

Mehanizmi množinske samoregulacije klica i stvaranja biofilma u etiopatogenezi infektivnih bolesti

Bouček, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:303296>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine
Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Kristina Bouček

Mehanizmi množinske samoregulacije klica i stvaranja biofilma u etiopatogenezi infektivnih bolesti

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2016.

„Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju, KBC Zagreb, pod vodstvom prof. dr. sc. Zdenka Kovača i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016.“

Mentor rada: prof. dr. sc. Zdenko Kovač

Kratice

QS = *quorum sensing* (množinska samoregulacija)

BF = biofilm

AHL = N acil-homoserin lakton

DNA = deoksiribonukleinska kiselina

AI-2 = Autoinducirajući sustav tipa 2 ili signalna molekula za Autoinducirajući sustav tipa 2

AI-3 = Autoinducirajući sustav tipa 3

AIP = autoinducirajući peptid

Nuc ili Nuc1 = nukleaza tipa 1

PIA = polisaharidni unutarstanični adhezin

PB = periodontalna bolest

OM = otitis media (upala srednjeg uha)

CF = cistična fibroza

CFRT = regulatorna bjelančevina transmembranskog prijenosa u cističnoj fibrozi

IMS = infekcije mokraćnog sustava

MRSA = meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus*

UPEC = uropatogena *Escherichia coli*

SIRS = sindrom sustavne upalne reakcije, od engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*

MODS = sindrom višeorganske disfunkcije, od engl. *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*

MOFS = sindrom višeorganskog zatajenja, od engl. *Multiple Organ Failure Syndrome*

Sadržaj

1. SAŽETAK

2. SUMMARY

3. UVOD 1

4. ETIOPATOGENEZA INFEKTIVNIH BOLESTI 4

4.1. Infekcija i mehanizmi infekcije 4

4.2. Putovi širenja infektivnih čimbenika 5

4.3. Reakcija domaćina na klice 6

4.4. Ishod infekcije 7

5. ETIOPATOGENETSKA ULOGA QS-SUSTAVA I PRIPADNIH SIGNALNIH MOLEKULA 12

5.1. Autoinducirajući tip 1, LuxR I-tip 12

5.2. Autoinducirajući tip 2, LuxS-tip 13

5.3. Autoinducirajući sustav 3, adrenalinsko-noradrenalinski signalni sustav 14

5.4. Peptidni signalni sustav u Gram pozitivnih bakterija 15

6. BIOFILM 18

6.1. Definicija i sastav biofilma 18

6.2. Faze stvaranja biofilma 19

6.3. Štetni učinci biofilma 21

7. KLINIČKI VAŽNE INFEKTIVNE BOLESTI UDRUŽENE S BIOFILMOM 24

7.1. Biofilm biotičkih površina u etiopatogenezi pojedinih infektivnih bolesti 27

Karijes 27

Periodontalna bolest 27

Kronični rinosinuitis 28

Kronični otitis media 29

Kronična plućna infekcija u bolesnika s cističnom fibrozom 29

Kronične infekcije mokraćnog 31

Infekcija kronične rane 31

Osteomijelitis 32

7.2. Biofilm abiotičkih površina u etiopatogenezi pojedinih infektivnih bolesti 34

Centralni i periferni venski kateteri 34

Urinarni kateteri	34
Unutarmaternični uložak	35
Kontaktne leče	35
Periprotetičke infekcije	36
Pacemaker	37
Žilni presadci	37
Mehanički srčani zalisci	38
 8. ANTIBIOTSKA REZISTENCIJA.....	 40
 9. ZAKLJUČAK	 43
 8. ZAHVALE.....	 44
 9. REFERENCE	 45
 10. ŽIVOTOPIS	 58

Mehanizmi množinske samoregulacije klica i stvaranja biofilma u etiopatogenezi infektivnih bolesti

1. Sažetak

Autor: Kristina Bouček

Množinska samoregulacija klica (ili *quorum sensing*, QS) je skup mehanizama s pomoću kojih bakterije kontroliraju genski izražaj ovisno o gustoći bakterijske populacije. Množinska se samoregulacija ostvaruje putem izvanstaničnih molekularnih signala te predstavlja središnju komponentu bakterijske komunikacije.

Kvorum, (od lat. *quorum*) prema definiciji, podrazumijeva minimalan broj prisutnih članova zajednice potrebnih za prihvaćanje određene odluke. Bakterijski kvorum podrazumijeva minimalnu, kritičnu gustoću bakterijskih stanica u populaciji potrebnih da se pokrene dodatni novi genski izražaj koji je predstavlja i koordinirani odgovor na promjene u njihovu okolišu. Postoje četiri vrste QS-sustava: autoinducirajući sustavi (LuxR I-tip), autoinducirajući sustav 2 (LuxS-tip), autoinducirajući sustav 3 (adrenalinско-noradrenalinски signalni sustav) te peptidni signalni sustav u Gram pozitivnih bakterija. Bakterije mogu komunicirati unutar svoje vrste i s bakterijama drugih vrsta kao i s gljivama.

Bakterije koriste QS sustav u svrhu koordinacije genskog izražaja, tj. aktivacije, inhibicije ili modulacije transkripcijskih programa (u eukariotskim i imunološkim stanicama) te u svrhu kontrole bakterijskog rasta i metabolizma, izražaja virulencije i mnogih esencijalnih funkcija unutar bakterijskih populacija.

QS ima ulogu i u stvaranju biofilma, a mikrookoliš omogućava QS-fenomenologiju. Biofilm je organizirana homogena ili heterogena populacija bakterija uloženi u matriks sačinjen od izvanstanične polimerne tvari izlučene od iste populacije bakterija na biotičkim i abiotičkim površinama. Primjeri nekih biotičkih površina na kojima se

može stvarati biofilm su sluznica dišnog i mokraćnog sustava, sluznica usne šupljine, površina zubi te površina kronične rane. Abiotičke površine na kojima se može stvarati biofilm su intravenski i urinarni kateteri, umjetni srčani zalisci, unutarmaternalni implantati, kontaktne leće i *pacemaker*.

Biofilm je uključen u etiopatogenezu karijesa, sinuitisa, periodonitisa, kroničnog otitis media, kroničnih infekcija mokraćnih putova, infekcije kronične rane, osteomijelitisa te kronične plućne infekcije u bolesnika s cističnom fibrozom.

Razumijevanje etiopatogeneze bakterijskih komunikacija otkriva nova područja mogućih terapijskih pristupa kočenjem QS-a i stvaranja biofilma.

Ključne riječi: množinska samoregulacija (*quorum sensing*), bakterijska populacija, biofilm, biotička površina, abiotička površina

Mechanisms of quorum sensing and biofilm generation in etiopathogenesis of infection diseases.

2. Summary

Author: Kristina Bouček

Quorum sensing (QS) describes intercellular bacterial communication mechanisms which regulate bacterial gene expression according to population cell density by extracellular molecular signals. *Quorum sensing* represents central component of bacterial communication.

Quorum, by its definition, means minimal number of present members of community needed for accepting decision. Bacterial quorum (*quorum sensing*) means a minimal critical density of bacterial cells in bacterial population needed for common genetic expression and coordinated action during microenvironmental exchanges.

There are four QS systems: Autoinducer type 1 (LuxR-I type), Autoinducer type 2 (LuxS type), Autoinducer type 3 (epinephrine/norepinephrine sensor signaling system), and Short peptide signaling system in Gram-positive bacteria. One type of bacteria can communicate with other (same type) bacteria and with other types of bacteria. Also, bacteria can communicate with fungi.

Bacteria use QS apparatus to coordinate gene expression, and to inhibit, activate or modulate transcriptional programs (found in eukaryotic epithelial cells and immune effector cells) among bacterial strains to control bacterial growth and metabolism, virulence expression and many other essential functions in bacterial populations.

QS plays a role in the generation of biofilms, and microenvironment of the biofilm allows QS-phenomenology. Biofilms can be defined as an organized group of homogenous or heterogeneous microorganisms living within a self-produced matrix

of polymeric substances which gets attached to the biotic or abiotic surfaces. Examples of biotic surfaces are respiratory and urinary mucosal surfaces, mucosa of oral cavity, surface of the tooth, and surface of chronic wound. Abiotic surfaces are intravenous and urinary catheters, prosthetic heart valves, intrauterine devices, contact lense surfaces, and pacemaker.

Biofilm is important in the etiopathogenesis of dental caries, sinusitis, periodontitis, and chronic otitis media, and chronic urinary tract infections, chronic wound infections, osteomyelitis, and chronic respiratory infections in patients suffering from cystic fibrosis.

Understanding etiopathogenesis of bacterial communication mechanisms reveals new possible therapeutic approach by targeting quorum sensing with quorum sensing inhibitors and biofilm generation inhibitors.

Key words: *quorum sensing*, bacterial population, biofilm, biotic surface, abiotic surface

3. Uvod

Množinska samoregulacija klica (ili *quorum sensing*, QS) mehanizmi su kojima bakterije kontroliraju genski izražaj ovisno o gustoći bakterijske populacije putem izvanstaničnih molekularnih signala. QS predstavlja središnju komponentu bakterijske komunikacije (Cámara 2002; William 2007). Bakterije međusobno komuniciraju jer im zajednički pristup omogućuje dinamične prilagodbe, lakše preživljavanje i život u različitim okolišnim uvjetima (Miller 2001; Cámara 2002; Greenberg 2003). Međubakterijski signalni putovi reguliraju bakterijski rast, metabolizam, stvaranje biofilma, pojavu virulentnosti i drugih agresivnih svojstava klica u odnosu na domaćina. QS je način komunikacije koji omogućuje prelazak preko antimikrobnih barijera i ostvarivanje infekcije (Asad & Opal 2008).

Komunikacijski signali mogu prelaziti barijere među vrstama i regulirati ljudski transkripcijski program u svoju korist. QS može promovirati rast bakterija sličnih svojstava i (simultano) inhibirati rast nekih drugih klica, čak i gljiva koje se bore za istu ekološku nišu. Isto tako, infektivni čimbenik može detektirati stanje stresa u domaćinu i ostvariti invaziju kada je domaćin najvulnerabilniji. Tome u prilog govori i činjenica da, osim signala koje produciraju klice, bakterijski QS sustav može prepoznati i reagirati na ljudske hormone (adrenalin, noradrenalin) te citokine (Asad & Opal 2008). Neke klice su također sposobne koristiti signale drugih bakterija u vlastitu korist s ciljem štednje vlastite metaboličke energije potrebne za stvaranje njihovog vlastitog komunikacijskog sustava. Pretpostavlja se da bi svojevrsno „prisluškivanje“ među različitim klicama moglo biti često u kompleksnim bakterijskim zajednicama (Diggle 2007; Sandoz 2007; Rumbaugh 2009; Poropat 2012).

Načelno govoreći, u prvom susretu s domaćinom ishod susreta nije odluka jedne (izolirane) ili malog broja klica već predstavlja kolektivni proces kao rezultat izmjene informacija i suradnje među velikim brojem klica. Prvi ishod može biti privremena kolonizacija, stjecanje nutrijenata i potraga za drugim domaćinom. Drugi mogući ishod je kolonizacija i stvaranje biofilma. Treći mogući ishod je potpuni izražaj

virulentnih čimbenika i invazija domaćina (Miller 2001; Greenberg 2003; Asad & Opal 2008).

Bakterije s ciljem ostvarenja infekcije napadaju domaćinovu prirodenu i stečenu imunost (te stanični i humoralni imunološki odgovor). Domaćinovi mehanizmi čišćenja i uklanjanja klica u nekom trenutku gube bitku s bakterijskim umnažanjem što u konačnici uzrokuje tkivnu ozljedu, odnosno infektivnu bolest (Akira 2006; Beutler 2006; Hermann 2007). QS klica pri tomu ima važnu etiopatogenetsku zadaću savladavanja domaćinovih linija obrane.

QS mehanizam imaju: stafilokoki, streptokoki, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, Gram negativne anaerobne bakterije, Gram negativne enterobakterije te Gram pozitivni aerobni koki (Asad & Opal 2008).

Biofilm je organizirana homogena ili heterogena populacija bakterija uloženi u matriks sačinjen od izvanstanične polimerne tvari izlučene od iste populacije bakterija na biotičkim i abiotičkim površinama. (Cortes et al. 2011; Gupta et al. 2015). BF ima obilježja hidrogela koji pokazuje viskoelastična svojstva (Stoodley et al. 2002; Hall-Stoodley et al. 2004), a omogućuje opstanak BF unatoč mehaničkom stresu.

Bakterije unutar BF pokazuju veću metaboličku i funkcionalnu raznolikost te veću metaboličku suradnju u odnosu na planktonski oblik bakterija (Gupta et al. 2015).

QS ima ulogu u stvaranju funkcionalnog i potpuno razvijenog biofilma te je uključen u svaku fazu stvaranja biofilma (Asad & Opal 2008). Mnoge infektivne bolesti u bakterijskoj patogenezi imaju biofilm kao izvor trajne infekcije koja često rezultira bolešću.

Biotičke površine su definirane kao površine organizama koje svrstavamo u živi dio ekosustava. Najčešće biotičke površine na kojima se stvara BF u ljudi su sluznica dišnog i mokraćnog sustava, sluznica usne šupljine, površina zubi, površina kronične rane te endotel srčanih zalistaka. Abiotičke površine su materijali neživog podrijetla (plastične mase, metali, posebni polimeri, itd.) koji se ugrađuju ili privremeno postavljaju u različite dijelove čovjekova tijela u svrhu nekog terapijskog ili dijagnostičkog zahvata. Na površinama takvih abiotičkih struktura može se stvarati biofilm, a najčešće su to - intravenski i urinarni kateteri (Gupta et al. 2015), umjetni

srčani zalisci, unutarmaternični implantati, kontaktne leće, elektronički dijalizator i *pacemaker* (Asad & Opal 2008). Biofilmove može tvoriti populacija jedne vrste bakterija (homogeni biofilm) ili, što je mnogo češće, više vrsta bakterija (heterogeni biofilm) (Cortes et al. 2011; Gupta et al. 2015). Biofilm može biti jednoslojan ili višeslojan (Asad & Opal 2008).

Mehanizmi množinske samoregulacije i stvaranje biofilma omogućuju prilagođavanje bakterija uvjetima posebnih nutritivnih zahtjeva i ponuđenih nutritivnih izvora.

4. Etiopatogeneza infektivnih bolesti

4.1. Infekcija i mehanizmi infekcije

Infekcija podrazumijeva prodor, naseljavanje i umnožavanje patogenih mikroorganizama (virusi, bakterije, gljive, paraziti) u tkivu nekog višeg organizma (čovjek, životinja, biljka). Infekcija ne dovodi u svakom slučaju do bolesti te je stoga puno širi pojam u odnosu na zarazu. Zarazu definiramo kao infekciju pri kojoj je poremećena ili ugrožena funkcija napadnutog organizma, tj. složen biološki proces u kojem sudjeluju mikroorganizmi, domaćin i vanjski uvjeti okoliša (Gamulin et al. 2005). Dakle, pojam infekcija obuhvaća subklinička stanja i infektivne bolesti (zaraze) u različitim kliničkim oblicima, intenzitetu i ishodima.

Klice uzrokuju bolesti zahvaljujući svojstvima kao što su invazivnost, patogenost i toksičnost.

