

Bakterijski biofilmovi - stanična komunikacija

Zorc, Branka

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2019, 75, 387 - 394**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:694785>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Bakterijski biofilmovi – stanična komunikacija

BRANKA ZORC

Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavodu za farmaceutsku kemiju, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb

Prema statistikama Svjetske zdravstvene organizacije infektivne bolesti su izravni uzrok smrti nekoliko milijuna ljudi godišnje. Od infekcija donjih dišnih putova umrlo je 2016. 3 milijuna, od infekcija probavnog sustava 1,4 milijuna, a od tuberkuloze 1,3 milijuna ljudi (1). Mortalitet od infektivnih bolesti u stalnom je porastu pa se očekuje da će za tridesetak godina nadmašiti mortalitet od karcinoma i kardiovaskularnih bolesti (1). Glavni uzrok velikog mortaliteta je razvoj rezistencije na postojeće antimikrobne lijekove i sposobnost bakterija da tvore biofilm. Naime, bakterije mogu postojati u dvije životne forme: kao samostalni organizmi i u sklopu biofilma. Smatra se da je stvaranje biofilma strategija kojom bakterije povećavaju preživljavanje u gostujućem okruženju. U biofilmu je prisutna gusta heterogena populacija bakterija s različitim stopom rasta (uključujući dormantne bakterije), obavijena zaštitnim ekstracelularnim matriksom (*extracellular matrix*, ESM) ili biopolimernim matriksom (*biopolymer matrix*, BPM) (2). Matriks potiče prianjanje bakterija na površinu, međusobno povezivanje stanica i njihovu agregaciju, a služi kao 3D sustav koji im osigurava mehaničku stabilnost i zaštitu (3). Matriks sadrži ekstracelularnu DNA (eDNA), polisaharide, lipide i biosurfaktante. Sastav i struktura matriksa varira ovisno o vrsti mikroorganizma, dostupnom supstratu i okruženju unutar domaćina. Bakterije same proizvode polimerni matriks, ali za njegovu izgradnju koriste i materijal nastao liziranjem stanica obrambenog sustava domaćina.

Biofilm se najčešće stvara na kateterima, elektrostimulatorima srca (*pace-maker*), umjetnim srčanim zaliscima, stentovima, umjetnim zglobovima i drugim implantatima. U formaciji biofilma bakterije mogu preživjeti u nepovoljnijim uvjetima: otpornije su na obranu imunološkog sustava domaćina i djelovanje antimikrobnih lijekova (2). U biofilmu bakterije mogu tolerirati čak 1000 puta

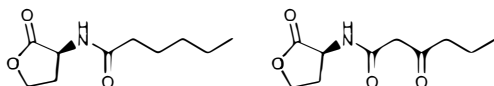
veće doze antimikrobnih lijekova, prvenstveno zbog usporenih metaboličkih reakcija i sastava ekstracelularnog matriksa koji ih obavlja (4).

Cistična fibroza je klasični primjer bolesti povezane s kroničnom infekcijom koju najčešće uzrokuju Gram-negativne bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. U formaciji biofilma te bakterije odolijevaju djelovanju antibiotika i opstaju godinama. Međutim, tretman antibioticima sprječava širenje infekcije, usporava destrukciju pluća i produljuje životni vijek pacijenta (4).

Stvaranje biofilma nije samo zdravstveni već i ozbiljan industrijski problem (5). Zbog toga su u tijeku intenzivna istraživanja u potrazi za agensima/lijekovima koji sprječavaju stvaranje biofilma ili koji potpomažu disperziju već stvorenih biofilмова.

Tek je prije tridesetak godina otkriveno da jednostanični organizmi mogu međusobno komunicirati (4). Ta komunikacija naziva se stanična komunikacija (*quorum sensing*, QS) (2). Poznato je da rastuća populacija bakterija oslobađa kemijske signale koji se zovu autoinduktori (*autoinducers*, AIS). Patogene bakterije koriste QS komunikaciju za ekspresiju virulentnih gena koja je povezana s gustoćom stanica. Kako su virulentni faktori jaki antigeni, njihovo odgođeno oslobađanje do postizanja velike gustoće bakterija, presudno je za preživljavanje bakterija jer ih imunološki sustav ne primijeti na vrijeme, odnosno primijeti ih tek kada su se bakterije jako razmnožile (4).

