybiotyku komórki mogą reagować na stres wydzielając cząstki sygnałowe które przenikając w głąb struktury biofilmu będą „informowały” pozostałe komórki o zmianie otoczenia. Sztucznie modyfikowane szczepy drobnoustrojów (eksperymenty z *Burkholderia cepacia* oraz

Staphylococcus aureus), pozbawione zdolności czucia kworum charakteryzowały się większą podatnością biofilmu na antybiotyki, przy braku zmian form planktonowych [21].

Wśród grzybów najbardziej znaną cząsteczką sygnałową jest farnesol. Znane są też jego funkcje ochronne. Poprzez tłumienie szlaku RAS1-cAMP znacząco zwiększa wytrzymałość komórek *Candida albicans* na reaktywne formy tlenu produkowane przez makrofagi, hamuje również produkowane przez nie cytokiny IFN-g i IL-12 które są związane z odpowiedzią na kandydozę [23]. Większe stężenia farnesolu są w stanie wywołać apoptozę w komórkach zarówno drożdży jak i grzybów pleśniowych. Poza działaniem w obrębie biofilmu *Candida albicans*, ochrania strukturę przed bakteriami gram ujemnymi. Farnesol hamuje wzrost *Pseudomonas aeruginosa* oraz jest w stanie indukować śmierć *Acinetobacter baumannii* po przez zaburzenie integralności błony komórkowej [23-24].

3. Biofilmy bakteryjno-grzybicze.

W naturalnym środowisku mikroorganizmy występują obok siebie i dochodzi między nimi do interakcji. Biofilmy mogą występować jako skupiska nie tylko mikroorganizmów jednego gatunku. W warunkach in vivo obserwowane jest współistnienie struktur złożonych z różnych gatunków grzybów, czy bakterii, ale nawet biofilmów mieszanych bakteryjno-grzybiczych, które stanowią około 20% infekcji związanych z grzybicą [12]. Najczęstszymi miejscami występowania infekcji mieszanych grzybiczo- bakteryjnych są drogi oddechowe, jelita, skóra i układ moczowo-płciowy. Próchnica zębów, choroby dziąseł, zapalenie ucha środkowego infekcje rany cukrzycowej, przewlekłe infekcje płuc (np. mukowiscydoza), infekcje dróg moczowych to najczęstsze infekcje spowodowane biofilmem mieszanym [17]. Współwystępowanie infekcji grzybiczo-bakteryjnych występuje przeważnie pod postacią infekcji z udziałem *Candida albicans* oraz bakterii gram ujemnych. Związane jest to z silnymi zdolnościami do kolonizacji urządzeń medycznych oraz biomateriałów przez te grupy mikroorganizmów [25].

Podobnie jak *Candida albicans*, bakterie *Escherichia coli* są komensalami flory człowieka, które w dogodnych warunkach mogą wywołać infekcje. Oba gatunki wykazują synergizm w tworzeniu zakażenia. *Candida albicans* łatwo przyłącza się do kolonii pałeczki okrężnicy, a także, za sprawą bakteryjnych lipopolisacharydów zwiększa swoją zdolność adhezji w obrębie tkanek w których obecna jest *Escherichia coli*. Hipotetycznie ułatwienie formowania biofilmu *Candida albicans* może wiązać się z miejscowym działaniem

