

Kronična pseudomonasna infekcija pluća oboljelih od cistične fibroze

Mendek, Marcela

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:105:103735>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marcela Mendek

**Kronična pseudomonasna infekcija pluća
oboljelih od cistične fibroze**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Jasmine Vraneš i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

POPIS KRATICA

ATP – adenzin-trifosfat

ADP – adenzin-difosfat

BAL – bronhoalveolarni lavat

cAMP – ciklički adenzin monofosfat

CF – cistična fibroza

CFTR – eng. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, hrv. transmembranski regulator provodnosti u cističnoj fibrozi

CFRD – eng. *cystic fibrosis related diabetes*, hrv. dijabetes povezan s cističnom fibrozom

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

eDNK – izvanstanična DNK

FEV1 – forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi

LPS – lipopolisaharid

MRSA – meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*

Na – natrij

NaCl – natrij klorid

Pa – *Pseudomonas aeruginosa*

PCL – eng. *pericillar layer*, hrv. pericilijarni sloj

PFGE – eng. *pulse field gel electrophoresis* hrv. gel elektroforeza u pulsirajućem polju

PMN – polimorfonukleari

RNK – ribonukleinska kiselina

SADRŽAJ

SAŽETAK.....	I
SUMMARY	II
1. UVOD	1
2. CISTIČNA FIBROZA	2
2.1. Etiopatogeneza.....	2
2.2. Patofiziologija.....	3
2.2.1. Građa i funkcija CFTR.....	4
2.3. Patologija	5
2.4. Dijagnostika.....	7
2.5. Klinička slika.....	8
2.6. Liječenje	10
3. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	12
3.1. Epidemiologija.....	13
3.2. Patogeneza	14
3.2.1. Čimbenici virulencije.....	14
3.2.2. Međustanična signalizacija	16
3.3. Laboratorijska dijagnostika	17
3.4. Liječenje, prevencija i kontrola	18
4. <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> I BIOFILM.....	20
4.1. Biofilm.....	21
4.2. Mukoidni fenotip <i>P. aeruginosa</i>	22
4.3. Stvaranje biofilma u oboljelih od cistične fibroze.....	24
5. KRONIČNA INFEKCIJA PLUĆA U OBOLJELIH OD CISTIČNE FIBROZE.....	27
5.1. Patofiziološke promjene dišnih puteva u CF – podloga za infekciju	27
5.2. Rana kolonizacija i infekcija	29
5.3. Patologija kronične plućne bolesti.....	31
5.4. Pseudomonasna infekcija pluća.....	33
6. PREVENCIJA I TERAPIJA KRONIČNE PLUĆNE INFEKCIJE	36
6.1. Antibiotika terapija.....	36
6.2. Metode uklanjanja sekreta iz dišnih puteva i mukolitici	40
6.3. Protuupalna terapija.....	42
7. NOVE MOGUĆNOSTI U PREVENCIJI I TERAPIJI PLUĆNE INFEKCIJE	43
8. ZAKLJUČAK	48
ZAHVALE	50
LITERATURA.....	51
ŽIVOTOPIS	56

SAŽETAK

Kronična pseudomonasna infekcija pluća oboljelih od cistične fibroze

Marcela Mendek

Cistična fibroza najčešća je autosomno recesivna nasljedna bolest u bijele rase. To je multisustavna bolest, uzrokovana mutacijom u genu koji kodira transmembranski regulator cistične fibroze (CFTR). Posljedica njegove disfunkcije je stvaranje je gustog, ljepljivog sekreta koji oblaže dišne puteve i onemogućava normalni mukocilijarni klirens. Dolazi do nakupljanja bakterija i razvoja infekcije. *Pseudomonas aeruginosa* je ubikvitarno prisutan oportunistički patogen, sa sposobnošću preživljenja u bolničkim uvjetima. Kolonizira dišne puteve većine pacijenata koji boluju od cistične fibroze već u ranoj dječjoj dobi. Ako se tada ne liječi agresivnom antibiotskom terapijom, akutne intermitentne infekcije prelaze u kroničnu infekciju, s postupnim propadanjem plućne funkcije, sve do respiratornog zatajenja. Tome doprinosi jaki polimorfonuklearni upalni odgovor, koji otpuštanjem kisikovih radikala, uzrokuje mutacije u genomu *P. aeruginosa*, i pojavu mukoidnog fenotipa obilježenog pojačanim stvaranjem polisaharida alginata i stvaranjem biofilma. Biofilm je nakupina bakterija uloženi u egzopolisaharidni matriks, unutar kojeg bakterije postaju slabije virulentne i metabolički aktivne te ostaju zaštićene od djelovanja imunološkog sustava domaćina i antibiotika. Na taj način, pseudomonas preživljava i perzistira u plućima oboljelih. Konvencionalna terapija kronične plućne infekcije je kronična supresivna terapija inhalacijskim antibioticima, s ciljem održavanja primjerene plućne funkcije. Zbog pojave visoke antibiotske rezistencije, razvoj lijekova usmjeren je prema novim formulacijama i kombinacijama antibiotika, te prema tvarima koje sprječavaju formiranje biofilma (inhibitori *quorum sensing* sustava, antioksidansi, kelatori željeza) ili uzrokuju njegovu razgradnju.

Ključne riječi: Cistična fibroza; *Pseudomonas aeruginosa*; kronična infekcija pluća; biofilm

SUMMARY

Chronic pseudomonas lung infection in cystic fibrosis patients

Marcela Mendek

Among Caucasians, cystic fibrosis is the most common autosomal recessive inherited disease. It is a multisystem disease caused by a genetic mutation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). As a consequence, a thick mucus layer coating the surface of airway epithelium is formed, disabling normal mucociliary clearance. *Pseudomonas aeruginosa* is an ubiquitous opportunistic pathogen, with the ability to survive in hospital environment. By early childhood, it colonizes the airways of most cystic fibrosis patients. If it is not promptly treated by aggressive antibiotic therapy at that stage, the acute intermittent infections become chronic, with a gradual decrease in pulmonary function leading to respiratory failure. This is perpetuated by a strong polymorphonuclear inflammatory response, with production of oxygen radicals which cause mutations in *Pa* genome, and induce the mucoid phenotype, characterized by alginate overproduction and biofilm formation. Biofilm is a bacterial consortium, embedded in an exopolysaccharide matrix, within which the bacteria have reduced virulence and metabolic activity, but are protected against the activities of host immune system and the effects of antibiotic substances. This allows pseudomonas to survive and persist in the cystic fibrosis lung. Conventional chronic pulmonary infection therapy is chronic suppressive therapy, via inhaled antibiotics, with the primary goal of maintaining lung function in patients. Due to emergence of high antibiotic resistance, development of new drugs is focused on producing different antibiotic formulations and combinations, and towards investigation of substances which can prevent biofilm formation (*quorum sensing* inhibitors, antioxidants, ion chelators), or achieve its disintegration.

Keywords: Cystic fibrosis; *Pseudomonas aeruginosa*; chronic lung infection; biofilm

1. UVOD

Cistična fibroza je najčešća monogenska autosomno recesivna nasljedna bolest u bijele rase. Uzrokovana je mutacijom u genu koji kodira transmembranski regulator provodnosti cistične fibroze (CFTR), transmembranski protein, koji vrši ulogu kloridnog kanala ovisnog o cikličkom adenozin-monofosfatu. Nalazimo ga na apikalnim površinama epitelnih stanica gdje je odgovoran za normalan promet vode i elektrolita, a kod njegove nedostatne funkcije javlja se promjena u sekretima žlijezda s vanjskim izlučivanjem. Bolest zahvaća više organskih sustava, a kliničkom slikom dominira učinak na dišni, gastrointestinalni i reproduktivni sustav. Bolest uzrokuje promjenu u gustoći sekreta dišnih puteva, i čini oboljele od cistične fibroze podložnima infekcijama oportunističkim patogenima. Jedan patogen tijekom vremena uspostavlja dominaciju u dišnim putevima oboljelih od cistične fibroze, te perzistira unatoč mehanizmima obrane imunološkog sustava i liječenju antibioticima. *Pseudomonas aeruginosa* je gram-negativna oportunistička bakterija koja kolonizira dišne puteve pacijenata oboljelih od cistične fibroze, i s vremenom uzrokuje kroničnu plućnu infekciju. Dok je u prošlosti glavni uzrok smrtnih ishoda bio povezan s gastrointestinalnim komplikacijama bolesti već u dječjoj dobi, danas zahvaljujući znatnom napretku u liječenju i osnivanju centara za liječenje cistične fibroze, pacijenti koji boluju od ove bolesti većinom doživljavaju stariju odraslu dob. Produljenjem životnog vijeka, glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta postaje kronična plućna bolest, u kojoj dolazi do postupne destrukcije plućnoga tkiva upalom i infekcijama sve do respiratornog zatajenja i smrti pacijenata. Cilj ovog rada je prikazati karakteristike oboljelih od cistične fibroze koje ih čine podložnima ovakvoj vrsti infekcije i karakteristike *P. aeruginosa* koje mu omogućavaju da inficira i trajno kolonizira pluća oboljelih, prikazati tijek kronične plućne bolesti i njene karakteristike, te prikazati trenutno dostupne terapijske opcije i ideje za nove terapijske mogućnosti koje su još u fazi istraživanja.

2. CISTIČNA FIBROZA

Cistična fibroza je autosomno recesivna multisustavna bolest koja zahvaća sekrecijske stanice epitelnih organa, odnosno egzokrine žlijezde, a nastaje zbog poremećaja u sintezi proteina koji ima ulogu regulatora membranskog protoka vode i elektrolita. U bijele rase, cistična fibroza je najučestalija smrtonosna autosomno recesivna nasljedna bolest. Od nje boluje oko 75,000 ljudi svih rasnih i etničkih skupina diljem svijeta, no najučestalija je u bjelačke rase, s najvišim stopama incidencije u Sjevernoj Americi, Europi i Australiji. U Europi joj incidencija znatno varira, najveća je u Irskoj, Slovačkoj, Rumunjskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu (~1:1300 – 1:2500 novorođenih) a najmanja u Finskoj, na Cipru i u Portugalu (~1:6000 – 1: 25000 novorođenih) (1). U Hrvatskoj je 2007. osnovan nacionalni registar cistične fibroze, tada je u Republici Hrvatskoj od ove bolesti bolovalo 108 osoba (2). Procjene su da je svaka 25. osoba u europskoj populaciji heterozigot, tj. posjeduje jedan mutirani alel. U djeteta čija su oba roditelja heterozigoti, postoji vjerojatnost od 25% da dijete bude homozigot i oboli od cistične fibroze (3).

2.1. Etiopatogeneza

Bolest je uzrokovana mutacijom na dugom kraku 7. kromosoma gdje se nalazi gen koji kodira glikoprotein – transmembranski regulator propusnosti cistične fibroze (eng. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* – CFTR). Taj gen kodira CFTR proteinski produkt koji se ugrađuje u apikalnu membranu epitelnih stanica i vrši funkciju kloridnog kanala. Do danas je identificirano 2027 različitih mutacija koje mijenjaju strukturu gena te građu i sudbinu proteinskog produkta (4). Većina mutacija nađenih u bolesnika s cističnom fibrozom spada u mutacije koje tek neznatno mijenjaju građu molekule CFTR-a.

Najčešća je mutacija $\Delta F508$, koja izaziva deleciju aminokiseline fenilalanina na 508. mjestu polipeptidnog lanca. Tako nastaje poremećaj u građi CFTR-a koji ometa njegovo sazrijevanje u endoplazmatskoj mrežici, i uzrokuje manjak CFTR-a na staničnoj membrani (5).

$\Delta F508$ mutaciju na barem jednom kromosomu nosi oko 70% bolesnika u zapadnoj i sjevernoj Europi, dok je u Hrvatskoj njena učestalost 60%. Sve ostale mutacije su vrlo rijetke i dosežu tek nekoliko postotaka u ukupnom broju oboljelih. Česti su slučajevi složenih heterozigota koji na jednom homolognom kromosomu posjeduju jednu, a na drugom kromosomu drugu mutaciju. Težinu kliničke slike tada u pravilu određuje blaža mutacija (3).

2.2. Patofiziologija

Kao što je već navedeno, poznat je velik broj mutacija u CFTR genu koje mogu izazvati bolest, ali značajnost tih mutacija za funkciju samog proteina poznata je u manjem broju slučajeva. Jedan od klasifikacijskih sustava dijeli posljedice mutacija u šest klasa (I-VI) ovisno o poremećaju sinteze, prijenosa, i funkcije CFTR produkta. U klasi I nalazimo mutacije koje dovode do stvaranja stop-kodona pa izostaje sinteza CFTR-a. Kod klase II, mutacije uzrokuju neispravnu obradu i sazrijevanja proteina. Klasa III mutacija CFTR uzrokuju stvaranje proteina s neispravnim regulacijskim mehanizmom, koji ne odgovara na podražaj za otvaranje kanala. U klasi IV oštećena je provodnost kanala jer je mutacijom promijenjena građa pore kroz koju prolaze ioni. U klasu V spadaju mutacije koje dovode do alternativnog prekrajanja glasničke RNK i time do znatno smanjene sinteze normalnog CFTR-a. U posljednju klasu VI, spadaju mutacije čija je posljedica ubrzana razgradnja i uklanjanje CFTR proteina s površine stanice. Kod klasa I-III, CFTR funkcija je ukinuta, dok je kod klasa VI-IV ona reducirana, što dovodi do razlike u kliničkoj slici ovisno o tipu mutacije i njihovim kombinacijama (6, 7).

Prema tome, svi bolesnici ne obolijevaju od jednako teških oblika cistične fibroze, ali gotovo svi bolesnici razviju kroničnu plućnu bolest. Odprilike 10-15% ima očuvanu egzokrinu funkciju gušterače, te u njih u pravilu izostaju crijevni poremećaji (mekonijski ileus, crijevna pseudoopstrukcija) i jetrena bolest. Homozigoti za najčešću mutaciju $\Delta F508$, obolijevaju i od teške plućne bolesti i od insuficijencije gušterače (3).

2.2.1. Građa i funkcija CFTR

Cistično-fibrotički transmembranski regulator – CFTR je protein koji je dobio naziv po funkciji regulacije prolaska klorida kroz staničnu membranu, a građen je od pet molekularnih područja („domene“). Dva transmembranska hidrofobna područja umetnuta su u lipidni dvosloj stanične membrane kroz čiju punu širinu vijuga šest intramembranskih segmenata u tri puna zavoja. Druga su dva područja hidrofilna, smještena na citoplazmatskoj površini membrane. Ona povezuju ATP i njegovu hidrolizu s temeljnom funkcijom prijenosnika. Peto područje čini R-domena, regulacijsko područje s jakim električnim nabojem i nekoliko mogućih mjesta za fosforilaciju, za koje se pretpostavlja da regulira prolazak klorida kroz kanal. Vezanjem ATP-a dolazi do njegove hidrolize i stvara se cAMP koji aktivira proteinsku kinazu A. Kinaza fosforilira područje R, i time mijenjajući konfiguraciju molekule otvara kloridni kanal (5).