Invazivnost je svojstvo prodiranja u tkiva mikroorganizama, razmnožavanje u njima i širenje (Gamulin et al. 2005). Neki mikroorganizmi ne prodiru u tkiva, ali izlučivanjem toksičnih tvari koje mogu djelovati lokalno ili prijenosom toksina krvlju, limfom, živčanim vlaknima na udaljene ciljne organe utječu na razvoj infektivnih bolesti. Drugi mikroorganizmi imaju svojstvo naglog prodiranja i razmnožavanja u domaćinovu tkivu. Invazivnost nekih mikroorganizama temelji se na specifičnosti njihove građe (hidrofilni gel u površinskoj ovojnici) ili stvaranju enzima koji ih štite od fagocitoze (streptokinaza, fibrinolizin, leukocidin) te na stvaranju enzima koji omogućuju prodor i širenje u tkiva domaćina (hijaluronidaza, kolagenaza, lecitinaza). S pomoću takvih mehanizama klice se bore i kadšto savladavaju fiziološke brane domaćina.

Patogenost je sposobnost nekog mikroorganizma da uzrokuje bolest, a potječe iz uzajamnog međudjelovanja mikroorganizma i makroorganizma (domaćina) (Gamulin et al. 2005). S obzirom da se nerijetko patogenost poistovjećuje s pojmom virulencija, važno je poznavati razliku. Naime, virulencija se definira kao određeni stupanj patogenosti nekog mikroorganizma, tj. sposobnost nekog mikroorganizma da izazove infekciju (Gamulin et al. 2005). Patogenost je opće svojstvo vrste mikroorganizama, a

virulentni su samo oni sojevi patogene vrste mikroorganizama koji imaju svojstvo nadvladavanja otpornosti domaćina i razmnožavanja u istom (Gamulin et al. 2005).

Toksičnost klice ostvaruju preko svojih toksina, izlučenih ili otpuštenih otrovnih tvari velike molekularne mase (Gamulin et al. 2005). Toksini djeluju lokalno ili/i sustavno u domaćinu. Klice proizvode egzotoksine i endotoksine. Egzotoksini su proteini koje bakterija izlučuje u svoj okoliš. U pravilu se sastoje od dijela koji se veže za specifični receptor i dijela koji je nosilac toksične aktivnosti koji, po ulasku u stanicu, izvršava toksični učinak. Endotoksini su lipopolisaharidi (Gram-negativne klice) ili peptidoglikani (Gram-pozitivne klice) porijekla stanične stijenke, a oslobađaju se u trenutku raspada bakterije. Toksigene klice najčešće stvaraju samo jednu vrstu toksina. Infektivne bolesti koje uzrokuju bakterije koje stvaraju više od jedne vrste toksina i/ili enzima praćene su vrlo teškom kliničkom slikom jer izazivaju teška tkivna oštećenja.

4.2. Putovi širenja infektivnih čimbenika

Postoji više načina prijenosa ili širenja infekcije. To su: širenje dodirnom, širenje zrakom, vodom i hranom, prijenosnicima i prekoposteljično širenje infekcije (Gamulin et al. 2005).

Širenje zaraze može se ostvariti izravnim ili neizravnim dodirnom. Izravni dodir uključuje rukovanje, poljubac i razmjenu tjelesnih tekućina (snošaj, prekoposteljični prijenos, itd.). Većina se zaraznih bolesti prenosi s bolesne osobe ili kliconoše (zdravi nosioc zarazne klice) izravnim dodirnom. To se u prvome redu odnosi na kožne gljivične infekcije i infekcije čiji uzročnici ne mogu dugo opstati izvan živog organizma. Neizravni dodir podrazumijeva širenje infekcije kontaminiranim predmetima kojima se služio zaraženi ili su kontaminirani na neki drugi način. To su najčešće pribor za jelo i piće, ručnici te zajednička kozmetička sredstva. Ovo je način širenja mikroorganizama koji mogu dulje vrijeme opstati izvan živog organizma. **Aerogene** infekcije su infekcije koje se šire zrakom (govor, kihanje, kašljanje zaražene osobe), a najčešće zahvaćaju dišni sustav. Alimentarne infekcije su one koje se šire hranom, a infekcije koje se šire vodom nazivamo hidrične infekcije. **Alimentarne i hidrične** infekcije najčešće uzrokuju crijevne zarazne bolesti.

Transmisivne infektivne bolesti prenose se različitim vrstama člankonožaca (grinje, uši, buhe, komarci, krpelji, muhe). Mogući načini širenja su mehanički, tj. prijenos nožicama, krilcima, dlačicama člankonožaca i biološki način prijenosa pri kojemu uzročnik ulazi u člankonošca i u njemu se razmnožava ili prolazi fazu svojega ciklusa. **Prekoposteljično** širenje infekta podrazumijeva širenje mikroorganizama koji imaju visok afinitet za fetalne ovojnice i/ili fetus. Ovakve vrste infektivnih bolesti u pravilu završavaju teškim oštećenjima ili smrću ploda.

4.3. Reakcija domaćina na klice

Domaćinov organizam posjeduje svojstva koja mu omogućuju obranu od živih uzročnika infektivnih bolesti (bakterije, virusi, gljive, paraziti). Tri su linije obrane organizma. (Slika 1.)

Prvu liniju obrane, kao fiziološkog odgovora domaćina, karakteriziraju pasivnost i nespecifičnost (Gamulin et al. 2011). Uključuju fizičku branu (koža, sluznica, spojnice oka) i kemijsku branu (pH u fiziološkim granicama za određeno anatomsko područje, lipidi, defenzimi, enzimi).

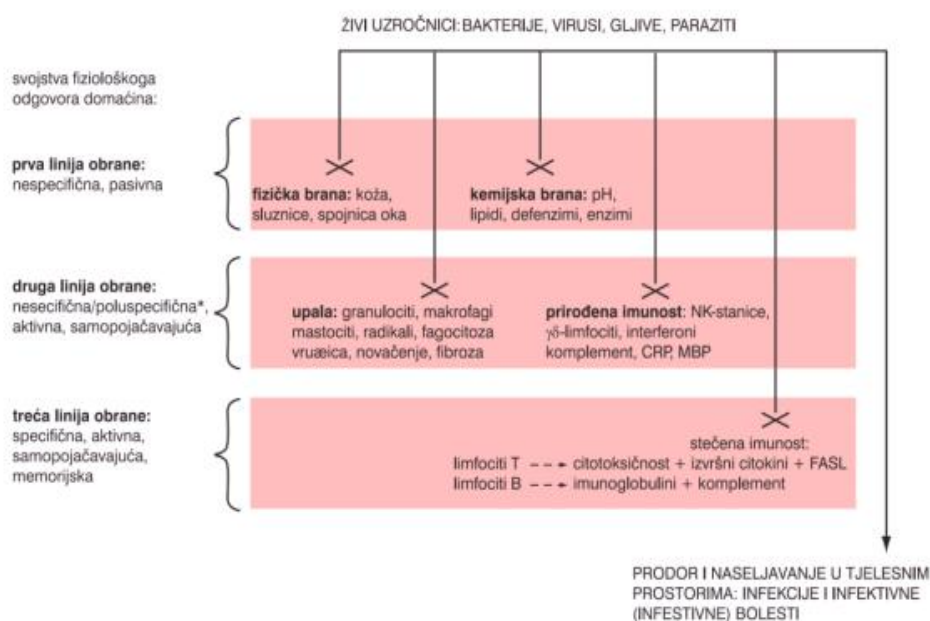
Svojstva druge linije obrane domaćina su nespecifičnost, aktivnost, a karakteristično ovoj liniji obrane je i samopojačavanje djelovanja (Gamulin et al. 2011). U domaćinu se aktiviraju mehanizmi upale koje posreduju granulociti, makrofagi i mastociti. Aktivirani mehanizmima druge linije obrane vode organizam u vrućicu. Pokrenutu drugu liniju obrane također karakterizira aktivnost i novačenje NK-stanica, limfocita. Osim toga u nespecifične mehanizme obrane pripada i aktivacija alternativnog puta komplementa. Domaćinov organizam stvara interferone, C-reaktivni protein i mijelinski bazični protein (Gamulin et al. 2011). Limfni čvorovi kao dio imunskog sustava također predstavljaju barijeru bakterijama. Monociti i neutrofili iz krvi suprotstavljaju se bakterijama u krvi, a retikuloendotelne stanice u tkivu (jetra i slezena).

Specifičnu obranu organizma čine stanični i humoralni imunski mehanizmi koji predstavljaju treću liniju obrane organizma od živih uzročnika infektivnih bolesti. Treća linija obrane je, osim specifična, aktivna, samopojačavajuća i memorijska. Protutijela, kao funkcionalni dio humoralnog imunskog sustava, predstavljaju

obranu organizma u borbi protiv izvanstaničnih mikroorganizama mehanizmima opsonizacije te aktivacijom komplementa (Gamulin et al. 2011).

Obrana organizma imunosnim mehanizmima posredovanih stanicama način je borbe organizma domaćina protiv unutarstaničnih bakterija. Temelji se na predočavanju antigena limfocitima T što čine makrofagi. Specifično senzibilizirani limfociti T pokreću daljnje mehanizme obrane kojima privlače i aktiviraju dotad neaktivirane makrofage (preostale koji nisu bili aktivirani drugom linijom obrane), limfocite B i citotoksične limfocite T.

Posljedica izostanka ili obrane organizma od klica je prodor i naseljavanje u tjelesnim prostorima, tj. razvoj infekcije i infektivne bolesti.



Slika 1. Biološkim etiopatogenetskim čimbenicima suprotstavljen je složen sustav fizioloških barijera koje ostvaruju zaštitu pasivnim, aktivnim, nespecifičnim, specifičnim i memorijskim mehanizmima. Disfunkcija i poremećaj cjelovitosti fizioloških brana omogućuje zarazu i zaraznu bolest. Preuzeto iz Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici, Patofiziologija, sedmo, obnovljeno i izmijenjeno izdanje Zagreb: Medicinska naklada; 2011. Slika 24-2, str. 776.

4.4. Ishod infekcije

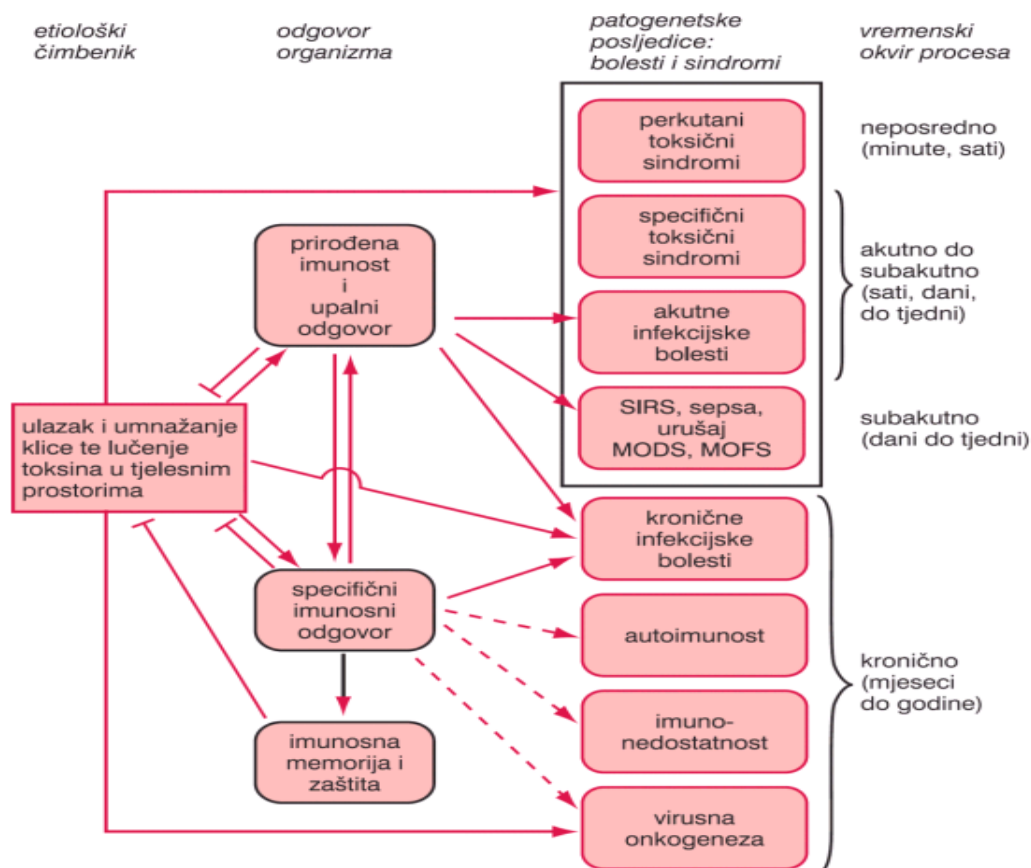
U prvom susretu bakterijskog mikroorganizma s domaćinom ishod susreta nije odluka malog broja klica ni samo jedne (izolirane) bakterije već predstavlja kolektivni proces kao rezultat izmjene informacija i suradnje među klicama. Prvi ishod može biti privremena kolonizacija, stjecanje nutrijenata i potraga za drugim domaćinom. Drugi mogući ishod je kolonizacija infekcija uz stvaranje biofilma. Treći mogući ishod je potpuni izražaj virulentnih činioca i invazija domaćina (Miller 2001; Greenberg 2003; Asad & Opal 2008).

Ukoliko patogeni mikroorganizmi uzrokuju infekciju, to u domaćina pokreće mnoge reakcije, od kojih su neke dio odgovora akutne faze (Gamulin et al. 2005). Odgovor akutne faze su reakcije organizma domaćina koje se događaju (osim u infektivnih bolesti) usljed oštećenja tkiva, upala i imunosnih procesa. Uključuje promjene metaboličkih, endokrinih, živčanih i imunosnih funkcija unutar prvih nekoliko sati od djelovanja nokse. Odgovor akutne faze infektivne bolesti uključuje vrućicu, negativnu ravnotežu dušika i sintezu proteina akutne faze. Najveći dio zbivanja akutne faze posreduju monokini aktiviranih makrofaga, a to su čimbenik tumorske nekroze alfa, interleukin - 1 i interleukin - 6 (Kovač & Gamulin 2005).

Sustavni upalni odgovor se odvija pod nadzorom homeostatičkih mehanizama koji, nakon uklanjanja mikroorganizma koji je uzrokovao infekciju, tj. prestanka opasnosti za organizam, vraćaju mehanizmima negativne povratne sprege poremećenu homeostazu u ravnotežno stanje organizma. Brojne reakcije potaknute citokinima imaju i mehanizme pozitivne povratne sprege kojima se povećava proizvodnja proupalnih posrednika. Štoviše, neke od tih reakcija koje aktiviraju citokini su stupnjevite što znači da se na svakom susljednom stupnju takvih reakcija broj molekula proizvoda povećava za nekoliko potencija (Kovač & Gamulin 2005). Kada se aktiviraju mehanizmi pozitivne povratne sprege i reakcije s biokemijskim mehanizmima samopovećanja, žestina reakcija se može u kratkom vremenu naglo povećati. Takvo se stanje očituje sindromom sustavnog upalnog odgovora (engl. *Systemic Inflammatory Response Syndrome* – SIRS). Ako je SIRS posljedica infekcije, tada se radi o sepsi (ako su u krvotoku prisutne klice) ili septikemiji (ako su

u krvotoku prisutni toksini klica). Dijagnoza SIRS-a se postavlja ako su prisutna dva ili više od sljedeće navedenih elemenata:

1. tjelesna temperatura mjerena rektalno viša od 38°C ili manja od 36°C
2. frekvencija rada srca viša od 90 otkucaja u minuti u mirovanju
3. frekvencija disanja viša od 20 daha u minuti u mirovanju ili parcijalni tlak kisika manji od 4,3 kPa (manji od 37 mmHg)
4. broj leukocita u krvi veći od $12 \times 10^9 / \text{L}$ ili manja od $4 \times 10^9 / \text{L}$ (Kovač & Gamulin 2005).