Smatra se da je stanična komunikacija vrlo bitna za stvaranje biofilma i ekspresiju gena odgovornih za virulenciju. I Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije koriste staničnu komunikaciju za koordinaciju, iako različite vrste bakterija koriste različite signalne molekule, receptore i transdukcijske putove (2). U Gram-negativnim bakterijama *N*-acil-L-homoserin laktoni (AHL) posreduju u staničnoj komunikaciji, tj. služe kao autoinduktori. U njima je homoserin lakton (HSL) amidno povezan s masnim kiselinama različite duljine i oksidacijskog stanja. Homoserin lakton je konzerviran, dok kiselinski bočni ogranak varira u različitim bakterijskim vrsta (4). Dva takva induktora s kiselinama sa 6 atoma ugljika (C6-HSL) prikazani su na slici 1. U prvom je L-homoserin lakton amidno povezan s heksanskom (kapronskom) kiselinom, a u drugom s beta-ketoheksanskom (β -ketokapronskom) kiselinom. Produljenjem ugljikovodičnog lanca u kiselinskom dijelu molekule na C10 do C14, nastaju spojevi koji više nisu induktori, već suprotno, inhibitori stanične komunikacije.



Slika 1. ◀ C-6 L-homoserin laktoni – autoinduktori u staničnoj komunikaciji.

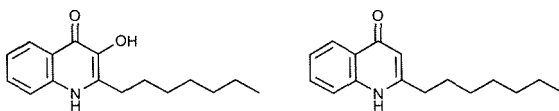
AHL-posredovana stanična komunikacija najviše je proučavan QS sustav. Uključuje dva proteinska sustava, LuxI i LuxR, od kojih je prvi bitan za produkciju, a drugi za vezanje AIs na receptore. Zbog toga se LuxI još naziva AHL sintetaza, a LuxR AHL receptor i transkripcijski aktivator. Koncentracija AIs raste s gustoćom populacije bakterije – kada se postigne kritična koncentracija, signalne molekule se vežu na LuxR proteine. Nastali AI-LuxR kompleks aktivira transkripciju gena odgovornu za nastanak različitih fenotipova bakterija, patogenezu i produkciju virulentnih faktora, pokretljivost bakterija i nastanak biofilma.

Inhibicija stanične komunikacije je atraktivna meta u borbi protiv stvaranja biofilma. Inhibitori stanične komunikacije (*quorum sense inhibitors*, QSIs) sprječavaju stvaranje biofilma ili ga čine osjetljivijim na imunološki sustav domaćina i konvencionalne antimikrobne lijekove pa na taj način mogu smanjiti doziranje lijekova i skratiti trajanje terapije (2). Inhibicija stanične komunikacije može nastupiti zbog inhibicije sinteze signalnih molekula, razgradnje signalnih molekula ili zbog blokiranja receptora na koje se vežu signalne molekule. Razgradnja signalnih molekula naziva se gašenje komunikacije, a spojevi koji ih gasite lji komunikacije (*quorum quenchers*, QQ).

U bakterija *Chromobacterium violaceum* stanična komunikacija povezana je s produkcijom ljubičastog pigmenta violaceina. Zbog toga se upravo ta bakterija koristi u biološkim istraživanjima kao pokazivač postojanja komunikacije (*reporter bacteria*). Ako je u prisutnosti ispitivanog spoja prekinuta stanična komunikacija, sinteza violaceina je onemogućena. Kao pravi inhibitori stanične komunikacije smatraju se samo spojevi koji sprječavaju produkciju violaceina bez utjecaja na rast i razmnožavanje bakterija. Da bi se razlikovalo da li se uistinu radi o inhibiciji stanične komunikacije ili možda samo o gašenju komunikacije, paralelno se provode pokusi na dva soja *C. violaceum* – divljem soju i mutiranom soju, koji može sintetizirati violacein samo u prisutnosti egzogenog AHL. Ako ispitivani spoj zaustavlja samo sintezu violaceina u mutiranom soju (naravno, uz dodatak AHL), smatra se da je gasitelj stanične komunikacije, a ne inhibitor (2).