Otvaranjem kanala dolazi do izlaska iona klora, koji zatim slijede natrij i voda, te ulaze u lumen izvodnog kanalića žlijezde. Fiziološki mehanizmi donekle se razlikuju s obzirom na vrstu epitelnih stanica, posebice u žlijezdama znojnicama, gdje u zdravih osoba izlazak klorida iz stanica aktivira antiport $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ i rezultira pojačanom apsorpcijom NaCl-a, čime se u zdravom organizmu sprječava gubitak soli znojem.

U osoba koje boluju od cistične fibroze protein CFTR se ne sintetizira ili nije funkcionalan, što ometa izlučivanje kloridnih iona iz epitelnih stanica i dovodi do povećane resorpcije Na i vode iz lumena u stanicu. Time se stvara sekret koji je gust i žilav, te se otežano odstranjuje iz kanala žlijezda. Tako zgusnuti sekret na respiracijskoj sluznici nije moguće odstraniti fiziološkim mukocilijarnim mehanizmima, te on postaje podloga za razvoj patogenih mikroorganizama, u početku najčešće pneumokoka i hemofilusa, a potom mukoidnih pseudomonasa i burkholderije. Do zgušnjavanja i precipitacije sadržaja dolazi i u žučnim vodovima, u lumenu crijeva, te u sjemenovodima muškarca. U gušterači, uz opstrukciju žljezdanih izvodnih kanalića, izostaje sekrecija bikarbonata, a u žlijezdama znojnicama javlja se pojačan gubitak NaCl-a zbog smanjene reapsorpcije (3, 5).

2.3. Patologija

Viskozan i zgusnut sadržaj u lumenu kanalića onemogućava normalnu sekreciju egzokrinih žlijezda u različitim epitelnim organima. Patološke promjene kojima je cistična fibroza obilježena najizraženije su u dišnom i probavnom sustavu (3).

U dišnom sustavu dolazi do nakupljanja guste sluzi u bronhioloma uz znakove upalne reakcije u stijenci, što dovodi do ponavljajućih sekundarnih infekcija, te u kasnijim stadijima kroničnog bronhitisa i bronhiolitisa. Kako opstrukcije i upala napreduju, u bolesnika se radiološki i histološki mogu naći pneumonije, emfizem, pneumotoraks, bronhiektazije, atelektaze, plućne priraslice, apscesi, i konačno, masivna destrukcija plućnog parenhima. Oko 10% bolesnika starijih od deset godina boluje i od kronične polipoze nosa (8, 3).

U izvodnim kanalićima sluzničkih žlijezda debelog i tankog crijeva dolazi do precipitacije sadržaja i stvara se velika količina gustog sekreta koji priliježe uz crijevne stijenke, no struktura crijevnih resica i njihova funkcija ostaju očuvane (8).

U probavnom sustavu, još za vrijeme intrauterinog razvoja, može doći do opstrukcije crijevnog lumena izrazito gustim crijevnim sadržajem – mekonijem, i razvoje mekonijskog ileusa. U slučaju rupture crijeva zbog grčevite peristaltike, može doći i do mekonijskog peritonitisa (3).

U gušterači dolazi do dilatacije intralobularnih kanalića, a zatim do destrukcije acinusa i zamjene žljezdanog tkiva masnim tkivom. Kod 85% pacijenta koji boluju od cistične fibroze razvije se kronični pankreatitis, kao posljedica opstrukcije izvodnih kanalića egzokrinog dijela žlijezde gustim sekretom, i njihovog cističnog proširenja. Visok tlak u kanaliću uzrokuje oštećenje stijenke pritiskom, i dolazi do upalne reakcije s umnožavanja veziva i gubitkom egzokrinog tkiva gušterače. Makroskopski, gušterača postaje mala, čvrsta i nepravilnog oblika, a može sadržavati i ciste. Na kraju se razvije insuficijencija gušterače i posljedična malapsorpcija ugljikohidrata, masti i bjelančevina iz lumena tankog crijeva. Endokrina funkcija gušterače ostaje dugo očuvana, no u dugotrajnoj bolesti smanjuje se i lučenje inzulina (8, 3).

Do sličnih promjena može doći i u žlijezdama slinovnicama zbog nakupljanja guste sline. Gusta sluz u jetrenim žučnim vodovima, onemogućuje normalno izlučivanje žuči, što doprinosi malapsorpciji, a uslijed oštećenja žučnih kanalića pacijenti mogu razviti sekundarnu bilijarnu cirozu (8).

U reproduktivnom sustavu muškarca, slične se promjene zbivaju u Wolffovu kanalu. Seminalne vezikule se ne mogu identificirati, epididimis je hipoplastičan, dok je sjemenovod u više od 95% bolesnika obliteriran, zbog čega je većina odraslih bolesnika muškog spola neplodna (8, 3).

2.4. Dijagnostika

Dijagnostički postupci za dokazivanje cistične fibroze uključuju: a) određivanje koncentracije iona klorida i natrija u znoju, b) promjene električne vodljivosti na nosnoj sluznici i c) nazočnost mutacija utvrđenih DNK analizom (3).

Test određivanja klorida u znoju najčešća je metoda, a znoj za analizu dobiva se iontoforezom pilokarpin-nitrata u ograničeno područje kože. Normalna vrijednost koncentracije klorida u znoju iznosi do 40 mmol/L, vrijednosti između 40-60 mmol/L granične su i test se mora ponoviti, a vrijednosti iznad 60 mmol/L su patognomonične za cističnu fibrozu. Osim CF, postoje i neke druge bolesti u kojima koncentracija klorida u znoju može biti povišena, i treba ih uzeti u obzir kod diferencijalne dijagnoze (3).

Mjerenje električnog potencijala nosne sluznice temelji se na pojavi transepitelijalnog električnog potencijala kroz respiracijski epitel, zbog protoka iona natrija i klorida, koji je u pacijenata oboljelih od cistične fibroze karakteristično promijenjen (3).

Dokazivanje mutacija CFTR gena rabi se u prenatalnoj i postnatalnoj dijagnostici cistične fibroze. Rutinski se traže 15-20 mutacija, najzastupljenijih u odgovarajućoj populaciji što omogućuje identifikaciju genskog defekta u 80-95% ispitanika (3).

Za postavljanje dijagnoze potrebno je ispuniti barem po jedan uvjet iz obiju sljedećih skupina: a) prisutnost jedne ili više karakterističnih fenotipskih pojava za cističnu fibrozu ili cistična fibroza u brata ili sestre, ili pozitivni novorođenački test probira; b) uz jednu od mogućnosti iz skupine a), mora postojati i laboratorijski dokaz o poremećaju svojstvenom za cističnu fibrozu: povećana koncentracija klorida u znoju u najmanje dva neovisna mjerenja, ili identifikacija dviju mutacija gena CFTR, ili dokazan abnormalni potencijal nosne sluznice u najmanje dva mjerenja (9, 3).

Fenotipska obilježja svojstvena cističnoj fibrozi uključuju: kroničnu bolest dišnog sustava, probavne i prehrambene poremećaje, sindrom gubitka soli ili metaboličku alkalozu, i opstruktivnu azoospermiju (3).

Neonatalni probir, već uveden u mnogim zemljama, vrši se određivanjem imunoreaktivnog tripsinogena u osušenom uzorku krvi novorođenčeta. U djece s CF vrijednosti tripsinogena su povišene jer dolazi do prodora enzima u krv zbog opstrukcije kanalića gušterače. One ostaju takve do 7.- 8. godine života, kada zbog smanjenja aktivnosti gušterače dolazi i do pada razine tripsinogena u krvi. U Hrvatskoj još nije uveden sustav novorođenačkog probira, ali se razmatra uvođenje u narednim godinama (10, 3).

2.5. Klinička slika

Iako je CF bolest s kojim se čovjek rađa, manje od 20% oboljelih ima kliničke manifestacije bolesti u novorođenačkom i ranom dojenačkom razdoblju. Međutim, promjene u dišnim putevima nastaju rano u djetinjstvu, prije nego što se mogu klinički prepoznati, stoga bi ranim prepoznavanjem bolesti kroz novorođenački probir imali mogućnost ranog početka liječenja i ublažavanja posljedica bolesti (10). Kao multisustavna bolest, cistična se fibroza može očitovati različitim kliničkim slikama što ovisi jednim dijelom o tome koje se mutacije CFTR gena nalaze u bolesnika, ali i o utjecaju tzv. modificirajućih gena i faktora iz okoliša (11).

Plućna bolest prisutna je u gotovo svih oboljelih od cistične fibroze i danas je najvažniji determinirajući faktor preživljenja. Neki pacijenti već u dojenačkoj dobi razvijaju prve simptome u obliku neproduktivnog, iscrpljujućeg kašlja, opstruktivne dispneje i zvižduka koji oponašaju simptome bronhiolitisa. U drugih pacijenata plućna bolest se razvija postupno, mjesecima i godinama, uz sliku kronične bronhoopstrukcije, bronhitisa, recidivirajućih pneumonija i hiperinflacije plućnog parenhima.

S napretkom i progresijom bolesti, dolazi do razvoja peribronhalne fibroze, atelektaza i bronhiektazija. Klinički tijek bolesti karakteriziraju plućne egzacerbacije uz mogućnost razvoja pneumotoraksa, te razvoj kronične plućne bolesti uz pojavu kronične respiratorne insuficijencije i plućnog srca. Kod adolescenata i odraslih, u refrakternih egzacerbacija plućne bolesti, u obzir dolazi i alergijska bronhopulmonalna aspergiloza (12).

U plućnim infekcijama dječje dobi najčešći izolirani uzročnici su oni uobičajeni za dob djeteta – respiratorni virusi, bakterije roda *Haemophilus* i *Streptococcus pneumoniae*. U kasnijim stadijima bolesti najčešće se izoliraju *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, i *Burkholderia cepacia*. Eradikacija pseudomonasa iz respiratornog trakta predstavlja poseban izazov zbog njegove sposobnosti transformacije i stvaranja biofilma (13).

Kronična insuficijencija gušterače javlja se u 85% oboljelih. Deficit u egzokrinnoj sekreciji enzima gušterače uzrokuje maldigestiju i sekundarnu malapsorpciju, steatoreju i povećan crijevni gubitak dušika (14). Djeca su blijeda, slabo dobivaju na težini, izbočenog trbuha, imaju masne obilne stolice i flatulenciju, razvijaju malapsorpciju, malnutriciju i manjak vitamina topivih u mastima. Kao posljedica toga, mogu se razviti akrodermatitis, anemija, neuropatija, noćna sljepoća, osteoporoza i poremećaj krvarenja (10). Malnutricija, posebice kod dugotrajnog energetskeg deficita, ima negativan utjecaj na dišni sustav. Povećava učestalost plućnih infekcija i upalnih procesa koji uzrokuju strukturalne promjene dišnih puteva (13,14). Endokrina funkcija Langerhansovih otočića gušterače obično ostaje očuvana do adolescencije i odrasle dobi. Jedna trećina oboljelih ipak razvije dijabetes povezan s cističnom fibrozom (*cystic fibrosis related diabetes* – CFRD), jedinstvenu formu šećerne bolesti koja ima karakteristike dijabetesa i tipa I i tipa II (15).

Novorođenčad s CF mogu razviti prolaznu kolestatsku žuticu, uzrokovanu opstrukcijom intrahepatičnih žučnih vodova. Stariji pacijenti su pod povećanim rizikom od razvoja fokalne bilijarne ciroze, ali samo manji dio pacijenata razvije klinički manifestnu bolest jetre, obično do 15. godine života. Zatajenje jetre na drugom je mjestu vodećih uzroka smrti u oboljelih od cistične fibroze (13). Već je spomenuto da novorođenčad može razviti mekonijski ileus, a starija djeca i odrasli, distalni opstruktivni sindrom i prolaps rektuma - zbog opstrukcije gustom stolicom na razini distalnog tankog crijeva (11). Zbog povećanog gubitka natrija i klorida znojem, djeca su sklonija hiponatremijskoj dehidraciji i hipokloremijskoj metaboličkoj alkaloziji. U oboljele djece pubertet je često odgođen za godinu, dvije, zbog usporenog rasta i maturacije, kao posljedica malnutricije (3).

Većina muških pacijenata imaju azoospermiju i neplodnost kao posljedicu opstrukcije sjemenovoda. Bolesnici su fertilni, ali je zbog promijenjenih osobina sluzi u spolnom traktu, začeće otežano (16).

2.6. Liječenje

Danas dostupnu terapiju možemo podijeliti u dvije glavne skupine, a to su: a) simptomatsko i potporno liječenje i b) etiološka (kauzalna) terapija. Iako se eksperimentira s genskom terapijom, te danas imamo par lijekova odobrenih za uporabu u etiološkom liječenju CF, temeljno liječenje ostaje simptomatsko (3).

Simptomatsko liječenje uglavnom je fokusirano na respiratorne i gastrointestinalne simptome, uz pružanje odgovarajuće nutritivne potpore. Obuhvaća nadomjesnu terapiju enzima gušterače, te visokokalorijsku dijetu uz nadoknadu vitamina topivih u mastima.

Posebna dijeta zahtjeva 20% veći unos od preporučenog dnevnog unosa, kako bi se zadovoljile povećane dnevne potrebe uzrokovane hipermetaboličkim stanjem koje se javlja u oboljelih. Kod neadekvatnog prehrambenog statusa dolazi do pogoršanja plućne funkcije i povećava se učestalost plućnih infekcija, pa je stoga adekvatna prehrana esencijalni dio liječenja (16).

Liječenje respiratornih komplikacija bazira se na kontroli infekcija i upale, te na poticanju drenaže sekreta iz dišnih puteva. Pacijenti s terminalnim stadijem plućne bolesti kandidati su za transplantaciju pluća. Antibiotika terapija glavni je način liječenja plućnih infekcija u svim stadijima bolesti, a agresivna terapija znatno je doprinijela produljenju životnog vijeka oboljelih. Od ostalih lijekova primjenjuju se sekretolitici, bronhodilatatori, protuupalni lijekovi poput nesteroidnih antireumatskih lijekova i makrolida, te se primjenjuju različite metode respiratorne fizikalne drenaže. Primjena cjepiva može biti korisna u sprječavanju komplikacija u dišnom sustavu i bolesti jetre (10, 17). Detaljnije o liječenju plućne bolesti bit će navedeno zasebnom poglavlju.

