

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd



**PATOGENEZE INFEKČNÍCH ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÝCH
BIOFILM FORMUJÍCÍMI MIKROORGANISMY**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Hradec Králové, 2017

Adéla Diepoltová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, 4. 5. 2017

Adéla Diepoltová

Za odborné rady, připomínky a komentáře k formální i obsahové stránce této práce děkuji RNDr. Kláře Konečné, Ph.D. Velký dík za podporu patří také rodině a přátelům.

OBSAH

OBSAH	4
1 ÚVOD	10
1.1 Zadání bakalářské práce – Cíl práce	11
2 CO JE TO BIOFILM?	12
2.1 Výhody života ve společenství biofilmu	12
2.2 Historie výzkumu mikrobiálních biofilmů	14
2.3 Biofilm jako analogie mnohobuněčného těla	14
3 PROSTŘEDÍ VZNIKU BIOFILMŮ	15
4 STRUKTURA A CHEMICKÉ SLOŽENÍ BIOFILMU	17
4.1 Extracelulární polymerní matrice	17
4.1.1 Funkce extracelulární polymerní matrice	17
4.1.2 Složení extracelulární polymerní matrice	17
4.1.3 Virulenční efekt exopolysacharidů	19
4.2 Architektura biofilmu	21
4.3 Rozložení mikroorganismů v biofilmu	22
5 DĚJE PROBÍHAJÍCÍ V BIOFILMU	24
6 VZNIK A VÝVOJ BIOFILMU	26
6.1 Adheze buněk k povrchu	27
6.1.1 Vlastnosti povrchu ovlivňující adhezi k substrátu	28
6.1.2 Vlastnosti kolonizujících mikrobů ovlivňující adhezi k substrátu	29
6.2 Zrání biofilmu	29
6.3 Uvolňování buněk z biofilmu	31
7 QUORUM SENSING	32
7.1 Princip <i>quorum sensing</i>	33
7.2 Signální molekuly jednotlivých skupin bakterií	34
8 QUORUM SENSING JAKO NOVÝ CÍL TERAPIE	36
9 QUORUM QUENCHING ENZYMY	37
10 REZISTENCE BIOFILMŮ K ANTIMIKROBNÍM LÁTKÁM	38
10.1 Mechanismy rezistence biofilm formujících mikroorganismů vůči antibiotikům	38

10.2	Mechanismy rezistence dané změnou fenotypu	39
11	BIOFILMY V MEDICÍNĚ	40
11.1	Infekce dutiny ústní	42
11.1.1	Zubní plak.....	42
11.1.2	Periodontitis.....	43
11.2	Chronická rhinosinusitis	44
11.3	Otitis media	46
11.4	Infekce plic u pacientů s cystickou fibrózou	48
11.5	Infekce ran diabetiků	51
11.6	Infekční endokarditis	52
12	METODY VEDOUCÍ K ODSTRANĚNÍ BIOFILMŮ	52
13	ZÁVĚR.....	53
14	SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A SCHÉMAT	54
15	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	55

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor: Adéla Diepoltová

Školitel: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Název bakalářské práce: Patogeneze infekčních onemocnění vyvolaných biofilm formujícími mikroorganismy

Cíl: Cílem této práce je přehledně popsat význam mikrobiálních biofilmů v medicíně a v patogenezi infekčních onemocnění. Tato práce zahrnuje upřesnění pojmu biofilm, strukturu a chemické složení biofilmu, vznik, vývoj a děje probíhající v biofilmu, které přímo souvisí s patogenezi infekčních onemocnění. V krátkosti jsou také uvedena nejčastější infekční onemocnění pojící se s tvorbou mikrobiálních biofilmů.

Hlavní poznatky: Mikrobiální biofilmy jsou aktivní vrstvy mikroorganismů a látek, které tyto mikroorganismy produkují. Biofilm je na rozdíl od planktonické fáze přisedlá forma života. Mikroorganismus nejprve adhezuje k danému substrátu, následně se množí a produkuje metabolity, které vytvoří okolní sliz – matici. Následně se části takto vzniklé vrstvy mohou oddělovat a osídlovat nová prostředí. Mezi tato prostředí patří jakékoliv přírodní niky s přístupem vody, průmyslová potrubí, ale také tkáň hostitele. Tam biofilmy způsobují onemocnění jako je otitis media, endokarditis nebo infekce plic pacientů s cystickou fibrózou. Biofilmy jsou velice odolné a vykazují zvýšenou rezistenci proti antimikrobním látkám. Léčba s biofilmy spojených onemocnění proto bývá velice náročná a často neúspěšná, což vede k výzkumu nových terapeutických přístupů.

Závěry: Biofilmy jsou pro vědce aktuálním tématem. Patogeneze s biofilmem spojených onemocnění spočívá v jeho postupné tvorbě. Přítomní mikrobi jsou pro imunitní systém po dlouhou dobu skryti. Po dosažení určité denzity mikrobů v biofilmu nastává manifestace choroby, která je velmi akutní a agresivní. Běžná léčba obvykle není příliš účinná, proto se navrhuje nové léčebné postupy orientující se na mechanismy vzniku biofilmu či na procesy, které se v biofilmu odehrávají.

Klíčová slova: mikrobiální biofilm, patogeneze infekčních onemocnění, mechanismy formace biofilmu, *quorum sensing* fenomén

ABSTRACT

Charles Univerzity

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Study program: Medical Laboratory Technician

Author: Adéla Diepoltová

Supervisor: RNDr. Klára Konečná, Ph.D.

Title of bachelor thesis: Pathogenesis of infectious diseases caused by biofilm-forming microorganisms

Background: The aim of this thesis is to describe the importance of microbial biofilms in medicine and in pathogenesis of infectious diseases. This thesis includes specification of the concept of biofilm, its structure and chemical composition, formation, development and processes occurring in biofilm which are directly related to pathogenesis of infectious diseases. Briefly, the most common infectious diseases associated with the formation of microbial biofilms are also mentioned.

Main findings: Microbial biofilms are active layers of microorganisms and their metabolic products. Biofilm, unlike the planktonic phase, is sessile form of life. The microorganism first adheres to suitable substrate, then multiplies and produces metabolites, that create slime called matrix. Parts of the biofilm layer can tear off and colonize new environments. These environments include any natural niches with water access, industrial pipelines but host tissues, as well. Biofilms cause diseases such as otitis media, endocarditis, or pneumonia in patients with cystic fibrosis. Biofilms are highly resistant and show increased insusceptibility to antimicrobial substances. Treatment of biofilm-associated diseases is often highly troublesome and often unsuccessful, which resulted in the research of new therapeutical approaches..

Conclusions: Study of biofilm is the hot topic for researches, now. The pathogenesis of biofilm-associated diseases consists of sequential formation of a biofilm, that is hidden for the immune system for a long time. After acquisition of the critical cell density in biofilm, acute and aggressive manifestation of infection begins. Conventional treatment is usually not very effective. New strategies of treatments are proposed, focusing on biofilm formation mechanisms or on processes taking part in biofilm development.

Key words: microbial biofilm, pathogenesis of infectious diseases, mechanisms of biofilm formation, *quorum sensing* phenomenon.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AHSL	acyl-homoserine lactone, acyl-homoserin lakton
agr	accessory gene regulator, přídatný genový regulátor
ATB	antibiotic, antibiotikum
ATBs	antibiotics, antibiotika
C4-HSL	N-butanoylhomoserine lactone, N-butanoylhomoserinlakton
CF	cystic fibrosis, cystická fibróza
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator, transmembránový regulátor cystické fibrózy
CRC	catabolite repression control protein, protein regulující (represivní funkce) utilizaci uhlíku u bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
eDNA	extracellular deoxyribonucleic acid, extracelulární deoxyribonukleová kyselina
ELA	elastase, elastáza
EPM	extracellular polymeric matrix, extracelulární polymerní matrice
EPS	exopolysaccharides, exopolysacharidy
LPS	lipopolysaccharides, lipopolysacharidy
MRP	Multidrug resistance pumps, lékové rezistenční pumpy
MUC7	mucin-7 protein, mucinózní protein 7
OR	oxygen radicals, kyslíkové radikály

PIA	polysaccharide intracellular adhesin, polysacharidový nitrobuněčný adhezín
PMNs	polymorphonuclears, polymorfonukleáry
QS	quorum sensing
sp.	species, druh
spp.	species, druhy
T1SS	type 1 secretion system, sekreční dráha typu 1
T5SS	type 5 secretion system, sekreční dráha typu 5

1 ÚVOD

Mikroorganismy jsou jen zřídka kdy přítomny v různých prostředích volně, tedy ve flotující neboli planktonické podobě. Volnou formu života využívají mikrobi běžně pouze ke kolonizaci nových prostředí. Daleko častěji se však nachází v podobě takzvané sesilní (přisedlé k různým povrchům) a tvoří struktury zvané biofilm, které tato práce popisuje. Mezi těmito dvěma způsoby života mikroorganismů jsou značné rozdíly. Především jde o odlišnosti v genové expresi a fenotypu. Forma života v biofilmu znamená často pro mikrobi strategii k přežití. Jedná se o starobylý způsob, pomocí kterého jsou mikroorganismy schopny přežívat v nehostinném prostředí.

Účelem této práce bylo popsat biofilmy jako aktivní vrstvy obsahující mikroorganismy a jejich výměšky, které jsou pevně přichycené k podkladu. Práce se dále věnuje procesu vzniku biofilmu, mechanismům jeho růstové regulace, jsou také jmenována rozličná prostředí pro vznik biofilmu a problémy, které na daných místech tato společenství působí.

Největší potíže způsobují biofilmy na tkáních lidského organismu a na zavedených zdravotnických náhradách. Schopnost mikroorganismů tvořit biofilm se pokládá za faktor virulence. Biofilmy stojí za po dlouhou dobu latentní chorobou, která se ale může změnit náhle a velmi agresivně do podoby manifestní infekce. Jedná se o infekce plic u pacientů s cystickou fibrózou, otitis media, endokarditis atd. Společným jevem vývoje všech těchto onemocnění je samotná tvorba biofilmu a děje, jenž v něm probíhají. Tato obecná část patogeneze, včetně popisu složení a architektury biofilmu, bude zahrnuta v první části této práce. Další část je věnována dějům probíhajícím v biofilmech a mechanismům rezistence proti antimikrobním látkám. Bližšímu popisu patogeneze několika vybraných onemocnění je vyčleněna poslední část práce.

1.1 Zadání bakalářské práce – Cíl práce

- Řešitel(ka) bude vycházet z recentních prací na téma biofilm vs. infekční onemocnění. Bude pracovat především se zcela recentními pracemi na toto téma. Práce bude mít rešeršní podobu a bude obsahovat ilustrativní obrázky či schémata.
- Práce bude zpracována z minimálně 40 literárních zdrojů.
- Cílem práce bude přehledně, souhrnně podat informace týkající se mikrobiálních biofilmů, se zaměřením se na samotný termín mikrobiální biofilm, na strukturu biofilmu a na procesy probíhající v biofilmu.
- V rámci bakalářské práce budou také stručně popsána vybraná infekční onemocnění asociovaná s tvorbou mikrobiálních biofilmů.

2 CO JE TO BIOFILM?

Studium suspenzí bakterií *in vitro* v kapalných médiích umožnilo objev hlavních rysů mikrobiální fyziologie a genetiky. V přírodě však mikroorganismy ve flotujícím (volném, planktonickém) stavu najdeme jen stěží. Mikrobi předně využívají této formy pro kolonizaci nových prostředí. Většinou se však nachází v podobě biofilmu. Biofilm lze označit za multicelulární sesilní růstovou formu, která je vždy asociována s povrchy. Mezi oběma růstovými fázemi jsou rozdíly v genové expresi, která se projevuje mimo jiné také ve fenotypu mikrobiálních buněk [1].

Společenství mikroorganismů tvořících biofilm je zanořeno v matici (někdy také nazývané matrix), jež je převážně tvořena polymerními substancemi, zejména polysacharidy. Složení matrice bude blíže popsáno v kapitole 4.1 [2; 3; 4; 5; 6].

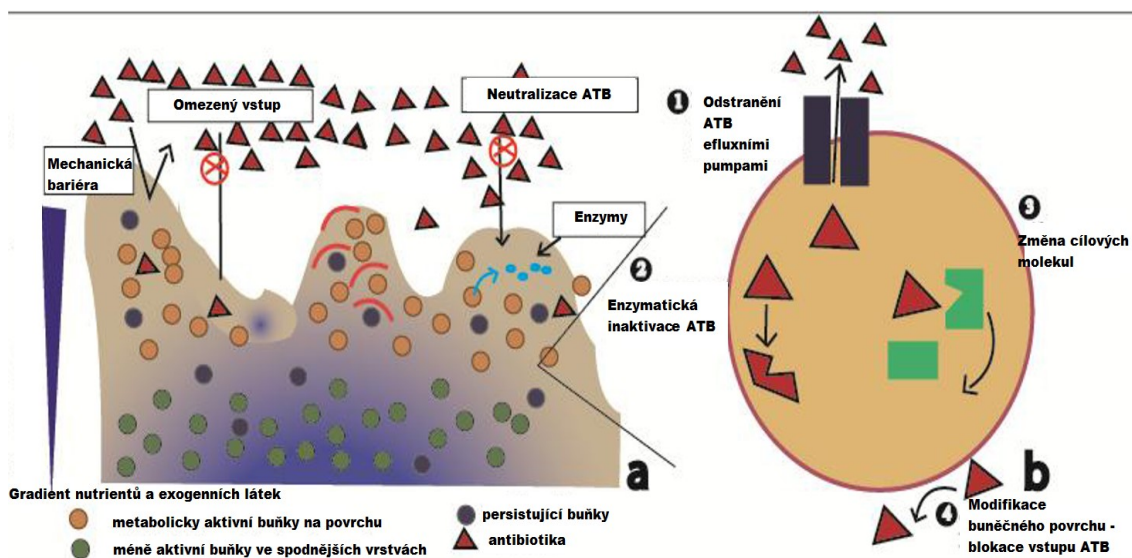
Biofilm je velice stálý, což přináší problémy při snaze o jeho odstranění, a to jak v průmyslu, kde například kolonizuje rozvody pitné vody a znečišťuje tak výrobní procesy, tak především ve zdravotnictví [5].

Prostředím vzniku a problémům, které biofilmy způsobují v medicíně budou věnovány další kapitoly této práce.

2.1 Výhody života ve společenství biofilmu

Způsob života planktonicky žijících mikroorganismů se značně liší od těch, které jsou ukotveny v komplexním společenství biofilmu. Uskupení biofilmu je pro mikroorganismy velice výhodné v porovnání s planktonickou fází. Dostává se jim vhodných podmínek jako je stálost prostředí a dostatek živin [2].

Velkou výhodou života v biofilmu je poskytnutí ochrany. Toxické látky z okolí do struktury biofilmu sice proniknou, ale průchodem jednotlivými vrstvami se postupně naředují, čímž ztrácí na toxickém účinku. Celou vrstvou biofilmu nepronikne ani škodlivé UV záření. Rovněž je zajištěna obrana proti buňkám imunitního systému hostitele a predátorům. Mikroorganismy jsou stejně tak chráněny před mechanickými vlivy – proudem kapaliny a třením a také před nepříznivým pH vnějšího prostředí a volnými radikály. Některé obranné mechanismy biofilmu jsou znázorněny na Obrázku č. 1 [2].



Obrázek č. 1: Znárodnění obranných mechanismů ve společenství biofilmu.
Převzato z [7] a upraveno.

Další výhodou je možnost přenosu genetické informace v tzv. „zrychleném módu na kratší vzdálenost“. Řada studií prokázala větší obrat v konjugačních procesech bakterií tvořících biofilm, což má za následek mnohem efektivnější přenos klíčových faktorů ovlivňujících antibiotickou rezistenci (problematika blíže popsána v kapitole 10), virulenci a schopnost odolat nepříznivým faktorům prostředí [8].

Pro mikrobi je rovněž přínosná retence extracelulárních enzymů v matrici, recyklace nutriční díky řízené lyzi buněk společenstva a dosažení vysoké populace – hraniční hodnoty pro snazší mezibuněčnou komunikaci díky signálním molekulám [9].

Souhrnně je možno jmenovat čtyři hlavní hypotézy o příčinách vzniku biofilmu jakožto výhodné strategie pro život a jeho rolích v patogenezi infekčních nemocí:

- I) využití výhod biofilmu k ochraně před nepříznivými účinky obranných mechanismů hostitele
- II) kolonizace vhodného a na živiny bohatého prostředí
- III) využití kooperace mezi buňkami
- IV) planktonický stav slouží pouze jako mechanismus přemísťování, a naopak fáze biofilmu je stabilní částí buněčného cyklu, v níž dochází k vývoji a zrání buněk. Biofilm je tedy jakýmsi defaultním (výchozím) módem [8; 10].

Pro detailnější poznání důvodu přechodu mikroorganismu do módu biofilmu je nutno identifikovat a popsat externí podněty, které zahajují formaci a rozpouštění biofilmu a sledovat genetické změny doprovázející tento proces [5].

2.2 Historie výzkumu mikrobiálních biofilmů

Fenotyp mikroorganismů je vědci pozorován již několik stovek let. Anthoni van Leeuwenhoek jako první studoval pomocí jednoduchého mikroskopu materiál odebraný z vlastních úst – zubní plak, který je v podstatě tvořen bakteriálním biofilmem. Nicméně, po dlouhou dobu se pozorování a výzkum zaměřoval na studium mikrobů a jejich patogenního potenciálu pouze v jejich planktonické formě života [11].