Stanična komunikacija najviše je proučavana na bakteriji *P. aeruginosa*, najčešće na soju PAO1-*lasB**gfp* koji izlučuje zeleni fluorescentni protein (*green fluorescence protein*, GFP) samo ako je komunikacija uspostavljena (6). Uz dva AHL sustava stanične komunikacije, *P. aeruginosa* ima i treći, tzv. kinolonski sustav, koji koristi 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon (*Pseudomonas* kinolonski signal, PQS) i njegov prekursor 2-heptil-4-hidroksikinolin (HHQ) (slika 2.) (4). Taj sustav djeluje kao regulatorna veza između dva AHL sustava, a sam je reguliran od strane AHL sustava (LasR i RhIR). Osim toga, on autoinducira vlastitu produkciju

preko interakcije s transkripcijskim regulatorom PqsR i modulira ekspresiju nekoliko gena važnih za virulenciju (6). Metilantranilat i halogenirani derivati antranilne kiseline (2-aminobenzojeve kiseline) najpoznatiji su inhibitori PQS sustava. Dokazano je da ti spojevi onemogućavaju sintezu HHQ i PQS te produljuju preživljavanje miševa inficiranih s *P. aeruginosa* (4).



Slika 2. ◀ Kinolonska signalna molekula 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon (*Pseudomonas* kinolonski signal, PQS) i njegov prekursor 2-heptil-4-hidroksi-kinolin (HHQ).

U potrazi za inhibitorima stanične komunikacije pretražuju se cijele biblioteke prirodnih i sintetskih spojeva te lijekovi koji se koriste u suvremenoj terapiji, bez obzira na terapijsku skupinu. Tako je otkriveno da salicilna kiselina, niklozamid, nifuroksazid, azitromicin, ciprofloksacin, ceftazidim djeluju kao inhibitori stanične komunikacije (4). Za antimikrobne lijekove azitromicin, ciprofloksacin i ceftazidim dokazano je da sprječavaju ekspresiju nekoliko virulentih faktora reguliranih pomoću QS, npr. ramnolipida, elastaze, kitinaze, proteaze (7).

Otkriveno je da različiti prirodni spojevi koče staničnu komunikaciju: cinnamaldehyd (različite *Cinnamomum* vrste), iberin (iz hrena *Armoracia rusticana*), ajoen (iz bijelog luka *Allium cepa*), ružmarinska kiselina (iz ružmarina *Rosmarinus officinalis* i srodnih biljaka), ginseng (*Panax ginseng*), floretin (iz lišća jabuka, rod *Malus*) te široko rasprostranjeni flavonoidi (kamferol, hesperidin, neohesperidin, naringenin, eriodiktiol, taksifolin, katehin, epikatehin te kvercetin, koji se koristi kao pozitivna kontrola u evaluaciji potencijalnih QSI) (2, 4, 8). Halogenirani furanoni iz morske alge *Delisea pulchra* najviše su proučavani QSI, a ekstrakt bijelog luka je čak klinički ispitan na pacijentima s cističnom fibrozom, ali nije pokazao značajni učinak (4). Ionske tekućine (npr. 1-alkilkinolinij-bromid) pokazuju široki spektar antimikrobnog djelovanja i sprječavaju stvaranje biofilma (9), dok kationski peptidi (pozitivno nabijeni peptidi koji sadrže lizin i arginin), npr. LL-37 kojeg izlučuju humane epitelne stanice značajno smanjuje sposobnost prihvatanja *P. aeruginosa* na površinu (10). Nadalje, aminokiseline D-konfiguracije inhibiraju stvaranje biofilma u *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa* i *Streptococcus aureus* (11), a galaktan, polisaharid Gram-negativne bakterije *Klebsiella kingae*, sprječava stvaranje vlastitog biofilma i biofilma drugih bakterija (12). U miješanim bakterijskim zajednicama mnogi mikroorganizmi izlučuju antagoniste signalnih molekula, površinski-aktivne tvari i enzime koji moduliraju

bakterijsku interakciju, a ne djeluju antibiotski. Tako *Bacillus* sp. soj SW9, bakterija koja sama ne tvori biofilm, u izravnom kontaktu s drugim bakterijama sprječava njihov prelazak u biofilm (13).