Etiološko liječenje zasada se bazira na pokušajima sinteze lijekova koji bi mogli utjecati na neki od procesa sinteze, prijenosa, obrade, ugradnje proteina CFTR u staničnu membranu, odnosno funkciju već ugrađenog kanala. Za kliničko liječenje je 2012. godine odobren prvi CFTR modulator - *Ivacaftor*, za pacijente s G551D mutacijom (klasa III), koji djeluje kao potencijator, odnosno povećava frekvenciju otvorenosti CFTR kanala koji kod ove mutacije ima defekt u provođenju. Lijek poboljšava plućnu funkciju, prehrambeni status, i smanjuje učestalost egzacerbacija plućne bolesti, ali liječenje je moguće tek u manjem broja bolesnika koji nose tu mutaciju. Nastavlja se s istraživanjem spojeva koji bi djelovali u bolesnika homozigotnih za najčešću mutaciju $\Delta F508$ (17).

3. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Bakterije roda *Pseudomonas* su aerobni, gram-negativni, pokretni štapići, koji spadaju u skupinu oportunističkih patogena životinja, biljaka i ljudi. Ubikvitarno su prisutni u svim medijima poput tla, vode, vegetacije i materijalu nastalom organskim raspadom, uz predilekciju prema vlažnom okolišu. U mikroskopskom preparatu bojenom po Gramu imaju izgled kratkih ravnih štapića duljine 1,5 – 5 µm, širine 0,5 – 1 µm i pojavljuju se pojedinačno, u lancima ili redovima. Posjeduju enzime citokrom-oksidadazu i katalazu, a neki sojevi posjeduju i polisaharidnu kapsulu. Pokretne su bakterije te posjeduju jedan ili više polarnih bičeva, a neke vrste posjeduju i fimbrije. Određeni sojevi mogu rasti u anaerobnim uvjetima, koristeći se nitratima ili argininom kao terminalnim akceptorom elektrona. Iako neke vrste imaju sposobnost rasta i razmnožavanja na 4°C – 42°C, većina ih je mezofilna s optimalnom temperaturom za rast i umnožavanje između 30 i 37°C. Jedna od karakteristika pseudomonasa jest i sposobnost stvaranja vodotopljivih pigmenata: pijocijanina (plavi pigment), pioverdina (žuti pigment), piorubina (crveni pigment) i piomelanina (crni pigment) (18).

Prvi opisi pseudomonasa potječu iz 19. stoljeća, kada je francuski vojni kirurg Sellidot opisao stvaranje plavkastog gnoja u rani ozlijeđenog vojnika. Opis samog mikroorganizma daje 1882. godine Gessard, koji ga naziva *Bacillus pyocyaneus*. Godine 1900. Migula uvodi naziv *Pseudomonas* (grč. *pseudo* – lažan, lažno, *monas* – jedinka, jedinica) i epitetom *aeruginosa* (lat. *aeruginosus* – pun bakrene hrđe, tj. zeleno-plav) zamjenjuje dotadašnji naziv vrste *pyocyaneus*, pa nastaje naziv *Pseudomonas aeruginosa* koji je i danas službeni naziv ove vrste koja tipski najbolje opisuje cijeli rod (18).

Unutar roda *Pseudomonas* medicinski najznačajnija vrsta jest *Pseudomonas aeruginosa*, zbog svoje sposobnosti invazije tkiva domaćina te brojnih čimbenika virulencije i toksičnosti. Sposobnost preživljavanja u različitim tekućinama omogućuje mu trajnu postojanost u bolničkom okruženju, te je jedan je od najznačajnijih uzročnika bolničkih infekcija.

Čini tipičnu bakterijsku vrstu iz skupine oportunističkih patogena, i uzročnik je infekcija u bolesnika s oslabljenom imunošću. *P. aeruginosa* je po svojoj prirodi bakterija rezistentna na antimikrobne kemoterapeutike te je čest nastanak izrazito rezistentnih sojeva, najčešće u bolnicama i domovima za njegu starijih osoba, na gotovo sve klase antibiotika. U ovom radu razmatra se ponajprije njegova uloga u kroničnim plućnim infekcijama u pacijenata oboljelih od cistične fibroze (18).

3.1. Epidemiologija

Pseudomonasi su oportunistički patogeni ubikvitarno prisutni u različitim okolišnim uvjetima. Medicinski je relevantno što *P. aeruginosa* možemo pronaći u bolničkom okruženju gdje preživljava u dezinficijensima, kremama, sapunima, tekućini za ispiranje, kapima za oči, otopinama i opremi za dijalizu, i što je posebno bitno, nebulizatorima koje pacijenti oboljeli od CF koriste u primjeni terapije. Također ga se učestalo može pronaći u ovlaživačima zraka, sanitarnim odvodima, umivaonicima, kadama, hidroterapijskim bazenima, kupkama i na površini različitih biljaka. Izvor infekcije mogu biti i javna kupališta, otopine za leće, kozmetika, umjetni nokti, intravenske droge, i unutrašnja površina sportske obuće. *P. aeruginosa* može biti i sastavni dio normalne flore u zdravih pojedinaca, ali uglavnom kao prolazna flora. Gastrointestinalni sustav najčešće je mjesto kolonizacije, učestalije u vegetarijanaca, ali i drugi vlažni dijelovi tijela poput ždrijela, nazalne sluznice, i vlažnih dijelova kože (aksila i perineum) također mogu biti kolonizirani. U hospitaliziranih pacijenata učestalost kolonizacije je veća, a raste s duljinom hospitalizacije te primjenom antimikrobne terapije širokog spektra ili kemoterapije. U tih bolesnika, pseudomonas može kolonizirati i donje dijelove respiratornog trakta, od čega su pod visokim rizikom intubirani bolesnici. Na suhoj i intaktnoj zdravoj koži, ovaj mikroorganizam ugiba u kratkom razdoblju (18).

3.2. Patogeneza

Obzirom na mogućnost rasta i razmnožavanja u gotovo svim uvjetima, brojne čimbenike virulencije i rezistenciju na antibiotike, iznenađujuće je da *P. aeruginosa* nije učestaliji patogen. Umjesto toga, infekcije koje izaziva, primarno su oportunističke i pogađaju bolesnike s oslabljenom ili oštećenom imunošću. Stanja koja pogoduju razvoju infekcije su nestanak odnosno oštećenje kožno-sluznične barijere (opekline, rane, intubacija, kateterizacija), stanja kompromitiranih obrambenih imunosnih mehanizama (neutropenija, hipogamagloblinemija, starija životna dob, dijabetes, cistična fibroza, karcinom, AIDS) te stanja u kojima je zaštitna funkcija normalne flore poremećena terapijom antibioticima širokog spektra (18). Kod infekcije pluća koja se javlja u cističnoj fibrozi, najvjerojatnije je riječ je o kombinaciji oštećenih obrambenih imunosih mehanizama i korištenja antibiotika širokog spektra, uz anatomske predispozicije promijenjenih dišnih puteva koji omogućavaju dugotrajnu kolonizaciju ovom bakterijom.

3.2.1. Čimbenici virulencije

Čimbenike virulencije koje *P. aeruginosa* posjeduje dijelimo na strukturne i sekrecijske. Čimbenici vezani na površinu stanice odgovorni za pokretljivost i adherenciju su: polarni bič (flagela), fimbrije, i sluzava amorfn masa nazvana alginat. Sekrecijski čimbenici virulencije koje bakterija izlučuje su: ekstracelularni produkti (enzimi, hemolizini, egzotoksin A), proteini tipa III sekrecijskog sustava, *quorum sensing* signalne molekule, te alginat (ekstracelularni sluzavi matriks). Površinske strukture štite bakteriju od fagocitoze, protutijela i sustava komplementa, dok enzimi i toksini koje bakterija luči omogućavaju prodor kroz tkiva i stvaranje pogodne sredine za prehranu i umnožavanje bakterije (18).

P. aeruginosa uzrokuje infekciju tijekom nekoliko koraka. Prvo se uspostavlja bakterijska kolonizacija na koži ili sluznicama organizma procesom adherencije, nakon čega je moguća daljnja invazija tkiva i organskih sustava, te nastanak diseminirane bolesti, bakterijemije i sepse. U procesu adherencije identificirane su četiri glavne grupe adhezina: fimbrije, mucin-vežući protein vanjske membrane F, površinski lektini i mukoidni egzopolisaharidi (alginat i kapsula). Kod kroničnih infekcija najvažniji je alginat, koji se sastoji od ponavljajućeg polimera manuronske i glukuronske kiseline, te omogućava adherenciju i zaštitu bakterijama na mjestu kolonizacije. Prekomjerna ekspresija alginata javlja se kod prelaska na mukoidni fenotip, te ova sluzava masa štiti *P. aeruginosa* od fagocitoze, antibiotskog djelovanja i onemogućuje obrambeni odgovor domaćina (18, 19).

Obzirom da je adherencija značajan prvi korak u patogenezi većine infekcija, većina patogena posjeduje više različitih adhezina, koje iskazuje ovisno o fazi infekcije, odnosno okolišnim uvjetima, pa premda patogene bakterije posjeduju gene i za desetke različitih adhezina nisu svi u isto vrijeme aktivirani. Dokazano je da alginat nije uključen u adherenciju *P. aeruginosa* na epiteloidne stanične kulture, već je ona posredovana fimbrijama (21), a postaje značajan tek u kasnijem tijeku infekcije.

Proteolitički enzimi i hemolizini glavni su čimbenici koji omogućuju invazivnost pseudomonasa, te razaranjem tkiva stvaraju potrebne uvjete za umnožavanje bakterija. Među enzimima najvažnije su proteaze: alkalna fosfataza i elastaza, a od hemolizina fosfolipaza C osjetljiva na toplinu, i ramnolipid otporan na toplinu. Hemolizini sinergistički djeluju razgrađujući lipide, što je posebno bitno kod invazije plućnog tkiva gdje fosfolipaza C razgrađuje fosfatidilkolin, glavni sastojak plućnog surfaktanta. Ramnolipid detergentskim djelovanjem pospješuje učinak fosfolipaze, a u visokim koncentracijama privlači i lizira leukocyte, te ima ciliostatički učinak.

Još jedan važan čimbenik virulencije *P. aeruginosa* je i tip III sekrecijskog sustava, koji se sastoji od tri komponente: sekrecijskog aparata, translokacijskog aparata i efektorskih proteina – toksina. On je povezan s akutnim invazivnim infekcijama i zahtjeva fimbrijama posredovan kontakt bakterije i epitelne stanice, a omogućava sekreciju pseudomonasnih egzotoksina: ExoS, ExoT, ExoU i ExoY, - čije je djelovanje citotoksično (21, 18).

Lipopolisaharid (endotoksin) i egzotoksin A omogućuju sustavnu toksičnost *P. aeruginosa* u teškim proširenim infekcijama. Većina kliničkih izolata (oko 90%) stvara egzotoksin A. Njegov je mehanizam djelovanja ADP-ribosilacija elongacijskog čimbenika 2, što prekida sintezu proteina i dovodi do smrti stanice. Lipopolisaharid ima glavnu ulogu u etiologiji sepse uzrokovane pseudomonasom. Osim tih čimbenika virulencije odgovornih za invazivnu bolest, *P. aeruginosa* izlučuje i siderofore, piokelin, i pioverdin, kleatore željeza nužne za uspostavu i održavanje infekcije, a može koristiti i siderofore drugih mikroorganizama (18).

3.2.2. Međustanična signalizacija

Osim invazivnih čimbenika, *P. aeruginosa* je također razvio mehanizam za koordiniranu ekspresiju gena značajnih za adaptaciju na okolišne uvjete. Ova je reakcija kontrolirana sustavom detekcije kvoruma (eng. *quorum sensing*) – složenim regulatornim krugom koji uključuje međustaničnu signalizaciju. Ovaj signalni sustav omogućuje pseudomonasu regulaciju genske ekspresije, ovisno o gustoći samih bakterijskih stanica u nekom području, pomoću malih difuzibilnih molekula zvanih autoinduktori. *Quorum sensing* signalne molekule jesu acil-homoserin laktoni (AHL), slobodno difuzibilne molekule, koje po postignutoj graničnoj koncentraciji vežu LasR/RhlR aktivatore transkripcije, te induciraju ekspresiju određenih gena.

Aktivacija *quorum sensing* kaskade promiče formiranje biofilma – strukturiranih zajednica bakterija koje naseljavaju površine sluznica i invazivna medicinska pomagala (18).

Stvaranje biofilma omogućuje bolje uvjete bakterijske perzistencije u tkivima i organima, što je posebice izraženo u kroničnim plućnim infekcijama koje *P. aeruginosa* uzrokuje u pacijenata s cističnom fibrozom. Bakterije unutar biofilma zaštićene su sluzavom masom koju su same stvorile i mnogo ih je teže eradicirati u odnosu prema onima u pojedinačnom, tzv. planktonskom obliku, te su i do 1000 puta rezistentnije na antibiotike (18, 22).

3.3. Laboratorijska dijagnostika

Uzorci za izolaciju *Pseudomonasa* određeni su mjestom infekcije, pa su kod infekcija dišnog sustava to iskašljaj, aspirat donjih dišnih puteva i bronhoalveolarni lavat. U izravnom preparatu uzorka bojenog po Gramu mogu se vidjeti gram-negativni štapići čija se morfologija ne može razlikovati od morfologije enterobakterija ili drugih gram-negativnih štapića. *Pseudomonasi* imaju jednostavne zahtjeve za uzgoj i lako rastu na uobičajenim krutim hranjivim podlogama za uzgoj mikroorganizama poput krvnog agara, kao i na većini selektivnih i diferencijalnih hranjivih podloga za uzgoj enterobakterija. Za uzgoj im je potrebna aerobna atmosfera, osim ako je u podlozi prisutan nitrat, a ukoliko se uzgajaju u tekućoj hranjivoj podlozi (bujonu), njihov rast je najizraženiji na površini, u kontaktu sa zrakom, gdje je koncentracija kisika najviša. *P. aeruginosa* na krvnom agaru najčešće raste u obliku plosnatih kolonija s nazubljenim rubovima, koje imaju metalni sjaj i karakterističan slatkasti voćni miris koji podsjeća na miris lipe. *Pseudomonas* može rasti i u nekoliko drugih morfoloških oblika, poput glatkih kolonija sličnih enterobakterijskima, sitnih kolonija, te mukoidinih sluzavih kolonija koje nastaju zbog produkcije alginata. Na krvnom je agaru izražena β -hemoliza.

Na Müller-Hintonovu agaru vidljiva je produkcija vodotopljivih pigmenata koji difundiraju u okolinu kolonija te boje agar u karakterističnu boju u ovisnosti o pigmentu ili kombinaciji izlučenih pigmenata. Pioverdin daje fluorescentno žutu, piocijanin plavu boju, piocijanin i pioverdin zajedno žuto-zelenu boju, a rijede se viđaju piorubin koji daje crvenu boju i pomelanin koji daje crnu. Uz to, pseudomonas je laktoza negativna bakterija, po čemu ga razlikujemo od laktoza-pozitivnih enterobakterija. Budući da je nefermentativna bakterija, na Kliglerovom agaru daje negativnu reakciju zbog nemogućnosti fermentacije šećera u njemu, a pozitivna je reakcija oksidaze. Ima sposobnost dehidrozilacije arginina, koristi se citratom, i raste na 42°C (18).