První publikaci, která poukazuje na spojitost mezi infekcí a přítomností agregujících bakterií, vydal Niels Høiby v roce 1973. Práce se týkala barvení sputa pacienta s cystickou fibrózou a později také hodnocení autoptického materiálu [11].

Ve stejném roce vypožoroval William G. Characklis, že přisedlé bakterie netvoří pouze houževnatou vrstvu, ale vykazují i vyšší rezistenci k antimikrobním látkám [12].

Termín biofilm poprvé použil až Bill Costerson, a to v roce 1978. Právě ten je považován za nejdůležitější osobu této problematiky. V tomto roce se také tým dr. R. J. Gibbonse začal věnovat studiu tvorby biofilmu tvořeného bakterií *Streptococcus mutans* na zubech [8].

Je tedy zřejmé, že tematika biofilmů v medicíně je stará maximálně 40 let, a i nyní je velice aktuální a mezi mikrobiology populární. Studium biofilmu objasňuje mechanismus patogeneze některých infekčních onemocnění a v budoucnu pravděpodobně napomůže vyvinout nové terapeutické možnosti [11].

2.3 Biofilm jako analogie mnohobuněčného těla

Biofilm může svou komplexností připomínat strukturu těla. Je proto možné ho chápat jako určitý mnohobuněčný celek. Jev, kdy mnohobuněčný mikrobiální celek tvoří funkční základ, nemusíme pozorovat pouze na úrovni celého biofilmu, ale i

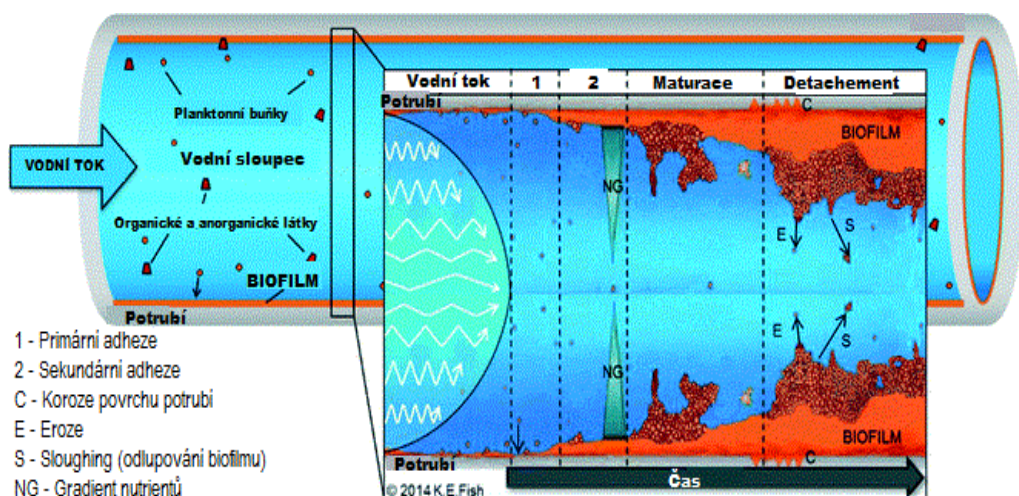
v jednotlivých mikrobiálních koloniích. Například u magnetotaktických bakterií (skupina Gram negativních bakterií se specifickými nitrobuňčnými strukturami – magnetosomy, které obsahují krystaly magnetických sloučenin železa) podle všeho úplně chybí jednobuněčná forma. Vytvářejí totiž shluky o velikosti 10-40 buněk, které spolu dokáží fungovat pouze jako celek [13].

Nicméně, někteří autoři se tomuto úhlu pohledu brání. Narozdíl od mnohobuněčných organismů se totiž buňky v biofilmu nediferencují, pouze se adaptují vlivům prostředí změnou genové exprese tak, aby mohly přežít. Z tohoto důvodu je podle některých autorů mnohem přesnější nahlížet na bakteriální biofilmy jako na interaktivní komunity, než je srovnávat s multiceulárním organismem [10].

3 PROSTŘEDÍ VZNIKU BIOFILMŮ

Biofilmy vznikají na velmi různorodých površích. Podmínkou je dostatečně pevný podklad, tok okolní kapaliny a přítomnost mikroorganismů [5].

Růst biofilmu je tedy pozorován v průmyslových závodech, potrubích, rozvodech pitné vody, kanalizacích a přírodních vodních systémech. Biofilmy znečišťují výrobní procesy v potravinářství, farmaceutickém průmyslu atd. Biofilm vytvořený na vnitřním povrchu vodního potrubí je znázorněn na Obrázku č. 2 [5].



Obrázek č. 2: Biofilm vytvořený na vnitřním povrchu vodovodního potrubí. Převzato z [14] a upraveno.

Je známo praktické využití biofilmů. Mohou být například zahrnuty v procesech čištění odpadních vod. Existují práce, které odkazují na zcela klíčovou roli mikrobiálních biofilmů v dekontaminaci spodních vod od ropných produktů [16].

Většinou však biofilmy umělým ani přirozeným povrchům neprospívají. Častěji jsou naopak vážnými komplikacemi a jejich odstranění není snadné. Přehled míst, na kterých biofilmy nejčastěji vznikají a problémy, které jejich tvorbu doprovází, je uveden v Tabulce č. 1 [5].

Klinicky významná je skutečnost, že se biofilmy vyvíjí na lidských a zvířecích tkáních, na lékařských nástrojích, katetrech a implantátech [15].

Tabulka č. 1: Prostředí vzniku biofilmu.

Prostředí	Komplikace
potrubí teplotních výměníků a chladících zařízení	zvýšení odporu přenosu tepla, ztráty energie, snížený výkon
vodovodní potrubí a kanalizace, porézní prostředí, trupy lodí	zvýšení třecího odporu kapaliny, ztráty energie, snížený výkon
urychlená koroze v důsledku mikrobiálních procesů na rozhraní biofilm-substrát	poškození materiálu, snížená trvanlivost zařízení
senzory, periskopy ponorek, dalekohledy	snížený výkon
distribuční sítě pitné vody	snížení kvality vody a zvýšení zdravotního rizika
uvolňování mikroorganismů z biofilmu v chladících zařízeních (<i>Legionella</i>)	zdravotní riziko
akumulace biofilmu na zubech, dásních, močové trubici, střevu	zdravotní riziko
tvorba biofilmu na povrchu materiálů vkládaných do lidského těla (katetry, umělé chlopně, protézy, ...)	infekce

Převzato z [5] a upraveno.

4 STRUKTURA A CHEMICKÉ SLOŽENÍ BIOFILMU

Složení biofilmu je přímo závislé na mikrobech, kteří jsou jeho součástí, dále na jejich fyziologickém statutu, na dostupné nutriční a na faktorech okolního prostředí. Každý biofilm je tedy svou skladbou unikátní. Lze však popsat několik atributů, které jsou pro tato společenství univerzální [17].

4.1 Extracelulární polymerní matrice

Biofilm se od planktonické populace výrazně liší především přítomností extracelulární polymerní matrice (EPM, extracellular polymeric matrix), v níž jsou buňky fixovány. Tato matrice je často, vzhledem ke konzistenci, označována anglickým pojmem „*slime*“, který lze přeložit slovem sliz. EPM je velmi dynamický systém, na kterém závisí existence celého biofilmu [15].

4.1.1 Funkce extracelulární polymerní matrice

EPM slouží k upevnění buněk k povrchu a vzájemně je propojuje. Právě v jejím prostředí dochází k distribuci plynů a živin, k eliminaci buněčných metabolitů a ke skladování a rozkladu složitějších organických látek. EPM zároveň živiny vycytává z okolní proudící tekutiny, čímž biofilm vyživuje i za méně příznivých podmínek. Funkcí EPM je rovněž ochrana před vnějšími vlivy, účinky toxických látek a antibiotik (ATBs) [5].

Ochrannou funkci EPM proti UV záření, které působí na biofilmy tvořené bakterií *Pseudomonas aeruginosa* kultivovaných ve vrstvě alginátu sleduje studie Elasmriho a Millera (1999). Buňky v planktonické fázi silně podléhají účinkům záření. Dochází k narušení buněčného cyklu a dělení. Buňky v biofilmu jsou však ovlivněny jen nepatrně [18].

4.1.2 Složení extracelulární polymerní matrice

EPM je směs extracelulárních produktů samotných buněk společenstva, v které je obsaženo asi 50-90 % organického uhlíku celého biofilmu. Buňkami vylučované

exopolysacharidy (EPS) jsou stěžejní součástí EPM tvořící kostru biofilmu. Pro biofilm jsou nezbytně nutné. Význam EPM pro biofilm byl sledován na mutantních mikroorganismech neschopných syntetizovat nebo exportovat EPS. Tito mikrobi byli ochuzeni o možnost tvorby biofilmu a byli citliví k ATBs oproti nemutatním kmenům se zachovanou schopností tyto EPS tvořit [15; 5].

V případě bakteriálních biofilmů tvořených bakterií *Pseudomonas aeruginosa* jsou v EPM zastoupeny EPS jako je alginát, levan, Psl polysacharid nebo Pel polysacharid. V případě EPM tvořené Gram pozitivními bakteriemi se lze setkat s levanem a různými dalšími EPS tvořenými glukózou, galaktózou, fruktózou apod. Dále v EPM nacházíme například N-acetyl-glukosamin polymer [19].

EPS obsaženy v biofilmech vytvořených dalšími druhy mikroorganismů jsou zahrnuty v Tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Přehled některých EPS charakteristických pro biofilm daného druhu mikroorganismu.

Exopolysacharid	Druh biofilmu
alginát	<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
kurdlan	<i>Agrobacterium sp. ATCC 31749</i>
1,3-β-kuldran-typ	<i>Cellulomonas flavigena</i>
kuldran-typ	<i>Cellulomonas sp.</i>
xantan	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citr</i>
1,6-α- glukan	<i>Streptococcus mutans</i>
1,3-α- glukan	
glukan alterman dextran	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> kmen NRRL B-1355
galaktan	<i>Methylobacterium sp.</i>

Převzato z [20] a upraveno.

Mezi proteinové komponenty obsažené v EPM patří například amyloidní vlákna, která navzájem buňky biofilmu propojují a zprostředkovávají jejich kontakt. Stejně tak spojují ostatní komponenty biofilmu v komplexně fungující celek. Dalšími proteiny přítomnými v EPM jsou adhesiny, které rovněž slouží ke kontaktu mezi samotnými

mikrobiálními buňkami a stejně tak zprostředkovávají i kontakt mezi mikrobiálními buňkami a živým či neživým povrchem [21].

Extracelulární DNA (eDNA, extracellular deoxyribonucleic acid) v EPM moduluje vlastnosti buněčného povrchu a také se podílí na kontaktu mezi buňkami. Má se za to, že eDNA interaguje s EPS a proteiny EPM, čímž se podílí na celkové stabilitě biofilmu [21].

Kromě toho je EPM složena z velké části z vody a dalších anorganických a organických komponent. V matrici mohou být rozptýlené živiny, metabolity a části buněk [5].

Tabulka č. 3. uvádí stručný přehled složení EPM.

Tabulka č.3: Složení extracelulární polymerní matrice.

Složka	% matrice
Voda	až 97 %
mikrobiální buňky	2-5 %
polysacharidy	1-2 %
proteiny (extracelulární a výsledek lýze) + enzymy	<1-2 %
DNA a RNA	<1-2 %
ionty	? (vázané a volné)

Převzato z [12] a upraveno.

4.1.3 Virulenční efekt exopolysacharidů

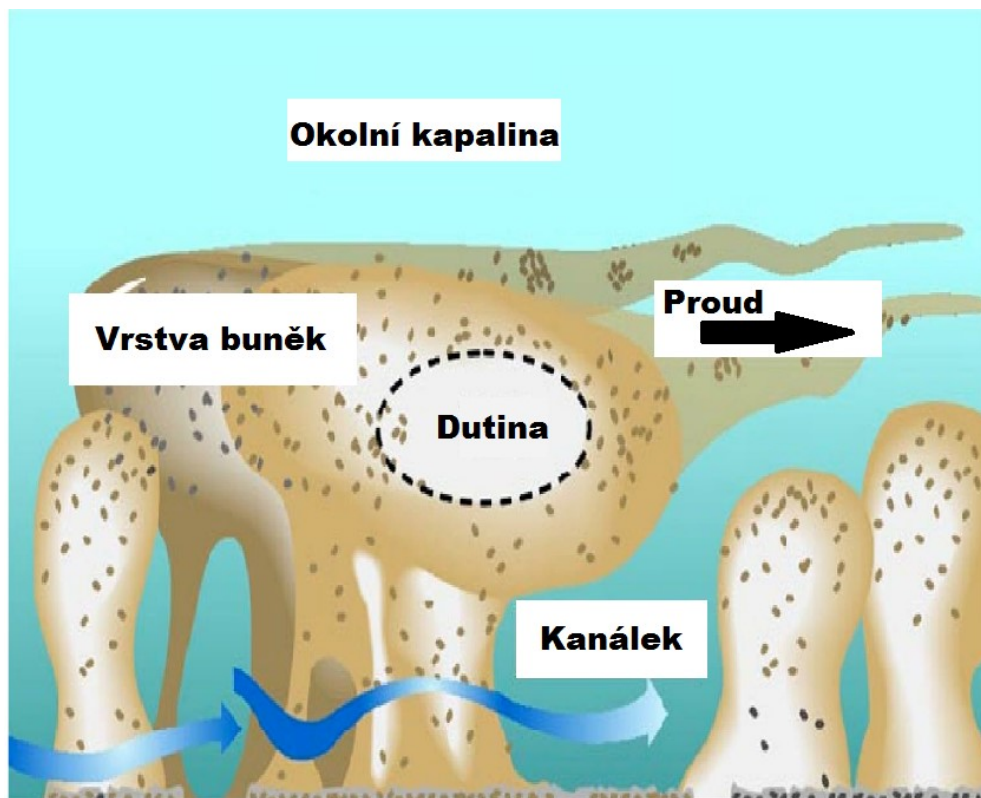
V roce 1966 byl vědci Linkerem & Jonesem z biofilmů bakterie *Pseudomonas aeruginosa* prvně izolován výše zmíněný polysacharid alginát – jedna z nejčastějších složek EPM. Mukózní alginát je pro tuto a jí příbuzné bakterie faktorem virulence. Biofilm tvořící kmeny bakterie *Pseudomonas aeruginosa* způsobují u pacientů s cystickou fibrózou těžké pneumonie, objevují se také u infekcí středního ucha a močových cest [22].

Dalším EPS s prokázaným efektem podporujícím virulenci je poly-N-acetylglukosamin spolu s polysacharidovým nitrobuněčným adhezinem (PIA, polysaccharide intracellular adhesin) v EPM stafylokoků. PIA byl poprvé popsán jako kapsulární polysacharid. Je zodpovědný za adhezi, agregaci a akumulaci stafylokokových buněk [5; 6].

Významnou složkou buněčné stěny Gram pozitivních bakterií je záporně nabitá kyselina teichoová, která rovněž přispívá k tvorbě biofilmu a jeho zvýšené virulenci. Pravděpodobně interaguje s okolními povrchovými proteiny a pomáhá při adhezi buněk [6].

4.2 Architektura biofilmu

Biofilm za dobu své existence vyzrává. V rámci maturovaného biofilmu jsou mikrobiální buňky seskupeny v tzv. mikrokoloniích kuželovitého, voštinovitého či hříbovitého tvaru. Mezi koloniemi se proplétají vodní kanálky, jenž se postupně zužují a na povrchu biofilmu tvoří póry. Prostřednictvím těchto kanálků je distribuována nutriční či kyslík z okolní proudící kapaliny. Tento heterogenní model je typický nejen pro biofilmy tvořené monokulturami, ale rovněž pro směsné biofilmy, které tvoří více druhů mikrobiálních agens. Členitost architektury biofilmu je zřejmá z Obrázku č 3 [15].

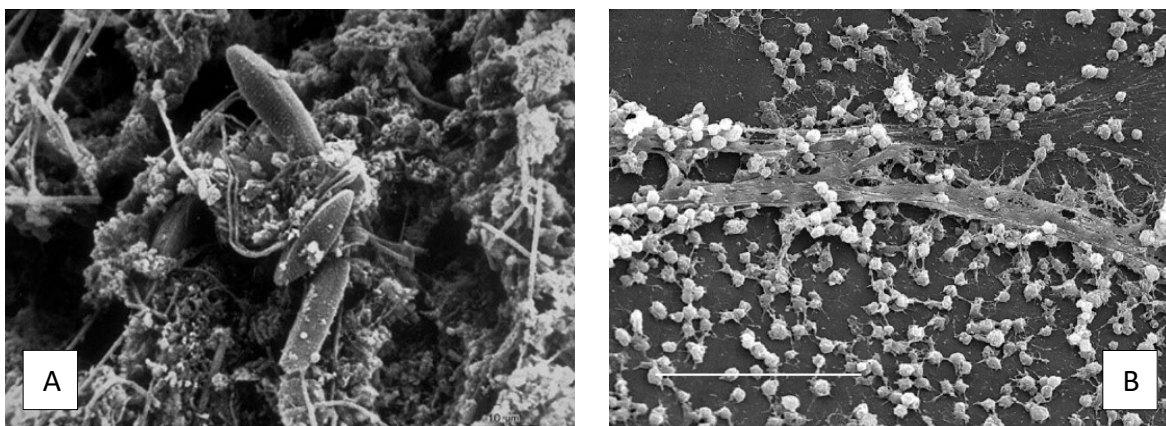


Obrázek č. 3: Schéma architektury biofilmu.