Kao potencijalni inhibitori stanične komunikacije ispitani su i različiti sintetski spojevi, prije svega analozi *N*-acil homoserin laktona (14–18) i slobodne masne kiseline (prisutne na površini kože, bitne za sprječavanje kožnih infekcija (19)). Mnogi od njih pokazuju jači ili slabiji učinak. Jakim inhibitorima smatraju se spojevi koji onemogućavaju staničnu komunikaciju više od 90 %, a ako je učinak ispod 40 % spoj se smatra neaktivnim. Za najaktivnije spojeve mjeri se učinak na sazrijevanje biofilma (prelazak iz mikrokolonija u potpuno formirani biofilm). Provode se i kvantitativna mjerenja – mjeri se smanjenje mase biofilma i smanjenje pokretljivosti i sposobnosti nakupljanja (*swimming and swarming inhibition*). Naime, pokretljivost bakterija vrlo je bitna za prihvaćanje bakterija na podlogu u ranoj fazi nastajanja biofilma i za sazrijevanje biofilma. Istražuje se spektar djelovanja na različite bakterijske vrste, količina ekstracelularnog polimera i koncentracija staničnog c-di-GMP (ciklički dinukleotid koji u mnogih bakterija regulira nastajanje biofilma) (3). Za ispitivanje djelotvornosti *in vivo*, koriste se implantati obloženi biofilmom (*mouse implant-biofilm infection experiment*) (6).

Inhibicija stanične komunikacije samo je jedan od mogućih pristupa u borbi protiv stvaranja biofilma. Ciljni supstrat može biti i ekstracelularni matriks. Na sastav i funkciju matriksa može se djelovati na više načina: može se inhibirati njegovu produkciju, smanjiti adhezivnost ili povećati njegovu razgradnju. Spojevi koji dispergiraju već nastale biofile također su vrlo interesantni jer je terapijska intervencija potrebna kada je biofilm već stvoren. Takav dispergirajući učinak imaju donori dušikovog(II) oksida jer NO posreduje prijelaz bakterija iz biofilma u planktonski oblik (20). Istražuju se i druge mogućnosti: oblaganje površine implantata spojevima koji inhibiraju/usporavaju stvaranje biofilma ili antimikrobnim lijekovima te uklanjanje biofilma mehaničkim putem (3).

Iako zadnjih petnaestak godina u literaturi nalazimo na eksplozivni porast spojeva koji moduliraju stvaranje ili disperziju biofilma, do danas nije registriran niti jedan lijek s takvim učinkom. No, nekoliko kandidata nalazi se u kliničkim ispitivanjima pa uskoro možemo očekivati pojavu prvih lijekova na tržištu (3). Ti lijekovi ne bi izravno utjecali na opstanak bakterija pa se na njih očekuje i sporiji razvoj rezistencije. Moguće je da će se u budućnosti infekcije vezane uz stvaranje biofilma tretirati kombinacijom inhibitora stanične komunikacije i konvencionalnih antimikrobnih lijekova (4).



Bacterial biofilms – cellular communication

B. Zorc

Abstract

Bacteria may assume two different life forms: floating (planktonic) and biofilm forms. In biofilms bacteria exist as heterogeneous populations with various growth rates embedded in extracellular polymeric substrate, which functions as a 3D scaffold that provides stability and protection against antimicrobial treatments and immunological system of the host organism. The composition of the matrix varies with the microorganism type, local mechanical shear forces, substrate availability and the host environment.