Serotipizacija je moguća s obzirom na raznolikost O-postraničnog lanca strukturnog antigena – lipopolisaharida (LPS) vanjske membrane. Izvodi se postupkom aglutinacije na predmetnom stakalcu pomoću dijagnostičkih seruma koji su komercijalno dostupni. Tako se može razlikovati 20 različitih serotipova sukladno međunarodnoj klasifikaciji *Pa* na temelju antigenskog sastava. Konačna tipizacija pseudomonasa najtočnija je primjenom molekularnih metoda koje čine „zlatni standard“ – cijepanje restrikcijskim enzimima i gel elektroforeza u pulsirajućem polju - PFGE (engl. *pulse field gel electrophoresis*) (18).

3.4. Liječenje, prevencija i kontrola

P. aeruginosa je po svojoj prirodi bakterija rezistentna na antimikrobne kemoterapeutike i posjeduje raznolike mehanizme za stjecanje otpornosti na antibiotike, uz čest nastanak višestruko i ekstenzivno rezistentnih sojeva, najčešće u bolničkim uvjetima. Najvažniji mehanizmi rezistencije su 1. slaba propusnost stanične stijenke koja omogućuje intrinzičnu rezistenciju na mnoge antibiotike; 2. proizvodnja komosomalnih i plazmidnih β -laktamaza, aminoglikozidaza i cefalosporinaza; 3. promjene u ciljnom mjestu vezanja antibiotika;

4. aktivni efluksni mehanizam izbacivanja antibiotika iz stanice. Rezistenciji također doprinosi sposobnost stvaranja biofilma, koji svojim osobitostima djeluje kao fizikalna i kemijska barijera u zaštiti bakterija od djelovanja različitih antibiotika (18).

Pseudomonas akumulira mnoge genske mutacije koje se fenotipski očituju jednim od već navedenih mehanizama, a horizontalnim prijenosom genskog materijala (putem konjugacije i transdukcije) može steći i mnoge druge enzime poput β -laktamaza proširenog spektra (eng. *extended spectrum β -lactamases* – ESBL) i karbapenemaza (18).

U liječenju infekcija uzrokovanih *P. aeruginosa*, u ovisnosti o rezultatima antibiograma, uspješno se upotrebljavaju antipseudomonasni penicilini (tikarcilin, piperacilin, karbenicilin), cefalosporini III. i IV. generacije (ceftazidim i cefepim), karbapenemi (meropenem i imipenem), monobaktami (aztreonam), fluorokinoloni (ciprofloksacin), i aminoglikozidi (gentamicin i amikacin). U multirezistentnih sojeva koriste se toksičniji antibiotici iz skupine polimiksina (polimiksin B i kolistin). (18). Za što uspješniji ishod liječenja, često se kombiniraju β -laktamski antibiotici s aminoglikozidnim antibioticima, iako monoterapija jednim antibiotikom može biti jednako uspješna kao i liječenje kombinacijom, ako je započeta u pravo vrijeme i odgovarajućoj dozi. Primijećeno je da pojedini antibiotici u koncentracijama nižim od minimalne inhibitorne koncentracije onemogućuju lučenje pojedinih čimbenika virulencije pseudomonasa što je iskorišteno u liječenju pacijenata oboljelih od cistične fibroze. Azitromicin, u koncentracijama manjim od minimalne inhibitorne koncentracije, pseudomonasu onemogućuje lučenje alginata, te se time postiže dodatni terapijski učinak u kroničnim plućnim infekcijama karakterističnim za cističnu fibrozu (18). Poseban problem je nastanak multirezistentnih sojeva koji se pojavljuju u zdravstvenim ustanovama i domovima za starije osobe, osobito na odjelima s rizičnom populacijom bolesnika (jedinice intenzivnog liječenja i hematološki odjeli).

P. aeruginosa je najčešći nonfermentor izoliran u infekcijama udruženim sa zdravstvenom skrbi (18). Multipla rezistencija na antibiotike najčešće se definira kao neosjetljivost na barem jedan antibiotik iz tri ili više grupa antipseudomonasnih antibiotika (24).

Pokušaji eliminacije bakterije iz bolničkog okruženja su u praktičnom smislu nemogući, s obzirom na njenu ubikvitarnost. Stoga je posebice važno primjenjivati mjere kojima se sprječava i suzbija širenje rezistentnih sojeva *P. aeruginosa*. To su osobito mjere kojima se sprječava onečišćenje sterilne i kritične medicinske opreme kao što su respiratorna i dijalizna oprema, te prijenos uzročnika između bolesnika posredovan zdravstvenim radnicima. Nužno je provođenje kontaktne izolacije, higijene ruku, prikladno čišćenje i dezinfekcija pribora, opreme i bolesničke okoline, te je također važna mjera - racionalna uporaba antibiotika širokog spektra (18). U Republici Hrvatskoj u 2016. Godini bilo je 10% sojeva rezistentnih na piperacilin-tazobaktam, 14% na ceftazidim, 9% na cefepim, 21% na meropenem, 20% na imipenem, 25% na ciprofloksacin, 22% na gentamicin i 9% na amikacin. U posljednjih 10 godina vidljiv je trend porasta rezistencije na ciprofloksacin, ceftazidim i imipenem, uz pad rezistencije na gentamicin i piperacilin-tazobaktam (25).

4. PSEUDOMONAS AERUGINOSA I BIOFILM

Već se dugi niz godina smatra da su kronične pseudomonasne infekcije pluća u oboljelih od cistične fibroze povezane s stvaranjem sluzavog izvanstaničnog matriksa - biofilma, iako su sama definicija biofilma i značenje bakterijskog biofilma u paogenezi infekcija prihvaćeni mnogo kasnije. Već od 1960-tih bilo je poznato da je mukoidni fenotip *P. aeruginosa* usko povezan sa kroničnim infekcijama pluća u ovih pacijenata. 1989. Baltimore i sur. dokazali su postojanje intraluminalnih agregata *P. aeruginosa* u plućima pacijenata preminulih od cistične fibroze korištenjem protutijela na mukoidni tip *P. aeruginosa* (26).

Agregati su također nađeni u plućnim apscesima i iskašljaju pacijenata koji boluju od CF (27). Danas znamo da je *P. aeruginosa* bakterija koja izaziva biofilm infekcije u plućima pacijenata oboljelih od cistične fibroze, te da su takve infekcije često kronične i mogu trajati desetljećima (26).

4.1. Biofilm

U prirodi, mikroorganizmi mogu egzistirati kao planktonski organizmi - individualne stanice koje slobodno plivaju u tekućem mediju; ili u obliku sesilne zajednice - biofilma. Biofilm je zajednica mikroorganizama vezana za površinu supstrata. Kao sesilni oblik života bakterija, omogućuje opstanak bakterijske populacije, te je u prirodi dominantan nad slobodno-živućim, planktonskim oblikom. Bakterije koje čine biofilm zaštićene su od negativnih utjecaja okoliša, imaju sposobnost disperzije i pokazuju vrlo veliku rezistenciju na djelovanje antibakterijskih čimbenika kao što su antibiotici i efektorske molekule imunosnog sustava. U protekla dva desetljeća definicija biofilma mijenjala se s novim spoznajama o formiranju, strukturi, dozrijevanju i rezistenciji biofilma. Danas se biofilmom smatra sesilna zajednica mikroorganizama čije su stanice ireverzibilno povezane sa supstratom i međusobno, te uronjene u izvanstanični matriks polisaharidnih polimera koji su same stvorile, a očituju izmjenjen fenotip zbog promijenjene brzine reprodukcije i transkripcije gena koja se ne uočava u planktonskih mikroorganizama (19).

Nakon početne adherencije bakterija na površinu i formiranja zrelog biofilma, na sluzavi izvanstanični matriks otpada čak 80-85% biofilma, dok mikroorganizmi čine samo 15-20% biomase. Biofilm čine često različite bakterije, ili bakterije i gljive, ali ga može činiti i samo jedna vrsta mikroorganizama.

Mikroorganizmi koji čine biofilm međusobno komuniciraju pomoću autoinduktorskih molekula, i tako detektiraju kada je broj jedinki dostatan da bi se aktivirali geni odgovorni za virulenciju, taj mehanizam znanstvenici nazivaju detekcijom kvoruma (eng. *quorum sensing*) (19).

4.2. Mukoidni fenotip *P. aeruginosa*

Osim signalnog molekularnog sustava, u razvoju kronične pseudomonasne infekcije u pacijenata oboljelih od cistične fibroze, važnu ulogu imaju geni i putevi uključeni u pretvorbu pseudomonasa normalnog (nemukoidnog) fenotipa u mukoidni oblik. Mukoidni fenotip povezuje se sa infekcijama u cističnoj fibrozi, pogotovo kroničnim. Obilježava ga gubitak pokretljivosti bakterije i ekscesivna proizvodnja viskoznog egzopolisaharida – alginata. Alginat okružuje bakteriju i stvara omotač koji podsjeća na sluz pa ga stoga takav fenotip nazivamo mukoidnim (Slika 1). Povezuje ga se sa stvaranjem biofilma, općom rezistencijom na više vrsta antibiotika i okolišne stresore kao što su isušenje i nedostatak hranjivih tvari. Najvažniji gen uključen u proces produkcije alginata je *algU*, on kodira sigma faktor koji je slabo izražen u nemukoidnih sojeva, a bazalna količina koja se u normalnim uvjetima proizvodi biva sekvestrirana od strane anti-sigma faktora MucA. Ta je interakcija ključna kod konverzije soja u mukoidni fenotip. Kada MucA normalno sekvestrira AlgU u nemukoidnom obliku, bakterija ne proizvodi značajne količine alginata. U uvjetima stresa (oksidativni, osmotski, toplinski, nedostatak hranjivih tvari, isušenje, antibiotici), bakterija dobiva signal za pokretanje mehanizama proteolitičke razgradnje MucA. (28).



Slika 1. Sluzavi izgled kolonija mukoidnog soja *P.aeruginosa* koji producira polisaharid alginat (ljubaznošću prof. J.V.).

Time se oslobađa vezani AlgU i slobodno djeluje kao transkripcijski faktor te zajedno s nekoliko drugih proteina stimulira produkciju alginata i tako omogućava privremenu ekspresiju mukoidnog fenotipa. No, kod pacijenata koji boluju od cistične fibroze s kroničnom plućnom infekcijom, često imamo pojavu konstitutivno izraženog mukoidnog fenotipa kao posljedicu mutacije u *mucA* genu (28). Smatra se da do indukcije mutacija dolazi zbog pokretanja polimorfonuklearnog (PMN) imunosnog odgovora uz otpuštanje reaktivnih kisikovih radikala koji oštećuju bakteriju i stvaraju za nju nepogodne uvjete. Høiby i sur. u svojoj su studiji provedenoj na uzorcima skandinavskih pacijenata oboljelih od CF dokazali da vodikov peroksid i aktivirani polimorfonukleari mogu inducirati istu mutaciju u *MucA* genu *Pa* soja PAO1 (29). Mutacije toga gena pronašli su u 93% mukoidnih sojeva izoliranih iz pluća oboljelih pacijenata, u suradnji s drugim autorima (30).

Prema tome, možemo zaključiti da je ta mutacija dovela do promjene PO1 soja u mukoidni fenotip i da je ključna uloga aktiviranih PMN i kisikovih radikala.

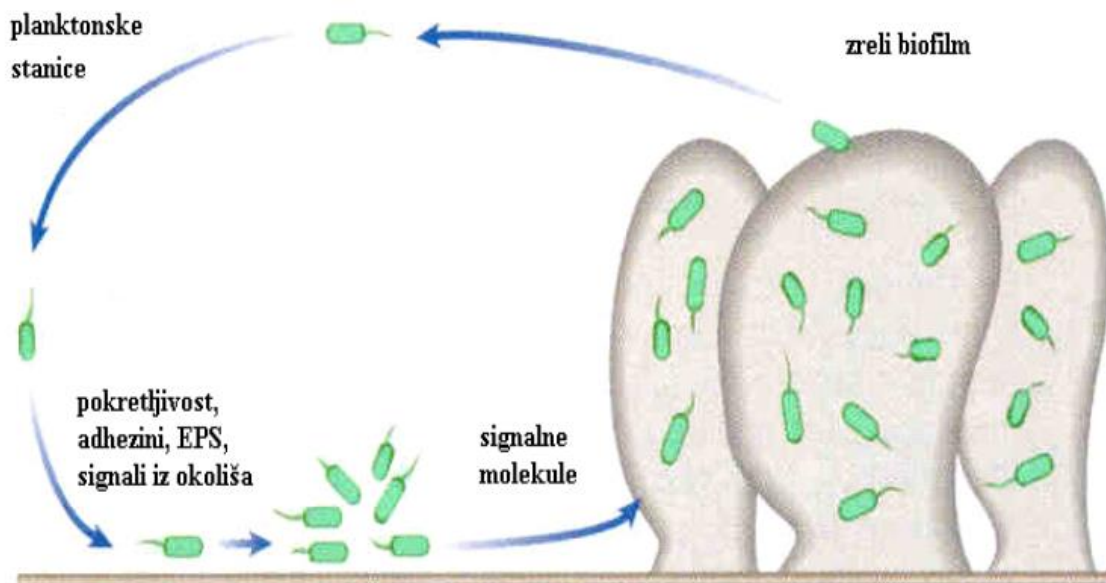
Alginat djeluje kao sakupljač kisikovih radikala, i štiti *Pa* od fagocitoze i fizioloških mehanizama čišćenja dišnih puteva. To čini *Pa* mukoidnog fenotipa otpornijim od nemukoidnog na eradikaciju putem mehanizama obrambenog imunološkog sustava (31). Kada jednom dođe do infekcije mukoidnim tipom *P. aeruginosa*, ili konverzije normalnog u mukoidni tip, javlja se pogoršanje kliničkog tijeka bolesti. Do konverzije obično dolazi tijekom kronične infekcije pluća, bez značajnih trenutnih promjena u kliničkoj slici, ali pacijenti tijekom vremena razvijaju kroničnu upalu, koja smanjuje plućnu funkciju (28). U sputumu pacijenata oboljelih od CF sa kroničnom infekcijom pluća, nalazimo velike količine alginata i pseudomonasnih agregata u mikrokolonijama. Stoga se on smatra značajnim faktorom virulencije, a inducira i jaki humoralni imunosni odgovor sa stvaranjem protutijela IgG i IgA razreda. Visok titar protutijela na *P. aeruginosa* koji nalazimo u pacijenata s mukoidnim tipom pseudomonasa, negativan je prediktivni faktor bolesti, jer pokreće burniji upalni odgovor koji brže uništava plućno tkivo. Povišenje titra protutijela na pseudomonas identificirano je kao indikator prelaska akutne u kroničnu plućnu infekciju (26).