Převzato z [23] a upraveno.

Tloušťku, texturu a celkovou architekturu biofilmu ovlivňuje více faktorů. Mocnost biofilmu kolísá od několika jednotek po stovky mikrometrů. Jednoduché biofilmy bývají tenčí. Směsné biofilmy jsou naopak silnější. Příkladem může být biofilm tvořený ve vodovodním potrubním systému. Ten je obvykle vysoce komplexní, často

obsahující rovněž produkty koroze anebo biofilm vytvořený na lékařském implantátu (Obrázek č. 4) [3].



Obrázek č. 4: Struktura biofilmu.

Vysvětlivka: A) Komplexní architektura 8 týdnů starého biofilmu vytvořeného na kovovém povrchu potrubí vodního hospodářství, fotografie z elektronového mikroskopu; B) Stafylokokový biofilm na povrchu zavedeného implantátu, fotografie z elektronového mikroskopu, velikost měřítko 20 µm.

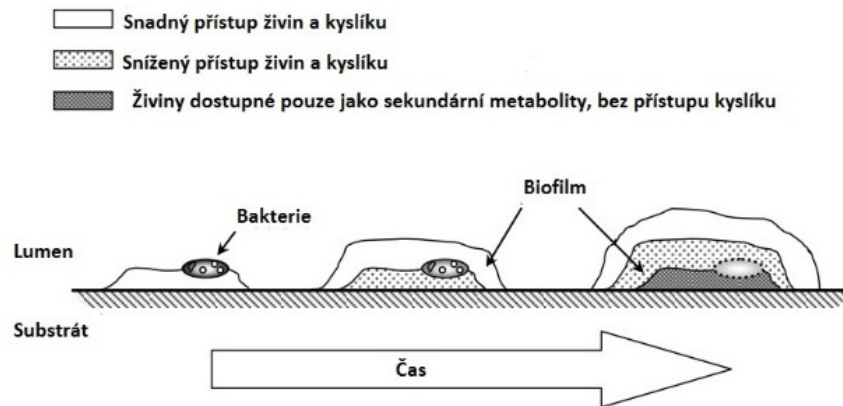
Převzato z [15] a upraveno.

4.3 Rozložení mikroorganismů v biofilmu

Vznik biofilmů pozorujeme u bakterií, kvasinek, hub, prvoků i drobných mnohobuněčných organismů. Základním předpokladem k jeho tvorbě je schopnost mikrobů dostatečně pevně adherovat k živým i neživým povrchům. Mikroorganismy jsou, jak už bylo zmíněno, v biofilmu rozprostřeny nerovnoměrně v mikrokoloniích a nachází se v metabolicky aktivním nebo neaktivním stádiu. Rozmístění záleží na dostupnosti nutrientů a kyslíku. [5; 24]

Studii autorů Hopeho a Wilsona [24] byly prokázány na povrchu biofilmu (místo s vysokou dostupností kyslíku) metabolicky aktivní aerobní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Metabolicky aktivní mikroorganismy se tedy nejdříve nachází v lokaci s nejhodnějšími podmínkami. Studii však také bylo prokázáno, že tyto kolonizující aerobní bakterie jsou časem dislokovány do míst, kde je dostupnost kyslíku omezená. To souvisí s vývojem biofilmu. Místa s aerobními mikroorganismy jsou časem přerůstána vznikající masou biofilmu, která zabrání přístupu O₂. Tyto změny mohou vést ke ztrátě aktivity, a dokonce viability buněk. Takovýchto neaktivních kolonií v průběhu času

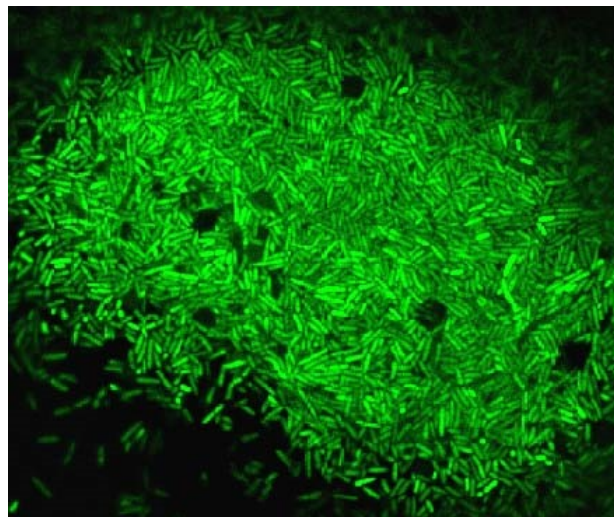
ve společenstvu přibývá. Tak v biofilmu vznikají celé zóny s neaktivními či odumřelými mikrobi. Proces vysvětluje Obrázek č. 5 [5; 24].



Obrázek č. 5: Časová dislokace primárních kolonizátorů v orálním biofilmu dle studie autorů Hopeho a Wilsona.

Převzato z [24] a upraveno.

Nejlépe prostudovanými biofilmy jsou biofilmy tvořené zmíněnou Gram negativní bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. (Obrázek č. 6) [12].



Obrázek č. 6: Biofilm tvořený bakterií *Pseudomonas aeruginosa*.

Vysvětlivka: Obrázek ukazuje biofilm tvořený bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, kmene PA14, velikost měřítka 20 μ m. Analýza prostorové struktury byla provedena s využitím konfokálního skenovacího laserového mikroskopu. Stáří biofilmu - 9 hodin.

Převzato z [25].

Gram pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis* jsou častí průvodci nozokomiálních onemocnění. Jejich houževnaté biofilmy často osídlují chronické rány pacientů a zavedené katetry [12].

Bakterie *Escherichia coli* je běžnou součástí přirozené mikroflóry těla, může však způsobovat infekce močového systému nebo pohlavních orgánů. U některých kmenů *Escherichia coli* přispívá k virulenci schopnost tvořit biofilm a také schopnost vytvářet pouzdro [6; 8; 26].

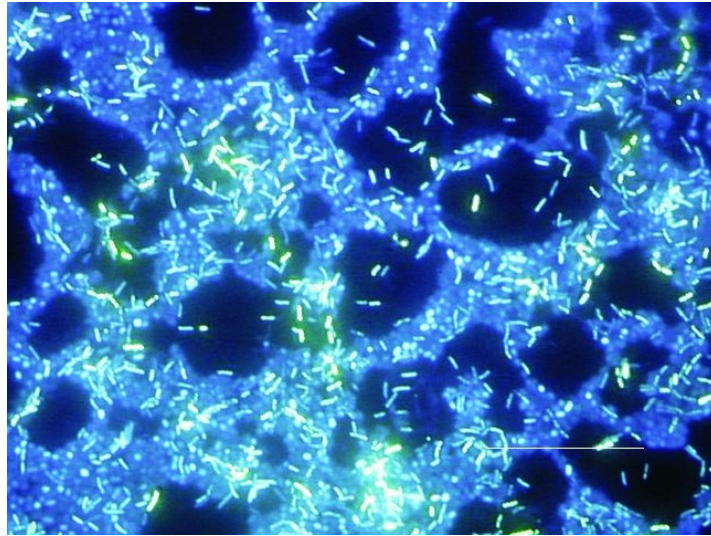
Klinicky významné bakterie z důvodu schopnosti tvorby biofilmu jsou rovněž *Vibrio spp.*, *Enterobacter cloacae* a mnoho dalších. Nebezpečné jsou také kandidové biofilmy [26]. Patogeneze některých konkrétních s biofilmy asociovaných infekcí jsou popsány v kapitole 11.

5 DĚJE PROBÍHAJÍCÍ V BIOFILMU

Uvnitř biofilmu může docházet k metabolickým procesům zcela odlišným od těch, které probíhají mimo něj, díky izolaci mikrokolonií od okolí pomocí matrice. Proto například i v aerobním prostředí mohou růst anaerobní druhy bakterií. V rámci biofilmového společenství se také uplatňují symbiotické vztahy různých mikrobiálních druhů. Metabolity jednoho druhu mikroorganismu totiž mohou být živným substrátem pro další druh [3; 5; 15].

Na povrchu je biofilm omýván okolní kapalinou obsahující molekuly živin, jež pronikají do biofilmu a póry difundují do buněčných mikrokolonií. Zároveň jsou těmito póry odváděny metabolity ven. Difuzivita biofilmu roste se zvyšující se koncentrací rozpuštěných živin a s klesající rychlostí proudu kapaliny. Na kvalitě difúze se podílí také složení matrice biofilmu. S její zvyšující se drsností rychlost difúze stoupá [3; 15; 27].

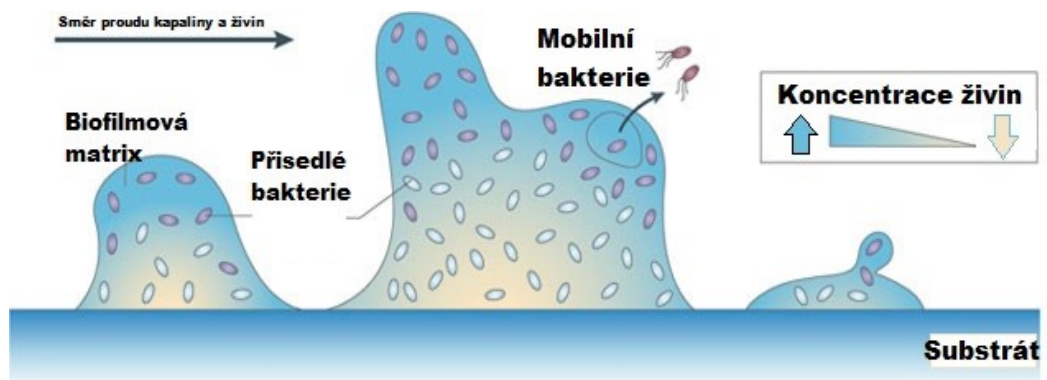
Kanálky a chodbičky lze pozorovat pomocí mikroskopie jako tmavá místa mezi ostrůvky mikrokolonií. (Obrázek č. 7) [15; 28].



Obrázek č. 7: Polymikrobiální biofilm (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* spp.).

Vysvětlivka: 14 dní starý biofilm vytvořený na povrchu kovového zásobníku s pitnou vodou. Na snímku jsou patrné polymikrobiální mikrokolonie, mezi kterými jsou tmavé zóny – vodní kanálky. Obrázek pořízen epifluorescenčním mikroskopem, velikost měřítka 20 μm . Barveno 4,6-diamino-2-phenylindolem. Převzato z [15].

Ve spodních vrstvách biofilmu probíhá proudění kapaliny s výživnými látkami už jen na principu difúze. Také proto se v hlubších patrech nachází méně náročné mikroorganismy. Obrázek č. 8 schematicky zobrazuje koncentrační gradient nutrice ve vrstvě biofilmu [15; 28].

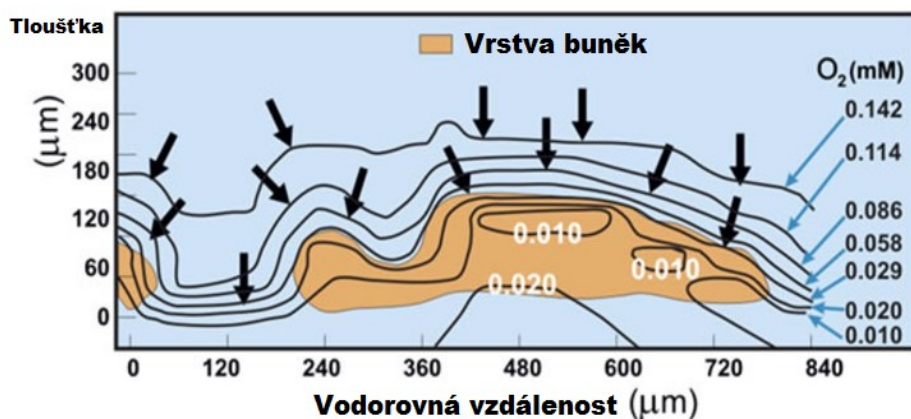


Obrázek č. 8: Koncentrace nutrientů v biofilmu.

Vysvětlivka: Na povrchu biofilm oplývá dostatkem živin. Směrem k podkladu koncentrace nutrice ubývá. Převzato z [29] a upraveno

Pokud je biofilm dobře zásobený živinami, jeho povrch je napnutý. Naopak při jejich nedostatku je svraštělý. Kromě dostatku živin závisí reliéf biofilmu rovněž na rychlosti proudu okolní kapaliny. Je-li vyšší, je povrch často odtrháván a působí hladkým a kompaktním dojmem – celá substance je hustší. V pomalém proudu se odlupují pouze drobné části biofilmu, a ten se jeví pórovitě a je řidší. (Více o uvolňování částí biofilmu v kapitole 6.3) [5].

Velice důležitá je rovněž koncentrace kyslíku ve vrstvě biofilmu. Ta pomáhá určit druhové složení smíšeného mikrobiálního společenstva. Ve vyšších zónách můžeme očekávat aerobní druhy, zatímco blíže k pevnému povrchu pozorujeme druhy anaerobní. Tyto odchylky jsou dány rozdílnou distribucí a spotřebou kyslíku aerobními a fakultativně anaerobními mikroorganismy. Kyslíkový gradient ve vrstvě biofilmu je znázorněn na Obrázku č. 9 [3; 28].



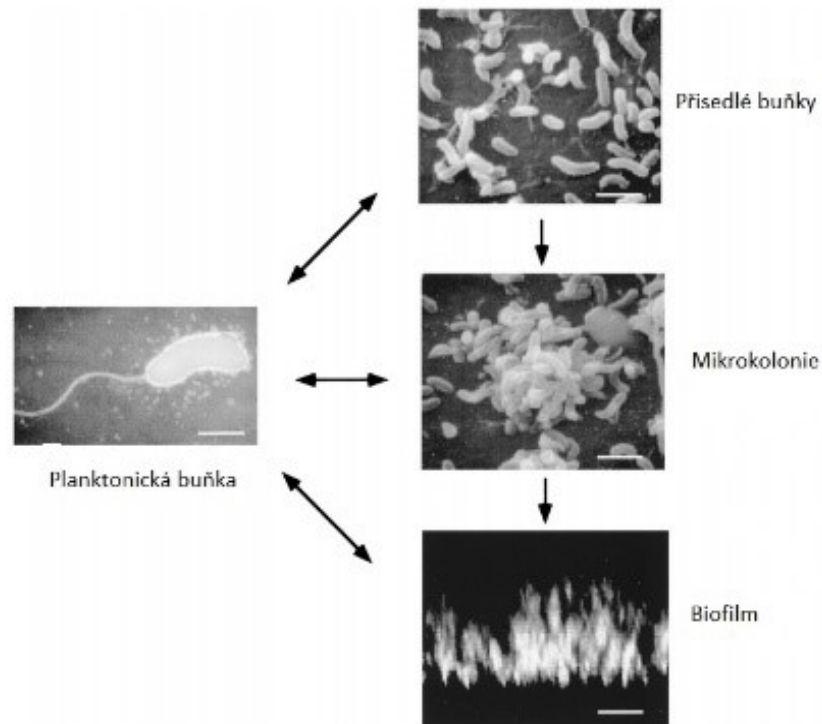
Obrázek 9: Schéma gradientu kyslíku v biofilmu.
Převzato z [30] a upraveno.

Na potřebě kyslíku závisí i tloušťka biofilmu. Biofilm přísně aerobní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je velmi tenký (30 až 40 μm), aby byla ve všech jeho vrstvách koncentrace kyslíku pro bakterii dostačující [3; 28].

6 VZNIK A VÝVOJ BIOFILMU

Proces vzniku a vývoje biofilmu se dělí do několika základních kroků. Prvním stěžejním krokem je dostatečně pevná adsorpce na živý či neživý povrch. V dalším kroku

dochází k replikaci buněk a vzniku mikrokolonií. Poté začínají buňky produkovat extracelulární matici a biofilm maturuje – dozrává. Poslední fázi provází odpoutávání částí vyzrálého biofilmu vlivem okolního proudu kapaliny a přichycení těchto částí ve vzdálenějších místech hostitelského prostředí. Jednotlivé kroky vzniku biofilmu jsou zaznamenány na fotografiích na Obrázku č. 10 [6; 28].



Obrázek č. 10: Mikroskopická studie kroků vedoucích ke vzniku biofilmu bakterie *Vibrio cholerae*.

Vysvětlivka: Planktonická buňka byla vizualizována pomocí transmisní elektronové mikroskopie (měřítko - 1 μm), přisedlé buňky a mikrokolonie byly vizualizovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (měřítko 2 μm) a snímek maturovaného biofilmu byl pořízen pomocí konfokální skenovací mikroskopie - měřítko - 10 μm .

Převzato z [8] a upraveno.

6.1 Adheze buněk k povrchu

Zachycení buněk na podkladu je poměrně složitý, ne zcela prozkoumaný proces. Těsně před přilnutím buňky k substrátu se enormně zvýší aktivita některých jejích genů a později dojde také ke změně jejího fenotypu. Tyto geny můžeme rozdělit do dvou

základních skupin. První kódují molekuly odpovědné za přilnutí buněk. V druhé skupině jsou geny, jejichž exprese je podmíněna vnějšími faktory či signálními molekulami mikroorganismů již přítomných v biofilmu. [3; 5]

Samotný průběh adheze závisí zejména na vlastnostech povrchu, který je kolonizován a na kolonizujících buňkách [15].