Current biofilm-targeting strategies involve physical-mechanical and chemical approaches. Quorum sensing (QS) or cell-to-cell communication represents an attractive target of antibiofilm drug discovery. Inhibition of QS-regulated gene expression lead to reduction of virulence factor secretion and biofilm formation. QS inhibition can be accomplished in different ways, by inhibiting the signal molecules production, by degrading the signal molecules or by blocking the signal receptors. Various compounds of natural and synthetic origins have been reported as efficient antibiofilm agents. They do not directly affect bacterial survival and thus the expectation is that resistance to these molecules will not readily occur.

Ability of bacteria to form biofilms complicates treatment of various infections, especially those related to the use of medical devices. This enhances risks of health threats and causes a lot of industrial problems. To date, no antibiofilm drug has been registered although several of them are in clinical trials.

Literatura – References

1. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>; datum pristupa 3.1. 2019.
2. Manner S, Fallarero A. Screening of natural product derivatives identifies two structurally related flavonoids as potent quorum sensing inhibitors against Gram-negative bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19:1346.
3. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Hall-Stoodley L, Stoodley P. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategie. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017; 15:740–755.
4. Jakobsen TH, Bjarnsholt T, Jensen PØ, Givskov M, Høiby N. Targeting quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: current and emerging inhibitors. *Fut. Microbiol.* 2013; 8:901–921.

5. Nadell CD, Xavier JB, Foster KR. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* 2009; 33:206–224.
6. Fong J, Yuan M, Jakobsen TH, Mortensen KT, Salido Delos Santos MM, Chua SL, Yang L, Tan C-H, Nielsen TE, Givskov M. Disulfide bond-containing ajoene analogs as novel quorum sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Chem.* 2017; 60:215–227.
7. Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R, Yang L, Jensen PO, Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Tolker-Nielsen T, Høiby N, Givskov M. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52:3648–3663.
8. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Med. Chem.* 2015; 7:647–671.
9. Busetti A, Crawford DE, Earle MJ. Antimicrobial and antibiofilm activities of 1-alkylquinolinium bromide ionic liquids. *Green Chem.* 2010; 12:420–425.
10. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect. Immun.* 2008; 76:4176–4182.
11. Kolodkin-Gal I, Cao S, Chai L, Böttcher T, Kolter R, Clardy J, Losick R. A self-produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide. *Cell* 2012; 149:684–692.
12. Bendaoud M, Vinogradov E, Balashova NV, Kadouri DE, Kachlany SC, Kaplan JB. Broad-spectrum biofilm inhibition by *Kingella kingae* exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 2011; 193:3879–3886.
13. Shepherd RW, Lindow SE. Two dissimilar *N*-acylhomoserine lactone acylases of *Pseudomonas syringae* influence colony and biofilm morphology. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75:45–53.
14. Smith KM, Bu Y, Suga H. Library screening for synthetic agonists and antagonists of a *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *Chem. Biol.* 2003; 10:563–571.
15. Geske GD, Wezeman RJ, Siegel AP, Blackwell HE. Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127:12762–12763.
16. Geske GD, O'Neill JC, Miller DM, Mattmann ME, Blackwell HE. Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: systematic evaluation of *N*-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action. *J. Am. Chem. Soc.* 2007; 129:13613–13625.
17. Ishida T, Ikeda T, Takiguchi N, Kuroda A, Ohtake H, Kato J. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by *N*-acyl cyclopentylamides. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73:3183–3188.
18. Amara N, Mashiach R, Amar D, Krief P, Spieser SAH, Bottomley MJ, Aharoni A, Meijler MM. Covalent inhibition of bacterial quorum sensing. *J. Am. Chem. Soc.* 2009; 131:10610–10619.

19. Georgel P, Crozat K, Lauth X, Makrantonaki E, Seltsmann H, Sovath S, Hoebe K, Du X, Rutschmann S, Jiang Z, Bigby T, Nizet V, Zouboulis CC, Beutler B. A toll-like receptor 2-responsive lipid effector pathway protects mammals against skin infections with Gram-positive bacteria. *Infect. Immun.* 2005; 73:4512–4521.
20. Barraud N, Hassett DJ, Hwang SH, Rice SA, Kjelleberg S, Webb JS. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2006; 188:7344–7353.

Primljeno 11. siječnja 2019.