Slika 2. Shematski prikaz patogenetskih mehanizama odgovornih za klinička očitovanja infektivnih bolesti i sekundarnih bolesti pokrenutih klicama. Isprekidane strjelice označuju preobraženi imunosni odgovor. Preuzeto iz Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici, Patofiziologija, sedmo, obnovljeno i izmijenjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. Slika 24-4, str. 782.

Kada se u sepsi (SIRS uzrokovan infekcijom) smanji arterijsko-venska razlika tlakova i perfuzija tkiva krvlju, postojećem stanju se pridružuju različiti oblici krvotočnog urušaja (npr. septički urušaj). Posljedično zatajenje funkcije brojnih organa naziva se višesustavno zatajenje koje se očituje istoimenim sindromom: sindrom višeorganske disfunkcije (engl. *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* – MODS) ili sindrom višeorganskog zatajenja (engl. *Multiple Organ Failure Syndrome* – MOFS) (Gamulin et al. 2011).

Općenito u razvoju SIRS-a (uzrokovanog klicama) je moguće razlikovati tri stupnja. Prvi stupanj je infekcija koja potiče stresni odgovor te proizvodnju citokina i drugih posrednika. Drugi stupanj je odgovor akutne faze i posljedica je narušenja homeostaze. Treći stupanj je razvijeni SIRS koji nastaje pojačavanjem odgovora i gubitkom homeostaze. Posljedica SIRS-a može biti višesustavno zatajenje organizma često sa smrtnim ishodom.

Pokrenut razvoj procesa infektivne bolesti razvija se kroz sljedeće faze:

1. inkubacija (razdoblje od infekcije do pojave znakova bolesti)
2. inicijalno razdoblje
3. razdoblje razvijene bolesti (akutna infekcija)
4. razdoblje povlačenja (regresije) bolesti
5. ozdravljenje (razdoblje rekonvalescencije).

Neuspjeh obrane organizma domaćina posredovan prirođenom imunošću, upalnim odgovorom, specifičnim imunosnim odgovorom i imunosnom memorijom rezultira ozbiljnim patogenetskim posljedicama, a to su bolesti i sindromi.

Uključuju perkutani toksični sindrom, specifični toksični sindrom, akutne infekcijske bolesti, zatim SIRS, sepsu, urušaj, MODS i MOFS (Gamulin et al. 2011). Posljedice mogu biti i razvoj kronične infekcijske bolesti, autoimunost i imunoneдостatnost (Gamulin et al. 2011).

U etiopatogenezi infektivnih bolesti povezanih sa stvaranjem biofilma najčešće se ostvaruje nedostatnost domaćinovih mehanizama obrane (nedovoljne za potpuno uklanjanje uzročnika ili ozdravljenje) te nastaje jedan od oblika trajne infekcije, a to su kliconoštvo, kronična infektivna bolest ili latentna infekcija (Gamulin et al. 2005).

Kliconoštvo označava prisutnost i izlučivanje uzročnika iz organizma bez vanjskih znakova bolesti. Kliconoštvo različito dugo traje, nekoliko dana do nekoliko godina, a može biti posljedica i nemanifestine ili subkliničke infekcije.

Kronična infektivna bolest praćena je simptomima i znakovima bolesti. Po svim svojim značajkama odgovara kroničnoj upali. Posljedice uvelike ovise o lokalizaciji bolesti. Najčešće bolesti etiopatogenetski združene s biofilmom su kronične infekcije. Dovode najčešće do anatomske-fizioloških poremećaja uz te uz potrebu produljenja medikamentozne terapije (koja također sa sobom nosi opsežne posljedice) ponekad uključuju i kiruršku metodu liječenja.

Latentna infekcija podrazumijeva prisutnost mikroorganizma u domaćinu bez kliničkih znakova bolesti, ali uz mogućnost reaktivacije infektivne bolesti. Reaktivacija se događa kada, nakon primoinfekcije, u domaćinovu organizmu zaostaje mikroorganizam te se pod određenim, zasad još nedovoljno poznatim poticajima (stres, vrućica, prehlada?) razvija akutna infekcija (Gamulin et al. 2005).

5. Etiopatogenetska uloga QS-sustava i pripadnih signalnih molekula

Međustanična komunikacija utemeljena na QS sustavu sudjeluje u globalnoj regulaciji bakterijskih gena uključujući gene za virulenciju u okvirima specifičnih uvjeta okoliša i rasta (Miller 2001, Càmarà 2002; Greenberg 2003). Dakle, klice temeljem međusobnog „razgovora“ ostvaruju stanovite prilagodbene prednosti u odnosu na domaćinove linije obrane. QS sudjeluje u stvaranju biofilma, biološkom potencijalu rasta klica, rezistenciji usmjerenoj protiv antibiotika, prijenosu DNA među klicama, izražaju virulencije, autolizi i toleranciji oksidativnog stresa. Isto tako QS upravlja metaboličkom aktivnošću i pokretljivošću, a može promovirati rast bakterija i (istodobno) kočiti rast nekih drugih bakterija, čak i gljiva koje se bore za istu ekološku nišu (Asad & Opal 2008).

5.1. Autoinducirajući tip 1, LuxR I-tip

Autoinducirajući tip 1 (LuxR I-tip) predstavlja signalni sustav kojim komuniciraju Gram negativne klice (Beutler 2006). Vrlo je sličan izvornom *luxR/luxI* autoinducirajućem sustavu u *Vibrio* spp. kojim je dokazano postojanje QS-a (Asad & Opal 2008). Signalna molekula koju koristi ovaj sustav je N acil-homoserin lakton (AHL). AHL je dobro topiva i slobodno difuzibilna molekula. Zajednička karakteristika svim AHL molekulama je L izomerni oblik homoserinskog laktonskog prstena. Međusobno se AHL molekule razlikuju po duljini lanca (4 do 18 ugljikovih atoma), stupnju saturacije te po broju supstitucija na kisikovom atomu (Asad & Opal 2008). (Tablica 1.)

AHL, zahvaljujući karakteristikama kao što su topivost i difuzibilnost, slobodno prolazi staničnu membranu. Kada je bakterijska populacija mala, ta manja, ograničena količina AHL otplavljuje se, a geni koji su pod kontrolom QS-a nisu aktivni. Kada gustoća populacije prijeđe kritični prag, koncentracija AHL poraste i ulazi u interakciju s citosolnim receptorom. Nakupljanje signalnih molekula u okolišu omogućuje svakoj pojedinoj bakterijskoj stanici procjenu stanične gustoće, odnosno procjenu ukupnog broja bakterija (Asad & Opal 2008). Primjerice, u standardnim kulturama koje tvori bakterija *P. aeruginosa*, koncentracija AHL molekule mjeri se u rasponu od 2 do 10

μM. Ove relativno niske koncentracije izmjerene su u standardnim laboratorijskim uvjetima (37 °C), što možda u potpunosti ne korelira sa stanicom domaćinom u *in vivo* uvjetima.

Receptor za AHL molekulu je unutarstanični Lux-R protein koji je produkt istoimenog gena. AHL molekula vezana za Lux-R receptor predstavlja koaktivatorski kompleks na promotorskoj strani za QS odgovorne operone u bakterijskom genomu (Asad & Opal 2008). Signalni put započet spajanjem AHL i Lux-R receptora za bakterijske patogene znači aktivaciju viruloma (dio genoma gdje su smješteni svi geni odgovorni za virulenciju) u svrhu mikrobne invazije.

Ovaj sustav pronađen je u mnogih medicinski značajnih Gram negativnih patogena (Miller 2001; Bassler 2002; Williams 2002; Càmara 2002; Greenberg 2003; Wagner 2007). Ostale bakterije, uključujući *E. coli*, ne sintetiziraju AHL, ali eksprimiraju LuxR biosenzorski homolog nazvan SdiA (Asad & Opal 2008).

Ovaj QS-sustav dopušta „osluškivanje“ komunikacijskih signala drugih Gram negativnih bakterija i iskorištavanje istih u vlastitu korist (Ahmer 2004).

5.2. Autoinducirajući tip 2, LuxS-tip

Autoinducirajući tip 2 (LuxS-tip) predstavlja signalni sustav kojim komuniciraju Gram negativne i Gram pozitivne bakterije (Càmara 2002), a posredovan je *luxS* genom (Miller 2001; Bassler 2002). Ovaj signalni sustav koristi kompleksni, dvokomponentni receptor-kinazni sustav u svrhu ostvarenja međubakterijske komunikacije (Asad & Opal 2008). Signal koji koristi ovaj *quorum sensing* sustav kompleks je višestruko prstenastih i cikličnih molekula furanozila koje sadržavaju atom bora (AI-2) (Bassler 2002). Receptor za LuxS tip također je kompleks koji funkcionira kao receptor-kinazni signalni transkripcijski kompleks. Dvodomenski receptor u *Vibrio* spp. (sastavljen od kinaze i regulatora LuxQ) vezan je uz membranu. U crijevnih bakterija topivi receptor veže signalnu molekulu (AI-2) u periplazmatskom prostoru, a zatim prenosi molekulu kroz membranu tzv. ABC tipom prijenosnika (Kendall 2007). Internalizirana signalna molekula fosforilira se i zajedno s unutarstaničnim receptorom čini sustav koji funkcionira kao transkripcijski aktivator

(Asad & Opal 2008). Mnoge bakterije ne eksprimiraju *luxS* gen, ali eksprimiraju AI-2 receptorski kompleks. (Tablica 1.)

Određena bakterijska kolonija drugoj može slati generirane AI-2 signale kako bi primajuća kolonija mogla kontrolirati vlastiti transkripcijski odgovor.

Precizna uloga AI-2 komunikacije (signaliziranja) u bakterijskoj patogenezi nije do kraja definirana, ali postoji jasna dokazana transkripcijska aktivnost usmjerena prema regulaciji metaboličkih putova, a dokazana je i posredna detoksikacijska uloga (Cámara 2002; Kendall 2007) kodiranjem višefunkcionalnih enzima (npr. konverzija toksičnog S-adenozil-L-homocisteina u homocistein kao glavna reakcija u aktiviranom metilnom ciklusu u kojem su metilne grupe pridružene proteinima i metabolitima).

S. mutans navodi se kao primjer bakterijskog patogena u kojeg *luxS* ima najvjerojatnije primarno metaboličku ulogu, a tek sekundarno ulogu u QS signaliziranju (Sztajer 2008).

5.3. Autoinducirajući sustav 3, adrenalinsko-noradrenalinski signalni sustav

Za novije otkriveni Autoinducirajući sustav 3 (adrenalinsko-noradrenalinski signalni sustav) pretpostavlja se da je najkompliciraniji među svim do sada otkrivenim signalnim putovima. Autoinducirajući sustav 3 dijeli mnoge karakteristike s Autoinducirajućim sustavom 2 među kojima je najbitnija karakteristika izgled receptora, tj. dvokomponentni receptor-kinazni unutarstanični signalni kompleks za aktivaciju viruloma (Asad & Opal 2008). (Tablica 1.) Ovaj sustav kao signale koristi adrenalin i noradrenalin (Fuqua 2002). Prirodni mikrobni ligand nije još točno definiran, ali zna se da je strukturno sličan katekolaminima. Zanimljiva je i činjenica da alfa-adrenergički blokatori mogu zakočiti AI-3 signaliziranje u *E. coli* (Kendall 2007). Receptor za ovaj signalni sustav nazvan je QseC i po funkciji je senzorska kinaza. QseB je fosforilirani regulator koji mijenja transkripciju gena odgovornih za virulenciju. QseC i QseB zajedno čine QseBC kompleks (Clarke 2005) koji ima funkciju periplazmatskog receptora.

Autoinducirajući sustav 3 neizostavan je u patogenezi enterohemoragične *E. coli* i *E. coli* komenzalnih svojstava te u patogenezi drugih crijevnih bakterija (Kendall 2007), ali nije dokazan u patogenezi Gram pozitivnih bakterija (Asad & Opal 2008).

5.4. Peptidni signalni sustav u Gram pozitivnih bakterija

Peptidni signalni sustav u Gram pozitivnih bakterija strukturno je različit, ali funkcionalno sličan signalni sustav preostalim sustavima globalne regulacije gena temeljene na staničnoj gustoći (Gov 2002; Yarwood 2003). (Tablica 1.) Opisan je u stafilokoka kao dodatni genski regulatorski sustav (*agr*) i u enterokoka kao *Enterococcus faecalis* regulatorni QS-sustav (*frs*) (Gov 2002). Signalna molekula ovog sustava je mali ciklički peptid s tiolaktonskim prstenom nazvan autoinducirajući peptid (AIP). Receptor koji veže AIP (nazvan AgrC) dvokomponentna je molekula koja na staničnoj površini prepoznaje peptide i aktivira histidinsku kinazu koja generira transkripcijske aktivatore za mnoge genske lokuse (Asad & Opal 2008). Genetski lokus *agr*, najbolje opisan u bakterije *S. aureus*, sastoji se od 2 operona označena kao RNAII i RNAIII. Modeli upućuju na to da je AIP proizvod *agrD* koji je zatim procesuiran, posttranslacijski modificiran te izlučen iz stanice tzv. ABC tipom prijenosnika nazvanim AgrB (Asad & Opal 2008). AgrC je receptor koji funkcionira kao histidinska kinaza. U odsutnosti liganda (AIP), AgrC može fosforilirati AgrA koji se ponaša kao transkripcijski aktivator vežući se na promotorsku stranu RNAII i RNAIII (Novick 2003).

Aktivacija RNAII omogućuje pozitivnu povratnu spregu sinteze AIP (Asad & Opal 2008). Također je zanimljivo da isti AIP koji autoaktivira svojstvo produkcije *S. aureus* inhibirat će signale iste bakterijske vrste posredovane drugim peptidima (Yarwood 2003). Ovakav način inhibicije predstavlja vrstu borbe za opstanak u istoj ekološkoj niši s ograničenim nutrijentima među različitim sojevima zlatnog stafilokoka (Càmara 2002).

RNAIII ima dvostruku ulogu u izražaju virulencije (Asad & Opal 2008). Transkripcijski produkt RNAIII posreduje sintezu delta toksina i funkcionira kao regulatorna RNA sekvenca koja mijenja izražaj gena viruloma (Yarwood 2003). Aktivacija *agr* sustava

visokom koncentracijom AIP-a u nekih grupa stafilokoka uzrokuje izražaj velikog broja egzotoksina (toksin sindroma toksičnog šoka tip 1, delta toksin, eksfolijatin, hemolizini te neki stafilokokni enterotoksini) (Yarwood 2003). Sinteza RNAIII istovremeno smanjuje broj površinskih bakterijskih bjelančevina, čimbenika koji veže fibrinogen i adhezijskih molekula (Asad & Opal 2008).

Tablica 1. Osnovne karakteristike četiriju QS-sustava koja prikazuje vrstu aktivacijskih molekula koje koristi QS-sustav, način vezanja aktivacijskih molekula za bakteriju te bakterije u kojih je QS-sustav dokazan.