6.1.1 Vlastnosti povrchu ovlivňující adhezi k substrátu

Obecně pro kolonizaci platí, že čím drsnější je podklad, tím více je usnadněna adheze. Adhezi mikroorganismů ovlivňují i fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu. V řadě studií bylo zjištěno, že buňky lépe adherují k hydrofobním nepolárním povrchům jako je například teflon nebo plast spíše než k hydrofilním povrchům, jako jsou kovy nebo sklo [15].

Na schopnost mikrobů vázat se na určitý povrch má vliv i médium, okolní tekutina, ve které se daný substrát nachází. Běžně se povrchy pokrývají polymery z různých médií a tímto dochází k chemické modifikaci povrchu, která ovlivňuje míru schopnosti mikroba k němu přilnout. Vybraná média, která ovlivňují adhezi mikrobů na konkrétních tkáních hostitele jsou seřazena v Tabulce č. 4 [15].

Tabulka 4: Tekoucí média ovlivňující adhezi buněk k tkáním hostitele.

Prostředí	Okolní kapalina	Složky umožňující adhezi
močová trubice	moč, prostatické tekutiny, sperma	mukopolysacharidy, glykoproteiny
kardiovaskulární systém	krev	albuminy, fibrinogen, fibronektin
oči	slzy	lysozym, fibrin
ústní dutina	sliny	mukopolysacharidy, glykoproteiny, albuminy

Prostředí	Okolní kapalina	Složky umožňující adhezi
žlučovody	žluč	steroidy, žlučové soli, mukopolysacharidy
podkoží	extracelulární tekutina	fibrin
peritoneální dutina	peritoneální tekutina	fibrin, albuminy, dialyzáty
dýchací trubice	respirační sekrety	mukopolysacharidy
kostní lůžko, kloub	kloubní výpotek, krev	sérové proteiny, krevní elementy

Převzato z [5] a upraveno.

6.1.2 Vlastnosti kolonizujících mikrobusů ovlivňující adhezi k substrátu

Většina bakterií má hydrofóbní povrch. Mezi nimi a substrátem tedy dochází k hydrofóbním interakcím. Svoji roli zde také mohou sehrávat fimbrie a bičíky, které k celkovému hydrofóbnímu rázu přispívají [15].

Významnou roli v umožnění adheze hrají non-fimbriální adheziny. Jedná se o proteinové molekuly sekretované různými sekrečními drahami, jako je sekreční dráha typu 1 (T1SS, type 1 secretion system), sekreční dráha typu 5 (T5SS, type 5 secretion system), prostřednictvím tzv. "two-partners" sekrečního systému nebo se jedná o polysacharidové adhesiny [31].

Dalšími faktory, které ovlivňují schopnost se vázat, je hodnota pH, obsah nutrice, iontová síla vodného média a také teplota [4].

6.2 Zrání biofilmu

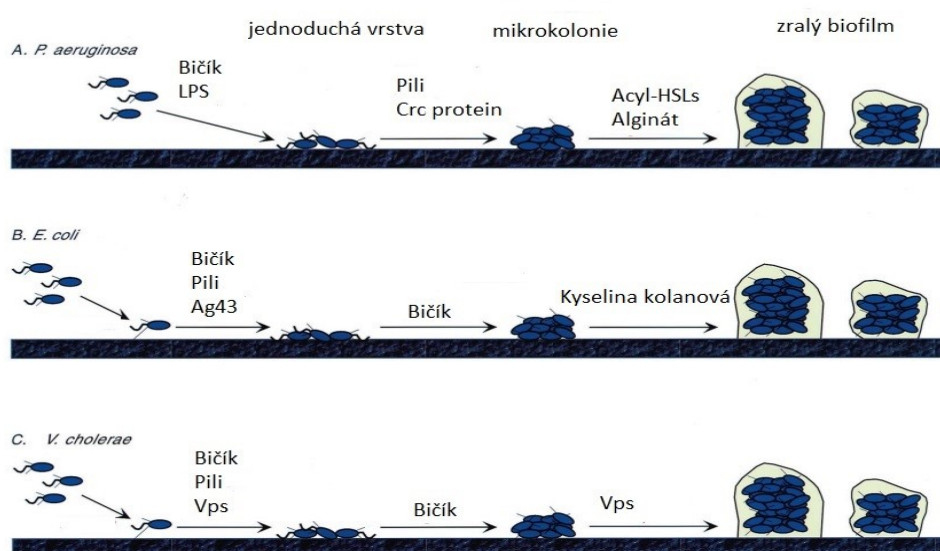
Jak již bylo zmíněno dříve, adherované mikrobiální buňky oproti flotujícím buňkám exprimují jinou skladbu genů. Tím je pozměněna produkce přibližně 1/3 bílkovin. Dochází ke zvýšené expresi především proteinů tvořících póry, proteinů

účastnících se transportu živin a těch, které se podílí na syntéze extracelulární matrice [3].

Mikrobiální společenství postupně tvorbou exopolysacharidů nabydou na objemu a vytvoří charakteristickou houbovitou strukturu. Tím vzniká typická architektura maturovaného biofilmu popsaná v kapitole 4.2 [5].

Řada výzkumů bylo poukázáno na to, že formování biofilmu a jeho maturace výrazně závisí na produkci tzv. „quorum sensing“ molekul (viz kapitola 7). Na příkladu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* bylo demonstrováno, že v případě alterace tvorby těchto signálních molekul se radikálně změnila architektura biofilmu [32].

Na Obrázku č. 11 je znázorněn vznik biofilmu tří nejstudovanějších Gram negativních bakterií.



Obrázek 11: Vznik biofilmu bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Vibrio Cholerae*.

Vysvětlivka: V planktonickém stadiu jsou buňky obohaceny o bičík, jež jim pomáhá přemístit se k vhodnému substrátu. V přisedlé fázi již není nutný. První interkaci a vazbu na povrch *Pseudomonas aeruginosa* sehrávají lipopolysacharidy spolu s proteiny vnější membrány. Když je bakterie přichycena, k buňkám nasedají další buňky a tvoří se tak mikrokolonie. Dále dochází ke zvýšení biosyntézy alginátu a ke snížení exprese genů podílejících se na syntéze bičíků. Pro tvorbu maturovaného biofilmu je pak klíčová produkce signálních molekul acyl-homoserin laktonů. Alginát je základní strukturou biofilmu tohoto mikroorganismu. V případě bakterie *Escherichia coli*, jsou to opět bičíky a také pili, které dovolí bakteriálním buňkám dostat se k povrchu a pevně se vázat. Důležité jsou nejen ty, ale také protein vnější membrány označovaný jako Ag43. Hlavní součástí maturovaného biofilmu je zde kolanová kyselina. Stejně tak v případě *Vibrio cholerae* - pro první krok adheze je zapotřebí bičíků, pili a Vps. LPS=lipopolysacharidy, CRC Protein= „Catabolite repression control“ protein, Acyl-HSL=Acyl-homoserin lakton, Vps=vibrio polysacharid

Převzato z [32] a upraveno.

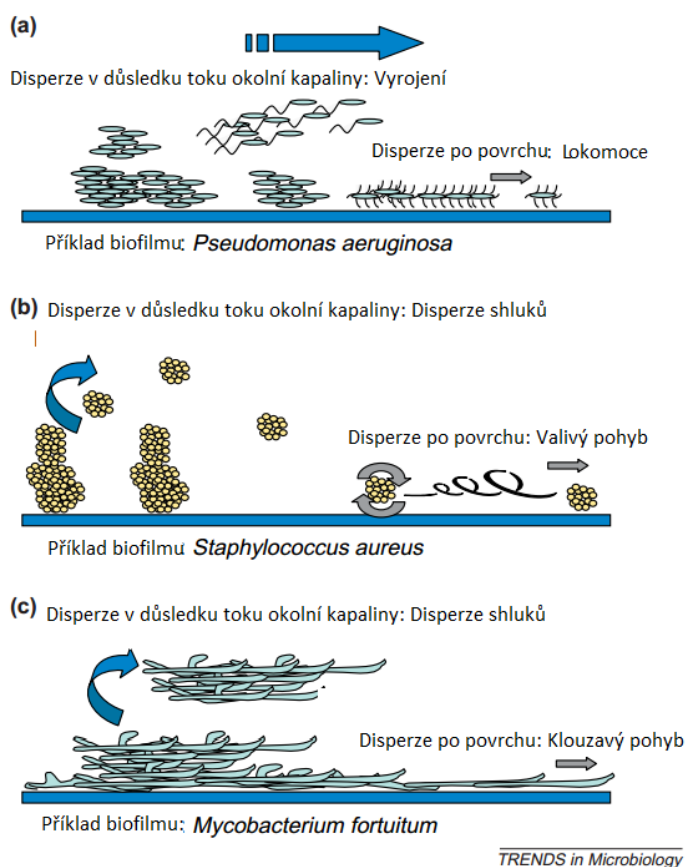
6.3 Uvolňování buněk z biofilmu

Vývojem biofilmu dochází ke vzniku jakýchsi mikrobiálních dep. Část z nich je schopna se uvolnit a osídlit nové niky hostitele. Tento proces disperze biofilmu je nazýván „*detachment*“ [5; 33].

Rulík *et al.* ve své knize [5] shromáždil několik možných faktorů iniciujících odtrhávání. Patří mezi ně tvorba enzymů degradujících matrici, bubliny plynů vznikající činnostmi mikroorganismů v biofilmu, nutriční dostatek, smykové tření, *quorum sensing* (kapitola 7), aktivita bakteriofágů a podobně [5].

Jak už bylo naznačeno, rychlost odtrhávání ovlivňuje především rychlost proudění okolní kapaliny. Velká odtrhávací síla stimuluje produkci strukturních polysacharidů. Při mohutnějším odtrhávání vznikají biofilmy husté tuhé a kompaktní. Naopak, pokud je odtrhávání mírné, biofilmy mají charakter vyšší nadýchané pórovité vrstvy [27; 34].

Možné mechanismy disperze buněk z biofilmu jsou zobrazeny na Obrázku č. 12.



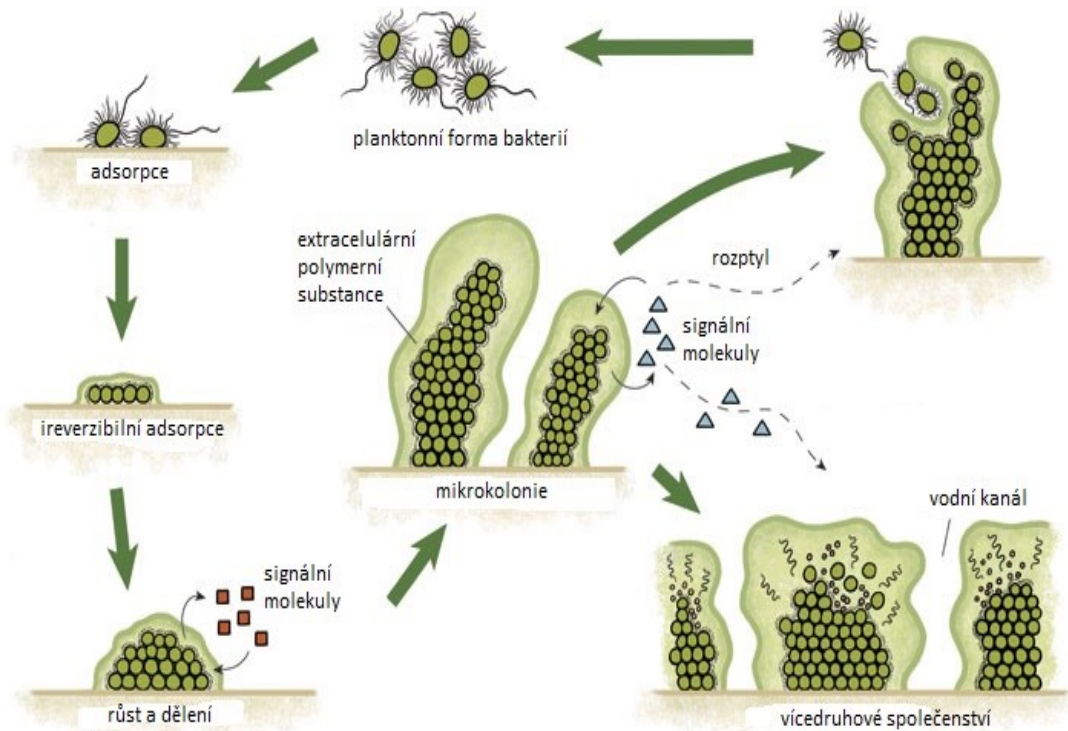
Obrázek č. 12: Mechanismy disperze biofilmu.

Vysvětlivka: U bakteriálních biofilmů se uplatňují různé způsoby disperze, a) *Pseudomonas aeruginosa*, b) *Staphylococcus aureus*, c) *Mycobacterium fortuitum*. Tyto mechanismy lze sjednotit do dvou rozdílných módů. Disperze do protékající tekutiny a disperze po povrchu. Disperze může být zprostředkována vlastní schopností lokomoce bakterií anebo vlivem toku tekutiny. V případě užití schopnosti lokomoce se buňky odtrhávají jednotlivě a nemohou operovat s profitem, které jim poskytuje odtrhávání se ve shlucích často obklopených EPM

Převzato z [33] a upraveno.

Disperze částí biofilmu tedy zřejmě není, jak se původně uvažovalo, náhodný proces. Jedná se pravděpodobně o strategii potřebnou k osídlování nových povrchů ještě před tím, než začne být dosavadní nika pro biofilm nedostatečná z hlediska prostoru či přístupu živin [5; 33].

Shrnutí životního cyklu biofilmu zobrazuje Obrázek č. 13.



Obrázek č. 13: Vznik a struktura biofilmu – souhrn.
[Převzato z 35 a upraveno]

7 QUORUM SENSING

Je zřejmé, že bakterie vnímají změny okolního prostředí a dokáží na ně reagovat. Rovněž jsou schopny regulovat svůj životní cyklus, kontrolovat dostatečný přísun živin a využít tyto informace jako podnět k virulentnímu chování [36].

Důležitou vlastností mikrobiálních buněk biofilmu je schopnost pozorovat hustotu vlastní populace a reagovat na její zvyšování pomocí chemických signálů. Tyto signální molekuly jsou produkovány přímo buňkami společenství. Se zvyšující se denzitou biofilmu signál roste a je tím snáze detekovatelný pro další buňky. Po dosažení kritické koncentrace (bod „*quorum*“) dochází ke změně chování bakterií – ustává dělení buněk a biofilm tak nemůže být přehuštěn. Tento proces regulace byl nazván *quorum sensing* (QS) [37; 38].

V časně fázi vzniku biofilmu, tedy před překročením zmíněného koncentračního prahu signálních molekul, se QS podílí na tvorbě polysacharidové matrice. Po dosažení hraniční koncentrace má QS podpůrný vliv na produkci faktorů virulence, které stojí za projevy infekčních onemocnění. QS se dále podílí na schopnosti resistance vůči ATBs [37; 38].

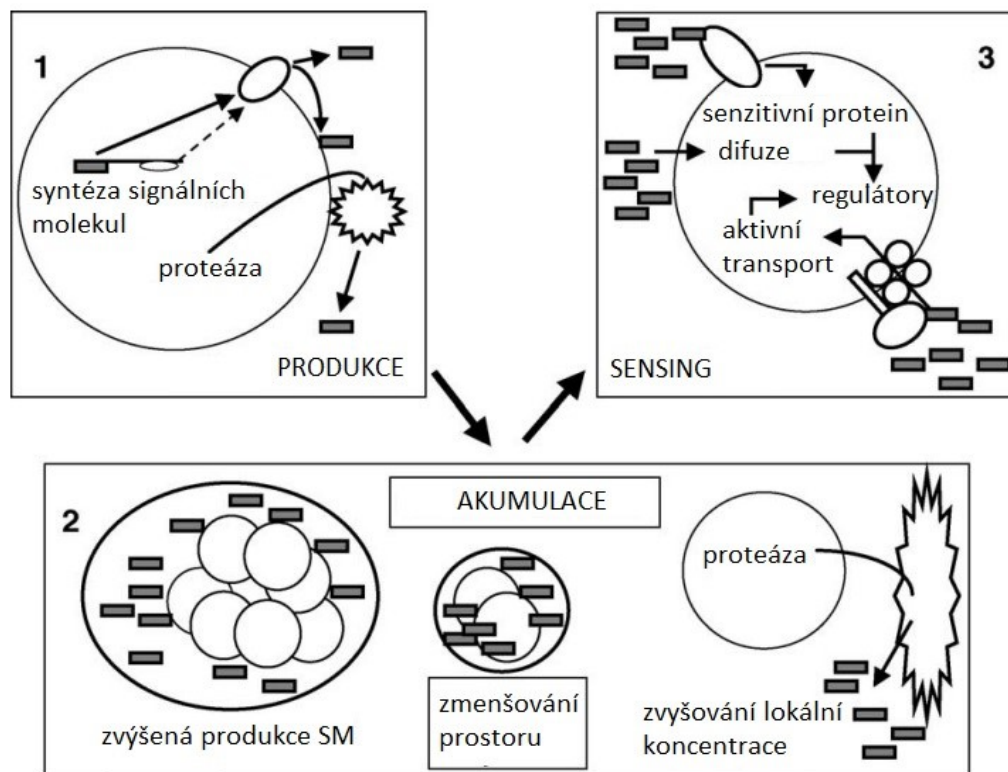
QS bylo prvně popsáno u *Vibrio fischeri*-bakterie, která tvoří mutualický vztah s některými mořskými světélkujícími organismy, jako je hlavonožec sepiola kropenatá. Signální molekuly AHLs (acyl-homoserine lactones, acyl-homoserin laktony) regulují transkripci genů *luxA* a *luxB* kódující enzym luciferázu, jež je zodpovědný za bioluminiscenci biofilmu vibria. Takto světélkujících biofilmů využívá hlavonožec ve svých světelných orgánech jako výstrahu proti predátorům a bakterii na oplátku poskytuje vhodné zázemí [5; 39].