4.3. Stvaranje biofilma u oboljelih od cistične fibroze

Nekoliko studija potvrđuje teoriju o mogućnosti stvaranja biofilma u plućima oboljelih od cistične fibroze. U jednoj od njih, mikroskopskom studijom iskašljaja oboljelih, otkrivena je povišena rezistencija na fagocitozu i antibiotike zahvaljujući visokoj produkciji izvanstaničnih polimera u biofilmu (32). U normalnim dišnim putevima, površina epitelnih stanica se održava hidriranom pomoću sloja sluzi koju čini mješavina elektrolita, glikoproteina mucina, lipida, i proteina.

Kako bi formirao biofilm u plućima oboljelih od CF, *P. aeruginosa* mora probiti mukozni sloj i ući u zonu hipoksičnih uvjeta, gdje prelazi na anaerobni metabolizam, u kojem se koristi nitritom, nitratom i dušičnim oksidom kao alternativnim akceptorima elektrona. Zato se sposobnost rasta pseudomonasa u anaerobnim uvjetima smatra važnim preduvjetom za stvaranje biofilma u oboljelih od CF (28).

Kod formiranja biofilma *P. aeruginosae* na biotičkim i abiotičkim površinama in vitro, uočavaju se određeni stadiji razvoja biofilma (Slika 2). Proces započinje vezanjem planktonskog ili slobodnoživućeg oblika bakterije na ponudenu površinu, u slučaju cistične fibroze, respiratorni epitel donjih dijelova dišnog sustava. Taj korak zahtijeva aktivaciju nekoliko gena i faktora, čija je posljedica ekspresija flagela i fimbrija na površini bakterijske stanice. Tijekom drugog stadija, bakterija počinje stvarati i lučiti dijelove izvanstaničnog matriksa, koji potiču i olakšavaju združivanje bakterija i stvaranje mikrokolonija (33). Matriks se sastoji od polisaharida, proteina i eDNK, što igra važnu ulogu u povećanju rezistencije biofilm-formirajućih bakterija oko 1000 puta u odnosu na planktonski oblik bakterija (34). Zatim, tako stvorene mikrokolonije ulaze u proces dozrijevanja (maturacije) u gušći oblik biofilma, a time dolazi do stvaranja gradijenta kisika u biofilmu. To znači da će koncentracija kisika biti veća na površini biofilma, a manja u dubljim slojevima, te ćemo untutar samog biofilma razlikovati područja aerobnih, mikroaerofilnih i anaerobnih uvjeta. Zadnji korak u razvoju čini pojava odlamanja i raspršenja dijelova biofilma, što je uvjetovano razgradnjom njegovih dijelova ili modifikacijom pri kojoj dolazi do oslobađanja površinskih proteina, a rezultira promjenom strukture i mogućnosti stvaranja novog biofilma (28).



Slika 2. Stvaranje biofilma: u prvoj fazi mikroorganizmi se reverzibilno vežu za površinu, zatim slijedi ireverzibilno vezanje, potom faza dozrijevanja biofilma, i na kraju faza disperzije. Prema: Kalenić i sur. (2013.) str. 89, uz dopuštenje Medicinske naklade.

Čini se da heterogenost uvjeta koji vladaju u cističnom fibrozom promjenjenim plućima, uvjetuje i fenotipsku heterogenost *P. aeruginosa* izoliranih iz iskašljaja oboljelih pacijenata (35). Najčešće perzistira jedan klon *Pa*, uz pojavu nekoliko različitih fenotipova, koji su posljedica mutacija u genomu bakterije induciranih uvjetima iz okoliša u kojem se bakterija nalazi. Fenotipovi koji se iskazuju u plućima oboljelih od CF su mukoidni, nemukoidni, i mikrokolonije, a dolazi i do stvaranja visoko mutabilnih tipova tzv. hipermutatora, nastalih zbog oštećenja mehanizama popravka DNK. Njih karakterizira sposobnost reverzije iz mukoidnog ponovno u nemukoidni fenotip (31). U pacijenata oboljelih od cistične fibroze, 65-80% svih infekcija su povezujemo sa prisustvom biofilma (36). Biofilm infekcije su kronične i karakterizira ih kontinuirani upalni proces u kojem dominira humoralni imunološki odgovor s produkcijom visokog titra protutijela i invazijom mjesta infekcije velikim brojem polimorfonuklearnih leukocita koji uništavaju okolno tkivo.

Tijekom takve kronične infekcije koja može trajati desetljećima, *P. aeruginosa*, kako bi preživio, prolazi proces prilagodbe na upalni imunosni odgovor i na različite uvjete koji vladaju u respiratornim i provodnim zonama pluća, kao i na antibiotike korištene u liječenju pacijenata (31).

5. KRONIČNA INFEKCIJA PLUĆA U OBOLJELIH OD CISTIČNE FIBROZE

Iako je bolest dišnog sustava u CF bazirana na genskoj mutaciji *CFTR* gena, to nije glavni uzrok morbiditeta i mortaliteta u ovih pacijenata. Nefunkcionalnost *CFTR*-a stvara pogodne uvjete za preživljenje i razmnožavanje određenih mikroorganizama. Nakupljanje guste sluzi u plućima onemogućava uklanjanje bakterija iz dišnih puteva i stvara medij bogat nutrijentima u kojem bakterije mogu rasti i umnožavati se (28). Već je naglašeno da je dominantan bakterijski uzročnik infekcija pluća u starijih pacijenata upravo *P. aeruginosa*. Karakterizira ga sposobnost prilagodbe i perzistencije u odjeljcima dišnih puteva u kojima vladaju različiti uvjeti, uz razvoj kronične infekcije koju povezujemo sa stvaranjem biofilma (31).

5.1. Patofiziološke promjene dišnih puteva u CF – podloga za infekciju

U zdravim plućima, površina dišnih puteva obložena je tankim slojem pericilijarne vodenaste sluzi. Sluz oblaže trepetljike epitelnih stanica respiratornog epitela u bifaznom sloju. Gornji sloj nešto je viskozniji od donjeg sloja, i hvata čestice i bakterije koje prolaze prema donjim dišnim putevima. Donji sloj sluzi, koji nazivamo pericilijarnim slojem (eng. *pericillar layer* – PCL), manje je gustoće i fluidniji, što omogućava kretanje trepeljiki unutar njega. Pomicanjem trepetljiki, pomiče se i mukozni sloj, te se mehanički odstranjuje prema gornjim dijelovima dišnog sustava, gdje dolazi do ekspektoracije sadržaja (28).

Tim mehanizmom se iz pluća normalno odstranjuju bakterije i debris koji bivaju udahnuti ili na neki drugi način uneseni u dišni sustav. CFTR protein koji se nalazi na apikalnim membranama stanica dišnog epitela, zajedno s drugim ionskim kanalima, izmjenom iona održava normalnu hidraciju i osmotsku ravnotežu pericilijarnog mukoznog sloja. Uloga CFTR-a je u transportu aniona klorida i bikarbonata iz stanica u lumen dišnih puteva, te u njegovom odsustvu ili nefunkcionalnosti dolazi do zgušnjavanja PCL-a. Danas vjerujemo da je to posljedica primarnog poremećenog transporta kloridnih iona i sekundarnog transporta hidrogenkarbonatnih iona putem CFTR. Čini se da nedostatak hidrogenkarbonata, i posljedični pad pH utječe na gušće slaganje proteina mucina, koji čine glavnu proteinsku komponentu mukoznog sloja. PCL koji oblaže trepetljike jako je osjetljiv na promjene udjela vode, a kod nedovoljne sekrecije iona, javlja se i manjak vode u secerniranom sadržaju, što dovodi do njegovog zgušnjavanja (28).

Velika gustoća mukoznog sloja onemogućava normalnu pokretljivost cilija, te dolazi do nakupljanja sadržaja odnosno stvaranja sluzavog čepa koji se sastoji od sluzi, bakterija, staničnog debrisa i neodstranjenih čestica. Unatoč tome, vrčaste stanice dišnog epitela nastavljaju lučiti jednake količine sluzi, koja se ne može normalno odstraniti i počinje ispunjavati dišne puteve. Pokreće se snažna reakcija imunosnog sustava koja dovodi do upale u stijenci zahvaćenog bronha. Upalne stanice koje dominiraju su PMN i makrofagi, čija se količina značajno povećava u dišnim putevima ovih pacijenata. Oni fagocitiraju bakterije i debris stanica imunosnog sustava, te luče pro-upalne citokine koji pojačavaju upalni odgovor i privlače druge stanice imunosnog sustava. Dolazi do otpuštanja većih količina enzima proteaza i elastaza iz upalnih stanica, koje osim što uništavaju prisutne bakterije, oštećuju epitelne stanice dišnih puteva, što kroz višegodišnje ponavljanje dovodi do trajnih oštećenja s fibroznim promjenama plućnog tkiva (28).

5.2. Rana kolonizacija i infekcija

Ubikvitarnost *P.aeruginosa* u okolišu vjerojatno uvjetuje visoku pojavnost ovog patogena u pacijenta koji boluju od cistične fibroze. Kao što je prije spomenuto, *P. aeruginosa* je gram-negativna bakterija koja spada u oportunističke patogene, a izaziva asimptomatsku kolonizaciju gastrointestinalnog trakta u 6-30% oboljelih od CF. Dišni sustav, sinusi, te probavni trakt (pretpostavlja se uslijed gutanja sputuma), inicijalno su kolonizirani nemukoidnim sojevima *P. aeruginosa*, koji se tipično nalaze u okolišu. Do kolonizacije respiratornog sustava pseudomonasom u ovih pacijenata može doći u bilo kojem razdoblju života, a rezultati istraživanja pokazuju da je 70-80% njih inficirano do rane odrasle dobi, s time da do inicijalne infekcije dolazi najvjerojatnije već u prve tri godine života. Infekciju mogu zadobiti putem socijalnog kontakta ili tijekom boravka u bolnicama, no, raznolikost *Pa* klonova izoliranih u pacijenata koji boluju od CF, upućuje na okolišno podrijetlo većine kliničkih izolata (37).

Na temelju istraživanja, rizičnim čimbenicima za ranu akviziciju *Pa* infekcije smatraju se: ženski spol, homozigotnost za $\Delta F508$ – CFTR mutaciju, i kontakt sa starijim pacijentima već koloniziranim s *P. aeruginosa* (38). Ranu kolonizaciju u pacijenata koji boluju od CF povezujemo s lošijim rentgenskim nalazima pluća, lošijim kliničkim nalazom, i smanjenjem plućne funkcije u odnosu na neinficirane pacijente (39).

Pri rođenju, pluća djece oboljele od cistične fibroze normalnog su izgleda, ali ubrzo se javljaju znakovi infekcije i upale u bronhoalveolarnim lavatima (BAL), čak i u klinički zdrave djece. Još uvijek ne možemo sa sigurnošću tvrditi što se prvo javlja, infekcija ili upala, no postoje dokazi o upalnim aktivnostima u dišnim putevima djece i bez prisustva infekcije (13).

Takva su saznanja dovela u pitanje dotadašnji tradicionalni stav da se upalna reakcija plućima javlja kao posljedica kolonizacije i infekcije patogenima, i potaknula daljnja istraživanja usmjerena na dokazivanje da je povišena razina upalnih medijatora koja se može naći u BAL-u neinficiranih pacijenata, posljedica pretjeranog upalnog odgovora dišnog epitela na neke od ranih prolaznih patogena koji se uspješno uklanjaju iz dišnog sustava prije nego uzrokuju infekciju, ili ih nije moguće detektirati kultivacijom i metodama klasične bakteriologije (37).

Pluća dojenčadi s cističnom fibrozom rano su kolonizirana bakterijama *Haemophilus influenzae* i *Staphylococcus aureus*, koji su inače benigni kolonizatori gornjih dišnih puteva i nosne šupljine. *S. aureus* povezujemo uglavnom s infekcijama u prvim godinama života, te se javlja se u gotovo 40% dojenčadi tijekom prva tri mjeseca života. No ubrzo, *P. aeruginosa* postaje dominantna bakterija u dišnim putevima ispitanika (35). U jednoj studiji 39 od 40 dojenčadi s CF imalo je serološki ili kulturom dokazanu infekciju *P. aeruginosa* već do 3. godine života (40). Kronična infekcija *S. aureusom* obično prethodi infekciji s *P. aeruginosa*, pa se stoga smatra da oštećenje dišnih puteva tijekom infekcije stafilokokom stvara uvjete za kolonizaciju pseudomonasom (35).

Kod profilaktičke primjene antistafilokoknih antibiotika u djece s dokazanom vrstom *S. aureus* u obriscima grla, češće dolazi do kolonizacije s *Pa* nakon eradikacije stafilokoka, a moguća je i pojava meticilin-rezistentnog *S. aureusa* (MRSA) što znatno pogoršava klinički tijek bolesti i otežava liječenje (36, 27).

Od drugih patogena koji naseljavaju dišne puteve pacijenata koji boluju od cistične fibroze, česti su *Burkholderia cepacia*, *Stentotrophomonas maltophilia*, MRSA, te atipične mikobakterije. *Burkholderia cepacia* kompleks (više genovara) pokazuje inherentnu antibiotsku rezistenciju, visoku virulenciju i lak prijenos s jedne osobe na drugu.

Opasnost leži u brzom padu plućne funkcije i porastu mortaliteta u pacijenata koji razviju *B. cepacia* plućnu infekciju (41).

5.3. Patologija kronične plućne bolesti

Promjene u cističnoj fibrozi primarno zahvaćaju dišne puteve i submukozne žlijezde uz poštedu intersticija i alveolarnih prostora do kasnijih stadija bolesti. Ekspresija CFTR-a lokalizirana je u spomenutim primarno zahvaćenim područjima, s najdominantnijom ekspresijom u području submukoznih žlijezda. Čak i prije klinički manifestne infekcije, prisutna je hipertrofija submukoznih žlijezda, hiperplazija mukoznih stanica dušnika i glavnih bronha uz hipersekreciju sluzi. Bronhalne seromukozne žlijezde povećanog su volumena uz povećan omjer debljine žlijezde i stijenke bronha. Nedugo nakon rođenja, započinju prve infekcije bakterijskim patogenima, uz intenzivan neutrofilni odgovor u peribronhalnim i endobronhalnim prostorima. Dolazi do stvaraju mukopurulentnih čepova u malim i srednjim bronhiolima uz papilarnu hipertrofiju epitela, već u dječjoj dobi. To uzrokuje ponavljajuće bronhitise i bronhiolitise s upalnim odgovorom neutrofila, histiocita, limfocita i plazma stanica. U starijih bolesnika, upalnim procesima dišnih puteva dominiraju također neutrofili uz povišene razine interleukina 8 i neutrofilne elastaze, a kao posljedica proteolize i hondrolize potpornog tkiva dišnih puteva dolazi do njihove dilatacije sa stvaranjem bronhiektazija (13).

Bronhiektazije se pogoršavaju s dobi, a prvi su znakovi dilatacije dišnih puteva u nekih pacijenata vidljivi već pri rođenju, da bi do dvadesete godine bili prisutni u gotovo svih oboljelih od cistične fibroze. *P. aeruginosa* infekcije u pacijenata s bronhiektazijama povezane su sa učestalijim egzacerbacijama, hospitalizacijama i pogoršanjem kvalitete života, uz povećanu stopu smrtnosti kod učestalih egzacerbacija (42).