Vrsta sustava	Aktivacijska molekula (molekularna masa)	Način vezanja za bakteriju	Bakterije u kojih je sustav dokazan	Literaturni izvor
Autoinducirajući tip 1, LuxR I-tip	<i>N</i> -acyl-homoserin lakiton (188)	AHL molekula vezana za Lux-R receptor predstavljaju koaktivatorski kompleks na promotorskoj strani za QS odgovorne operone u bakterijskom genomu (aktivaciju viruloma)	Gram-negativne bakterije (<i>Burkholderia</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.); mogući utjecaj na ljudske gene	Asad & Opal (2008); Beutler (2006)
Autoinducirajući tip 2, LuxS-tip	Heterociklični furanozil-borat (193)	Dvokomponentni membranski receptor-citoplazmatski kinazni kompleks	Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije; moguća važnija metabolička nego komunikacijska uloga	Asad & Opal (2008); Bassler (2002); Cámara (2002); Kendall (2007); Sztajer (2008)
Autoinducirajući tip 3, adrenalinsko-noradrenalinski signalni sustav	Epinefrin (183) i norepinefrin (169) kao predstavnici katekolamina ¹	Dvokomponentni receptor-kinazni unutarstanični signalni kompleks za aktivaciju viruloma	Gram-negativne, enteričke epinefrin/norepinefrin bakterije enterohemoragična <i>Escherichia coli</i> , enteropatogena <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> spp.	Asad & Opal (2008); Clarke (2005); Fuqua (2002)
Peptidni signalni sustav u Gram pozitivnih bakterija	mali ciklički peptidi s trilaktonskim prstenom (664)	AgrC kao dvokomponentna molekula koja na staničnoj površini registrira peptide i aktivira histidinsku kinazu koja generira transkripcijske aktivatore za mnoge genske lokuse	Gram-pozitivne bakterije, <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> spp.	Asad & Opal (2008); Gov (2002); Yarwood (2003)

¹ Napomena: Za katekolamine se pretpostavlja aktivacijski učinak, ali nije znanstveno dokazan.

6. Biofilm

6.1. Definicija i sastav biofilma

Biofilm je organizirana homogena ili heterogena populacija bakterija uloženi u matriks sačinjen od izvanstanične polimerne tvari izlučene od iste populacije bakterija udružene s biotičkim i abiotičkim površinama (Cortes et al. 2011; Gupta et al. 2015). QS ima ulogu u stvaranju funkcionalnog i potpuno razvijenog BF (Gupta et al. 2015).

Bakterije ostvaruju život u složenim zajednicama vezanima za površine te su u takvom obliku, u BF, sveprisutne (Parsek & Singh 2003). Mnoge bakterijske infektivne bolesti u patogenezi imaju BF kao izvor trajne infekcije koja često rezultira neželjenim ishodom. Bakterijske kolonije čine tek 15 do 20 posto sveukupnog volumena BF, a ostatak tvori matriks (Plančak et al. 2015). Matriks predstavlja mješavinu različitih prirodnih polimera; polisaharida, proteina, glikoproteina, glikolipida te nukleinskih kiselina (Cortes et al. 2011; Gupta et al. 2015).

Biofilm može biti jednoslojan ili višeslojan (Karatan & Watnick 2009). Jednoslojan BF stvara se ako su jače izražene sile između stanica i površine u odnosu na međustanične sile. BF se stvara brzo prihvatanjem pila i flagela pripadajućih bakterija na površinu, a zatim se zaustavlja daljnje povećanje debljine biofilma (Karatan & Watnick 2009). Višeslojan BF posljedica je djelovanja privlačnih sila između stanice i površine te među stanicama uz djelovanje pila i flagela. Osim karakteristika površine bitnih za stvaranje višeslojnog BF, bitna je i neutralizacija odbojnih međubakterijskih sila (Karatan & Watnick 2009).

Vanjski dio BF je hidrogel koji pokazuje viskoelastična svojstva (Stoodley et al. 2002; Hall-Stoodley et al. 2004), a omogućuje opstanak biofilma unatoč mehaničkom stresu. Bakterije u takvom okolišu mogu preživljavati jer su unutar BF prisutni nutrijenti prisutni i bakterije ga iskorištavaju. Voda je unutar matriksa zarobljena vodikovim vezama (hidrofilni polisaharidi) (Kostakioti et al. 2013). Bakterije unutar BF pokazuju veću metaboličku i funkcionalnu raznolikost te veću metaboličku suradnju u odnosu na planktonski oblik bakterija (Gupta et al. 2015). Biofilm ograničava difuziju

nanotvari, makromolekula te prodiranje upalnih i imunskih stanica, što sa stajališta mikroorganizama predstavlja moćan mehanizam samozaštite i samoekspanzije u domaćinu.

6.2. Faze stvaranja biofilma

Pet je faza stvaranja biofilma (Slika 1.). To su: reverzibilno vezanje, ireverzibilno vezanje, prva faza sazrijevanja, druga faza sazrijevanja te raspršivanje (Sauer et al. 2002; Stoodley et al. 2002).

Prvu fazu karakterizira prijanjanje uzrokovano fizikalnim silama kao što su van der Waalsove sile, elektrostatičke sile, steričke interakcije (Garrett et al. 2008) ili bakterijskim organelama, tj. flagelama i pilima (Maric & Vranes 2007). Prijanjanje ovisi o karakteristikama površine te o okolišnim uvjetima kao što su temperatura i tlak. Prvo se, dakle, događa vezanje stanice uz površinu ili adhezija, a nakon toga, ukoliko se radi o višeslojnom BF, vezanje stanice uz stanicu ili kohezija (Gupta et al. 2015).

U trenutku kada privlačne sile nadvladaju odbojne, reverzibilno prihvaćene stanice na podlogu postaju ireverzibilno priljubljene i time započinje druga faza formiranja BF nazvana ireverzibilno vezanje (Garrett et al. 2008). U ovoj fazi fizikalne odbojne sile nadvladane su djelovanjem pila i flagela (Kumar & Anand 1998). Hidrofobna površina stanice igra ključnu ulogu u formiranju BF kada bakterije adheriraju na hidrofobnu polarnu površinu jer se u takvoj vrsti interakcije između bakterija i površine smanjuje djelovanje međusobne odbojne sile (Tribedi & Sil 2014).

U trećoj fazi stvaranja BF nazvanoj prva faza sazrijevanja događa se početak međustanične komunikacije. Posljedica toga je stvaranje autostimulativnih signala koja rezultira izražajem gena specifičnih za BF (Davies et al. 1998). Također, događa se i izlučivanje matriksa izgrađenog od izvanstanične polisaharidne tvari s ciljem stabilizacije BF. U prvoj fazi sazrijevanja BF postaje višeslojan te mu debljina iznosi oko 10 mikrona (Gupta et al. 2015). U ovoj fazi stvaranja BF porijekla bakterije *P. aeruginosa*, primijećena je produkcija triju polisaharida različitih funkcija. Alginat stupa u interakciju s vodom i nutrijentima te opskrbljuje BF istim (Rasamiravaka et al.

2015), a saharidi nazvani Pel i Psl čine oklopni dio strukture BF omogućujući njegovu stabilnost (Colvin et al. 2011; Franklin et al. 2011).

U drugoj fazi sazrijevanja koja predstavlja četvrtu fazu stvaranja BF, primijećeno je kompleksno i koordinirano ponašanje (Gupta et al. 2015). Zbog međusobne blizine povećava se međubakterijska izmjena supstrata, raspodjela metaboličkih produkata uz istodobno odstranjivanje toksina i neželjenih produkata (Davey and O'toole 2000). Naime, u ovoj fazi sazrijevanja, BF stvara odlično okruženje za osnivanje sintropičke zajednice (Davey and O'toole 2000). Sintropička zajednica predstavlja simbiozu u kojoj dvije metabolički različite bakterije ovise jedna o drugoj gdje jedna bakterija iskorištava produkt druge kao supstrat ili energetski izvor za vlastite metaboličke puteve (Davey and O'toole 2000). Debljina BF se u ovoj fazi povećava do 100 mikrona (Gupta et al. 2015).

U posljednjoj fazi sazrijevanja BF događa se rasap BF što znači promjena sesilnog oblika bakterijske populacije u pokretan (Hall-Stoodley et al. 2004). Ponovno se aktiviraju geni čiji su produkti proteini flagela. Bakterije ponovno postaju pokretne jer BF stvara saharolitičke enzime koji destabiliziraju polisaharide BF te se otpuštaju bakterije s površine BF s ciljem kolonizacije novih površina (Gupta et al. 2015).

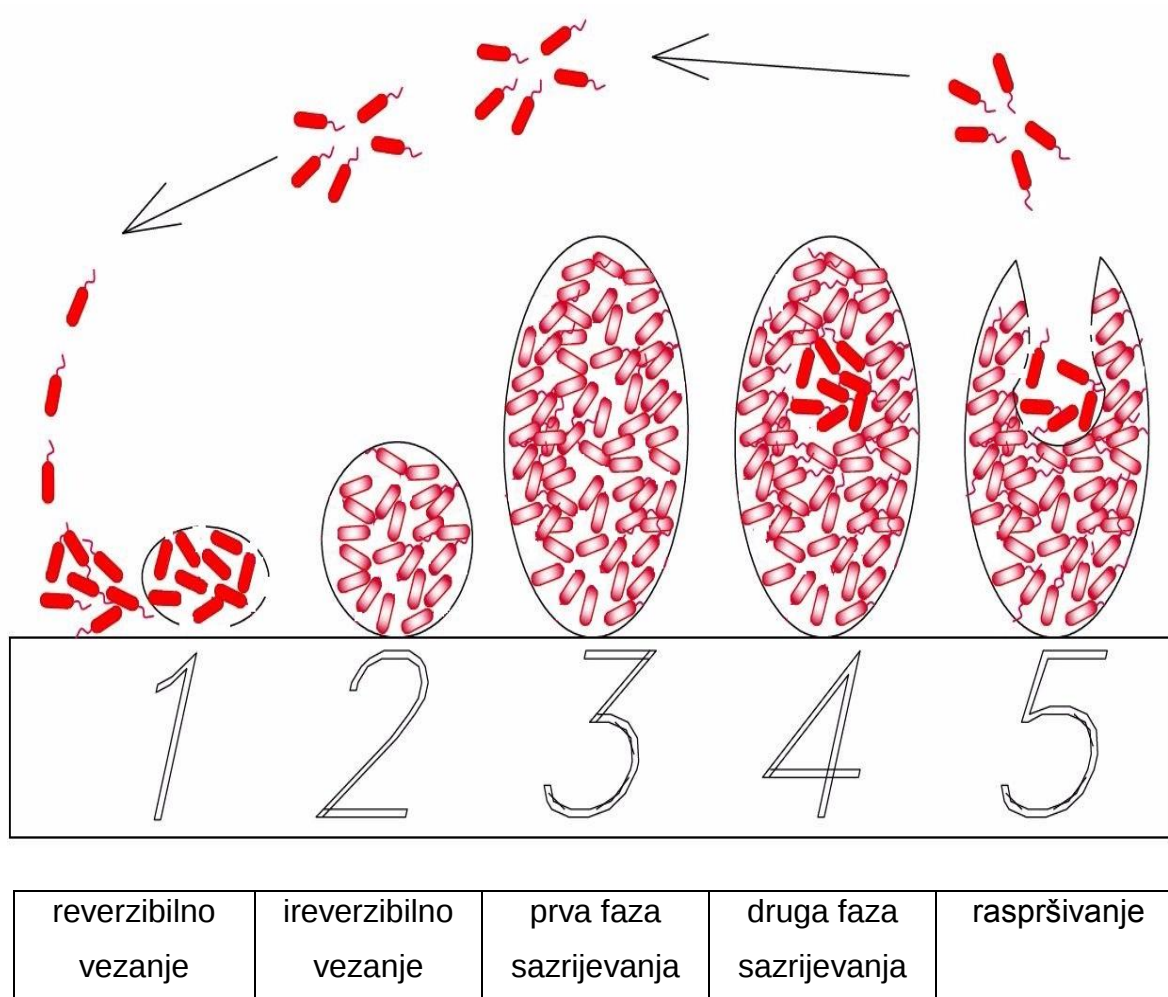
Rasap BF može biti posredovan proteazama, nukleazama i disperzinom B (Lauderdale et al. 2010; Kaplan et al. 2012; Shukla and Rao 2013; Reffuveille et al. 2014).

Proteaze kojima može biti posredovana disperzija su serinske proteaze (njih sedam), dvije cisteinske proteaze te metaloproteaza (Shaw et al. 2004). Stvaranje proteaza regulirano je QS sustavom (Bronner et al. 2004). Agr sustav (*quorum sensing* sustav zlatnog stafilokoka) regulira status virulencije stanice aktivacijom produkcije izlučenih toksina, enzima i smanjenjem izražaja površinskih faktora. Zanimljivo je da kolonizacija nosnica bakterijom *S. aureus* negativno korelira s kolonizacijom bakterijom *S. epidermidis* što može upućivati na lučenje raspršujućih tvari koje proizvodi zlatni stafilokok (Iwase et al. 2010).

Nukleazama posredovan rasap odnosi se na djelovanje nukleaza Nuc1 i Nuc2 (Tang et al., 2008). Nukleaza (Nuc ili Nuc1) regulirana je globalnim regulatorom sigB i tzv. SaeRS dvokomponentnim sustavom (Kiedrowski et al. 2011; Olson et al., 2013), a izražaj *nuc* gena smanjena je tijekom rasta BF (Olson et al., 2013). Nuc1 ima ulogu i

u ciklusu rasta BF. Uloga Nuc2 zasad je još uvijek nejasna. Pretpostavlja se da ima određenu ulogu u lokaliziranom rasapu. Dokazana je visoka aktivnost Nuc2 u endokarditisu (Lister L. J, Horswill R. A 2014).

Rasap je moguć i posredstvom disperzina B. Izoliran iz *Actinobacillus actinomicetemcomitans*, dokazano raspršuje BF bakterija *S. aureus* i *S. epidermidis* (Kaplan et al. 2004) Djelovanje ovog enzima temelji se na hidrolizi glikozidne veze polisaharidnog unutarstaničnog adhezina (PIA) koji je odgovoran za strukturnu cjelovitost BF (Lister L. J, Horswill R. A 2014).



Slika 1. Shematski prikaz pet faza stvaranja biofilma. U fazama 4. i 5. razvija se QS koji omogućava ponovni rasap i bakterijemiju (5. faza).

6.3. Štetni učinci biofilma

Mnogi su štetni učinci bakterijskog BF. Infektivne bolesti u oko 80 posto slučajeva (Cortes et al. 2011) imaju BF u bakterijskoj patogenezu. Jasno vidljivi (klinički) učinci zrelog BF očituju se pojavom BF na sluznicama i umjetnim medicinskim materijalima. Tada je nužno kao prvu liniju obrane upotrijebiti produljenu antibiotsku terapiju (osteomijelitis, endokarditis, infekcije udružene s produljeno ostavljenim kateterima). Kao drugu liniju obrane (u slučaju BF na umjetnim medicinskim materijalima) upotrebljavamo kiruršku eksciziju BF kontaminiranih izvora kao dugoročnu terapiju (Miller 2001; Kirsits 2006).

Jasan štetni učinak također je i promjenjena genski izražaj stanica članica BF u odnosu na bakterije iste populacije izvan BF, što se očituje sporijim rastom, povećanim izražajem virulentnih faktora te promjenom površinskih molekula. U BF je također olakšan prijenos gena među bakterijama što dovodi do povećanja broja virulentnih sojeva. Imunološki sustav sintetizira protuupalne citokine koji su nedjelotvorni protiv BF, a štetno djeluju ozljeđujući tkiva, najčešće okolinu BF, tj. imunološki sustav domaćina uzaludno se pokušava oduprijeti BF jer stanice BF brzo mijenjaju genski izražaj (Gupta et al. 2015).