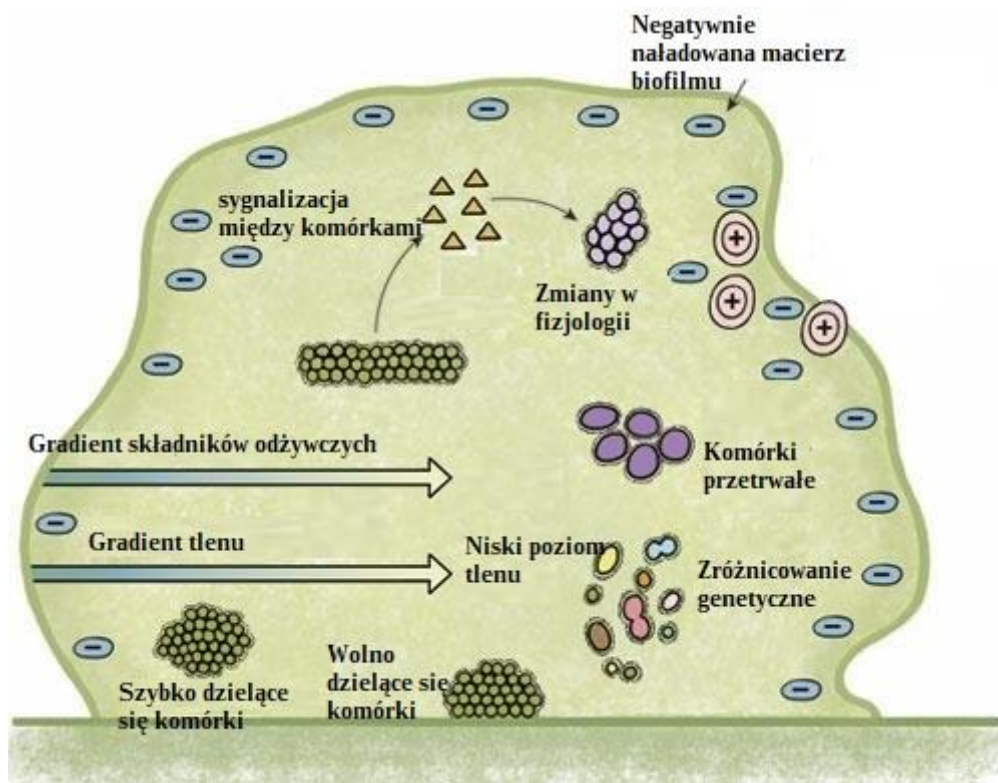
immunosupresyjnym spowodowanym obecnością *Escherichii* [25]. Z drugiej strony obserwuje się antagonizm pałeczki okrężnicy z innymi gatunkami drożdżaków (*Candida parapsilosis*, *Candida krusei* czy *Candida dubliniensis*) w kontekście infekcji układu moczowego. Mechanizm tej interakcji jest jeszcze nieznan.

Współistnienie drożdżaków i pałeczki ropy błękitnej obserwuje się na skórze oraz drogach oddechowych człowieka. Sama w sobie obecność *Candida albicans* w drogach oddechowych zdaje się nie być groźna, jednak ułatwia infekcje *Pseudomonas aeruginosa*. Tak samo obecność obu patogenów na oparzeniach powoduje trudniejsze gojenie się ran [25]. Zwiększona zjadliwość *Pseudomonas aeruginosa* wiąże się z większym wydzielaniem mediatorów quorum sensing oraz czynników wirulencji w odpowiedzi na wyczuwanie obecności grzybów. Do najważniejszych należy piowerdyna, ramnolipidy i piocyjaniny [25]. We wspólnych pożywkach pałeczka ropy błękitnej przylega i tworzy biofilmy na strzępkach *Candida albicans*. W obecności bakteryjnej fenazy, komórki grzyba przechodzą w metabolizm etanolowy, produkty którego stymulują zwrócić *Pseudomonas aeruginosa* do dalszego zwiększania wydzielania fenazy i rozwoju własnego biofilmu [17,25]. Ponadto bakteryjne mediatory quorum sensing, takie jak laktony acylo-homoserynowe hamują wzrost strzępek poprzez zablokowanie szlaku kinazy AMP-białka A. Z drugiej strony, grzybiczy farnesol ujemnie działa na wzrost *Pseudomonas aeruginosa* poprzez obniżenie metabolizmu bakteryjnych mediatorów [17,25]. Obydwa patogeny mogą jednak tworzyć sąsiadujące ze sobą biofilmy, bądź nawet pewien rodzaj wspólnej struktury, która będzie jednak miała mniejszą biomasa [17].