7.1 Princip quorum sensing

Proces regulace pomocí QS probíhá obecně ve třech krocích (viz. Obrázek č. 14). V prvním kroku dochází k produkci signálních molekul buňkami biofilmu a jejich transportu skrze buněčnou membránu. Vně buňky molekuly buď volně flotují nebo zůstanou navázány na jejím povrchu [37].

V druhém kroku se signální molekuly akumulují vně buňky. K hromadění dochází díky produkci signálních molekul buď v konstantním módu nebo díky zvýšené produkci mikrobiálními buňkami [37].

Ve třetím kroku koncentrace signálních molekul překročí udržitelný práh. Dochází tím k tzv. „*sensingu*“ čili okamžiku, kdy buňka začne signál vnímat. K tomuto bakterie využívají tzv. dvoukomponentové senzory. Tyto senzory jsou ukotveny na povrchu mikrobiální buňky a po vazbě signální molekuly dochází k převodu signálu do jejího nitra, kde je nastartována fosforylační kaskáda. Jinou alternativou je, že signální molekuly se dostávají do nitra buňky díky difúzi nebo aktivním transportem. Po dosažení intracelulárního buněčného prostoru se specificky váží na regulační protein [37].



Obrázek 14: Schéma tří základních kroků procesu regulace pomocí QS.

Vysvětlivka: 1 – signální molekuly jsou sekretovány do extracelulárního prostředí z mikrobiální buňky, případně jsou uvolňovány z buněčných povrchů prostřednictvím proteáz. 2 – Signální molekuly jsou akumulovány v okolí bakteriálních buněk díky jejich kontinuální produkci a také díky zvyšující se populaci buněk ve velmi omezeném prostoru. 3 – Dosažení hraniční koncentrace signálních molekul, buňky začnou signální molekuly vnímat díky jejich kumulaci na povrchu buňky či díky pasivnímu/aktivnímu transportu molekul dovnitř buňky. Dochází k aktivaci regulátorů řídících genovou expresi.

[Převzato z 37 upraveno]

7.2 Signální molekuly jednotlivých skupin bakterií

Do dnešního dne je rozpoznáváno pět tříd signálních molekul. AHLs jsou malé lipofilní molekuly produkované Gram negativními bakteriemi. Tyto molekuly volně difundují skrze bakteriální membránu. Bylo prokázáno, že slouží ke komunikaci v rámci jednoho druhu, ale také k mezidruhové komunikaci [37; 39; 40].

Heptyl-hydroxy-chinolony jsou podobné AHLs vzhledem k velikosti a lipofilnímu charakteru. Tyto molekuly jsou opět výhradně produkovány některými Gram negativními bakteriemi. Po chemické stránce jsou podobné chinolonům. To může být důvodem, proč mají některá antibiotika ze skupiny chinolonů schopnost interferovat se signálními cestami zprostředkovanými právě těmito molekulami [37].

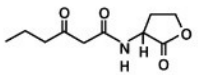
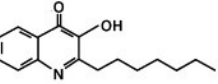
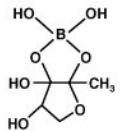
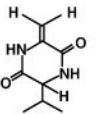
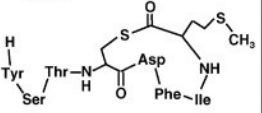
Zcela chemicky odlišnými signálními molekulami jsou furanosyl-borát-disestery. Tyto molekuly jsou produkovány jak Gram pozitivními, tak i Gram negativními

bakteriemi [37].

Cyklické dipeptidy (diketo-piperaziny) jsou dalšími molekulami chemicky odlišnými od předchozích. Tyto molekuly produkují pouze některé Gram negativní bakterie [37].

Oligopeptidy jsou molekuly blízké cyklickým dipeptidům. Výzkumy bylo prokázáno, že jsou produkovány jak Gram pozitivními, tak i Gram negativními bakteriemi. Struktury signálních molekul a způsoby jejich přenosu přes membránu jsou zahrnuty v Tabulce č. 5 [37].

Tabulka 5: Příklady signálních molekul typických pro různé skupiny bakterií.

Skupina látek	Struktura (příklad)	Produkující bakterie	Přenos přes membránu	Místo sensingu
N-acyl-homoserin laktony		G-	difuze	uvnitř buňky
hydroxy-chinolony		G-	difuze (?)	uvnitř buňky
furanosyl-borát		G+/G-	aktivní transport	vně/ uvnitř buňky
cyklické dipeptidy		G-	difuze (?)	uvnitř buňky
oligopeptidy		G+/G-	aktivní transport	vně/ uvnitř buňky

Převzato z [37] a upraveno.

V případě stafylokoků je pro patogenезi klíčovou komponentou genový regulátor *agr* (accessory gene regulator). Bylo prokázáno, že tento regulátor stojí za snížením exprese povrchových buněčných proteinů a zvýšením exprese sekretovaných faktorů virulence při přechodu z pozdní exponenciální růstové fáze do stacionární fáze [38].

Expese *agr* přispívá k invazivitě stafylokoků a k patogenезi stafylokokových infekcí jako jsou například podkožní abscesy, artritida či endokarditis.

Z řady výzkumných prací je evidentní, že *agr* je také odpovědný za samotné formování biofilmu u stafylokoků [37; 38].

QS jako regulátor tvorby biofilmu a virulence je popisován také u mnoha dalších mikrobů (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, rodu *Lactobacillus* a *Listeria*) [5].

8 QUORUM SENSING JAKO NOVÝ CÍL TERAPIE

QS od určité fáze potlačuje tvorbu a vývoj biofilmu, a naopak podporuje vznik faktorů virulence. Patří k nim enzymy a toxiny poškozující tkáň, jako jsou cytolyziny, hemolyziny, serinové proteázy apod. Díky QS tedy může biofilm na tkáni vznikat a růst zcela bez povšimnutí imunitního systému hostitele, protože kvůli dosavadní nedostatečné hustotě neprodukuje žádné signální molekuly. Úvodní fáze infekce tedy probíhá zcela latentně [5; 37].

Při zahájení produkce virulentních faktorů (dosažení kritické koncentrace signálních molekul) je biofilm již dostatečně pomnožený, takže symptomy infekce vypuknou velice rychle a invazivně a onemocnění se stává těžko léčitelným. [38]

Souvislost systému QS s podporou virulence může mít pro klinickou praxi velký význam. Podle recentních studií je totiž QS velmi vhodným cílem terapie. Vědci zjistili, že „vypnutím“ regulačního genu některé části QS vznikne mutant, jenž nedokáže produkovat původní signální molekuly. Výhod, které se naskýtají při užití QS jako terapeutického cíle, je několik: (I) Regulace pomocí QS je kmenově nebo druhově specifická. Terapie by tak neměla cílit na přirozenou bakteriální flóru, ale pouze na původce infekce. Zvýší se tedy citlivost a sníží nežádoucí účinky léčby [37].

(II) QS regulace může být zcela blokována bez jakéhokoliv vlivu na životaschopnost či vývoj buňky. Terapie se zaměřením na QS by tak neměla vyvolávat mutace způsobující například rezistenci jako v případě použití ATBs [37].

(III) V některých případech reguluje QS další vlastnosti, jako je schopnost inkorporace do eukaryotní buňky. Podávání látky tímto způsobem ovlivňující QS by mohlo být užito jako náhrada ATBs, která účinkují pouze vně eukaryotní buňky [37].

Příkladem, který poukazuje na důležitost systému QS v patogenitě mikroorganismů, je experiment provedený na bakterii *Streptococcus mutans*, původci

zubního kazu. V bakteriálním chromozomu v oblasti odpovědné za regulaci QS byla provedena genová delece. U mutantních kmenů bylo jasně prokázáno, že tato delece výrazně ovlivňuje nejen schopnost tvořit biofilm, ale také, že se snižuje schopnost růst a odolávat kyselému pH [41].

9 QUORUM QUENCHING ENZYMY

QS koordinuje vyžrávání a virulenci biofilmu, je proto zřejmé, že QS jednoho společenství může být vhodným cílem útoku jiného mikroorganismu v rámci konkurenčního boje o niku s vhodnými podmínkami. Bylo prokázáno, že některé (prokaryotní i eukaryotní) organismy jsou schopny produkovat enzymy zvané „*quorum quenching*“ neboli zhášecí enzymy, které jsou schopné degradovat signální molekuly konkurenčních bakterií na vícero úrovních (vznik, akumulace, adsorpce) [42; 43].

Quorum quenching enzymy jsou například laktonázy a acylázy hydrolyzující laktonový kruh. Tento mechanismus, jak vyžrát na konkurenci, byl doposud objeven u minimálně deseti bakteriálních druhů (příklady uvedené v Tabulce č. 6) [42; 43].

Tabulka 6: Příklady bakteriálních a eukaryotických druhů produkujících „*quorum quenching*“ enzymy.

Druh	Enzym
Prokaryota	
<i>Bacillus sp.</i>	laktonáza
<i>B. thuringiensis</i>	laktonáza
<i>B. cereus</i>	laktonáza
<i>B. mycoides</i>	laktonáza
<i>B. anthracis</i>	laktonáza
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	laktonáza
<i>Arthrobacter sp.</i>	laktonáza
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	laktonáza
<i>Variovorax paradoxus</i>	acyláza ?
<i>Ralstonia strain</i>	acyláza
<i>P. aeruginosa</i>	acyláza
Eukaryota	
Člověk (epitel dýchacích cest)	Laktonáza
Prase (ledviny)	Acyláza 1

Převzato z [42] a upraveno.

Quorum quenching mechanismus hraje významnou roli při získávání kompetiční výhody mezi jednotlivými mikroorganismy v přírodních ekosystémech. V současnosti však studie obracejí svůj zájem na význam zhášecích enzymů ve vztahu mezi mikrobem a hostitelem. Objev enzymů degradujících signální molekuly bakterií uplatňujících se také ve tkáních savců je důležitým mezníkem ve výzkumu. Správné popsání struktury a mechanismu účinku těchto enzymů vede k objasnění procesů v přirozeném boji s infekčními chorobami [42; 43; 44].

Navíc, *quorum quenching* mechanismus by mohl být inspirací pro vznik nové generace přípravků určených k léčbě infekcí vyvolaných biofilm formujícími patogeny bez rizika vzniku rezistence a alterace s dosavadní konvenční léčbou antibiotiky, což by bylo vzhledem k současnému problému s jejich nadužíváním velmi výhodné. I když se od tendence nadměrně předepisovat konvenční ATBs pomalu opouští, vznik rezistence je stále se rozšiřující problém. Lze tedy říci, že *quorum quenching* enzymy oplývají nesporným potenciálem tyto problémy potlačit [42; 43; 44].

10 REZISTENCE BIOFILMŮ K ANTIMIKROBNÍM LÁTKÁM

Jak již bylo zmíněno, biofilm reaguje mnohými mechanismy k ochraně vlastního společenství proti nepříznivým okolním faktorům. Jedním z těchto faktorů je samozřejmě také účinek antimikrobních látek, ať už těch, produkovaných konkurenčními druhy nebo vpravených do těla hostitele za účelem léčby. Bakterie v biofilmu jsou podle některých zdrojů až 1000x rezistentnější k ATBs než buňky v planktonické formě. Jejich citlivost se snižuje již od samého počátku vzniku biofilmu, tedy hned po adhezi buňky na povrch [45].

10.1 Mechanismy rezistence biofilm formujících mikroorganismů vůči antibiotikům

Možností vzniku takto účinné rezistence je několik. První mechanismus vychází z vlastností EPM. Díky denznímu a hydrodynamickému prostředí polymerní matrice je pro antimikrobní látky ztížen postup. Tento efekt byl sledován na biofilmu bakterií

Klebsiella pneumoniae a *Pseudomonas aeruginosa* [3].

U druhého mechanismu se předpokládá, že antibiotika se přímo navazují na polymerní strukturu matrice a neprostupují již dále skrze ni [3].

Třetí mechanismus je spojen se samotnými buňkami biofilmu. Mikrobiální buňky jsou schopny se chránit před vlivem ATBs a jinými nepříznivými vlivy sekrecí efektorových molekul. Tyto extracelulární sekretované molekuly jsou schopné ATB chemicky či enzymaticky modifikovat. Mezi takové molekuly patří například polysacharázy, proteázy, β -laktamázy, apod [45].

Další mechanismus vychází opět z architektury biofilmu. V hlubších vrstvách biofilmu se mikrobům nedostává nutrice v dostatečném množství, buňky zde hladoví a jejich růstový obrat je výrazně redukován. Tyto metabolicky méně aktivní buňky pak vykazují k ATBs méně citlivý fenotyp. Je třeba mít také na paměti, že k těmto buňkám v nižších vrstvách biofilmu se dostávají ATBs v subletálních koncentracích, což má za následek selekci rezistentních buněk a jejich klonální expanzi [45].

Biofilmu k rezistenci přispívá také jeho druhová heterogenita. Experiment na dvoudruhovém biofilmu bakterií *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis* ukázal, že činnost genů kódujících faktory rezistence proti ATB oxacilinu, erythromycinu a tobramycinu byla výrazně zvýšena. Minimální inhibiční koncentrace zmíněných ATBs byly pro bakterie ve dvoudruhovém biofilmu několikanásobně vyšší. Všechny zmíněné mechanismy mohou fungovat současně a rezistenční efekt tím ještě navyšovat [46].

Rezistenci ovlivňuje také výše zmiňovaná komunikační síť systému QS (viz kapitola 7).

10.2 Mechanismy rezistence dané změnou fenotypu

Pro efektivnější působení proti ATBs dochází u rezistentních mikroorganismů také k různým fenotypovým změnám. Rezistenci například podporují lékové rezistenční pumpy – MRP („*Multidrug resistance pumps*“). Podávání subletálních dávek ATBs může vést k expanzi mutantních buněk, které takovéto pumpy exprimují. Základem pump je třípeptidový systém vylučující veškeré neznámé chemické sloučeniny skrz vnější membránu z buňky ven. Tento mechanismus rezistence lze pozorovat i u planktonické fáze bakterií. Mutace, které vedou k nadměrné expresi pump dávají vzniknout

multirezistentním kmenům [47].

Zásadní roli v biofilmové rezistenci hrají i tzv. perzistentní bakterie. Jsou to buňky, které jsou k ATBs tolerantní čili takové, které bez větší újmy přečkají po dobu působení ATBs. Perzistentní buňky se nachází ve stavu dormance, což znamená, že jejich metabolismus je zpomalený, nedochází k jejich dělení a zároveň je u nich poškozen mechanismus programované buněčné smrti. Po odstranění antibiotika jsou funkce těchto bakterií obnoveny. Právě tyto buňky se poté stávají základem nové kolonie [48; 49].

Rezistentní k antimikrobiálním látkám nemusí být pouze bakterie. Kvasinka *Candida albicans* je schopna tvořit biofilmy, které vykazují odolnost proti běžně úspěšným antimykotickým přípravkům [50].