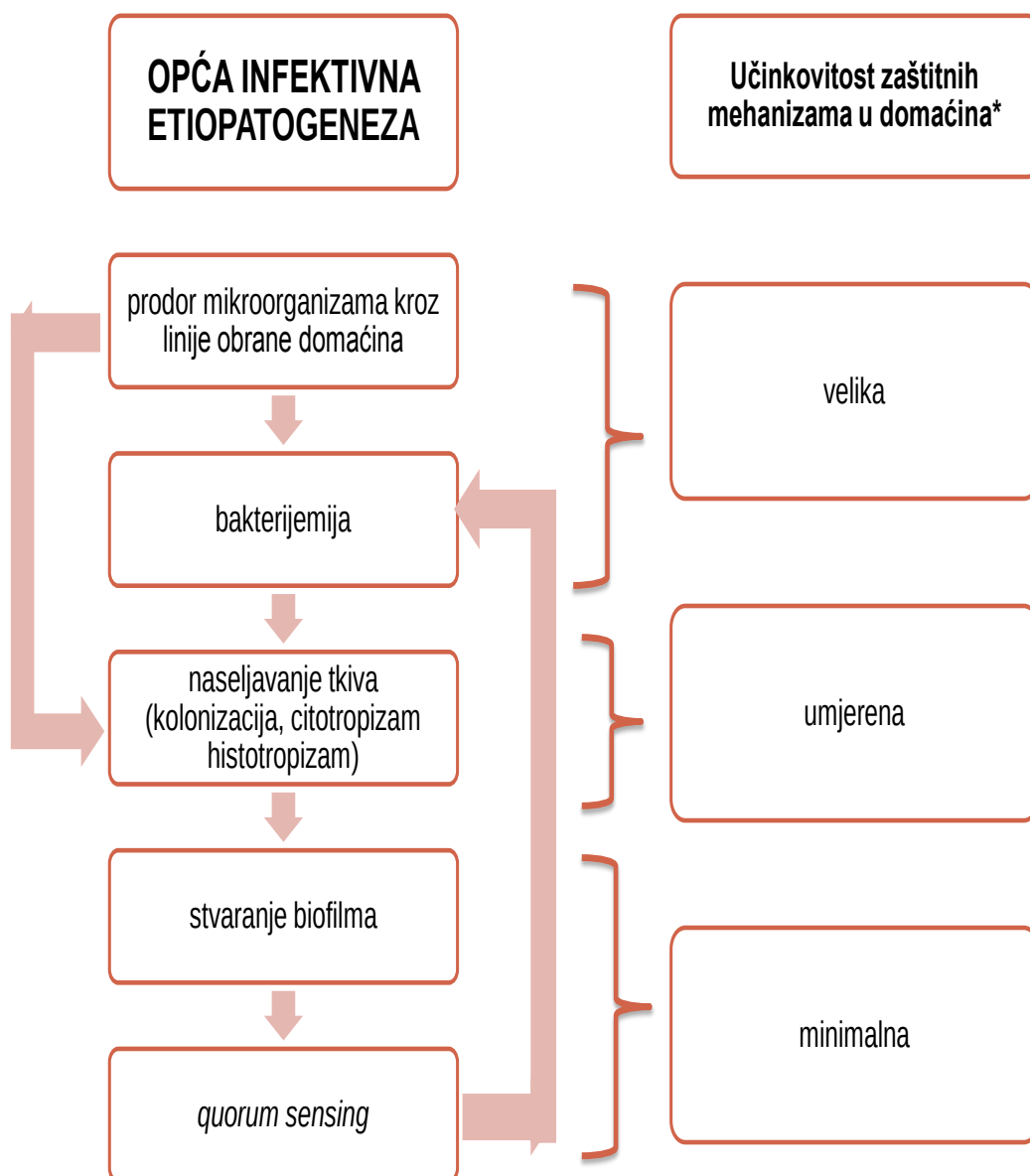
Dokazana je i usporena difuzija antibiotika kroz BF što značajno utječe na antibiotsku rezistenciju. Primijećena je i rezistencija protiv kemijskih sredstava i bakteriofaga. Osim zaštite od djelovanja antibiotika, bakterijski BF štiti bakterije od opsonizacije i neutrofila kojima, osim fizičke prepreke, na putu stoji i usporen metabolizam unutar BF (Gupta et al. 2015).

Postoji i jasno dokazan utjecaj QS na ljudske stanice što se očituje dvosmjernom komunikacijom između ljudskih stanica i stanica bakterijske populacije. Naime, AHL sintetiziran i izlučen od Gram pozitivnih bakterija mijenja T-stanični odgovor tipa 1 (T-stanice pomagači) u citokinski odgovor tipa 2 što uvjetuje povoljnije okruženje za bakterijski rast (Cámara 2002). Ako se uzme u obzir i dokazana stimulacija stvaranja mucina u dišnom epitelu (Tateda 2004), dokazana apoptotička učinkovitost QS-molekula prema neutrofilima (Tateda 2003) te poticaj vazodilatacije u mikrocirkulaciji (Lawrence 1999), svakako možemo zaključiti da postoji regulacija humanog imunog odgovora od strane patogena.

Poznato je da i ljudski hormoni stresa mogu biti prepoznati od *P. aeruginosa*, a dokazano je i postojanje receptora za interferon gama na vanjskoj membrani bakterije *P. aeruginosa*. Poznato je, naime, da visoke količine linterferona gama ugrožavaju i potencijalno ranjavaju domaćina (Asad & Opal 2008). Aktivacija virulentnih gena i invazivni fenotip patogena u osobe sklone stresu tijekom vremena povećava vjerojatnost infekcije u tog oslabljenog domaćina. Stoga se pretpostavlja da će inhibitori ovakvog stanično-staničnog komunikacijskog sustava biti novi način liječenja bakterijskih infekcija (Asad & Opal 2008).

7. Klinički važne infektivne bolesti udružene s biofilmom

Biofilm način je preživljavanja u neprijateljskom okruženju kojeg, za bakterijske infekcije, predstavlja čovjek. BF može postojati na biotičkim (Tablica 2.) i abiotičkim površinama (Tablica 3.). Etiopatogeneza kroničnog otitis media, kroničnog sinuitisa, periodontalne bolesti i karijesa, kroničnog tonzilitisa, kroničnog laringitisa, endokarditisa, kronične plućne infekcije u cističnoj fibrozi, bubrežnih kamenaca, infekcije bilijarnog trakta, infekcije urinarnog trakta, osteomijelitisa i kronične rane neposredno se povezuju s BF na navedenim (biotičkim) površinama. Infekcije povezane s pomagalicama i uređajima koji se koriste za dijagnostiku, praćenje i liječenje u medicini etiopatogenetski udružene s BF na abiotičkim površinama su infekcije povezane s unutarmaterničnim ulošcima, kontaktnim lećama, endotrahealnim tubama, centralnim i perifernim vaskularnim kateterima, protetskim srčanim zaliscima, *pacemakerima*, vaskularnim presadcima, urinarnim kateterima, ortopedskim usadcima i protetičkim zglobovima.



*Napomena: Prikaz se odnosi na zdravog domaćina. U stanjima u kojima su narušeni mehanizmi obrane (šećerna bolest, neutropenija, itd.) značajno je promijenjena njihova učinkovitost.

Slika 2. Opća infektivna etiopatogeneza. Važno je uočiti ulogu QS-a i biofilma u etiopatogenezi infektivnih bolesti. Naime, neovisno o tome je li se naseljavanje tkiva klicama dogodilo bez bakterijemije ili uključivo s bakterijemijom, rasap biofilma može uzrokovati bakterijemiju (posljednja faza u sazrijevanju biofilma) što ima veliki značaj u infektivnim bolestima. Još veći značaj QS-a i biofilma u etiopatogenezi infektivnih bolesti donosi činjenica minimalne mogućnosti obrane organizma domaćina ukoliko je u etiopatogenezu te konkretne infektivne bolesti uključen biofilm.

U početnoj fazi mikrobne invazije bakterijska populacija male je gustoće. Najvirulentniji geni nisu aktivni u korist sinteze površinskih adherentnih struktura i molekula koje inhibiraju imunoglobulin (Asad & Opal 2008). U trenutku kada je infekcija uzela maha, QS aparat je aktiviran, a genska aktivacija doprinosi s egzotoksinima, proteazama, hemolizinskim produktima te se simultano isključuje izražaj adhezinskih molekula što olakšava rasap bakterijskih patogena po organizmu (Asad & Opal 2008).

Problem s kojim se pokušavamo boriti u liječenju infekcija i držanjem istih pod kontrolom jesu povećava patogenost bakterija te zaštita bakterija unutar BF od uništenja vanjskom terapijom; zračenjem (ultraljubičasto zračenje), kemijskim agensima, fagocitozom, dehidracijom, antibioticima, primjenom pH stresa.

7.1. . Biofilm biotičkih površina u etiopatogenezi infektivnih bolesti

Karijes

Zubni karijes jedna je od najčešćih bolesti današnjice, a ujedno se smatra i najčešćom zaraznom bolesti jer pogađa 2, 43 milijuna ljudi što čini oko 36 posto globalne populacije (Vos et al. 2012.). Multifaktorijalna etiologija karijesa većim dijelom odnosi se na način prehrane, ali na razvoj karijesa utječu i okolišni i imunološki čimbenici. BF koji u obliku plaka adherira na zubnu površinu ima ključnu ulogu u nastanku zubnog karijesa (O'Donnell et al. 2015). BF oštećuje površinu zuba stvarajući velike količine mliječne kiseline. Početno, karijes je bio povezan s bakterijama *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* spp. (Loesche 1986; Badet i Thebaud 2008). Nedavno provedene studije navode polimikrobnu etiologiju karijesa (Belda et al. 2012; Simon & Soro, Guillen & Navarro 2014). Sada je jasno da i *Candida albicans* uz sinergističko djelovanje *S. mutans* aktivno utječe na stvaranje karijesa (Metwalli et al. 2013.). Postoje, naime, dokazi o postojanju matriksa unutar kojeg se nalaze streptokoki povezani i isprepleteni s mrežom hifa na površini zuba što govori o interakciji bakterija i gljiva u cilju uzrokovanja karijesa (O'Donnell et al. 2015).

Periodontalna bolest

Periodontalna bolest (PB) kompleksna je bolest uzrokovana interakcijama domaćinove bakterijske flore i patogenih bakterija. U istraživanju provedenom u Ujedinjenim Američkim Državama periodontalnu bolest ima 50 posto populacije mlađe od 30 godina i oko 70 posto starijih od 65 godina (Eke et al. 2012). U početnoj, blažoj i reverzibilnoj formi (gingivitis) bolest je karakterizirana bolnim otokom i krvarenjem desni. U težoj i ireverzibilnoj fazi bolest je karakterizirana uništenjem potpornog periodontalnog ligamenta i progresivnom resorpcijom kosti (O'Donnell et al. 2015). Bolest započinje formiranjem supragingivalnog plaka (O'Donnell et al. 2015) koji se nastavlja povećavati uz promijenjene mikrookolišne uvijete, kao što je promjena redoks potencijala i vrijednosti pH omogućujući anaerobnim klicama naseljavanje i stvaranje subgingivalnog plaka. Stvoreni supregingivalni i subgingivalni plak je BF.

Udio kandidate u supragingivalnom i subgingivalnom plaku povećava se što je bolest više uznapredovala, dakle, u težoj i kroničnoj fazi bolesti kandida zauzima veći udio plaka (Canabarro et al. 2012). Povezanost učestalosti prisutnosti kandidate u plakovima veća je u pacijenata oboljelih od šećerne bolesti (Sardi et al. 2012). Ova činjenica može biti povezana sa povećanim rastom *C. albicans* u povoljnijim uvjetima kao što je viša razina šećera u krvi u dijabetičara. Također, u žena koje koriste oralnu kontracepciju češći su plakovi s većim udjelom kandidate nego u ostale populacije (Zakout et al. 2012). Ta činjenica može upućivati na pozitivni hormonalni poticaj kandidi na kolonizaciju i stvaranje BF.

Sastav BF u usnoj šupljini određen je količinom i vrstom nutrijenata, plinova te karakteristikama biookoliša. Sasvim je jasno da, osim bakterija, ulogu u stvaranju BF kao podloge PB i karijesa ima i *C. albicans* (O'Donnell et al. 2015).

Kronični rinosinitis

Kronični rinosinitis širok je klinički sindrom kojeg karakterizira produljena mukozna upala nosa i paranazalnih sinusa. U zapanom svijetu oko 10 posto odraslih boluje od kroničnog rinosinitisa (Fokkens 2012). Sindrom uključuje nosnu opstrukciju, nosni iscjedak, bolnost u licu i njušnu disfunkciju. Kroničnim se označava ako postoje najmanje dva od navedena četiri simptoma kroz dvanaest tjedana i više. Kao osnovni patofiziološki mehanizam u nastanku kroničnog rinosinitisa navodi se stvaranje bakterijskog BF (Gupta et al. 2015), a najčešći uzročnici su *S. aureus* (koji je ujedno i najčešći uzročnik u teško lječivih kroničnih rinosinitisa) zatim *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa* (Foreman and Wormald 2010; Stephenson et al. 2010).

Kronični otitis media

Otitis media (OM) ili upala srednjeg uha najčešći je razlog posjeta liječniku u dječjoj dobi nakon obične prehlade (Lam et al. 2015). Oko dvije trećine dječje populacije do treće godine najmanje jednom oboli od akutne upale srednjeg uha (Lam et al. 2015). Kronični OM dijeli se u rekurentni i eksudativni podtip (Pereira 2004; Hall-Stoodley 2006). Dijagnoza rekurentnog OM se postavlja nakon tri ili više epizoda OM tijekom šest mjeseci između kojih nema kliničkih znakova bolesti. Dijagnoza eksudativnog OM postavlja se ukoliko sekrecija traje dulje od tri mjeseca (Vraneš & Leskovic 2009). Važno je napomenuti da je kronični OM najčešći uzrok oštećenja sluha provodnog tipa u dječjoj dobi, što za posljedicu može imati otežan razvoj govora te poremećaj psihomotornog razvoja (Vraneš & Leskovic 2009). Istraživanjima provedenim na animalnim modelima dokazana je prisutnost BF i uzročna povezanost BF s kroničnim OM (Dohar 2005). Najčešći uzročnici kroničnog OM su *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* i *Moraxella catarrhalis*, a rjeđi su *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* i *Pseudomonas aeruginosa* (Ehrlich 2002; Park 2004). Liječenje kroničnog OM antibioticima u pravilu je bezuspješno (Vraneš & Leskovic 2009).

Kronična plućna infekcija u bolesnika s cističnom fibrozom

Cistična fibroza (CF) je jedna od najčešćih autosomnih nasljednih bolesti, a očituje se poremećajima funkcije brojnih sustava. Temeljni poremećaj je mutacija gena za cistično-fibrozni transmembranski regulator provodljivosti (CFRT) (Gamulin & Kovač 2005). Dosad je opisano više od 900 različitih mutacija koje na različite načine mijenjaju strukturu gena i odgovarajuću građu bjelančevine. Bjelančevina koju programira CFRT gen jest transmembranski kloridni kanal čiju propusnost regulira adeozin-trifosfat i ciklički adenozin-monofosfat. Nalazi se na membranama epitelnih stanica bronhalnog stabla, crijeva, egzokrinog dijela gušterače, žučnih kanala, znojnih žlijezda. Najčešća je mutacija gubitak 508. kodona (TTT) što uzrokuje gubitak

fenilalanina na 508. mjestu aminokiselinskog slijeda bjelančevina CFRT (Gamulin & Kovač 2005). Posljedica mutacije se očituje kao zastoj u sazrijevanju CFRT pa se CFRT ne pojavljuje u membrani stanica što uzrokuje smanjenje propusnosti za kloride. Poremećena je i funkcija natrijevih kanala, a posljedično tome smanjuje se prolaz natrija i vode (radi održanja osmolarnosti). Najteže su posljedice u dišnom sustavu. Sekret u bronhalnom stablu je gust pa je djelovanje trepetiljka otežano. To pogoduje kolonizaciji klica. Klice izazivaju imunosnu reakciju, koja izaziva upalu, a upala oštećuje stanice što dalje pogoršava postojeće stanje. Stanični ostaci povećavaju gustoću sekreta što dodatno otežava odstranjivanje bakterija te se tako začarani krug zbivanja zatvara (Gamulin & Kovač 2005). Nastaje teški kronični bronhitis čija etiopatogeneza neizostavno uključuje stvaranje BF.