Wielogatunkowe biofilmy grzybiczo- bakteryjne nie ograniczają się tylko do interakcji grzybów z gram ujemnymi bakteriami. Biofilm wytwarzany przez *Candida albicans* zapewniają ochronę komórkom gram dodatniemu *Staphylococcus aureus*. Gronkowiec hodowany razem z drożdżakiem zyskuje oporność na wankomycynę która normalnie jest skuteczna przeciw tej bakterii. Związane jest to z obecnością macierzy zewnątrzkomórkowej zapewniającej fizyczną ochronę dla gronkowca, ale również z wykorzystaniem przez nią β -1,3-glukanu [17]. *Streptococcus gordonii* jest w stanie tworzyć wspólne biofilmy z *Candida albicans*, patogeny w takim układzie są bardziej inwazyjne i poziom kolonizacji jest wyższy niż w przypadku dwóch osobnych infekcji [17]. Dużą rolę w powstawaniu biofilmów z tych gatunków odkrywa produkowany przez *Streptococcus gordonii* mediator LUXS, stymulujący wzrost bakterii w biofilmach mieszanych.

Beztlenowe środowisko biofilmu *Candida albicans* ułatwia wzrost beztlenowym gram ujemnym bakteriom z rodzaju *Clostridium*, a także tworzenie wspólnych struktur. W

hodowlach planktonowych i warunkach tlenowych obecność *Clostridium* może indukować tworzenie się mikrofilmów grzybiczych zapewniających ochronę przed tlenem [17].



Rys 1. Schematyczne przedstawienie wybranych mechanizmów zwiększających oporność drobnoustrojów w strukturze biofilmowej [na podstawie X.D. Benetton, doctoral thesis 2007]

4. Podsumowanie

Obserwowany odsetek liczby zakażeń z towarzyszącym biofilmem stanowi coraz większy problem. Ze względu na różnorodne procesy biochemiczne i metaboliczne komórki wchodzące w skład biofilmu mogą się znacząco różnić między sobą w profilach wrażliwości na antybiotyki. W warunkach klinicznych biofilm jest dużym wyzwaniem dla służb medycznych ze względu na znacząco zwiększone trudności w eradykacji drobnoustrojów. Poza własnymi mechanizmami oporności drobnoustrojów na antybiotyki, we wspólnych strukturach dochodzą kolejne. Przez lata naukowcy pracując na czystych koloniach nie zauważali problemu naturalnie występujących złożonych struktur drobnoustrojów. Standardowe testy na antybiotykooporność wykonuje się na wyselekcjonowanych czystych koloniach, które nie uwzględniają wyżej opisanych mechanizmów oporności biofilmu, w związku z czym

przeniesienie wyniku uzyskanego *in vitro* do *in vivo* może nie być takie łatwe. Wiele związków przeciwdrobnoustrojowych w stężeniach śmiertelnych dla swobodnie unoszących się komórek planktonowych nie jest aktywnych w przypadku biofilmu (tabela 1.). Szczególnie niepokojące są przypadki infekcji układowych.

Leczenie długotrwałych, przewlekłych infekcji w których występują struktury biofilmowe stanowi nie łatwe wyzwanie i nastęcza szereg trudności. Zwłaszcza infekcje w których doszło do założenia biofilmu grzybiczego są niezwykle trudne do leczenia i mają tendencje do nawracania. Pełna eliminacja biofilmu bez usunięcia zainfekowanego podłoża jest niemal niemożliwa za pomocą obecnie stosowanych antimikotyków.