Pogođeni su najčešće proksimalni dišni putevi: gornji plućni režnjevi, desni srednji režanj, lingula, i gonji segmenti donjih plućnih režnjeva. Promjene u plućnom parenhimu uz znakove pneumonije moguće su od rođenja, a prisutne su u čak 82% oboljelih do 24. godine života.

Pneumonije se javljaju u svim stadijima bolesti. U početku je riječ o reverzibilnim fokalnim promjenama, ali s rekurentnim infekcijama koje karakteriziraju ovu bolest, dolazi do trajnog oštećenja tkiva i širenja infekcije na sve veće dijelove pluća (41).

Infekcije uzrokovane *S. aureusom* posebice povezujemo sa stvaranjem pneumatocela kao posljedica parenhimske nekroze. Može doći do formiranja endobronhalnih apscesa i atelektaza dijelova plućnog parenhima kao posljedica opstrukcije bronha mukopurulentnim sadržajem ili pritiska uvećanim limfnim čvorovima, što se često javlja u dojenačkoj dobi. Emfizematozne promjene manje su učestale, i javljaju se u starijih pacijenata. Moguća je pojava i plućnih cista koje mogu ili ne moraju komunicirati s bronhalnim stablom, a najčešće su bronhiektatične komunicirajuće ciste. Upala zahvaća i intersticij plućnog tkiva gdje nalazimo kronične infiltrate upalnih stanica i u kasnijim stadijima bolesti dolazi do razvoja intersticijske fibroze. Neki pacijenti razviju plućnu hipertenziju s intimalnom fibrozom i hipertrofijom medije plućnih arterijskih ogranaka (41).

Hemoptize su česte, i posljedica puknuća dilatiranih bronhalnih arterija ili vena u stijenkama dišnih puteva ili bronhiektatičnim šupljinama. Mogu nastati i kao posljedica direktnog oštećenja krvnih žila upalnim i infektivnim čimbenicima, te plućnom hipertenzijom potaknutih novostvorenih anastomoza i oslabljenog elasticiteta krvnih žila. Masivne hemoptize u mnogih su pacijenata uzrok smrtnog ishoda (41).

5.4. Pseudomonasna infekcija pluća

Dišni putevi oboljelih od CF pogodni su za kolonizaciju pseudomonasom iz nekoliko razloga: permisivnog mikrookoliša u hipoksičnim odjeljcima adherentnih mukoznih plakova, pojačanog vezanja bakterija za epitel, i smanjenog bakterijskog klirensa urođenim imunosnim i neimunosnim mehanizmima (7).

Prethodno opisani promjenjeni sastav sekreta dišnih puteva u plućima pacijenata koji boluju od CF, često se navodi kao predisponirajući čimbenik od strane domaćina za razvoj kronične kolonizacije s *P. aeruginosa*. Pretpostavlja se da promjena u ionskom sastavu sekreta dišnih puteva narušava obrambene mehanizme domaćina. Studija koju su proveli Tager i sur. pokazuje da povišena razina klorida u sekretu oštećuje sposobnost PMN da fagocitiraju bakterije, povećava učestalost njihove apoptoze, i smanjuje učinkovitost djelovanja peptidnih baktericidnih produkata koje oni otpuštaju (42, 43). Noviji koncept pretpostavlja da CFTR ne djeluje samo kao ionski kanal i regulator drugih kanala, već i kao receptor na epitelnim stanicama koji omogućava vezanje *P. aeruginosa* i njegovu internalizaciju u epitelne stanice dišnih puteva. Smanjen bakterijski klirens zbog nemogućnosti vezanja i internalizacije *Pa* u mišjih modela dovodi do povećanog nakupljanja bakterija u dišnim putevima (45). Stoga se može zaključiti da je u zdravim plućima internalizacija i apoptoza epitelnih stanica jedan od mehanizama uklanjanja bakterija iz dišnih puteva, kojim se sprječava kolonizacija *Pa*, a njegovim gubitkom dolazi do opterećenja dišnih puteva bakterijama.

P. aeruginosa posjeduje čimbenike virulencije, opisane u prethodnim poglavljima, pomoću kojih prodire u pericilijarni mukozni sloj, prihvaća se površinu respiratornog epitela, i započinje kolonizaciju. Kako bi preživio, *Pa* se mora prilagoditi uvjetima koji vladaju u plućima oboljelih od CF, a samo neke od njih čine: uvjeti osmotskog stresa, konkurencija drugih mikroorganizmima, siromaštvo hranjivim tvarima, antibiotici i uvjeti oksidativnog stresa.

Pa se tomu prilagođava promjenom genske ekspresije. Kronična se kolonizacija povezuje s genotipskim i fenotipskim promjenama kod *Pa* kao što su porast antibiotske rezistencije, usporavanje metabolizma, sporija stopa rasta, gubitak pokretljivosti, gubitak *quorum sensing* sustava i pojačano stvaranje alginata (46).

Kod početnih stadija infekcije *P. aeruginosa* raste u nemukoidnom obliku kojeg karakteriziraju pokretljivost, aerobni metabolizam, i slabiji humoralni odgovor domaćina uz predominantnu kolonizaciju u provodnim zonama pluća. U tom je stadiju moguća eradikacija agresivnom antibiotskom terapijom i imunosnim sustavom domaćina. Za nemukoidne sojeve se pokazalo da ne dovode do znatnog pogošanja plućne funkcije i prognoze u inficiranih pacijenata. To podupire nalaz kolonizacije uglavnom provodnih zona pluća, gdje im je glavni patološki učinak indukcija proizvodnje sputuma i potenciranje opstrukcije. Tijekom progresije infekcije, njihova se virulencija za razliku od *Pa* mukoidnog fenotipa ne povećava, a brzo gube sposobnost formiranja biofilma *in vitro* tijekom duljeg uzgoja (31).

U perzistentnoj infekciji, kemotaktički citokini privlače velik broj polimorfonuklearnih upalnih stanica u dišne puteve. *P. aeruginosa* pojačava taj odgovor otpuštanjem toksina i elastaza koji oštećujući upalne stanice uzrokuju otpuštanje njihovih proteaza i elastaza, što oštećuje tkiva i okolne upalne stanice. Bakterijski toksini i proizvodi oštećenih neutrofila pojačavaju PMN odgovor i dodatno potiču upalnu reakciju, uz oštećenje tkiva (35).

Slobodni radikali koje upalne stanice otpuštaju tijekom tzv. oksidativnog praska, oštećuju DNK bakterije i smatraju se glavnim pokretačem mutacija u genomu *pseudomonasa* koji dovodi do fenotipskih promjena *Pa* koje nalazimo u kroničnim infekcijama. Određeni regulatorni signalni putevi omogućuju pojačanu ekspresiju ili supresiju gena povezanih s čimbenicima virulencije ovisno o uvjetima koji vladaju u okolišu, a to je ključno kod prelaska iz akutne u kroničnu infekciju (47).

Perzistencijom infekcije, kolonije *P. aeruginosa* mutacijama mijenjaju fenotip u mukoidni, počinju sintetizirati alginatni omotač, gube pokretljivost, usporavaju metabolizam i stvaraju biofilm. Alginatni sloj i mukoidni egzopolisaharid igraju važnu ulogu u zaštiti bakterije od stanica imunskog sustava, i na taj način osiguravaju preživljenje i perzistenciju bakterija unutar biofilma. Mukoidni je fenotip često nestabilan, te je tijekom kroničnih infekcija i kod *in vitro* uzgoja uočena pojava regresije mukoidnog u nemukoidni fenotip, koji zbog mutacija u *quorum sensing* sustavu imaju smanjenu virulenciju (31).

U kroničnim infekcijama čest je nalaz mukoidnih i nemukoidnih varijanti *Pa* zajedno u uzorcima pacijenata. Nedavna je studija istraživala međusobnu interakciju ova dva fenotipska oblika i zaključila da postoji suradnja u obrani od efektor imunskog sustava, gdje mukoidni soj štiti nemukoidni produkcijom alginata, a nemukoidni štiti mukoidni produkcijom katalaze koja razgrađuje vodikov peroksid. Prema tome, može se zaključiti da bi miješane bakterijske zajednice mogle imati veću otpornost na djelovanje imunskog sustava od zajednica isključivo mukoidnog fenotipa (48).

Iako postoje znatne varijacije u kliničkom tijeku bolesti među pacijentima, kad jednom dođe do uspostave biofilm infekcije, teško je ili gotovo nemoguće postići eradikaciju odnosno izlječenje standardnim antibiotskim liječenjem. Pacijenti koji izbjegnu pseudomonasnu infekciju imaju znatno bolje stope preživljenja, i stoga je pojačan nadzor nad širenjem *Pa* i uvedena je na temelju istraživanja strategija rane eradikacije pseudomonasa korištenjem inhalacijskih antibiotika i sistemskih fluoroquinolona (7).

6. PREVENCIJA I TERAPIJA KRONIČNE PLUĆNE INFEKCIJE

Kronična pseudomonasna plućna infekcija i prateći upalni odgovor, danas su glavni izazov u kliničkom liječenju osoba s cističnom fibrozom. Očekivani životni vijek pacijenata oboljelih od cistične fibroze znatno se produljio u zadnja četiri desetljeća istraživanja i novih postignuća u području medicine. Unatoč tome, većina pacijenata i dalje umire od respiratornog zatajenja, i stoga je usporenje napretka plućne bolesti jedan od glavnih ciljeva u liječenju oboljelih od CF. Kroničnu infekciju karakterizira pojava akutnih egzacerbacija koje zahtijevaju promptno i učinkovito liječenje kako bi se umanjilo daljnje oštećenje dišnih puteva a pacijentu olakšale tegobe (9).

Liječenje kronične plućne bolesti načelno se sastoji od: a) sprječavanja, rane dijagnoze i liječenja infekcija, b) primjene različitih mjera za razrjeđenje i odstranjenje žilavog sekreta iz bronhalnog stabla, poput inhalacija hipertonične otopine natrijeva klorida, fizikalne terapije, inhalacije aerosola različita sastava, i upotrebe bronhodilatatora, c) kontrole upalne reakcije steroidnim i nesteroidnim protuupalnim lijekovima. No, kako je kronična plućna bolest, usprkos liječenju progresivne naravi, metoda izbora je i bilateralna transplantacija pluća. Zbog bolesnikova stanja, katkada je istodobno potrebna i transplantacija srca i jetre (3).

6.1. Antibiotička terapija

Opcije antibiotske primjene uključuju peroralni, intravenski i inhalacijski način primjene. Kako bi znali koji od njih koristiti za postizanje maksimalnog učinka, moramo znati u kojem dijelu pluća se nalazi infekcija. U tu svrhu, pluća možemo podijeliti u dvije zone koje se razlikuju po svojim karakteristikama i prodoru antibiotika. To su provodna (konduktivna) zona i respiratorna zona.

Provodna zona je manja i čini svega 5% plućnog volumena, a sastoji se od dušnika, bronha i terminalnih bronhiola koje oblaže trepetljikavi dišni epitel s vrčastim stanicama, a u stijenkama se nalaze submukozne žlijezde. Respiratorna zona zauzima oko 95% plućnog volumena i uključuje područje od terminalanih bronihola do alveola, tu nedostaju trepetljike, vrčaste stanice i submukozne žlijezde. Konduktivna je zona slabije prokrvljena od respiratorne, ali se nalazi mnogo bliže usnoj šupljini, što čini infekcije u ovoj zoni pogodnima za liječenje inhalacijskim antibioticima. Respiratorna zona ima bogatu mrežu plućnih kapilara, veliki protok krvi, i dobru izmjenu tvari na alveo-kapilarnoj membrani, pa se maksimalni učinak antibiotske terapije postiže liječenjem intravenskim ili peroralnim antibioticima (28, 31).

Antibiotici se u liječenju plućne infekcije u cističnoj fibroze koriste u četiri različita slučaja: kao profilaksa, za eradikaciju rane infekcije, za supresiju kronične infekcije, i u liječenju egzacerbacija (49).

Na temelju provedenih studija, profilaktička primjena antipseudomonasnih antibiotika se ne preporuča za prevenciju *P. aeruginosa* infekcija u oboljelih od cistične fibroze (50). Trogodišnja prospektivna studija pokazala je da nakon 3-mjesečne profilaktičke primjene inhalacijskog kolistina i oralnog ciprofloksacina nije bilo razlike u prevenciji inicijalne pseudomonasne infekcije između kontrolne i testne skupine (51). Trenutne smjernice u Ujedinjenom Kraljevstvu i većini europskih zemalja preporučuju profilaktičku primjenu antistafilokoknih antibiotika kao što je flukloksacilin od dijagnoze do 3. godine života. Opravdanje za primjenu takvog režima temelji se na nalazima smanjenja incidencije infekcije meticilin-osjetljivim *S. aureusom*, ali bez potvrde poboljšanja kliničkog ishoda. Smjernice Sjedinjenih Američkih Država protiv su profilaktičke primjene antistafilokoknih antibiotika, temeljem rezultata studija koji pokazuju povišenu incidenciju *P. aeruginosa* infekcije u tako liječenih pacijenata (49).

Prepoznato je da strategija ranog liječenja *P. aeruginosa* infekcija, započetog odmah po detekciji infekcije, nosi iznimnu važnost, jer je kod kasnije uspostave kronične infekcije i promjene fenotipa bakterije eradikacija gotovo nemoguća. Nužna je agresivna terapija koja u većini slučajeva uključuje inhalacijski tobramicin ili kolistin uz jedan od intravenskih antibiotika. Inhalacijska otopina tobramicina, primijenjena dva puta dnevno tijekom 28 dana, se u nedavno provedenoj placebo-kontroliranoj studiji, koja je obuhvatila djecu mlađu od sedam godina, pokazala učinkovitom i sigurnom u eradikaciji rane pseudomonasne infekcije (52).

Ukoliko se ne postigne eradikacija pseudomonasa u ranom stadiju infekcije, pacijenti ulaze u kronični stadij. U tom je stadiju glavna strategija liječenja supresija kronične infekcije i kontrola egzacerbacija. Kao terapije kronične infekcije koriste se uglavnom inhalacijski antibiotici tobramicin, kolistin i u novije vrijeme aztreonam, primijenjeni putem nebulizatora ili inhalatora kojima se postiže raspršenje antibiotika u dišnim putevima. Prednost pred intravenski primijenjenim antibioticima jest u manjem riziku od sustavne toksičnosti zbog potrebnih nižih doza za jednaku djelotvornost i lokalne primjene ograničene na dišne puteve. Akutne egzacerbacije liječe se s obzirom na težinu, 14-dnevnom peroralnom ili intravenskom primjenom antibiotika, najčešće kombinacijom aminoglikozidnog i β -laktamskog antibiotika, po potrebi kombiniranim s bronhodilatatorima i protuupalnim lijekovima (49).