Velice zajímavé je zjištění, že některá antibiotika ve výjimečných případech mohou dokonce svým působením vznik biofilmu vyvolat (např. u *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Tento efekt je vysvětlován tak, že se bakterie takto reagovat naučily v průběhu evolučního vývoje. [3]

11 BIOFILMY V MEDICÍNĚ

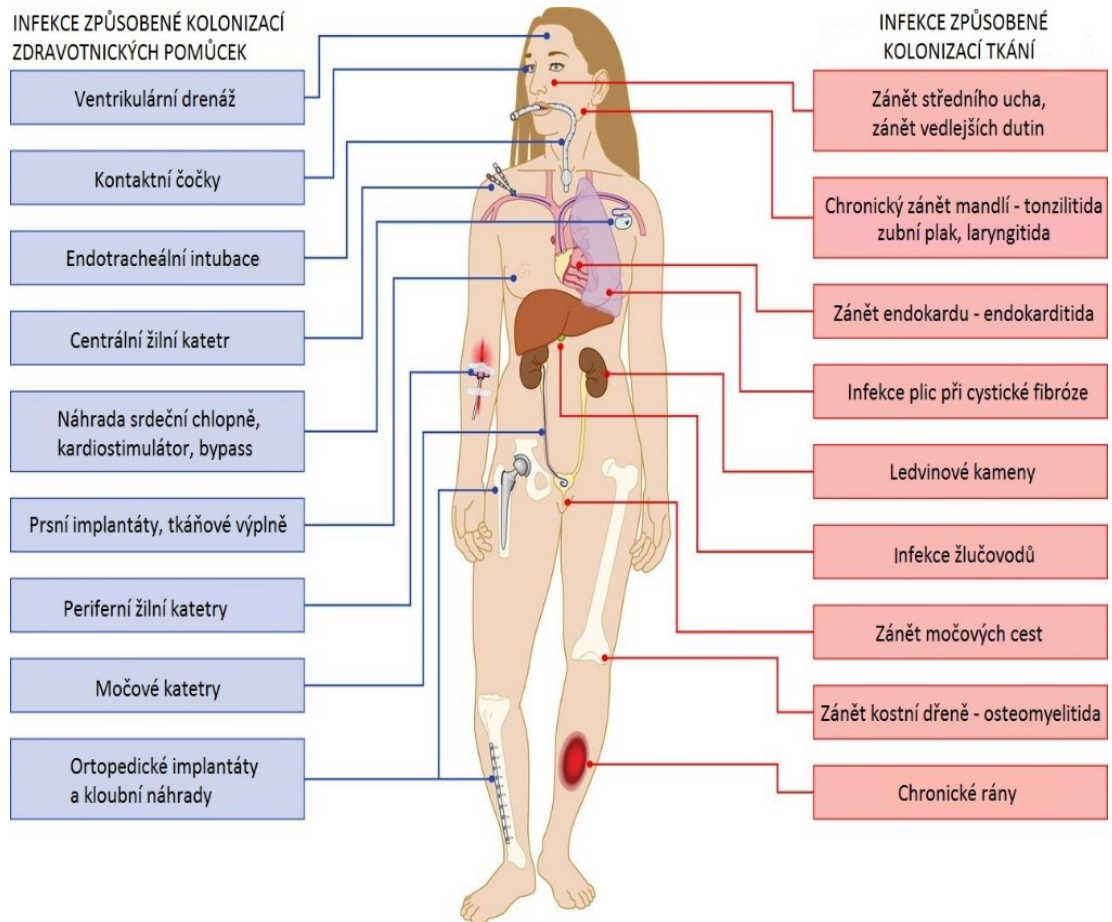
Nejmodernějšími mikroskopickými technikami je možné pozorovat druhově rozmanité mikrobiální biofilmy kolonizující lidské tkáně. Některé biofilmy vznikají fyziologicky a tvoří přirozenou mikroflóru tkání a sliznic hostitele. Takové biofilmy jsou pro hostitele přínosné. Patří k nim bakteriální osídlení tlustého střeva či biofilm tvořící vaginální mikroflóru. Tyto biofilmy stimulují imunitní systém a omezují přežívání a množení patogenů. Část saprofytů a komenzálů je však tzv. podmíněně neboli oportunně patogenní. To znamená, že při narušení imunologických bariér nebo při destabilizaci rovnováhy v mikroflóře mohou vyvolat vážná onemocnění. Některá z těchto onemocnění a mikroorganismy, které je způsobují jsou zahrnuty v Tabulce č. 7 [4; 51].

Tabulka č. 7: S biofilmy spojované infekce a jejich původci.

Infekce a onemocnění	Časté bakteriální druhy tvořící biofilm
Zubní kazy	Acidogenní grampozitivní koky (např. <i>Streptococcus</i>)
Periodontitis	Gramnegativní anaerobní orální bakterie
Otitis media	Netypovatelné kmeny <i>Haemophilus influenzae</i>
Infekce pohybového ústrojí	Grampozitivní koky (např. styfykoky)
Nekrotizující fasciitis	Streptokoky skupiny A
Infekce žlučových cest	Střevní bakterie (např. <i>Escherichia coli</i>)
Osteomyelitis	Kombinace různých druhů bakterií a hub
Bakteriální prostatitis	<i>E. coli</i> a další gramnegativní bakterie
Endocarditis	Viridující streptokoky
Infekce plic u pacientů s cystickou fibrózou	<i>P. aeruginosa</i> a <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Nozokomiální infekce	
Pneumonie	Gramnegativní tyčky
Stehy	<i>Staphylococcus epidermidis</i> a <i>S. aureus</i>
Vývody	<i>S. epidermidis</i> a <i>S. aureus</i>
Arteriovenózní zkraty	<i>S. epidermidis</i> a <i>S. aureus</i>
Infekce sklery	Grampozitivní koky
Kontaktní čočky	<i>P. aeruginosa</i> a grampozitivní koky
Urinální katetry	<i>E. coli</i> a další gramnegativní bakterie
Peritoneální dialýza	Kombinace bakterií a hub
Nitroděložní tělíška	<i>Actinomyces israelii</i> a mnoho dalších
Endotracheální intubace	Kombinace bakterií a hub
Hickmanovy katetry (chemoterapie)	<i>S. epidermidis</i> a <i>C. albicans</i>
Centrální žilní katetry	<i>S. epidermidis</i> a další
Umělé srdce	<i>S. aureus</i> a <i>S. epidermidis</i>
Bypass	Grampozitivní koky
Stent žlučových cest	Střevní bakterie a houby
Ortopedické nástroje	<i>S. aureus</i> a <i>epidermidis</i>
Penilní implantát	<i>S. aureus</i> a <i>epidermidis</i>

Převzato z [52] a upraveno.

Infekce, u kterých se na patogenезi podílejí biofilmy a místa jejich vzniku jsou zaznamenány na Obrázku č. 15.



Obrázek č. 15: Infekce spojené s biofilmy.

Převzato z [48] a upraveno.

Patogeneze některých uvedených infekcí jsou blíže popsány v následujících kapitolách.

11.1 Infekce dutiny ústní

11.1.1 Zubní plak

Nejdéle studovaným biofilmem v lidském těle je zubní plak. Na chrupu vzniká fyziologicky a velice snadno díky ideálnímu prostředí. Přítomnost proteinů a dalších látek

ve slinách hostitele poskytuje vhodný substrát pro adhezi mikroorganismů, jako jsou *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, *Nocardia* spp. a *Candida albicans*. Přilnutím těchto organismů na povrch je nastartován proces produkce matrice, a tím vznik a vývoj odolného biofilmu [36; 53].

Komplikacemi zubního plaku jsou zubní kazy. Kariogenní mikroorganismy (nejvíce laktobacily a streptokoky) se na jejich vývoji podílí svým metabolismem. Fermentují totiž cukry – hlavně sacharózu a fruktózu na kyselinu mléčnou a glukany. Kyselina snižuje pH prostředí a demineralizuje povrch zubu. Komunitu v biofilmu nízké pH příliš nenarušuje, což z něj dělá odolnou vrstvu [36; 53].

Správnou hygienou dutiny ústní je samozřejmě možné zubní plak dočasně odstranit. Vždy se však vytvoří znovu [4].

11.1.2 Periodontitis

Periodontitis je poměrně časté zánětlivé onemocnění podpůrné tkáně zubů. Mezi příčiny zánětu patří hromadění mikrobů v dásňovém žlábků, tvorba biofilmu v podobě plaku, zubního kamene a zubního kazu. Mikroorganismy podílející se na tvorbě biofilmu v těchto místech jsou *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Candida albicans* [53].

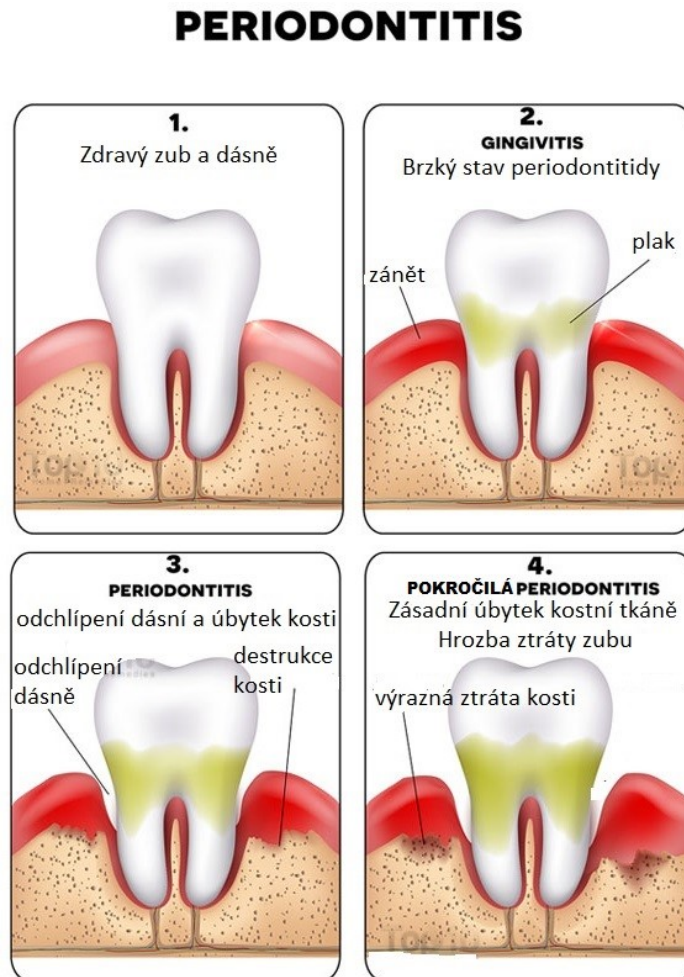
V daném místě se vytvoří primární zánět, tzv. primární léze, jež se zatím klinicky neprojevuje. Lze však pozorovat histologické změny. Primární zánět je vratný. Po odplavení imunitních buněk se tkáň vrátí do stavu homeostázy [54].

Pokud se zánět dále rozvíjí, následují rozsáhlejší reakce, při nichž dochází k infiltraci imunitních buněk, především neutrofilů, do místa léze díky signálu – interleukinu 8. Infiltrované buňky tvoří další mediátory zánětu, čímž rozvíjí nové zánětlivé procesy [54].

Neutrofilové rovněž produkují enzym metaloproteinázu sloužící primárně k degradaci intersticiálních kolagenů, která degraduje matici biofilmu. Exkrece metaloproteináz je zároveň signálem k amplifikaci její produkce. V této fázi se již zánět manifestuje bolestí a krvácením. Vzniká sekundární léze a rozvíjí se vážný zánět dásní. [54]

V poslední fázi se již jedná o chronickou stomatitidu. Vyvine se pokročilá nevratná léze, dochází ke ztrátám upevňovacích tkání zubu, opotřebení kosti, případně ke ztrátě zubů [53; 54].

Obrázek č. 16 zaznamenává vývoj onemocnění periodontitis.



Obrázek č. 16: Vývoj periodontitis

Převzato z [55] a upraveno

11.2 Chronická rhinosinusitis

Nosní a paranasální sliznice spolu tvoří anatomickou a funkční jednotku. Případný zánět proto ve většině případů postihuje obě tyto části. Tak je tomu i v případě onemocnění zvaného rhinosinusitis. [56]

Etiologie této choroby je multifaktoriální. Ke vzniku zánětu přispívají systémová

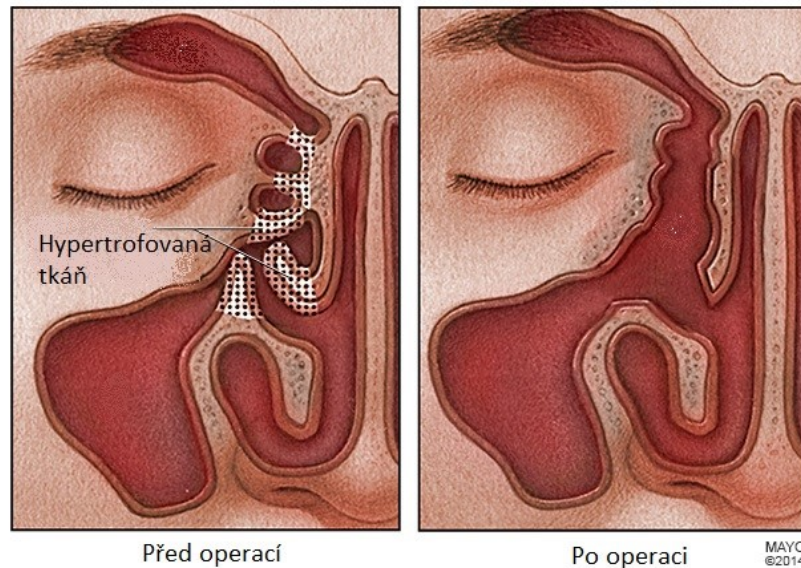
onemocnění (cystická fibróza, onemocnění vedoucí k imunodeficienci, autoimunitní procesy atd.) a lokální faktory (anatomické abnormality dutin, iatrogenní vlivy, novotvary atd.). Dalšími důvody vzniku nemoci mohou být alergie, kouření, bakteriální či plísňové infekce a v neposlední řadě přítomnost mikrobiálních biofilmů [57].

Dle studie S. Boase, A. Foremana *et al.* [58] bylo na sliznicích pacientů s rhinosinusitis prokázáno 33 různých bakteriálních druhů a 30 z 38 pacientů trpělo vícedruhovou infekcí. Nejčastěji izolovaným druhem byla bakterie *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, *Nocardia asteroides*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* a další [58].

Ve stejné studii bylo prokázáno, že stafylokoky ve smíšených biofilmech například s kvasinkou *Candida albicans* vykazují mnohem větší růst a také antimikrobiální rezistenci. To může být dáno tím, že tato bakterie a kvasinka sdílí stejné signální molekuly [58].

Vědci také na základě výsledků z různých studií předpokládají, že na formaci a patogenitu biofilmu v sinonasálních dutinách má výrazný vliv imunitní statut hostitele, tedy defekty ve složkách vrozené a získané imunity. Mechanismy vrozené imunity jsou první obranou před mikrobiálními infekcemi a narušení této složky může být spřaženo se vznikem biofilmů. Tvorba biofilmů může být spojena se sníženou produkcí antibakteriálních peptidů jako je laktoferin a MUC7 (mucinozní protein 7) v nasální sliznici a se sníženou regulací toll-like receptorů, které rozpoznávají Gram pozitivní bakterie [57].

Strategie léčby chronické rhinosinusitis asociované s biofilmy spočívá ve třech základních krocích: v antimikrobiální neutralizaci, v disperzi stávajícího biofilmu a v narušení QS signalizace. V případě výskytu anatomické abnormality se lékaři přiklání k jejímu odstranění (resekce nosní přepážky). Pokud potíže způsobuje hypertrofie tkáně, přistoupí se k jejímu oříznutí, čímž se dutiny opět zprůchodní (viz. Obrázek č. 17) [59].



Obrázek č. 17: Endoskopická operace; zprůchodnění dutin resekci hypertrofované tkáně.
Převzato z [60] a upraveno.

Patogeneze chronické rhinosinusitis asociované s biofilmy ještě vyžaduje další zkoumání. Výzkum by měl být zaměřen na větší skupiny pacientů, výsledky by se měly porovnávat se zdravými kontrolními jedinci a měly by se sledovat procesy probíhající v slizničním biofilmu [59].

11.3 Otitis media

Otitis media neboli zánět středního ucha je velmi častým zánětlivým onemocněním zejména u dětí. Obvykle postihuje Eustachovu trubici – spojnici mezi vnitřním uchem a ušním bubínkem. Projevuje se nespecificky horečkou, bolestí, případně únikem středoušního výpotku. Onemocnění obvykle po týdnu samovolně

odezní. V některých případech však přejde do chronické podoby, která může vyústit až v částečnou či úplnou ztrátu sluchu. Patogeny zodpovědné za toto infekční onemocnění jsou *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Moraxella catarrhalis*, viry chřipky typu A, rhinoviry apod. Často jsou však v biofilmu zastoupeny v kombinaci [53].

Předstupněm zánětu bývá snížená funkčnost Eustachovy trubice, která je u dětí užší a horizontálněji položená. Ta má fyziologicky zajišťovat čistotu středoušní tekutiny, ochranu středního ucha před nasofaryngeálním refluxem i případnou infekcí a vyrovnávat tlak [61].

Mukociliární systém trubice zajišťuje transport středoušní tekutiny směrem k nosohltanu. Podněty, jako jsou alergická rýma, vznik novotvaru, virové onemocnění horních cest dýchacích a další, způsobí obstrukci či zánět, a tím stázu této tekutiny [61].

U pacientů s takovou poruchou průchodnosti dýchacích cest a Eustachovy trubice vzniká biofilm snáze. Navíc, na jeho přítomnost poukazuje často neúspěšná terapie. U dětí trpících chronickou otitis media byly biofilmy objeveny na sliznici středního ucha a na povrchu membrány ušního bubínku. Zároveň byla prokázána přítomnost antimikrobiálních peptidů, jako jsou defensiny, lysozomy, laktoferiny a surfaktanty A a D, poukazující na přítomnost zánětu. Záněty středního ucha bývají díky multifaktoriální etiologii rekurentní, tedy opakující se. Patogenezi otitis media popisuje následující Schéma č. 1 [53; 61].

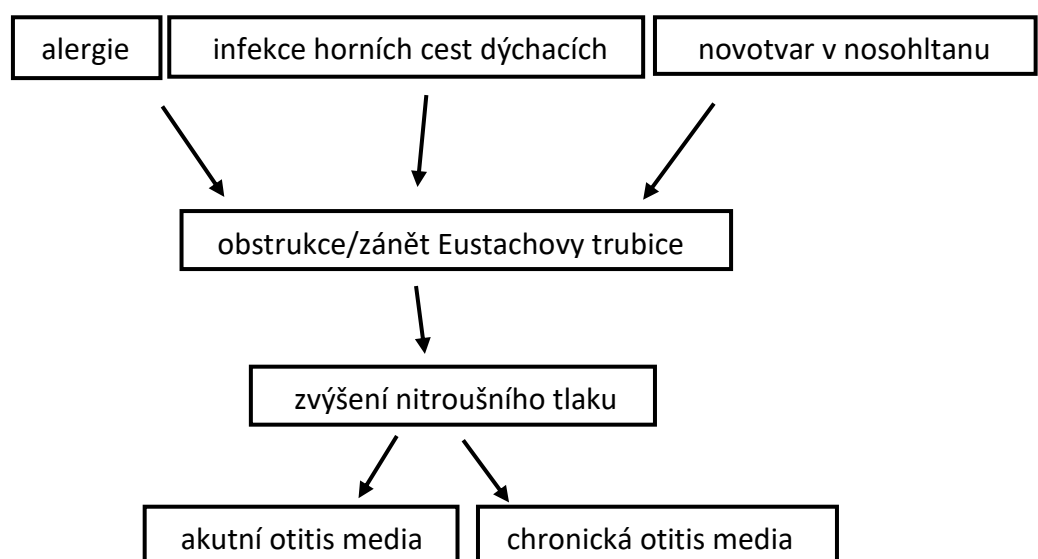


Schéma č.1: Patogeneze otitis media.