Nowe metody zarówno diagnostyki jak i leczenia zakażeń powinny uwzględniać wszelkie mechanizmy zarówno indywidualnych komórek jak i tworzonych przez nie struktur. Nawet w obrębie jednego gatunku patogenu może istnieć wiele wariantów czystych kolonii oraz można obserwować sporo różnic w obrębie tworzonych biofilmów [4]. Nie można zapominać również o wzrastającej liczbie szczepów opornych na antybiotyki, jak również szczepów wieloopornych, których leczenie może być niezwykle problematyczne.

Terapia antybiofilmowa nie może być skoncentrowana na jednym aspekcie a dotyczyć całej złożoności, zarówno fizycznej jak i molekularnej biofilmu. Skuteczną terapią antybiofilmową może się okazać kombinacja tradycyjnych leków ze środkami wpływającymi na komunikacje w biofilmie. Jedną z metod opracowywania nowych sposobów leczenia zakażeń jest poszukiwanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych, w tym przeciwbiofilmowych wśród dobrze znanych leków zarejestrowanych w innych schorzeniach, co wymaga wielu dalszych badań [5].

5. Bibliografia

1. Solano C, Echeverez M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.* 2014 Apr;18:96-104. doi: 10.1016/j.mib.2014.02.008. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24657330
2. Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol.* 2015;10(11):1743-50. doi: 10.2217/fmb.15.69. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26517598.
3. Del Pozo JL. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018 Jan;16(1):51-65. doi: 10.1080/14787210.2018.1417036. Epub 2017 Dec 19. PMID: 29235402.
4. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2017 May 1;41(3):276-301. doi: 10.1093/femsre/fux010. PMID: 28369412.
5. Król J, Nawrot U, Bartoszewicz M. Activity of base analogues (5-fluorouracil, 5-flucytosine) against planktonic cells and mature biofilm of *Candida* yeast. Effect of combination with folinic acid. *J Mycol Med.* 2019 Jun;29(2):147-153. doi: 10.1016/j.mycmed.2019.04.003. Epub 2019 Apr 22. PMID: 31023592.
6. Vivas R, Barbosa AAT, Dolabela SS, Jain S. Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. *Microb Drug Resist.* 2019 Jul/Aug;25(6):890-908. doi: 10.1089/mdr.2018.0319. Epub 2019 Feb 27. PMID: 30811275.
7. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Sep;8(9):623-33. doi: 10.1038/nrmicro2415. Epub 2010 Aug 2. PMID: 20676145
8. Justo JA, Bookstaver PB. Antibiotic lock therapy: review of technique and logistical challenges. *Infect Drug Resist.* 2014 Dec 12;7:343-63. doi: 10.2147/IDR.S51388. PMID: 25548523; PMCID: PMC4271721.
9. Banerjee A, Bardhan R, Chowdhury M, Joardar SN, Isore DP, Batabyal K, Dey S, Sar TK, Bandyopadhyay S, Dutta TK, Samanta I. Characterization of beta-lactamase and biofilm producing Enterobacteriaceae isolated from organized and backyard farm ducks. *Lett Appl Microbiol.* 2019 Aug;69(2):110-115. doi: 10.1111/lam.13170. PMID: 31087370.
- 10 Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia.* 2010 May;169(5):323-31. doi: 10.1007/s11046-009-9264-y. Epub 2009 Dec 13. PMID: 20012895; PMCID: PMC3973130.
11. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, Lounes-Hadj Sahraoui A, Fontaine J, Sanchez H, Hatfield RD, Ntambi JM, Nett JE, Mitchell AP, Andes DR. Novel entries in a fungal

biofilm matrix encyclopedia. *mBio*. 2014 Aug 5;5(4):e01333-14. doi: 10.1128/mBio.01333-14. PMID: 25096878; PMCID: PMC4128356.

12. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis*. 2016 Jun;74(4):ftw018. doi: 10.1093/femspd/ftw018. PMID: 26960943; PMCID: PMC5975230.

13. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, Tuch BB, Andes DR, Johnson AD. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*. 2012 Jan 20;148(1-2):126-38. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.048. PMID: 22265407; PMCID: PMC3266547.