Antibiotike bi trebalo primjenjivati u bolesnika sa simptomima, za liječenje bakterijskih infekcija dišnog sustava na temelju rezultatu kultivacije i antibiograma. Kod stafilokokne infekcije, lijek izbora je penicilin otporan na penicilinazu (npr. kloksacilin ili dikloksacilin) ili cefalosporin (npr. cefaleksin). Za dugotrajno ambulantno liječenje plućnih infekcija uzrokovanih nizom uzročnika pojedinačno ili u kombinaciji, mogu se primjenjivati eritromicin, amoksisilin–klavulonska kiselina, trimetoprim–sulfametoksazol ili, ponekad, kloramfenikol.

Fluorokinoloni su učinkoviti protiv osjetljivih sojeva *P. aeruginosa* i bez poteškoća se primjenjuju kod male djece. Kod teških egzacerbacija plućnih infekcija, osobito u bolesnika koloniziranih s *Pa*, savjetuje se parenteralna primjena antibiotika, za što je često potrebna hospitalizacija, ali se terapija može provoditi i kod kuće u pažljivo izabranih bolesnika. Kombinacije aminoglikozida (tobramicin, gentamicin) i anti-pseudomonasnog penicilina daju se intravenski. Korisna također može biti intravenska primjena cefalosporina i monobaktama s anti-pseudomonasnom aktivnošću. Uobičajena početna doza tobramicina ili gentamicina iznosi 2,5 do 3,5 mg/kg 3×/dan, ali za postizanje prihvatljivih razina koncentracija u serumu, mogu biti potrebne veće doze (3,5 do 4 mg/kg 3×/dan). Druga je mogućnost bezopasna i učinkovita primjena tobramicina u jednoj dnevnoj dozi (10 do 12 mg/kg). Zbog pojačanog bubrežnog klirensa, za postizanje odgovarajućih razina nekih penicilina u serumu mogu biti potrebne velike doze. Cilj liječenja plućnih infekcija trebao bi biti poboljšanje kliničkog stanja bolesnika u dovoljnoj mjeri da trajna primjena antibiotika ne bude potrebna. Međutim, u bolesnika čija su pluća kolonizirana s *P. aeruginosa*, može biti indicirana dugotrajna primjena antibiotika. U odabranih bolesnika za poboljšanje ili ustaljenje plućne funkcije i smanjenje učestalosti plućnih infekcija, može biti učinkovit tobramicin u obliku aerosola i oralni azitromicin tri puta tjedno, s izmjenjivanjem svaki drugi mjesec (53).

U simptomatskih bolesnika, čija su pluća kolonizirana nemukoidnim sojevima *P. aeruginosa*, zadaća antibiotskog liječenja je poboljšanje kliničkih parametara i po mogućnosti, smanjenje broja bakterija u dišnim putovima. *Pseudomonas* nije moguće u potpunosti iskorijeniti, međutim, dokazano je kako rana primjena antibiotika, otprilike u vrijeme početnog naseljavanja nemukoidnim sojevima *pseudomonasa* u dišne putove, može iskorijeniti uzročnika na određeno vrijeme. Strategije pri liječenju se razlikuju, no obično se sastoje od inhalacije tobramicina ili kolistina, često uz oralnu primjenu fluorokinolona (53).

Osim prevencije provođenjem higijenskih mjera, kako bi se spriječio prijenos infekcije među pacijentima, prevencija kronične *P. aeruginosa* biofilm infekcije moguća je samo ranom agresivnom antibiotskom terapijom početnih intermitentnih kolonizacija nemukoidnim sojevima *P. aeruginosa*, prije uspostave kronične biofilm infekcije (54). Prijelaz iz intermitentne u kroničnu infekciju obilježava porast titra protutijela na *Pa* i pojava karakterističnog mukoidnog fenotipa (55). Takav se terapijski protokol od 1989. godine uspješno koristi u Danskom centru za cističnu fibrozu sa prevencijom kronične *Pa* infekcije u oko 80% pacijenata, bez indukcije rezistencije, za razliku od kronične terapije (56). Kad jednom dođe uspostave biofilm infekcije, definitivna eradikacija *P. aeruginosa* gotovo nije moguća. Jedina terapijska opcija tada je kronična supresivna antibiotska terapija čiji je cilj što dulje održati primjerenu plućnu funkciju i primjerenu kvalitetu života u tih pacijenata (54).

6.2. Metode uklanjanja sekreta iz dišnih puteva i mukolitici

Opstrukcija dišnih puteva gustim sluzavim sadržajem koja se javlja u ovoj bolesti smanjuje protok zraka do respiratorne zone pluća i pruža hranjivu podlogu bakterijama. Pacijenti nisu u mogućnosti samostalno iskašljati takav sekret koji je gust i oblaže površine dišnih puteva. Kod opsežnijih promjena, dolazi do smanjenja oksigenacije krvi i razvoja cijanoze. Korištenje raznih metoda uklanjanja sekreta iz dišnih puteva čini svakodnevnicu pacijenata koji boluju od cistične fibroze. U pacijenata kod kojih se ne primjenjuje toaleta dišnih puteva, to doprinosi destruktivnom ciklusu infekcija – upala – opstrukcija – bronhiektazije – terminalni stadij plućne bolesti (28).

Prve metode korištene u uklanjanju sluzavog sadržaja iz dišnih puteva pacijenata bazirale su se na perkusiji prsnog koša pacijenta, koja je morala biti dovoljno snažna da dovede do odljepljenja sluzi sa stijenke bronha i ekspektoracije sadržaja.

U novije vrijeme, osmišljeni su prsluci koji vrše automatsku perkusiju, a još novije su metode koje se baziraju na zvučnim valovima i vibracijama za jednak ali bezbolan efekt. Na prvi znak zahvaćanja pluća, preporučuje se fizikalna terapija koja se sastoji od položajne drenaže, lupkanja, vibracije i potpomognutog iskašljavanja. U starijih bolesnika mogu biti učinkoviti drugi načini pročišćavanja dišnih putova, poput aktivnog disanja, autogene drenaže, aparata s pozitivnim ekspiratornim tlakom i prsluka za mehaničko vanjsko disanje. Kod reverzibilnog začepljenja dišnih putova mogu se oralno i/ili putem aerosola primjenjivati bronhodilatatori a putem aerosola i kortikosteroidi. Još uvijek se istražuje pozitivni utjecaj fizičke aktivnosti na poboljšanje plućne funkcije, odnosno idealni režimi fizičke aktivnosti za dugoročno najbolje rezultate (26, 46).

Ostale metode baziraju se na inhalaciji tvari koje dovode do razrjeđenja sekreta ili njegove razgradnje i tako olakšavaju njegovu prirodnu ekspektoraciju. Tvari koje su korištene u te svrhe su N-acetil-L-cistein, alfa dornaza, hipertonična fiziološka otopina, i u novije vrijeme otopine manitola. Za N-acetil-L-cistein se pokazalo da ima mukolitički efekt u cističnoj fibrozi, ali još nije došlo do konsenzusa vezano uz njegovu kliničku učinkovitost.(49)

Dornaza alfa je rekombinantna ljudska deoksiribonukleaza koja u sekretima dišnih puteva pacijenata razgrađuje DNK materijal raspadnutih polimorfonuklearnih stanica, koji inače znatno pridonosi viskoznosti sekreta. Inhalacijskom primjenom dornaze alfa dolazi do smanjenja viskoznosti i lakšeg uklanjanja sekreta iz dišnih puteva, a zapaženi su i smanjenje broja egzacerbacija i poboljšanje plućne funkcije u pacijenata sa blagom do srednje teškom plućnom bolesti. Jedini je mukolitik dokazane efikasnosti u cističnoj fibrozi, a pošto se učinci gube s prestankom uporabe, potrebna je dugoročna terapija održavanja (46, 53).

Hipertonična fiziološka otopina i manitol djeluju kao osmotski agensi koji navlače vodu u dišne puteve i time razrjeđuju sekrete. Dostupni su za uporabu u inhalacijskom obliku u Europi i djeluju komplementarno s alfa dornazom. Inhalacijska primjena hipertonične fiziološke otopine kratkoročno povećava hidraciju površinske sluzi dišnih puteva. U usporedbi s placebom, smanjuje broj teških plućnih egzacerbacija ali ne poboljšava znatno plućnu funkciju. Terapija manitolom nedavno je uvedena u praksu jer poboljšava plućnu funkciju. Manitol i hipertonična fiziološka otopina uzrokuju bronhokonstrikciju i stoga se primjenjuju zajedno s bronhodilatatorima (9, 43).

6.3. Protuupalna terapija

Upala je značajna komponentna plućne bolesti u cističnoj fibrozi, gdje dominira neutrofilni upalni odgovor. Uobičajeni protuupalni lijekovi kao što su kortikosteroidi, inhalacijski ili sistemski primjenjeni, nemaju dokazane učinkovitosti u liječenju pacijenata oboljelih od cistične fibroze (9).

Oralna primjena kortikosteroida indicirana je u dojenčadi s dugotrajnim bronhiolitisom i u bolesnika s refraktornim bronhospazmom, alergijskom bronhopulmonalnom aspergilozom i upalnim komplikacijama (npr. artritisom, vaskulitisom). Dugotrajna primjena kortikosteroida svaki drugi dan može usporiti pogoršanje dišne funkcije, no ne preporučuje se za rutinsku primjenu zbog komplikacija povezanih s kortikosteroidima. Bolesnike koji primaju kortikosteroide treba pažljivo nadzirati zbog mogućih poremećaja metabolizma ugljikohidrata i linearnog zastoja u rastu (53).

Dokazano je kako ibuprofen, primjenjivan u visokoj dozi, usporava pogoršanje plućne funkcije, osobito u djece između pet i trinaest godina. Ne preporuča se istovremeno korištenje s intravenskim aminoglikozidima ili drugim lijekovima koji mogu biti nefrotoksični.

Liječenje zahtjeva praćenje koncentracije lijeka i donosi rizik od gastrointestinalnog krvarenja, te unatoč obećavajućim rezultatima, nije široko prihvaćeno. Mogućnost uporabe drugih protuupalnih lijekova još se istražuje, trenutno nisu dovoljno istraženi ni dostupni za kliničku uporabu (9).

Makrolidni antibiotici, kao što je azitromicin pokazali su se korisnima u liječenju oboljelih od cistične fibroze, najvjerojatnije zahvaljujući svom imunomodulatornom i antibiotskom učinku. Iako nije primarno djelotvoran protiv *P. aeruginosa*, dokazi upućuju na njegovo djelovanje na sprječavanje sazrijevanja biofilma, koje *P. aeruginosa* stvara u kroničnim infekcijama. Terapija održavanja azitromicinom poboljšava plućnu funkciju i smanjuje broj egzacerbacija u pacijenata s kroničnom infekcijom. Postoji, međutim, zabrinutost da bi njegova dugoročna primjena mogla inducirati rezistenciju u drugih bakterija (49).

7. NOVE MOGUĆNOSTI U PREVENCIJI I TERAPIJI PLUĆNE INFEKCIJE

Većina novih trendova vezanih uz terapiju cistične fibroze mogu se naći na web stranici fondacije za cističnu fibrozu (*Cystic Fibrosis Foundation*) (57), koja prati sve vrste podataka vezanih uz istraživanja cistične fibroze. Na stranici fondacije mogu se pronaći podatci o lijekovima koji su još fazi kliničkih ispitivanja, i lista već dostupnih terapijskih opcija, dokazane učinkovitosti i sigurnosti. Prema terapijskoj funkciji, lijekovi su podijeljeni su u pet skupina: lijekovi koji obnavljaju funkciju CFTR, protuupalni lijekovi, antimikrobni lijekovi, prehrana, i lijekovi koji utječu na mukocilijarni klirens. Velik dio istraživanja usmjeren je na protuupalne i antimikrobne lijekove. Istraživanja u području antimikrobnih lijekova uglavnom su fokusirana na prilagođavanje dostupnih antibiotika u formulacije pogodne za inhalacijsku primjenu (vankomicin i amikacin u aerosolu) (57).

Jedna od važnijih nuspojava korištenja terapije održavanja antibioticima kod kronične infekcije pluća jest razvoj rezistencije bakterija na korištene antibiotike. Stoga su napori istraživačke zajednice usmjereni prema razvoju novih antibiotskih formulacija za korištenje u inhalacijskoj terapiji održavanja. Zanimljiv pristup tom problemu je ideja o korištenju kombinacije dvaju antibiotika, fosfomicina i tobramicina u obliku inhalacijske otopine. Taj lijekoviti pripravak trenutno je u fazi II kliničkih ispitivanja, a dosada se pokazao učinkovitijim od pojedinačno primjenjenih antibiotika u liječenju pseudomonasne infekcije kod osoba koje boluju od cistične fibroze (58). U dosadašnjim *in vitro* eksperimentima, studijama na životinjskim modelima, i pilot studiji na pacijentima, postignuti rezultati kombinirane antibiotske terapije superiorni su onima dobivenim zasebnom primjenom antibiotika kod pseudomonasne biofilm infekcije (59).

Kombinirana terapija ciprofloksacina s kolistinom također je pokazala sinergistički učinak *in vitro*, obzirom da ciprofloksacin djeluje na bakterije u površinskim dijelovima biofilma, u aerobnim uvjetima, dok kolistin bolje djeluje da one smještene u dubljim dijelovima biofilma gdje vladaju pretežno anaerobni uvjeti (60). Zasad se još ne zna puno o farmakokinetici i farmakodinamici antibiotika unutar biofilma, pa to ostaje važna tema za buduća istraživanja.

Kako bi se skratilo vrijeme dostave lijeka u dišne puteve i skratilo vrijeme primjene terapije, razvijene su antibiotske formulacije kolistina i tobramicina u obliku praška koji se primjenjuju putem posebnog inhalatora, kao alternativna opcija primjeni lijekova u obliku aerosola nebulizatorom, uz jednaku učinkovitost (58, 59). U procesu kliničkih istraživanja je i liposomalna formulacija amikacina, s mogućnošću primjene jednom dnevno u kroničnoj supresivnoj terapiji. Karakteristika liposoma jest da dolazi do njegove razgradnje ramnolipidima koje *P. aeruginosa* luči tijekom infekcije, pa bi do aktivacije lijeka trebalo doći ciljano na mjestu infekcije, uz produljenu retenciju u dišnim putevima.

Dosadašnji rezultati pokazuju učinak sličan učinku tobramicina na povećanje forsiranog ekspiracijskog volumena u prvoj sekundi (FEV1) (63).

Također, inhalacijska otopina levofloksacina nedavno se pokazala po djelotvornosti usporedivom s tobramicinom, uz dobru toleranciju (64). Provedena je duplo slijepa placebo kontrolirana multicentrična studija koja je usporedila terapiju kombinacijom fosfomicina i tobramicina s placebom, nakon 28-dnevne terapije aztreonamom. Studija je pokazala zadržavanje znatnog poboljšanja u FEV1 koje se javilo nakon primjene aztreonama u grupe koja je nakon toga primila kombinaciju fosfomicina i tobramicina, što navodi na zaključak da je budućnost liječenja *P. aeruginosa* infekcija alternirajuća kontinuirana primjena različitih antibiotika (58).