Převzato z [62] a upraveno.

Vzhledem k nesnázím, které léčbu infekcí asociovaných s biofilmy doprovází, se lékaři odvrací od předepisování antibiotik. Navrhují se laserové pulsní, elektromagnetické a ultrasonické systémy odstraňující biofilm a další typy terapie zaměřující se na dráhy pochodů v biofilmech, kterým se stručně věnuje kapitola 12 [53].

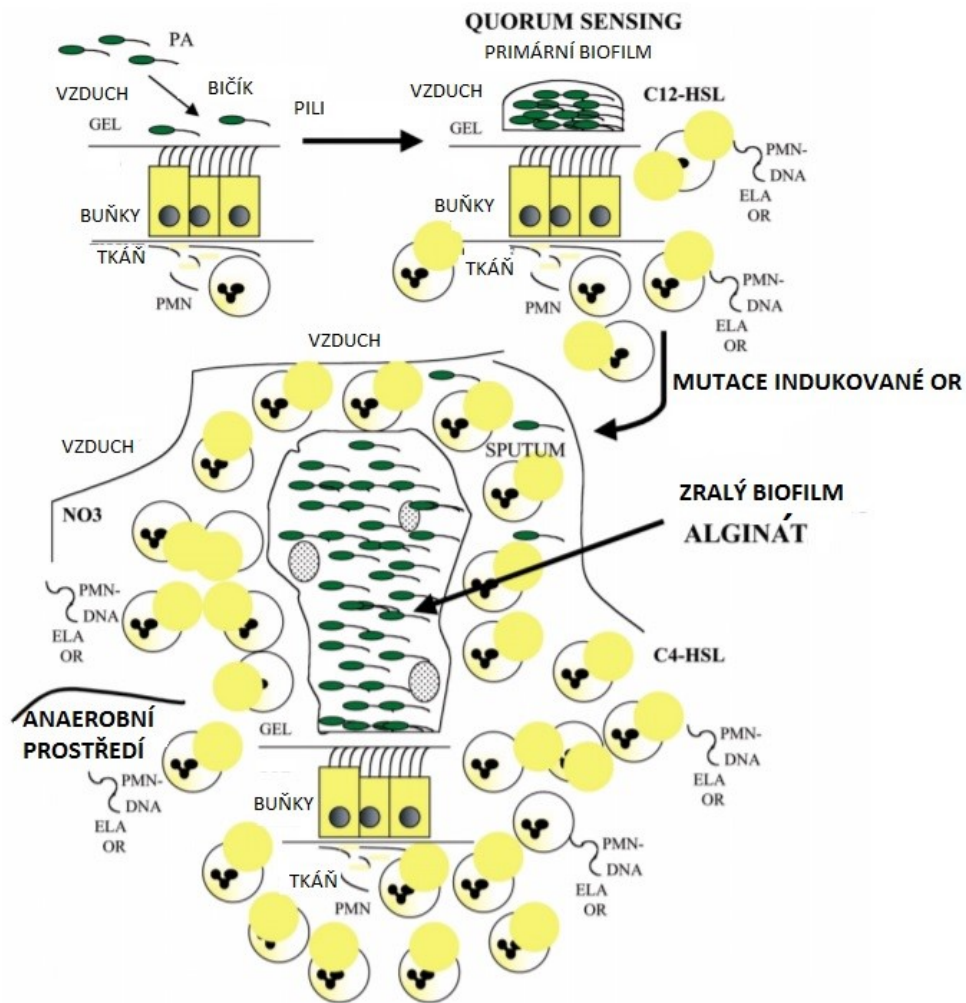
11.4 Infekce plic u pacientů s cystickou fibrózou

Cystická fibróza (CF) je autozomálně recesivní onemocnění způsobené dědičnou mutací genu CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator, transmembránový regulátor cystické fibrózy) na 7. chromozomu, jenž je zodpovědný za přítomnost specifického chloridového kanálu. Poruchou tohoto genu vznikne nedostatek chloridových kanálů, čímž je výrazně znesnadněn prostup chloridových aniontů ven z buněk. Tím je narušena osmotická rovnováha a může dojít až k dehydrataci organismu. Zároveň je, kvůli omezené přítomnosti chloridových kanálů na povrchu sliznic, ovlivněna produkce potu, složek trávicích šťáv a hlenu [53].

Brzkými symptomy této choroby je zvýšená náchylnost k plicním infekcím, vystupňovaná produkce sputa a dlouhotrvající kašel. Pacient se v pozdějším stádiu nemoci neobejde bez dýchací masky nebo ventilátoru pro mechanickou podporu dýchání [53].

Cystickou fibrózu typicky doprovází rekurentní plicní infekce způsobené zejména bakterií *Pseudomonas aeruginosa* produkující EPM s obsahem alginátu. Tyto infekce mnohdy nereagují na léčbu antibiotiky, což se připisuje přítomnosti biofilmu. Podmínky pro jeho vývoj jsou vhodné právě díky hypersekreci sliznic dýchacích cest. Proti alginátu v těle hostitele vznikají detekovatelné protilátky [63; 64].

Vývoj biofilmů tvořených bakterií *Pseudomonas aeruginosa* v bronchiolech pacienta s CF popisuje Obrázek č. 18.



Obrázek č. 18: Kroky vedoucí ke vzniku biofilmu tvořeného bakterií *Pseudomonas aeruginosa* na bronchiolech pacienta trpícího CF

Vysvětlivka: Žluté obláčky znázorňují produkty aktivovaných polymorfonukleárů (PMNs, polymorphonuclears), jmenovitě elastázu (ELA, elastase) a kyslíkové radikály (OR, oxygen radicals), které indukují mutaci u *Pseudomonas aeruginosa*, která následně vede k produkci alginátu. Autolýzí PMNs dochází k uvolňování DNA (deoxyribonucleic acid, deoxyribonuklová kyselina). Dále dochází k maturaci biofilmu s tvorbou vodních kanálků, pórů, a houbám podobných strukturám. Na této fázi se podílí především signální molekuly C4-HSL (N-butanoylhomoserine lactone, N-butanoylhomoserinlaktone). Části maturovaného biofilmu spolu s planktonickými bunkami *Pseudomonas aeruginosa* se uvolňují do okolního prostředí. Většina biofilmu je přítomna ve sputu nikoliv na povrchu epitelálních buněk respiračních cest a biofilm neobsahuje kyslík. K poškození tkání hostitele pak dochází díky zánětlivé reakci zprostředkované protilátkovou odpovědí na složky biofilmu.

Převzato z [64] a upraveno.

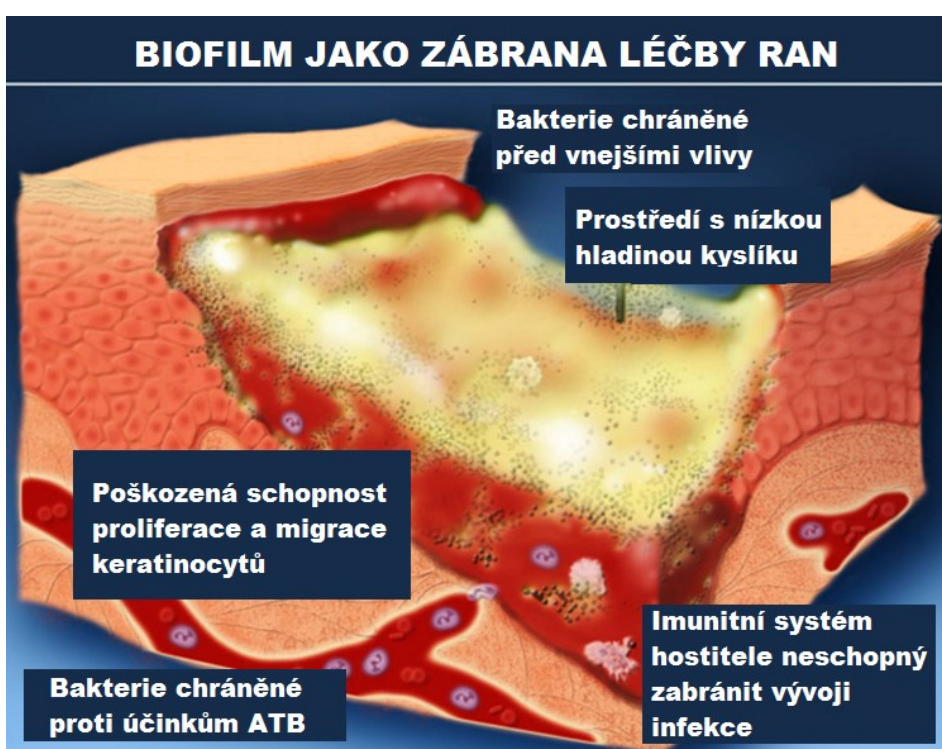
Kromě *Pseudomonas aeruginosa* byla v bronchoalveolární laváži získané od pacientů s CF detekována přítomnost dalších mikrobiálních druhů jako je *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus milleri*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *H. influenzae* a kvasinka *Candida albicans*. [53]

Co se týče terapie infekcí asociovaných s biofilmy u pacientů s CF, je jednou z terapeutických strategií profylaxe a volba agresivní antibiotické léčby v primární fázi CF, kdy se nepředpokládá vysoký stupeň vývoje biofilmu [64].

Novým cílem terapie by se mohla stát eDNA přítomná v biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*. Enzymová terapie DNAzami by mohla zastavit vývoj biofilmu v brzkém stádiu nebo mu dokonce předcházet. Zvažuje se rovněž možnost inhalace alginátových lyáz a aminoglykosidů za účelem rozpuštění alginátu [64].

11.5 Infekce ran diabetiků

Mezi chronické následky diabetu mellitu patří periferní neuropatie a nedostatečnost krevního oběhu. Obě tyto komplikace zvyšují možnost vzniku infekce v okrajových částech těla. Kvůli neuropatii si pacient často nepovšimne drobné ranky na končetině, nedostavují se ani typické projevy imunitní odpovědi a nedochází k iniciaci hojení ran kvůli nedostatečnému prokrvení. Neléčené infekce mohou ulcerovat, hnisat a vytvářet otevřené rány s nekrózami (Obrázek č. 19) – na dolních končetinách známé jako diabetická noha. Stav obvykle vyústí v nutnost amputace končetiny [53].



Obrázek 19: Biofilm utvořený v otevřené ráně.

Převzato z [65] a upraveno.

Výzkumem autorů A. Banu, M. M. N. Hassan *et al.* [66] bylo prokázáno 82 různých druhů mikrobů v ránách diabetiků. Nejčastějšími patogeny byly *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella oxytoca* a *Proteus sp.* 43 % vzorků vykazovalo přítomnost biofilmů asociovaných zejména s bakterií *Staphylococcus aureus* [66].

Další studie autorů D. Neut, E. J.A. Tijdens-Creusen *et al.* porovnávala dva

pacienty s diabetickou nohou. U obou byla pomocí konfokální laserové mikroskopie prokázána přítomnost kolonií ukotvených ve vrstvě exopolysacharidů. Hlavním činitelem biofilmů byla u obou pacientů bakterie *Staphylococcus aureus* [67].

11.6 Infekční endokarditis

Endokarditis je endovaskulární infekce vnitřní vrstvy srdce – endokardu. Onemocnění postihuje zejména srdeční chlopně a je velice vážné (20-30 % pacientů umírá) [68].

Původci infekce jsou bakterie, které se šíří krví. Patří mezi ně *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Gemella morbillorum* a další druhy, které se vyskytují primárně v ústní dutině. Dalším původcem mohou být *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus* spp [69].

Za fyziologických podmínek jsou srdeční endotel a chlopně prosté všech patogenů. Porušení endotelu (mechanické, degenerativní, zánětlivé) vede k odhalení vnitřních struktur, např. integrinů, což umožní adhezi patogenů připlavených krví z primárního stanoviště. Tím může být například ústní dutina po stomatologickém zákroku [68; 69].

Mezi projevy choroby patří horečka, dušnost, abnormality pozorované na echokardiogramu, krvácení do očních spojivek či lebky [68].

Při léčbě endokarditis se především spoléhá na mechanické operativní odstranění biofilmu z povrchu endokardu nebo na velké dávky ATB a pokud je to nutné, přistoupí se k možnosti náhrady srdeční chlopně [48; 68].

12 METODY VEDOUcí K ODSTRANĚNÍ BIOFILMŮ

Vzhledem k veliké houževnatosti biofilmů je stále velmi složité navrhnout vhodný postup k jejich úplnému a nevratnému odstranění.

V současné době jsou nejvíce zkoumány již zmíněné možnosti léčby, kdy se cílí na komunikační systém *quorum sensing* (kapitola 8). Druhým možným cílem terapie je primární adheze mikrobiálních buněk k povrchu. Pokud by se stanoviště vzniku biofilmu

upravilo tak, aby nebylo vhodné pro přisednutí prvních buněk, biofilm by se nemohl rozvíjet. Aplikace tohoto návrhu v systému *in vivo* ale prakticky není možná [6].

Protože každý mikroorganismus používá k tvorbě biofilmu jiné molekuly, není snadné navrhnout látku, která by všechny tyto různé molekuly degradovala. Terapii tedy znesnadňuje také druhová variabilita společenství. Zajímavou možností by bylo orientovat léčbu na molekuly signalizující procesy samodestrukce v biofilmu [6; 70].

Dalším případným cílem terapie mohou být exopolysacharidy matrice. Uvažuje se také o přípravě specifické protilátky proti antigenům, které biofilm vykazují. Objevují se fyzikální možnosti léčby elektromagnetickým polem, ultrazvukem či pomocí vibrací. Tyto možnosti jsou však stále ještě otázkou budoucnosti a budou vyžadovat složité a dlouhodobé výzkumy [3; 6; 70].

13 ZÁVĚR

Do této bakalářské práce byly využity informace z recentních článků pojednávajících o tématu biofilmu, jakožto aktivní vrstvě k podkladu přichycených mikroorganismů a jejich extracelulárních výměšků.

Vznik biofilmu byl popsán v několika fázích: adhezi mikroorganismů k vhodnému povrchu, dělení buněk, zrání biofilmu a odtrhávání jeho částí. Zmíněny jsou také principy regulace hustoty biofilmu pomocí systému *quorum sensing*.

V práci byla jmenována řada výhod, kterých mikroorganismy využívají za života v biofilmu. Nejvýznamnější z nich je ochrana proti antimikrobním látkám.

Biofilmy často sehrávají důležitou pozitivní roli v rozličných ekosystémech. V práci je však kladen důraz zejména na jejich negativní efekt, kdy jsou častou příčinou chronických perzistentních infekčních onemocnění. Patogeneze některých z nich je v rámci této práce stručně popsána. Patří mezi ně otitis media, endokarditis nebo infekce plic u pacientů trpících cystickou fibrózou.

Biofilmy je z důvodu odolnosti a rezistence k antibiotikům náročné nevratně odstranit. V textu jsou zmíněny nově navrhované léčebné postupy cílící na různé úrovně formace biofilmu či na procesy, které v rámci tohoto společenství probíhají.