Virulom je potisnut u djelovanju kada je bakterijska populacija (*P. aeruginosa*) mala što prevenira ranu detekciju i omogućava izbjegavanje aktivacije imunološkog sustava usmjerenog protiv imunostimulirajućih virulentnih faktora u inicijalnoj fazi kolonizacije domaćina. Kada gustoća populacije prijeđe prag, aktiviraju se replikacijski programi i potpuni izražaj virulentnih programa (Duan 2003; Murray 2007)

Eksperimentalna delecija gena odgovornih za funkciju QS-a u *P. aeruginosa* dešifrirala je ulogu QS-a in vivo u virulenciji i stvaranju BF u pneumoniji i bakterijemiji. Naime, BF porijekla takvih bakterija oštećen je i poremećene je strukture. Virulencija i potpuna funkcija biofilma vraća se komplementarnim eksperimentom u kojem se u bakteriju umeće plazmid koji nadomješta deletirane gene (Kirisits 2003; Smith 2003).

Orofaringealna bakterijska flora otpušta AI-2 signale u respiratorni trakt koje *P. aeruginosa* prepoznaje u mikrobnoj zajednici u npr. oboljelih od cistične fibroze ili u difuznom panbronhilitisu. Čini se da naizgled neškodljiva orofaringealna flora povećava ozljedu pluća u infekcije *P. aeruginosa* u animalnim modelima otpuštanjem AI-2 signala koji potiču izražaj pseudomonasnih virulentnih gena (Duan 2003; Murray 2007). Značajna količina AI-2 može se mjeriti u sputumu oboljelih od CF, što je od kliničkog značaja u nekih pacijenata oboljelih od pseudomonasne pneumonije (Murray 2007).

Viskozna sluz koja ometa disanje ključni je čimbenik u razvoju infekcija uzrokovanih bakterijama *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae*. Zanimljivo je da je u mlađih

pacijenata oboljelih od cistične fibroze dokazana kolonizacija s *H. influenzae* i zlatnim stafilokokom, a u odraslih pseudomonasne kolonije (Koch and Hoiby 1993; Lyczak et al. 2002). Prisutstvo *P.aeruginosa* loše utječe na pluća u oboljelih od cistične fibroze, a prisutnost bakterija može se testirati mjerenjem homoserin laktona u sputumu tih pacijenata (Singh et al. 2000).

Kronične infekcije mokraćnog sustava

Infekcije mokraćnog sustava (IMS) su, nakon respiratornih, bakterijske infekcije druge po učestalosti (Vraneš & Leskovar 2009). Ove infekcije se najčešće javljaju u mladih, zdravih i spolno aktivnih žena. Gotovo 80 posto žena svjetske populacije tijekom života ima najmanje jednu IMS, a 27 do 44 posto od ovih bolesnica unutar sljedećih šest mjeseci ima, unatoč adekvatnoj antimikrobnoj terapiji, rekurentnu epizodu bolesti (Gupta 2005). U gotovo 80 posto IMS se kao uzročnik izolira uropatogena *Escherichia coli* (UPEC) (Vraneš 2003; Anderson 2004).

Život u BF zajednička je karakteristika u *E. Coli* infekcijama udruženih s kateterskim i sluzničnim površinama (Asad & Opal 2008). UPEC je evoluirala i razvila svojstvo invazije u stanice pločastog epitela gdje obitava u stabilnim zajednicama izbjegavajući na taj način mehanizme imunološkog sustava i mehanizme čišćenja mokraćnog sustava. Naime, u 18 posto mladih, spolno aktivnih žena s cistitisom (*E.coli* kao uzročnik) dokazano je postojanje sesilnih zajednica u unutarstaničnom odjeljku epitelnih stanica mokraćnih puteva pacijenata s infekcijama mokraćnih puteva, a u 41 posto žena s cistitisom se u uzetim uzorcima urina nalaze dokazi o filamentoznim bakterijskim oblicima što je znak sesilnih bakterijskih kolonija (BF) (Asad & Opal 2008).

Infekcija kronične rane

Kronične rane nastaju endogenim mehanizmima koji su povezani s nekim predisponirajućim stanjima. Primjeri kroničnih rana su dijabetički ulkus (predisponirajuće stanje je metabolička bolest) i venski ulkus (predisponirajuće stanje je oštećenja arterijskog odnosno venskog protoka) (Bowler 2001). Kronične rane najčešće su inficirane bakterijama *S. aureus* i/ili *P. aeruginosa* (Gupta et al. 2015).

Zbog dugotrajnosti infekcije te rezistencije na antimikrobne lijekove, pretpostavlja se da bakterije kao *S. aureus* i *P. aeruginosa* koje koloniziraju kronične rane stvaraju BF (Vraneš 2003). Zanimljivo je da je čak 88 do 98 posto rana pozitivnih na *S. aureus* (površina rane). U bazi rane najčešće je pozitivna bakterija *P. aeruginosa*, a njome inficirane rane uglavnom su veće rane u usporedbi s onim ranama koje nisu inficirane (Gupta et al. 2015). Uz rezistenciju na antimikrobne lijekove, osnovni problem predstavlja činjenica da je svim inficiranim ranama potrebno više vremena za cijeljenje i reepitelizaciju.

Osteomijelitis

Osteomijelitis je upala kostiju koja je gotovo uvijek uzrokovana bakterijskim infekcijama. Iako bilo koji živi patogen može uzrokovati osteomijelitis, najčešći uzročnik je *S. aureus* koji stvara BF, a može se izolirati iz gnoja u kostima u oko 85 posto bolesnika (Lew & Waldvogel 2004; Damjanov, Jukić i Nola 2011). Nakon bakterija, drugi uzročnici po učestalosti su gljive. Osteomijelitis može nastati na tri načina: izravnom inokulacijom bakterija, hematogeno ili izravnim širenjem iz zglobova ili periostalnog mekog tkiva. Najčešći način nastanka osteomijelitisa je izravna inokulacija bakterija nastala pri zadobivanju prostrijelne rane ili traumi s frakturom (Damjanov, Jukić i Nola 2011). Dokazano je da *S. aureus* ima receptore kojima može vezati fibrinogen koji je prisutan u matriksu i time može započeti stvaranje biofilma. Afinitet stafilokoka da veže fibronektin, kolagen i laminin olakšava patogenima kolonizaciju kosti formiranjem biofilma (Ciampolini and Harding 2000). U krvlju prenesenom osteomijelitisu, metafiza je prva inficirana, a zatim na mjesto infekcije dolaze leukociti. Leukociti pokušavaju uništiti patogen sekrecijom enzima koji u konačnici liziraju kost. Stvara se gnoj koji se širi krvnim žilama kosti te se na taj način zaustavlja adekvatni krvni protok kroz kost pa kost postaje devitalizirana (Kumar et al. 2007) te propada ukoliko se ne pribjegne odgovarajućoj prilagođenoj antimikrobnoj terapiji.

Tablica 2. Infektivne bolesti udružene s biofilmom na biotičkim površinama i mikrobiološki uzročnici.

Infektivne bolesti udružene s biofilmom na biotičkim površinama	Mikroorganizmi koji stvaraju biofilm
Karijes	<i>S. mutans</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>C.albicans</i>
Periodontalna bolest	<i>S. mutans</i> , <i>Lactobacillus</i> spp., <i>C.albicans</i>
Kronični rinosinitis	<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Kronični otitis media	<i>H.influenzae</i> , <i>S.pneumoniae</i> i <i>Moraxella</i> <i>catarrhalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S.</i> <i>pyogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Kronična plućna infekcija u bolesnika s cističnom fibrozom	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i>
Kronične infekcije mokraćnog sustava	<i>E. coli</i>
Kronične infekcije rane	<i>S. aureus</i> i <i>P. aeruginosa</i>
Osteomijelitis	<i>S. aureus</i>

7.2. Biofilm abiotičkih površina u etiopatogenezi infektivnih bolesti

Centralni i periferni venski kateteri

Centralne i periferne venske katetere uputno je koristiti u uskim indikacijama za koje su namijenjeni, a pravilu se odnose na upotrebu u hitnoj medicini i primjenu u jedinicama intenzivne skrbi. Uputno ih je koristiti ukoliko se ničim drugim ne mogu zamijeniti. Primjena katetera ove vrste povezuje se s visokim rizikom za infekcije udružene s BF. BF se može stvarati u lumenu i na površini katetera. Najčešći uzročnici infekcija u i/ili na kateterima su *S. aureus*, *S. epidermis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* te *C. albicans* (Asad & Opal 2008).

Rizik od infekcije raste s brojem dana postavljenog katetera u krvnu žilu, a s obzrom da je postavljenost centralnih i venskih katetera dulje od deset dana uzročno povezano sa infekcijama etiopatogenetski povezanih s BF na abiotičkim površinama (Asad & Opal 2008), nakon deset dana preporučuje se zamjena ili uklanjanje katetera. Također, rizik od infekcije raste ukoliko je osoba kojoj treba kateterizacija imunokompromitirana bilo konstitucionalno, zbog bolesti ili jatrogeno te ako boluje od šećerne ili maligne bolesti.

Urinarni kateteri

Kateterizacija mokraćnoga mjehura je rutinski postupak kojim se omogućava drenaža urina i, iako je jednostavan postupak, zahtijeva standardiziran pristup i provedbu zbog mogućih popratnih komplikacija. Najčešća komplikacija vezana uz kateterizaciju je IMS, koja sa sobom nosi značajan morbiditet i mortalitet (Markić et al. 2014). Upotreba urinarnih katetera građenih od silikona ili lateksa navodi se kao jedan od rizičnih čimbenika za češću pojavu IMS. Uzročnici IMS povezanih s upotrebom urinarnih katetera koji stvaraju BF u su *E. coli*, *S. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. epidermis*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* te Gram negativne bakterije (Asad & Opal 2008). Kateterski sustav može biti otvoreni (takav sustav kateterizacije podrazumijeva drenažu urina u otvorenu posudu za mokraću koja se nalazi u blizini bolesničkog kreveta) ili zatvoreni (sustav koji omogućuje drenažu urina u zatvorenu i

vodonepropusnu vrećicu). Kronične infekcije mokraćnog sustava češće su pri primjeni otvorenog kateterskog sustava (Asad & Opal 2008). Infekcije mokraćnog sustava udružene s urinarnim kateterima relativno su refraktorne na djelovanje mnogih antibiotika što predstavlja problem u liječenju istih (Vraneš 2003; Anderson 2004).

Unutarmaternični uložak

Unutarmaternični uložak jedna je od najdjelotvornijih metoda kontracepcije. Iako različite studije upućuju na prednosti unutarmaterničnog uložka pri izboru metode kontracepcije, negativna posljedica primjene je mogući razvoj infekcije. Prisutnost stranoga tijela u maternici omogućuje adheriranje bakterija na površinu uložka i stvaranje BF (Orešković et al. 2010). Najčešći uzročnici unutarmaterničnih infekcija povezanih s biofilmom su *E. coli* i *U. urealyticum* (Orešković et al. 2010), ali pri liječenju treba misliti i na neke rjeđe uzročnike unutarmaterničnih infekcija kao što su *S. epidermis*, *C. albicans*, *S. aureus* i *L. plantarum* (Asad & Opal 2008).

Infekcije koje nastaju kao posljedica formiranja BF na unutarmaterničnom ulošku kronične su i teško izlječive. Stoga, prije postavljanja uložka treba isključiti prisutnost infekcije. Ako je dokazana infekcija, potrebno je odgoditi stavljanje unutarmaterničnog uložka do izlječenja.

Kontaktne leće

Kontaktne leće su prozirna optička sredstva omeđena dvjema površinama koja se postavljaju na rožnicu. Prema upotrebi se dijele na korektivne, terapijske i kozmetske leće. S obzirom na učestalost korištenja kontaktnih leća, bitno je naglasiti da, ovisno o odnosu pacijenta prema higijeni i pravilima upotrebe, imaju određene nuspojeve među kojima su jedne od najučestalijih keratitisi etiopatogenetski povezani s BF. Klinička slika keratitisa ovisi o tipu i sastavu leća, elektrolitskom statusu oka te o karakteristikama mikroorganizma. Bakterije koje se povezuju sa stvaranjem BF povezanog s kontaktnim lećama su *S. epidermis*, *C. albicans*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* (Asad & Opal 2008). Također, u

literaturi se navodi parazit *Acanthamoeba* kao jedan od uzročnika keratitisa u skupini pacijenata koji primjenjuju kontaktne leće. Karakteriziran je izrazitom boli te formiranjem prstenastog apscesa koji nosi visok rizik od perforacije rožnice. Oporavak je izrazito spor te uključuje antibiotike i antiseptike, ali ipak, za pacijente s *Acanthamoeba* keratitisom, najčešća konačna terapija je totalna keratoplastika, tj. transplantacija rožnice. (Cеровski et al. 2012).

Periprotetičke infekcije

Periprotetičke infekcije su bakterijske upale kosti i mekih tkiva oko ugrađenog umjetnog zgloba, tj. endoproteze ili oko ugrađenog implanta, najčešće metalnih pločica vijaka i čavala. Učestalost ove komplikacije u ortopedskim operacijama varira prema literaturi od 1 do 16 posto. Za razvoj periprotetičkih infekcija patogenost bakterija jednako je važna kao i lokalni čimbenici (kost obrambeno i farmakološki spada u "nižu" razinu tkiva). Implantat u kosti bilo kakve vrste i veličine povećava osjetljivost kosti na infekciju, narušava funkcionalnu fagocitozu bakterija, a smanjuje se i funkcija leukocita te se tako stvara lokalna imunodeficijencija. U tim uvjetima dovoljan je mali broj bakterija za početak infekcije. Nakon ugradnje ortopedskog implantata nastaje kompetitivno natjecanje za adherenciju na površinu u kojoj sudjeluju proteini izvanstaničnog matriksa, stanice domaćina, ali i bakterije. Ukoliko je virulencija bakterija i njihov broj dostatan, bakterije formiraju BF. Najčešći uzročnici periprotetičkih infekcija, koje su povezane sa stvaranjem BF su *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* te *E. coli* (Đapić, 2016). Dugotrajna primjena antibiotika samo privremeno suprimira infekciju okolnih tkiva, ali po prestanku primjene simptomi infekcije se ponovno pojave. Potpuno izlječenje periprotetičkih infekcija s formiranim biofilmom bez uklanjanja implanta najčešće nije moguće.

Infekcija je jedna od najozbiljnijih komplikacija svih aloartroplastika. Liječenje je dugotrajno. Rješavanje ove komplikacije znatno povećava troškove liječenja. U liječenju infekcije nakon aloartroplastike koriste se liječenje antibioticima, debridman u kombinaciji s protočnom drenažom i parenteralnom antibiotskom terapijom, resekcionalna artroplastika, artrodeza, realoartroplastika u jednom ili dva akta te amputacija (Đapić, 2016).