14. Fox EP, Bui CK, Nett JE, Hartooni N, Mui MC, Andes DR, Nobile CJ, Johnson AD. An expanded regulatory network temporally controls *Candida albicans* biofilm formation. *Mol Microbiol*. 2015 Jun;96(6):1226-39. doi: 10.1111/mmi.13002. Epub 2015 Apr 23. PMID: 25784162; PMCID: PMC4464956.

15. Jensen PØ, Briales A, Brochmann RP, Wang H, Kragh KN, Kolpen M, Hempel C, Bjarnsholt T, Høiby N, Ciofu O. Formation of hydroxyl radicals contributes to the bactericidal activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Pathog Dis*. 2014 Apr;70(3):440-3. doi: 10.1111/2049-632X.12120. Epub 2014 Feb 10. PMID: 24376174.

16. Conlon BP, Rowe SE, Lewis K. Persister cells in biofilm associated infections. *Adv Exp Med Biol*. 2015;831:1-9. doi: 10.1007/978-3-319-09782-4_1. PMID: 25384659.

17. Coenye T, Van Acker H, Peeters E, Sass A, Buroni S, Riccardi G, Mahenthiralingam E. Molecular mechanisms of chlorhexidine tolerance in *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 May;55(5):1912-9. doi: 10.1128/AAC.01571-10. Epub 2011 Feb 28. PMID: 21357299; PMCID: PMC3088199.

18. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Jan;16(1):19-31. doi: 10.1038/nrmicro.2017.107. Epub 2017 Oct 3. PMID: 29062072; PMCID: PMC5726514.

19. Beauvais A, Latgé JP. *Aspergillus* Biofilm In Vitro and In Vivo. *Microbiol Spectr*. 2015 Aug;3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0017-2015. PMID: 26350307.

20. Van Acker H, Coenye T. The Role of Efflux and Physiological Adaptation in Biofilm Tolerance and Resistance. *J Biol Chem*. 2016 Jun 10;291(24):12565-12572. doi: 10.1074/jbc.R115.707257. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27129224; PMCID: PMC4933474.

21 Coenye T, Van Acker H, Peeters E, Sass A, Buroni S, Riccardi G, Mahenthiralingam E. Molecular mechanisms of chlorhexidine tolerance in *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*.

2011 May;55(5):1912-9. doi: 10.1128/AAC.01571-10. Epub 2011 Feb 28. PMID: 21357299; PMCID: PMC3088199.

22. Abisado RG, Benomar S, Klaus JR, Dandekar AA, Chandler JR. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *mBio*. 2018 May 22;9(3):e02331-17. doi: 10.1128/mBio.02331-17. Erratum in: *MBio*. 2018 Oct 2;9(5): PMID: 29789364; PMCID: PMC5964356.

23. Wongsuk T, Pumeesat P, Luplertlop N. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *J Basic Microbiol*. 2016 May;56(5):440-7. doi: 10.1002/jobm.201500759. Epub 2016 Mar 11. PMID: 26972663.

24. Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi--a review. *Med Mycol*. 2012 May;50(4):337-45. doi: 10.3109/13693786.2011.652201. Epub 2012 Jan 24. PMID: 22268493; PMCID: PMC4294699.

25. Dhamgaye S, Qu Y, Peleg AY. Polymicrobial infections involving clinically relevant Gram-negative bacteria and fungi. *Cell Microbiol*. 2016 Dec;18(12):1716-1722. doi: 10.1111/cmi.12674. Epub 2016 Oct 20. PMID: 27665610.

26. Pettit RK, Weber CA, Kean MJ, Hoffmann H, Pettit GR, Tan R, Franks KS, Horton ML. Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul;49(7):2612-7. doi: 10.1128/AAC.49.7.2612-2617.2005. PMID: 15980327; PMCID: PMC1168683.