14 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A SCHÉMAT

Obrázek č. 1: Znázornění obranných mechanismů ve společenství biofilmu.	13
Obrázek č. 2: Biofilm vytvořený na vnitřním povrchu vodovodního potrubí.	15
Obrázek č. 3: Schéma architektury biofilmu.	21
Obrázek č. 4: Struktura biofilmu.	22
Obrázek č. 5: Časová dislokace primárních kolonizátorů v orálním biofilmu dle studie autorů Hopeho a Wilsona.	23
Obrázek č. 6: Biofilm tvořený bakterií <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
Obrázek č. 7: Polymikrobiální biofilm (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Flavobacterium</i> spp.).	25
Obrázek č. 8: Koncentrace nutrientů v biofilmu.	25
Obrázek 9: Schéma gradientu kyslíku v biofilmu.	26
Obrázek č. 10: Mikroskopická studie kroků vedoucích ke vzniku biofilmu bakterie <i>Vibrio cholerae</i>	27
Obrázek 11: Vznik biofilmu bakterií <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> a <i>Vibrio Cholerae</i>	30
Obrázek č. 12: Mechanismy disperze biofilmu.	31
Obrázek č. 13: Vznik a struktura biofilmu – souhrn.	32
Obrázek 14: Schéma tří základních kroků procesu regulace pomocí QS.	34
Obrázek č. 15: Infekce spojené s biofilmy.	42
Obrázek č. 16: Vývoj periodontitis.	44
Obrázek č. 17: Endoskopická operace; zprůchodnění dutin resekci hypertrofované tkáně.	46
Obrázek č. 18: Kroky vedoucí ke vzniku biofilmu tvořeného bakterií <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na bronchiolách pacienta trpícího CF.	49
Obrázek 19: Biofilm utvořený v otevřené ráně.	51
Tabulka č. 1: Prostředí vzniku biofilmu.	16
Tabulka č. 2: Přehled některých EPS charakteristických pro biofilm daného druhu mikroorganismu.	18
Tabulka č.3: Složení extracelulární polymerní matrice.	19
Tabulka 4: Tekoucí média ovlivňující adhezi buněk k tkáním hostitele.	28
Tabulka 5: Příklady signálních molekul typických pro různé skupiny bakterií.	35
Tabulka 6: Příklady bakteriálních a eukaryotických druhů produkujících „quorum quenching“ enzymy.	37
Tabulka č. 7: S biofilmy spojované infekce a jejich původci.	41
Schéma č.1: Patogeneze otitis media.	47

15 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- 1) Mercedes Berlanga, Ricardo Guerrero. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb Cell Fact.*, 2016, 15(1):165. *BioMed Central* [online]. 2016 [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0569-5>
- 2) Lhotský, J.: Úvod do studia symbiotických interakcí mikroorganismů, nový pohled na viry a bakterie, 2015. První vydání. Praha: nakladatelství Academia, 207 s., ISBN 978-80-200-2480-0, s. 112.
- 3) Schindler, J.: Ze života bakterií, 2008. První vydání. Praha: nakladatelství Academia, 143 s., ISBN 978-80-200-1666-9, s. 61-69.
- 4) Schindler, J.: Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů, 2010. První vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 224+24 s., ISBN 978-80-247-3170-4, s. 27-31.
- 5) Rulík, M., Holá, V., Ružička, F., Votava, M. a kolektiv: Mikrobiální biofilmy, 2011. První vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 447 s., ISBN 978-80-244-2747-8.
- 6) Hwang-Soo Joo, Michael Otto. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem Biol.*, 2012, 19(12):1503-13. *Pubmed.gov* [online]. 2012 [cit. 2017-02-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3530155/>
- 7) Saha Kirmusaoglu. Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms. 2016. ISBN 978-953-51-5435-1. *Intechopen* [online]. 2016 [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/microbial-biofilms-importance-and-applications/staphylococcal-biofilms-pathogenicity-mechanism-and-regulation-of-biofilm-formation-by-quorum-sensin>
- 8) Paula Watnick, Roberto Kolter. Biofilm, City of Microbes. *J. Bacteriol.*, 2000, 182(10):2675-9. *Pubmed.gov* [online]. 2000 [cit. 2017-02-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781532>
- 9) Hans-Curt Flemming. Why Microorganisms Live in Biofilms and the Problem of Biofouling. *Springer Series on Biofilms*, 10.1007/7142_2008_13. [online]. 2008 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/314422011_Why_Microorganisms_Live_in_Biofilms_and_the_Problem_of_Biofouling
- 10) Kimberly K. Jefferson. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Jul 15;236(2):163-73. *Pubmed.gov* [online]. 2004 [cit. 2017-02-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251193>
- 11) Niels Høiby. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathog Dis.* 2014 Apr;70(3):205-11 *PubMed* [online]. 2014 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24585728>

- 12) Muhsin Jamal, Ufaq Tasneem, Tahir Hussain, Saadia Andleeb. Bacterial Biofilm: Its composition, formation and role in human infections. *Research&Reviews* 131.69 [online]. 2015 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <https://www.rroij.com/open-access/bacterial-biofilm-its-composition-formation-and-role-in-human-infections.php?aid=61426>
- 13) Lei Yan, Shuang Zhang, Peng Chen, Hetao Liu, Huanhuan Yin a Hongyu Li. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application. *Microbiol Res*. 2012 Oct 12;167(9):507-19. *Sciencedirect.com* [online]. 2012 [cit. 2017-02-10]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131200047X>
- 14) Katherine E. Fish, A. Mark Osborn, Joby Boxall. Characterising and understanding the impact of microbial biofilms and the extracellular polymeric substance (EPS) matrix in drinking water distribution systems. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.*, 2016,2, 614-630. *Royal society of chemistry* [online]. 2016 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ew/c6ew00039h>
- 15) Rodney M. Donlan. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002 Sep;8(9):881-90. *Pubmed.gov* [online]. 2002 [cit. 2017-02-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2732559/>
- 16) Trevor Roger Garretta, Manmohan Bhakoob, Zhibing Zhanga. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Science direct* [online]. 2008 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1002007108002049>
- 17) Ian W Sutherland. The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*. 2001 May;9(5):222-7. *PubMed* [online]. 2001 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11336839>
- 18) Mohamed O. Elasri Robert, V. Miller. Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation. *Appl Environ Microbiol*. 1999 May;65(5):2025-31. [online]. 1999 [cit. 2017-02-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10223995>
- 19) M. V. Zhurina, A.,V. Gannesen E., L. Zdrovenko V., K. Plakunov. Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms. *Microbiology* (2014) 83: 713. *SpringerLink* [online]. 2014 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1134%2FS002626171406023X>
- 20) Pierre Lembre, Cécile Lorentz, Patrick Di Martino. Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World. *The complex world of polysaccharides*. ISBN 978-953-51-0819-1, 648 s., InTech, *Intechopen* [online]. 2012 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of->

[polysaccharides/exopolysaccharides-of-the-biofilm-matrix-a-complex-biophysical-world](#)

- 21) Nitai Steinberg, Ilana Kolodkin-Ga. The Matrix Reloaded: How Sensing the Extracellular Matrix Synchronizes Bacterial Communities. *J Bacteriol.* 2015 Jul; 197(13): 2092–2103. *PubMed* [online]. 2015 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4455261/>
- 22) Peter Gacesa. Bacterial progress alginate biosynthesis-recent and future prospects. *Microbiology.* 1998 May;144 (Pt 5):1133-43. Microbiology society [online]. [cit. 2017-02-14]. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-144-5-1133#tab2>
- 23) Ahed J Alkhatib, Mustafa A Al-Shehabat. Bacterial biofilms: Understanding structures and roles. *Ind Res J Pharm & Sci.* 2015: Dec.: 2 (4) *Research Gate* [online]. [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/285164528_fig1_Figure-2-Heterogeneous-structure-of-biofilm-which-includes-cell-cluster-void
- 24) C. K. Hope, M. Wilson. Cell viability within oral biofilms. *Chris K Hope*, Sep 19, 2014 [online]. 2003 [cit. 2017-02-16]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/38229153_Cell_viability_within_oral_biofilms
- 25) RSG Luxembourg. From single organism to community modeling. *SlideShare* [online]. 2017 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <http://ausubellab.mgh.harvard.edu/picturehtml/pic20.html>
- 26) Madhu Sharma Aparna Pt.B.D.; Sarita Yadav. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis.* 2008 Dec;12(6):526-30. *Scielo* [online]. 2008 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702008000600016
- 27) W. K. Kwok, C. Picioreanu, S. L. Ong, M. C. M. van Loosdrecht, W. J. Ng, J. J. Heijnen. Influence of Biomass Production and Detachment Forces on Biofilm Structures in a Biofilm Airlift Suspension Reactor *Biotechnol Bioeng.* 1998 May 20;58(4):400-7. [online]. 1998 [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980520\)58:4%3C400::AID-BIT7%3E3.0.CO;2-N/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0290(19980520)58:4%3C400::AID-BIT7%3E3.0.CO;2-N/abstract)
- 28) J. William Costerton, Zbigniew Lewandowski. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-45. *Pubmed.com* [online]. 1995 [cit. 2017-02-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8561477>

- 29) Guillaume Lambert, Luis Estévez-Salmeron, Steve Oh, David Liao, Beverly M. Emerson, Thea D. Tlsty, R. An analogy between the evolution of drug resistance in bacterial communities and malignant tissues: Figure 2 | Changes in microenvironments. *Nat Rev Cancer*. 2011 May; 11(5): 375–382. *Nature Reviews* [online]. 2011 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: http://www.nature.com/nrc/journal/v11/n5/fig_tab/nrc3039_F2.html
- 30) Courtesy, P. Stoodley, D. deBeer, Z. Lewandowski & F. Roe. Biofilm strategies: Gradients and niches. *Montana state university* [online]. [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics/biofilm_strategies_gradients_and_niches.html
- 31) Berne C, Ducret A, Hardy GG, Brun YV. Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiol Spectr*. 2015 Aug;3(4). doi: 10.1128/microbiolspec. MB-0018-2015. *PubMed* [online]. 2015 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26350310>
- 32) Mary Ellen Davey, George A. O’Toole: Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000 Dec;64(4):847-67. [online]. 2000 [cit. 2017-02-12]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11104821>
- 33) Luanne Hall-Stoodley, Paul Stoodley. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol*. 2005 Jan;13(1):7-10. *Research Gate* [online]. 2005 [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/8090937_Biofilm_formation_and_dispersal_and_the_transmission_of_human_pathogens
- 34) Y. Liu, J.-H. Tay. Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *J Appl Microbiol*. 2001 Mar;90(3):337-42. [online]. 2000 [cit. 2017-03-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298227>
- 35) Stephanie Freese. Formation of a biofilm is analogous to the development of a multicellular organism, with intercellular signals regulating growth and differentiation. [online]. [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: http://www.americanscientist.org/include/popup_fullImage.aspx?key=b/noR037T6c7Mp6leUBWWsAEibFxceGx
- 36) Jiunn C. N. Fong, Khalid A. Syed, Karl E. Klose, Fitnat H. Yildiz. Role of *Vibrio* polysaccharide (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology*. 2010 Sep;156(Pt 9):2757-69 [online]. 2010 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3068689/>

- 37) Podbielski, Kreikemeyer B. Cell density dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int J Infect Dis*. 2004 Mar;8(2):81-95. *PubMed* [online]. 2003 [cit. 2017-03-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732326>
- 38) Jeremy M. Yarwood, Patrick M. Schlievert. Quorum sensing in Staphylococcus infections. *J Clin Invest*. 2003 Dec 1; 112(11): 1620–1625. *PubMed* [online]. 2003 [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14660735>
- 39) Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 1;97(16):8789-93. *PubMed* [online]. 2000 [cit. 2017-03-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10922036>
- 40) Leadbetter JR, Greenberg EP. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol*. 2000 Dec;182(24):6921-6. *PubMed* [online]. 2000 [cit. 2017-03-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11092851>
- 41) Li YH, Lau PC, Tang N, Svensäter G, Ellen RP, Cvitkovitch DG. Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2002 Nov;184(22):6333-42. [online]. 2002 [cit. 2017-03-16]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399503>
- 42) Yi-Hu Dong, Lian-Hui Zhang. Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. *J Microbiol*. 2005 Feb;43 Spec No:101-9. *ResearchGate* [online]. 2005 [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/7969639_Quorum_sensing_and_quorum-queenching_enzymes
- 43) Yi-Hu Dong , Lian-Hui Wang, Lian-Hui Zhang. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007 Jul 29; 362(1483): 1201–1211. [online]. 2007 [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2435583/>
- 44) D.M. Livermore. The need for new antibiotics. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Nov;10 Suppl 4:1-9. *PubMed* [online]. 2004 [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15522034>
- 45) P. Gilbert, D.G. Allison and A.J. McBain. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Symp Ser Soc Appl Microbiol*. 2002;(31):98S-110S. [online]. 2002 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.5.x/pdf>

- 46) Ilse Vandecandelaere , Filip Van Nieuwerburgh , Dieter Deforce , Tom Coenye. Metabolic activity, urease production, antibiotic resistance and virulence in dual species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2017 Mar 6;12(3): e0172700. *eCollection* 2017. *PubMed* [online]. 2017 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28263995>
- 47) Alexei Brooun, Songhua Liu, Kim Lewis. A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Mar;44(3):640-6. *PubMed* [online]. 2000 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89739/>
- 48) David Lebeaux, Jean-Marc Ghigo, Christophe Beloin. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014 Sep;78(3):510-43 [online]. 2014 [cit. 2017-02-09]. Dostupné z: <http://mmb.asm.org/content/78/3/510.full>
- 49) Nathalie Q. Balaban Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science*. 2004 Sep 10;305(5690):1622-5. Epub 2004 Aug 12. [online]. 2004 [cit. 2017-03-31]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308767>
- 50) Doblin Sandai, Yasser M Tabana, Ahmad El Ouweini, and Ishola Oluwaseun Ayodeji. Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Drugs and the Host Immune System. *Jundishapur J Microbiol*. 2016 Nov; 9(11): e37385. *PubMed* [online]. 2016 [cit. 2017-03-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28138373>
- 51) Jílek, P.: *Základy imunologie*, 2008. Druhé přepracované vydání. Praha: Anyway s.r.o., 80 s., ISBN 978-80-254-2422-3, s. 60-61
- 52) J. W. Costerton, Philip S. Stewart, E. P. Greenber. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999 May 21;284(5418):1318-22. *PubMed* [online]. 1999 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334980>
- 53) Brian M. Peters, Mary Ann Jabra-Rizk, Graeme A. O'May, J. William Costerton and Mark E. Shirtliff. Polymicrobial Interactions: Impact on Pathogenesis and Human Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Jan;25(1):193-213. doi: 10.1128/CMR.00013-11. [online]. 2012 [cit. 2017-02-09]. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/content/25/1/193.long>
- 54) Ali Cekici, Alpdogan Kantarci, Hatice Hasturk, Thomas E. Van Dyke. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol*

2000. 2014 Feb;64(1):57-80. [online]. 2014 [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4500791/>
- 55) Home Remedies for Periodontitis [online]. [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <http://www.top10homeremedies.com/home-remedies/home-remedies-periodontitis-pyorrhoea.html>
- 56) Rhinosinusitis [online]. [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <http://telemedicina.med.muni.cz/pdm/detska-ori/index.php?pg=Nos--choroby-dutiny-nosni-a-pnd--rhinosinusitis>
- 57) Judd H. Fastenberg, Wayne D. Hsueh, Ali Mustafa, Nadeem A. Akbar, Waleed M. Abuzeid. Biofilms in chronic rhinosinusitis: Pathophysiology and therapeutic strategies. *World journal of otorhinolarygology*. 2017 Mar. [online]. 2016 [cit. 2017-04-11]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S209588111630004X>
- 58) Sam Boase, Andrew Foreman, Edward Cleland, Lorwai Tan, Rachel Melton-Kreft, Harshita Pant, Fen Z Hu. The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection. *BMC Infect Dis*. 2013 May 8;13:210 [online]. 2013 [cit. 2017-04-11]. Dostupné z: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-13-210>
- 59) Jan Rottenberg. Diagnostika a léčba chronické rhinosinusitis *Klin Farmakol Farm*. 2006; 20: 83–86 [online]. 2006 [cit. 2017-04-11]. Dostupné z: <http://www.solen.cz/artkey/far-200602-0006.php>
- 60) Mayo Clinic Staff. Chronic sinusitis. *Mayo Clinic* [online]. 2016 [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/chronic-sinusitis/diagnosis-treatment/treatment/txc-20211202>
- 61) James Mark Coticchia, Michael Chen, Livjot Sachdeva, Sean Mutchnick. New paradigms in the pathogenesis of otitis media in children. *Front Pediatr*. 2013; 1: 52 *PubMed* [online]. 2013 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3874850/>
- 62) Acute Otitis Media-pathophysiology, symptoms, management, nursing management. *Journal Published: July 20, 2014* [online]. 2014 [cot. 2017-04-12]. Dostupné z: <http://www.nsgmed.com/ent-ear-nose-throat/acute-otitis-media-pathophysiology-symptoms-management-nursing-management/>
- 63) Sophie Moreau-Marquisa, Bruce A. Stanton, George A. O'Toole. Pseudomonas aeruginosa biofilm formation in the cystic fibrosis airway: A short review. *Pulm*

- Pharmacol Ther.* 2008 Aug; 21(4): 595–599. *PubMed* [online]. 2008 [cit. 2017-04-12].
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2542406/>
- 64) Niels Høiby. Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *Journal of cystic fibrosis. J Cyst Fibros.* 1 (4), 249-254. 12 2002 [online]. 2002 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: [http://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569-1993\(02\)00104-2/abstract](http://www.cysticfibrosisjournal.com/article/S1569-1993(02)00104-2/abstract)
- 65) How is the skin healing process affected in chronic wounds?: Figure 1. Biofilm barrier to wound healing. *Montana university* [online]. [cit. 2017-05-06]. Dostupné z: <https://www.cs.montana.edu/webworks/projects/stevesbook/contents/chapters/chafter004/section004/blue/page001.html>
- 66) Asima Banu, Mir Mohammad Noorul Hassan, Janani Rajkumar, Sathyabheemarao Srinivasa. Spectrum of bacteria associated with diabetic foot ulcer and biofilm formation: A prospective study. *Australas Med J.* 2015; 8(9): 280–285. *PubMed* [online]. 2015 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4592943/>
- 67) Daniëlle Neut, Elvira JA Tijdens-Creusen², Sjoerd K Bulstra², Henny C van der Mei, Henk J Busscher. Biofilms in chronic diabetic foot ulcers—a study of 2 cases. *Acta Orthop.* 2011 Jun; 82(3): 383–385. [online]. 2011 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3235322/>
- 68) Infekční endokarditida. *IKEM.cz* [online]. [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/cs/infekcni-endokarditida/a-433/>
- 69) Habib G, Hoen B, Tornos P, et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis: The Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2009 Oct;30(19):2369-413 [online]. 2009 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19713420>
- 70) KIM LEWIS. Riddle of Biofilm Resistance: MINIREVIEW. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Apr;45(4):999-1007. [online]. 2001 [cit. 2017-04-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257008>