Pacemaker

Srčana elektrostimulacija posredstvom srčanog *pacemaker*-a je vrlo učinkovita metoda liječenja aritmija, ali, kao i svaka metoda liječenja, donosi moguće rane ili kasne komplikacije koje mogu biti više ili manje opasne po zdravlje pacijenta koji koristi uređaj. Postoje znanstveno utemeljeni dokazi o riziku infekcija i stvaranja biofilma udruženog s *pacemaker*-om (Santos et al. 2011). Incidencija pojavnosti infekcija udruženih s implementacijom *pacemaker*-a ne mogu se odrediti jer sve studije koje prikazuju ovaj problem navode prevalenciju ili navode BF udružen s elektrostimulatorom kao klinički problem u kardiologiji (Santos et al. 2011). Najčešće izolirane bakterije biofilma udruženog s *pacemaker*-om su *S. epidermidis* i *S. aureus*. Učinkoviti način liječenja u slučaju suspektnog BF stvorenog na *pacemaker*-u koji se isticao među svima je uklanjanje *pacemaker*-a (Santos et al. 2011). Antibiotiska profilaksa u smanjenju incidencije infekcije udružene s implantacijom *pacemaker*-a još uvijek se smatra kontroverznom.

Žilni presadci

Infekcije udružene s žilnim presadcima uvijek rezultiraju lošim kliničkim ishodom s visokom kratkoročnom stopom smrtnosti, bez obzira na napretke postignute u antimikrobnoj terapiji i kirurškim tehnikama. Najčešće izolirane bakterije porijekla BF stvorenog na žilnim presadscima su *S. aureus* te meticilin rezistentan *S. aureus* (MRSA). Bakterijemija uzrokovana sojem MRSA povezana je s većom stopom mortaliteta u odnosu na bakterijemiju uzrokovanu ostalim mikroorganizmima (Cirioni, 2011). Osnovni etiopatogenetski mehanizam infekcija udruženih s žilnim presadcima je zreli všeslojni BF. Antibiotiska terapija i profilaksa u liječenju BF ove vrste u pravilu podbaci zbog kapaciteta bakterija članica BF koje su mnogo otpornije na liječenje u odnosu na slobodne (planktonske) bakterije (Cirioni, 2011).

Mehanički srčani zalisci

Mikroorganizmi se mogu prihvatiti i stvarati BF na mehaničkim srčanim zaliscima i okolnom srčanom tkivu što vodi do razvitka endokarditisa udruženog s mehaničkim zaliscima. Bakterije koje stvaraju BF na mehaničkim srčanim zaliscima su *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus* spp., Gram-negativni bacili, difteroidi, enterokoki i *Candida* spp. (Donlan, 2001). Porijeklo navedenih mikroorganizama može biti koža u toku operacije (rani endokarditis u pravilu uzrokovan *S. epidermidis*), ekstrakcija zuba (*Streptococcus* spp.) ili postavljanje centralnog vaskularnog katetera (svi mikroorganizmi navedeni ranije u tekstu). Implantacija mehaničkog srčanog zaliska uzrokuje tkivno oštećenje što akumulira cirkulirajuće trombocite i fibrin na mjestu implantiranog zaliska. Mikroorganizmi imaju veću tendenciju kolonizirati srčano tkivo koje okružuje mehanički zalistak nego sam zalistak (Donlan, 2001). Antimikrobni lijekovi se u pravilu primjenjuju tokom zamjene zalistaka kao i svaki put pri provedbi invazivnog dentalnog zahvata kako bi se spriječila adherencija mikroorganizama u krvi.

Tablica 3. Infektivne bolesti udružene s biofilmom na abiotičkim površinama i mikrobiološki uzročnici.

Infektivne bolesti udružene s biofilmom na abiotičkim površinama	Mikroorganizmi koji stvaraju biofilm
Centralni i periferni venski kateteri	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> te <i>C. albicans</i>
Urinarni kateteri	<i>S. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , Gram negativne bakterije
Unutarmaternični uložak	<i>S. epidermidis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. plantarum</i>
Kontaktne leće	<i>S. epidermidis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Periprotetičke infekcije	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>E. coli</i>
Pacemaker	<i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>
Vaskularni presatci	<i>S. aureus</i> , MRSA
Mehanički srčani zalisci	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. spp.</i> , Gram negativni bacili, difteroidi, enterokok, <i>Candida spp.</i>

8. Antibiotiska rezistencija

Postavlja se pitanje zašto je rezistencija bakterija članica BF nekoliko desetaka do tisuća puta veća u odnosu na planktonske stanice (Vraneš & Leskovar 2009) te zašto postojeći antibiotici i antifungici nisu dovoljni u eradikaciji infektivnih bolesti porijekla BF. Iako je upravo rezistencija bakterija članica BF glavni predmet brojnih istraživanja, još uvijek su sva objašnjenja teorijska bez konkretnih dokaza o mehanizmima rezistencije.

Prva hipoteza antibiotske rezistencije govori o nemogućnosti prodiranja antibiotika kroz BF (Stewart and Costerton 2001) i o degradaciji antibiotika pri prolasku kroz BF čime se smanjuje učinkovitost (Gupta et al. 2015). Također, primijećeno je da se antibiotici adsorbiraju na vanjsku površinu izvanstaničnog polimernog matriksa (Kumon et al. 1994; Shigeta et al. 1997). Uz to, privlačne sile između pozitivno nabijenog antibiotika i negativnog naboja lipopolisaharida matriksa priječe prolazak antibiotika u dublje dijelove BF čime se onemogućuje djelovanje antibiotika na bakterijsku stanicu jer ne dolazi u njezinu blizinu (Gordon et al. 1988; Nichols et al. 1988).

Druga hipoteza vezana je uz uvjete mikrookoliša (Gupta et al. 2015). Promjena koncentracije kisika koja uvjetuje anaerobne uvjete u dijelovima BF uz površinu (de Beer et al. 1994) čini aminoglikozide nedjelotvornima (Tack and Sabath 1985). Nakupljanje toksina i potrošnja potrebnih supstrata uvode bakteriju u latentni oblik što penicilin čini nedjelotvornim (Tuomanen et al. 1986). Također, promjena pH smanjuje aktivnost antibiotika (Stewart and Costerton 2001). Ukoliko se dogodi osmotski stres, smanjuje se broj porina te se tako smanjuje mogućnost ulaska antibiotika u bakterijsku stanicu (Stewart and Costerton 2001).

Treća hipoteza govori u prilog razvoja zaštitnog fenotipa male populacije klica unutar BF koji je odgovoran za razvoj rezistencije. Rezistentni fenotip ekvivalent je sporama (Gupta et al. 2015).

Najnovija hipoteza govori u prilog postojanja perzistera odgovornih za rezistenciju (Vraneš & Leskovar 2009). Iako se o perzisterima vrlo malo zna, poznato je da je to vrlo mala frakcija stanica biofilma (čiji udio u biofilmu je svega 0,1-10%) koja

neovisno o vrsti, dozi i duljini primijenjene antimikrobne terapije perzistira (Lewis 2001; Lewis 2007). Osnovna razlika prema ostalim bakterijskim stanicama je neosjetljivost na antimikrobnu terapiju (Roberts 2005). Naime, većina stanica članica BF kao i stanice koje se odvoje od matičnog BF (i svojim karakteristikama vrate se u početnu slobodnu formu stanice) pokazuju osjetljivost na antimikrobnu terapiju. Ta antimikrobna terapija je djelotvorna, ali ponekad mora biti modificirana (promjena duljine primjene ili vrste antibiotka) osim ako se radi o perzisterima. Pretpostavlja se da su to stanice koje su učinile spontanu fenotipsku preobrazbu (Vraneš & Leskovic 2009), ali ih se ne smatra mutantima (Lewis 2005) ili pak stanicama zaustavljenim u nekom od stadija staničnog ciklusa (Lewis 2001). Nažalost, nepoznat je mehanizam nastanka perzistera. Dokazano je da perzisteri ne nastaju kao odgovor na antimikrobnu terapiju (Lewis 2005; Lewis 2007), a osim toga dokazano je i da *quorum sensing* signali proizvedeni tijekom međustanične komunikacije nemaju veze s nastankom perzistera (Lewis 2005; Lewis 2007). Zanimljivo je da perzisteri postoje i u planktonskim kulturama (Lewis 2001; Lewis 2007), ali na perzistere BF, s obzirom da su unutar BF zaštićeni egzopolisaharidnim matriksom (Lewis 2001; Lewis 2007), imunološki sustav ne djeluje te (p)ostaju visoko rezistentni. Nakon prekida antimikrobne (antibiotske) terapije, perzisteri obnavljaju BF, oslobađaju se nove planktonske stanice te se simptomi bolesti vraćaju (Lewis 2001; Lewis 2005). Perzisteri mogu biti osjetljiviji na antimikrobnu terapiju ukoliko se u farmakoterapiju implementiraju i raspršujuća sredstva kao što je disperzin B, proteinaza K ili DNaze (Lauderdale et al., 2010; Kaplan et al., 2012; Shukla and Rao, 2013; Reffuveille et al., 2014).

Rasap BF može biti posredovan proteazama, nukleazama i disperzinom B (Lauderdale et al. 2010; Kaplan et al. 2012; Shukla and Rao 2013; Reffuveille et al. 2014).

Proteaze kojima može biti posredovan rasap su serinske proteaze (njih sedam), dvije cisteinske proteaze te metaloproteaza (Shaw et al. 2004). Stvaranje proteaza regulirano je QS sustavom (Bronner et al. 2004).

Nukleazama posredovan rasap odnosi se na djelovanje nukleaza Nuc1 i Nuc2 (Tang et al., 2008). Nukleaza (Nuc ili Nuc1) regulirana je globalnim regulatorom sigB i tzv. SaeRS dvokomponentnim sustavom (Kiedrowski et al. 2011; Olson et al., 2013), a izražaj *nuc* gena smanjena je tijekom rasta BF (Olson et al., 2013). Nuc1 ima ulogu i

u ciklusu rasta BF. Uloga Nuc2 zasad je još uvijek nejasna. Pretpostavlja se da ima određenu ulogu u lokaliziranom rasapu

Rasap je moguć i posredstvom disperzina B. Izoliran iz *Actinobacillus actinomicetemcomitans*, disperzin B dokazano raspršuje BF bakterija *S. aureus* i *S. epidermidis* (Kaplan et al. 2004). Djelovanje ovog enzima temelji se na hidrolizi glikozidne veze polisaharidnog unutarstaničnog adhezina (PIA) koji je odgovoran za strukturnu cjelovitost BF (Lister L. J, Horswill R. A 2014).

9. Zaključak

Množinska samoregulacija (*quorum sensing*, QS) predstavlja središnju komponentu bakterijske komunikacije. Njome bakterije mogu komunicirati međusobno, unutar i izvan svoje vrste, a ovakva vrsta komunikacije prelazi i barijere kraljevstava. QS komunikacijski sustavi bitno utječu i na ljudske stanice. Dokazan patofiziološki mehanizam stvaranja BF kao podloge bakterijskih infektivnih bolesti mijenja postupak liječenja pacijenta; najčešće podrazumijeva dugotrajniju antibiotsku terapiju, a ponekad i agresivnije metode liječenja. Uzrok tome je razvijena bakterijska rezistencija usmjerena protiv antibiotika i drugih antimikrobnih metoda liječenja. Iako još uvijek nisu poznati svi komunikacijski putevi i sve signalne molekule bakterijske komunikacije, potrebno je što bolje razumjeti postojeće mehanizme bakterijske komunikacije. Također, od velikog znanstvenog, ali i kliničkog značaja bila bi potvrda ili opovrgavanje postojećih teorijskih modela antibiotske rezistencije s bitnim ciljem učinkovitijeg liječenja i kontrole infektivnih bolesti.

8. Zahvale

Iskreno zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Zdenku Kovaču na predloženoj temi, stručnoj i profesionalnoj pomoći te savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Omogućio mi je pristup potrebnoj dokumentaciji i literaturi te se strpljivo pobrinuo odgovoriti na sva moja pitanja.

Također, želim zahvaliti svojim roditeljima, Dubravki i Vilimu, koji su bili uvijek uz mene tokom cijelog školovanja, a bez kojih studiranje i završetak Mediciskog fakulteta za mene ne bi bio moguć. Za mene su uvijek imali ljubav koja je bila i jest velikodušna, dobrotiva, koja nikad nije tražila svoje i nije pamtila ono loše, ljubavi koja sve pokriva, sve vjeruje, koja se svemu nada, sve podnosi i koja nikada ne prestaje, slično ljubavi Božjoj prema svima nama svima opisanoj u trinaestom poglavlju Poslanice svetog Pavla apostola Korinćanima. Na tome ću im biti do kraja života zahvalna.

9. Reference

Ahmer BMM (2004) Cell-to cell signaling on *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. Mol Microbiol 52:933-945.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. Cell 124:783-801.

Anderson GG, Dodson KW, Hooton TM, Hultgren SJ (2004) Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. Trends Microbiol 12:424-30.

Asad S and Opal S (2008) Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. Dostupno na: <http://ccforum.com/content/12/6/236>. Datum pristupa: 3/2016.

Bassler BL (2002) Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. Cell 109:421-424.

Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R et al. (2012) The oral metagenome in health and disease. ISME J;6:46–56

Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, Du X, Hoebe K (2006) Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. Annu Rev Immunol 24:353-389.

Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG (2001) Wound microbiology and associated approaches to wound management. Clin Microbiol Rev 14:244-69.

Bronner S, Monteil H, Prevost G (2004). Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. FEMS Microbiol. Rev. 28, 183–200.

Cámara M, Williams P, Hardman A (2002) Controlling infection by tuning in and turning down volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect Dis* 2:667-676.

Canabarro A, Valle C, Farias MR et al. Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2012;48:428–32.

Cantekin EI (1996) Bacterial DNA fragments in otitis media with effusion. *JAMA* 275:186.

Cerovski B, Kutija MB, Jukić T, Juratovac Z, Mandić JJ, Kalauz M, Katušić D, Kordić R, Kuzman T, Masnec S, Perić S, Petriček I, Suić SP, Škegro I, Vidović T, Vukojević N (2015) Oftalmologija i optometrija. Zagreb, Stega tisak d.o.o.

Ciampolini J, Harding KG (2000) Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? *Postgrad Med J* 76(898):479–483.

Cirioni O, Mocchegiani F, Ghiselli R, Silvestri C, Gabrielli E, Marchionni E, Orlando F, Nicolini D, Risaliti A, Giacometti A (2010) Daptomycin and Rifampin Alone and in Combination Prevent Vascular Graft Biofilm Formation and Emergence of Antibiotic Resistance in a Subcutaneous Rat Pouch Model of Staphylococcal Infection. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 6:817–822. Dostupno na: [http://www.ejves.com/article/S1078-5884\(10\)00494-6/fulltext](http://www.ejves.com/article/S1078-5884(10)00494-6/fulltext). Datum pristupa: 4/2016

Clarke M, Hughes DT, Zhu C, Boedeker EC, Sperandio V (2006) The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10420-10425.

Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, Borlee BR, Wozniak DJ, Wong GC, Parsek MR (2011) The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 7(1):e1001264.

Cortes ME, Consuegra J, Sinisterra RD (2011) Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. *Sci Against Microbial Pathog Commun Curr Res Technol Adv* 2:896–905.

Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G (2003) The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 112:1466-77.

Davey ME, O'toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4):847–867.

Damjanov I, Jukić S, Nola M (2011) Patologija, treće, prerađeno i dopunjeno izdanje, Zagreb, Medicinska naklada

Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280(5361):295–298.

De Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z (1994) Effects of biofilm structure on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* 43(11):1131–1138.

Diggle S.P, Griffin A.S, Campbell G.S, and West S.A (2007) Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* 450, 411–414.

Dohar JE, Hebda PA, Veeh R, Awad M, Costerton JW, Hayes J, Ehrlich GD (2005) Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in a nonhuman primate model of chronic suppurative otitis media. *Laryngoscope* 115:1469-72.

Duan K, Dammel C, Stein J, Rabin H, Surette MG (2003) Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol Microbiol*, 50:1477-1491.

Đapić, T (2014) Infekcije sustava za kretanje. Dostupno na: <http://www.mef.unizg.hr/ortopedija/nastava/DapicInfekcijeSustavaZaKretanje.pdf>. Datum pristupa: 5/2016.

Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ, Daigle BJ, Ehrlich MD, Post JC (2002) Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA* 287:1710-5.

Ehrlich GD, Hu FZ, Shen K, Stoodley P, Post JC (2005) Bacterial plurality as a general mechanism driving persistence in chronic infections. *Clin Orthop Relat Res* 437:20-4.

Eke PI, Dye BA, Wei L et al. (2012) Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* 91:914–20.

Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J et al. (2012) European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. *Rhinology* March 50(1):1-12.

Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL (2011) Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol* 22(2):167.

Fuqua C, Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acylhomoserine lactone signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:685-695.

Gamulin S, Kovač Z. Načela patogenetskih mehanizama. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici (2005) Patofiziologija. Zagreb, Medicinska naklada str. 29.

Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici, Patofiziologija, sedmo, obnovljeno i izmijenjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. Slika 24-2, Biološkim etiopatogenetskim čimbenicima suprotstavljen je složen sustav fizioloških barijera. str. 776.

Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici, Patofiziologija, sedmo, obnovljeno i izmijenjeno izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. Slika 24-4, Shematski prikaz patogenetskih mehanizama odgovornih za klinička očitovanja infektivnih bolesti i sekundarnih bolesti pokrenutih klicama. str. 782.

Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z (2008) Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat Sci* 18(9):1049–1056.

Greenberg EP (2003) Bacterial communication and group behavior. *J Clin Invest* 112:1288-1290.

Gordon CA, Hodges NA, Marriott C (1988) Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic Arch Microbiol fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 22(5):667–674.

Gov Y, Borovok I, Korem M, Singh VK, Jayaswal RK, Wilkinson BJ, Rich SM, Balaban N (2004) Quorum sensing in staphylococci is regulated via phosphorylation of three conserved histidine residues. *J Biol Chem* 279:14665-14672.

Gupta K, Stamm WE (2005) Urinary tract infections. Dostupno na: <http://www.medscape.com/viewarticle/505095>. Datum pristupa: 1/2016.

Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P (2015) Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. Dostupno na: <http://micro.med.harvard.edu/pages/micro214/3-Gupta.pdf>. Datum pristupa: 1/2016

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2(2):95–108

Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, Forbes M, Greenberg DP, Dice B, Burrows A, Wackym PA, Stoodly P, Post JC, Ehrlich GD, Kerschner JE (2006) Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* 296:202-11.

Hermann C (2007) Variability of host–pathogen interaction. *J Endotoxin Res* 13:199-218.

Orešković, S, Kaliterna V, Kučišec – Tepeš N, Perković L (2014) Može li uvođenje postupnika za postavljanje intrauterinoga uloška smanjiti promjenu mikrobiološke

flore spolnoga sustava u žena koje ga rabe? Liječnički vjesnik 132, 99 – 101.
Dostupno na: <http://hrcak.srce.hr/63568>. Datum pristupa: 5/2016.

Iwase T, Uehara Y, Shinji H, Tajima A., Seo H, Takada K, et al. (2010). *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. Nature 465, 346–349.

Kaplan J.B., Lovetri K., Cardona S.T., Madhyastha S., Sadovskaya I., Jabbouri S., et al. (2012) Recombinant human DNaseI decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. J. Antibiot. 65, 73–77.

Karatan E, Watnick P (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. Microbiol Mol Biol Rev 73(2):310–347.

Kendall MM, Sperandio V (2007) Quorum sensing by enteric pathogens. *Curr Opin Gastroenterol* 23:10-15.

Kiedrowski M.R, Kavanaugh J.S, Malone C.L, Mootz J.M, Voyich J. M, Smeltzer M.S, et al. (2011) Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE 6:e26714.

Kirisits MJ, Parsek MR (2006) Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signaling to build biofilm communities? Cell Microbiol 8:1841-1849.

Koch C, Hoiby N (1993) Pathogenesis of cystic fibrosis. Lancet 341(8852):1065–1069.

Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ (2013) Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the post antibiotic era. Cold Spring Harb Perspect Med 3(4):a010306:1–23.

Kovač Z. Patofiziološki mehanizmi infektivnih bolesti. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici (2005) Patofiziologija. Zagreb, Medicinska naklada str. 781-3.

Kovač Z i Gamulin S. Cjelovito reagiranje organizma na noksu. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici (2005) Patofiziologija. Zagreb, Medicinska naklada str. 556-562.

Kumon H, Tomochika KI, Matunaga T, Ogawa M, Ohmori H (1994) A sandwich cup method for the penetration assay of antimicrobial agents through *Pseudomonas* exopolysaccharides. Microbiol Immunol 38(8):615–619.

Kumar CG, Anand SK (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. Int J Food Microbiol 42(1):9–27.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R (2007) Robbins basic pathology, 8th edn. Elsevier. pp 810–811.

Lam K, Schleimer R, Kern R (2015) The Etiology and Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis: a Review of Current Hypotheses Springer Science. Dostupno na: <http://f1000.com/prime/ext/725680275?referrer=GOOGLE>. Datum pristupa: 1/2016.

Lauderdale K.J , Malone C.L , Boles B.R., Morcuende J., Horswill A.R (2010) Biofilm dispersal of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material. J. Orthop.Res. 28, 55–61.

Lawrence RN, Dunn WR, Bycroft BW, Camara M, Chhabra SR, Williams P, Wilson VG (1999) The *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule *N*-C3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone inhibits porcine arterial smooth muscle contraction. Br J Pharmacol 128:845-848.

Lew DP, Waldvogel FA (2004) Osteomyelitis. Lancet 364 (9431):369–379.

Lewis K (2001) Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother 45:999-1007.

Lewis K (2005) Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* 70:267-74.

Lewis K (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 5:48-56.

Lister L. J, Horswill R. A (2014) *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Dostupno na: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00178/abstract>. Datum pristupa 4/2016.

Loesche WJ. (1986) Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50:353–80.

Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15(2):194–222.

Markić D., Strčić N., Markić I. (2014) Kateterizacija mokraćnoga mjehura – suvremeni pristup, *Medicina Fluminensis*, Vol.50 No.2, Str 158 – 168.

Maric S, Vranes J (2007) Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Period Bilogor* 109:115–121.

Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165-199.

Metwalli KH, Khan SA, Krom BP et al. (2013) *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog* 9:e1003616.

Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI (2007) *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr*, 19:83-88.

O'Donnell LE, Millhouse E, Sherry L, Kean R, Malcolm J, Nile CJ, Ramage G (2015) Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26298018>. Datum pristupa: 4/2016.

Olson M.E, Nygaard T.K, Ackermann L, Watkins R.L, Zurek O.W, Pallister K. B. et al. (2013). *Staphylococcus aureus* nucleaseisan SaeRS-dependent virulence factor. Infect.Immun. 81, 1316–1324.

Park CW, Han JH, Jeong JH, Cho SH, Kang MJ, Tae K, Lee SH (2004) Detection rates of bacteria in chronic otitis media with effusion in children. J Korean Med Sci 19:735-8.

Parsek MR, Singh PK (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu Rev Microbiol 57(1):677–701.

Pereira MB, Pereira MR, Cantarelli V, Costa SS (2004) Prevalence of bacteria in children with otitis media with effusion. J Pediatr (Rio J) 80:41-8.

Plančak D, Musić L, Puhar I (2015) Međustanična komunikacija parodontopatogenih bakterija Quorum Sensing of Periodontal Pathogens. Acta stomatol Croat. 2015;49(3):234-241.

Popat R.R, Crusz S.A.S, Messina M.M, Williams P.P, West, S.A.S, and Diggle, S.P.S (2012) Quorum-sensing and cheating in bacterial biofilms. Proc. Biol. Sci. 279, 4765–4771.

Privett BJ, Youn J, Hong SA, Lee J, Han J, Shin JH, Schoenfisch MH (2011) Antibacterial fluorinated silica colloid Superhydrophobic Surfaces Langmuir. 27(15): 9597–9601.

Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M (2015) The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. BioMed Res Int 2015:1–17.

- Reffuveille F., de la Fuente-Núñez C., Mansour S., Hancock R.E (2014) Broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5363–5371.
- Roberts ME, Stewart PS (2005) Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology* 151:75-80.
- Rumbaugh KP, Diggle SP, Watters CM, Ross-Gillespie A, Griffin AS, and West S.A (2009) Quorum sensing and the social evolution of bacterial virulence. *Curr. Biol.* 19, 341–345.
- Sandoz KM, Mitzimberg SM, and Schuster M (2007) Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 15876–15881.
- Santos AP, Watanabe E, Andrade Dd. (2011) Biofilm on artificial pacemaker: fiction or reality? *Arq Bras Cardiol.* 97(5):e113-20. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189616>. Datum pristupa: 5/2016.
- Sardi JC, Duque C, Mariano FS et al. (2010) *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. *J Oral Sci* 52:177–85.
- Sardi JC, Duque C, Mariano FS et al. (2012) Adhesion and invasion of *Candida albicans* from periodontal pockets of patients with chronic periodontitis and diabetes to gingival human fibroblasts. *Med Mycol* 50:43–9.
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184(4):1140–1154.
- Serralta VW, Harrison-Balestra C, Cazzaniga AL, Davis SC, Mertz PM. (2001) Lifestyles of bacteria in wounds: presence of biofilms? *Wounds* 13:29-34.
- Shaw L, Golenka E, Potempa J, Foster S.J (2004). The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 150, 217–228.

Shiner EK, Rumbaugh KP, Williams SC (2005) Inter-kingdom signaling: deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol Rev* 29:935-947.

Shukla SK., Rao TS. (2013) Dispersal of Bap-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm by proteinase K. *J. Antibiot* 66, 55–60.

Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407(6805):762–764.

Sirotković-Skerlev M. Reakcije domaćina na infekciju. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici (2011) *Patofiziologija*. Zagreb, Medicinska naklada str. 783. i 788.

Sirotković-Skerlev M. Ishod infekcije. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici (2011) *Patofiziologija*. Zagreb, Medicinska naklada str. 794., 796-7.

Smith RS, Iglewski BH (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 6:56-60.

Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358(9276):135–138.

Stoodley P, Cargo R, Rupp CJ, Wilson S, Klapper I (2002) Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29(6):361–367.

Sztajer H, Lemme A, Vilchez R, Schulz S, Geffers R, Yip CY, Levesque CM, Cvitkovitch DG, Wagner-Döbler I (2008) Autoinducer-2- regulated genes of *Streptococcus mutans* UA 159 and global metabolic effect of the LuxS mutation. *J Bacteriol* 190:401-415.

Tack KJ, Sabath LD (1985) Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, chloramphenicol, and clindamycin. *Chemotherapy* 31(3):204–210.

Tang J, Zhou R, Shi X, Kang M, Wang H, Chen H(2008).Two thermostable nucleases coexisted in *Staphylococcus aureus*: evidence from mutagenesis and *in vitro* expression. FEMS Microbiol.Lett. 284, 176–183.

Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Miyairi S, Pechere JC, Standiford TJ, Ishiguro M, Yamaguchi K (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3 oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. Infect Immun 71:5785-5793.

Tateda K, Standiford TJ, Pechere JE, Yamaguchi K (2004) Regulatory effects of macrolides on bacterial virulence: potential role as quorum-sensing inhibitors. Curr Pharm Des 10:3055- 3065.

Tuomanen E, Cozens R, Tosch W, Zak O, Tomasz A (1986) The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. J Gen Microbiol 132(5):1297–1304.

Tan NC, Foreman A, Jardeleza C et al. (2013) Intracellular *Staphylococcus aureus*: the Trojan horse of recalcitrant chronic rhinosinusitis? Int Forum Allergy Rhinol. 3:261–6.

Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. (2010) Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the global burden of disease study. Lancet 380:2163–96.

Vraneš J. (2003) Etiopatogeneza i dijagnostika infekcije dekubitalnih vrijedova. Hančević J i sur. Dekubitus, etiologija, profilaksa i liječenje. Zagreb: Medicinska naklada 89-105.

Vraneš J, Kružić V, Schoenwald S (2003) Virulence characteristics of *Escherichia coli* strains causing asymptomatic bacteriuria. Infection 31:216-20.

Vraneš J, Leskovar, V (2009). Dostupno na: https://www.google.hr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjxhuTstKDLAhVjvnIKHSCTAO4QFggbMAA&url=https%3A%2F%2Fbib.irb.hr%2Fdatoteka%2F407235.Vranes_Biofilm_finalno_MG_11509.doc&usg=AFQjCNHgmRUoG_0B8GxaKSb5Di0n3DtA6A&sig2=5kJ1RBwh40i3RIEe26EfoQ&bv m=bv.115339255,d.bGQ. Datum pristupa:1/2016.

Wagner VE, Li LL, Isabella VM, Iglewski BH (2007) Analysis of the hierarchy of quorum-sensing regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Anal Bioanal Chem* 387:469-479.

Williams P (2007) Quorum sensing, communication and crosskingdom signaling in the bacterial world. *Microbiology* 153:3923-3928.

Xu KD, McFeters GA, Stewart PS (2000) Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology* 146:547-9.

Yarwood JM, Schlievert PM (2003) Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest*, 112:1620-1625

Zakout YM, Salih MM, Ahmed HG (2012) Frequency of *Candida* species in papanicolaou smears taken from Sudanese oral hormonal contraceptives users. *Biotech Histochem* 87:95–7.

Zhou L, Slamti L, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, and Raymond B (2014) The Social Biology of Quorum Sensing in a Naturalistic Host Pathogen System. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.049> Datum pristupa: 3/2016.

10. Životopis

Rođena sam u Zagrebu 1992. godine, u peteročlanoj obitelji kao najmlađe dijete. Nakon završenog osnovnoškolskog obrazovanja, 2006. godine upisala sam opću gimnaziju „Tituš Brezovački“ koju sam završila 2010. godine. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci upisala sam 2010. godine gdje sam završila prve tri godine, a akademsku godinu 2013./2014. nastavila sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom fakulteta, aktivno sam se pridružila studentskim udrugama "croMSIC", čija sam članica od 2010., "EMSA", čija sam članica od 2014. te studentskoj Sekciji za neuroznanost ("SSN") čija sam članica od 2014. godine. Demonstratorica sam na Katedri za patofiziologiju od 2014. godine. U svibnju 2015. godine (akademska godina 2014/15) održala sam predavanje na temu: „Quorum sensing u etiopatogenezi“, a u siječnju 2016. godine (akademska godina 2015/16) predavanje na temu „Mehanizmi i etiopatogenetska uloga razvoja biofilma klica na biotičkim i abiotičkim površinama“. Oba predavanja su dio ciklusa *Seminaria pathophysiologica demonstratorum* (SPD) koja pod vodstvom prof. dr. sc. Zdenka Kovača izlažu studenti (demostratori) na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (KBC Rebro).

Stručnu praksu sam imala priliku raditi u kardiološkoj ambulanti "Kardiologija Uzelac" u prosincu 2013. godine, zatim u otorinolaringologološkoj ambulanti "ORL ordinacija Dubravka Zekić – Bouček" tijekom srpnja i kolovoza 2014. godine te u dermatološkoj poliklinici "Poliklinika Sokol" tijekom kolovoza i rujna 2014. godine. Od ostalih vještina i znanja navela bih poznavanje engleskog, njemačkog i talijanskog jezika (razine B2) te poznavanje informatičkog programa Microsoft Office.

OSOBNİ PODACI:

Kristina Bouček

Datum rođenja: 2. lipnja 1992.

Adresa: Vranovina 26, 10 000 Zagreb

E-mail: kristina.boucek@gmail.com

Tel.: 099 242 72 84