Kod kroničnih pseudomonasnih infekcija pluća, ključ perzistencije i rezistencije bakterija na terapijske postupke, čini se, leži u sposobnosti stvaranja biofilma, gdje alginat štiti bakterije, a promjena bakterijskog fenotipa omogućava izbjegavanje kako imunosnog sustava domaćina, tako i eradikaciju antibioticima. Time bi novi terapijski ciljevi mogli uključivati terapijska sredstva koja sprječavaju formiranje biofilma ili razgrađuju već stvoreni biofilm putem enzima ili polivalentnih aniona koji pokazuju sposobnost razgradnje matriksa biofilma (DNAza i alginatna liaza) (31). OligoG, alginatni oligosaharid podrijetla morske alge, u fazi je IIb kliničkih ispitivanja, a pokazuje dobra mukolitička svojstva i pojačanje učinka nekih antibiotika. Razvijen je u praškastoj formulaciji za primjenu inhalatorom i u obliku otopine za primjenu nebulizatorom (57).

Još jednu skupinu potencijalnih lijekova čine inhibitori *quorum sensing* sustava, međustanične molekulske signalizacije. Inhibicija tog sustava čini bakteriju podložnijom antibiotskom djelovanju, zbog njegove važne uloge u regulaciji proizvodnje čimbenika virulencije i formaciji biofilma (65).

Mete u signalnom putu su raznolike, a identificiran je niz bakterijskih enzima koji razgrađuju signalne molekule i utišavaju gensku ekspresiju faktora virulencije. Inhibitorna aktivnost otkrivena je i kod nekih namirnica (mrkva, kamilica, češnjak, alge). Furanoni koji su produkt morskih algi vrlo su potentni inhibitori stvaranja biofilma, ali su toksični za čovjeka, no pružaju dobru podlogu za razvoj netoksičnih ekvivalenata. Ekstrakt češnjaka također se pokazao učinkovitim na mišjim modelima, ali rezultate nije moguće ekstrapolirati na ljude jer su korištene doze iznad praga tolerancije za ljude (66). Temeljem *in vitro* studija i onih na animalnim modelima, otkriveno je da makrolidni antibiotik azitromicin djeluje kao inhibitor *quorum sensing* sustava i inhibitor sinteze alginata, u koncentracijama nižim od minimalne inhibitorne koncentracije (67).

Neutralizirajuća protutijela protiv kromosomske β -laktamaze, enzima koji produciraju neki sojevi *P. aeruginosa*, mogu poboljšati klinički učinak β -laktamskih antibiotika. Takva bi strategija u budućnosti mogla dobiti kliničku primjenu u neutralizaciji jednog od najvažnijih konvencionalnih mehanizama rezistencije *P. aeruginosa* (68).

Obzirom na visoke razine oksidativnog stresa u dišnim putevima oboljelih od CF, razmatraju se primjena antioksidansa i protuupalnih lijekova u prevenciji mutacija koje reaktivne kisikove vrste izazivaju u pseudomonasa, i time dovode do kroniciteta i razvoja težih oblika plućne infekcije. Na temelju dosadašnjih studija provedenih sa oralnim i inhalacijskim antioksidansima, glutation se pokazao učinkovitim u smanjenju oksidativnog stresa i poboljšanju plućne funkcije, no potrebne su prospektivne studije i veći uzorci ispitanika, kako bi se došlo do konkretnih zaključaka o njihovoj učinkovitosti (69).

Kao i mnoge bakterije, *P. aeruginosa* proizvodi siderofore kojima prikuplja ione željeza iz svog okoliša, nužne za normalno funkcioniranje i preživljenje. To saznanje potaklo je istraživanje učinaka kelatora željeza galija i deferoksamina na kliničke izolate *P. aeruginosa*.

Prirodni kelator željeza u dišnim putevima je laktoferin, no on slabije veže ione željeze od siderofora *psudomonasa* i time njegov učinak ne dolazi do izražaja (70). Jedna je studija razmatrala učinak galij-gentamicin liposomalnog preparata na kliničkim izolatima *P. aeruginosa in vitro*, te se pokazalo da galij pojačava aktivnost ovog antibiotika. Studije vezane uz efikasnost i sigurnost primjene na ljudima su u tijeku (71). Također je ustanovljeno da kombinacija primijenjenog deferoksamina i tobramicina *in vitro* može značajno smanjiti biomasu biofilma i spriječiti stvaranje biofilma na epitelnim stanicama u cističnoj fibrozi (72)

8. ZAKLJUČAK

Cistična fibroza epidemiološki je značajna, smrtonosna, genetska bolest koja pogađa ljude diljem svijeta. Od otkrića bolesti pa do danas, došlo je do velikog napretka u simptomatskom liječenju pacijenata uz produljenje životnog vijeka i poboljšanja kvalitete skrbi. Iako kontrola simptoma ostaje temeljni način liječenja, za kliničku primjenu nedavno su odobreni lijekovi s djelovanjem na CFTR koji ublažavaju simptome ali ne mogu dovesti do izlječenja i nisu primjenjivi u svih pacijenata. Produljenjem životnog vijeka glavnim uzrokom morbiditeta i mortaliteta postaje kronična plućna bolest, u čijoj je podlozi kronična plućna infekcija uzrokovana bakterijom *P. aeruginosa*. Uvjeti koji nastaju u dišnim putevima oboljelih već od rane dojenačke dobi uključuju neutrofilnu upalnu reakciju koja vodi u strukturalne promjene dišnih puteva i nakupljanje gustog sluzavog sadržaja, koji omogućava produljeno zadržavanje bakterija u dišnim putevima. Infekcije pluća uzrokovane s *P. aeruginosa* obično slijede nakon eradikacija infekcija uzrokovanih bakterijama *H. influenzae* i *S. aureus*, što navodi na zaključak da ili sami uzročnici ili upotrebljena terapija stvaraju povoljne uvjete za kolonizaciju dišnog sustava s *P. aeruginosa*. U početku su to intermitentne akutne infekcije, koje kroz određeno vrijeme postaju kronične, što se povezuje s mutacijama u genomu pseudomonasa i pojavom mukoidnog biofilm-producirajućeg fenotipa. Taj mukoidni fenotip *Pa* pokazuje iznimnu otpornost na antibiotike i uspijeva preživjeti unutar biofilma unatoč terapiji. Liječenje kronične plućne infekcije sastoji se od režima kronične supresivne terapije čiji cilj nije eradikacija uzročnika, već smanjenje učestalosti epizoda egzacerbacija i što dulje održavanje primjerene plućne funkcije. Veliki problem sada i u budućnosti stvara razvoj rezistencije *Pa* na antibiotike koji se primjenjuju u kroničnoj inhalacijskoj terapiji. Od novih terapijskih mogućnosti istražuju se nove kombinacije inhalacijskih antibiotika koje su se za sada pokazale učinkovitijima od monoterapije antibioticima, i nove praškaste formulacije za brže i lakše korištenje.

Budućnost učinkovitog liječenja pseudomonasne biofilm infekcije možda se nalazi u primjeni lijekova koji imaju sposobnost razgradnje komponenti biofilma, ili inhibitorima međustaničnog molekularnog sustava signalizacije ključnog za aktivaciju gena različitih faktora virulencije ove bakterije, uključujući i stvaranje biofilma.

ZAHVALE

Zahvaljujem svima koji su svojim sudjelovanjem i pomoći olakšali tijek izrade ovog rada, i na neki način omogućili njegovo oblikovanje i dovršenje.

Posebnu zahvalu dugujem mentorici, prof. J. Vraneš, na ideji i viziji, na neizmjernom strpljenju i susretljivosti, te na svom vremenu uloženom u pomoć i vodstvo meni tijekom oblikovanja i pisanja ovog rada. Hvala vam na svemu što ste učinili za mene.

Veliku zahvalu dugujem i svojoj sestri, koja mi je pomogla u tehničkom oblikovanju i opremanju rada, i pružila veliku podršku kroz cijeli proces izrade. Također, želim zahvaliti svim kolegama i prijateljima na pruženim savjetima, prenesenom znanju, i strpljivim odgovorima na sva moja pitanja.

Na kraju se zahvaljujem svojoj obitelji, posebno mami, na podršci koju su mi pružili za vrijeme pisanja rada ali i kroz šest godina studija. Hvala vam svima, od srca.

LITERATURA

1. Farrell PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros.* 2008;7(5):450–3.
2. T-Drinkovic D, Tjesic-D D, Kelecic J, Votava A. Data from the Croatian CF Registry. *J Cyst Fibros.* 2008;7:115.
3. Kolaček S. Nasljedne bolesti gušterače. U: Jakšić B, Reiner Ž, Vrhovac B, Vucelić B, ur. *Interna medicina*,. 4. izd. Zagreb: Naklada LJEVAK d.o.o.; 2008. str. 885–7.
4. Cystic Fibrosis Mutation Database: Statistics [Internet]. [pristupljeno 15.05.2018.]. Dostupno na: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>
5. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i sur, ur. *Poremećaji građe i funkcije makromolekula*. 7. izd. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 108-110.
6. Rowe SM, Clancy JP. Advances in cystic fibrosis therapies. *Curr Opin Pediatr.* 2006;18(6):604–13.
7. O’Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2009;373:1891–904.
8. Kos M, Dmitrović B, Švagelj D. Razvojne i genske bolesti i bolesti djetinjstva. U: Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M, ur. *Patologija*. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 210–3.
9. Smyth AR, Bell SC, Bojcin S, Bryon M, Duff A, Flume P, et al. European cystic fibrosis society standards of care: Best practice guidelines. *J Cyst Fibros.* 2014;13(S1):S23–42.
10. Tjesic-Drinkovic D, Grizelj R, Tjesic-Drinkovic D, Kelečić J, Gagro A, Vraneš J, et al. Značenje novorođenačkog probira na cističnu fibrozu. *Gynaecol Perinatol.* 2006;15(1):37–43.
11. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2003;361(9358):681–9.
12. Koch C, Høiby N. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet.* 1993;341:1065–9.
13. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(8):918–51.
14. Whitcomb DC. Genetic aspects of pancreatitis. *Annu Rev Med.* 2010;61(1):413–24.
15. Moran A, Brunzell C, Cohen RC, Katz M, Marshall BC, Onady G, et al. Clinical care guidelines for cystic fibrosis-related diabetes: A position statement of the American Diabetes Association and a clinical practice guideline of the Cystic Fibrosis Foundation, endorsed by the Pediatric Endocrine Society. *Diabetes Care.* 2010;33(12):2697–708.
16. Tješić-Drinković D, Tješić-Drinković D. Cystic Fibrosis. *Med Sci.* 2015;41:65–75.
17. Fajac I, Wainwright CE. New treatments targeting the basic defects in cystic fibrosis. *Press Medicale.* 2017;46(6P2):e165–75.
18. Drenjačević D, Vraneš J. *Pseudomonas, acinetobacter i srodne bakterije*. U: Kalenić S i sur., ur. *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 214.-220.

19. Vraneš J. Patogeneza bakterijskih infekcija. U: Kalenić S, ur. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 88–9.
20. Orgad O, Oren Y, Walker SL, Herzberg M. The role of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* EPS adherence, viscoelastic properties and cell attachment. *Biofouling*. 2011;27(7):787–98.
21. Vranes J, Tjesić-Drinković D, Zulj I, Kruzić V, Turković B, Marić S. Adherence ability of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis to two different epithelial cell lines. *Coll Antropol*. 2004;28:675–80.
22. Maresso AW, Frank DW, Barbieri JT. *Pseudomonas aeruginosa* toxins [Internet]. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. Elsevier; 2006. str. 257–69. [Pristupljeno 05.05.2018.] Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800188-2.00005-7>
23. Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. *Pseudomonas aeruginosa* [Internet]. Vol. 2–3, Molecular Medical Microbiology: Second Edition. Elsevier Ltd; 2014. str. 753–67. [Pristupljeno 15.05.2018] Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X>
24. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268–81.
25. Tambić-Andrašević A, Tambić T, Katalinić-Janković V, Žmak LJ, Obrovac M, Payerl Pal M, i sur. Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj Antibiotic resistance in Croatia, 2016. [Internet] Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske; 2016. [Pristupljeno 07.05.2018.] Dostupno na: <http://www.hdkm.hr/wp-content/uploads/2017/11/2017-Rezistencije-knjiga-2016-za-web.pdf>
26. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44(6):547–58.
27. Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm Pharmacol Ther*. 2008;21(4):595–9.
28. McDaniel CT, Panmanee W, Hassett DJ. An overview of infections in cystic fibrosis airways and the role of environmental conditions on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and viability [Internet]. Cystic Fibrosis in the Light of New Research. InTech; 2015. str.171–98. [pristupljeno 01.05.2018.]. Dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/cystic-fibrosis-in-the-light-of-new-research/an-overview-of-infections-in-cystic-fibrosis-airways-and-the-role-of-environmental-conditions-on-pse>
29. Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, Lindum PW, Campbell J, el al.. Mucoïd conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology*. 1999;(145):1349–57.
30. Ciofu O, Lee B, Johannesson M, Hermansen NO, Meyer P, Hoiby N, et al. Investigation of the algT operon sequence in mucoïd and non-mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoïd revertants. *Microbiology*. 2008;154(1):103–13.

31. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* 2010;5(11):1663–74.
32. Hassett DJ, Sutton MD, Schurr MJ, Herr AB, Caldwell CC, Matu JO. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends Microbiol.* 2009;17(3):130–8.
33. Vraneš J, Leskovar V. Značenje nastanka mikrobnog biofilma u patogenezi i liječenju kroničnih infekcija. *Med Glas.* 2009;6(2):147–65.
34. Ishida H, Ishida Y, Kurosaka Y, Otani T, Sato K, Kobayashi H. In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(7):1641–5.
35. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends Microbiol.* 2016;24(5):327–37.
36. Wagner VE, Iglewski BH. *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2008;35(3):124–34.
37. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):194–222.
38. Maselli JH, Sontag MK, Norris JM, MacKenzie T, Wagener JS, Accurso FJ. Risk factors for initial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis identified by newborn screening. *Pediatr Pulmonol.* 2003;35(4):257–62.
39. Rosenfeld M, Emerson J, McNamara S, Thompson V, Ramsey BW, Morgan W, et al. Risk factors for age at initial *Pseudomonas* acquisition in the cystic fibrosis epic observational cohort. *J Cyst Fibros.* 2012;11(5):446–53.
40. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J RM, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 2001;183(3):444–52.
41. Sheppard MN, Nicholson AG. The pathology of cystic fibrosis. *Curr Diagnostic Pathol.* 2002;8(1):50–9.
42. Araújo D, Shteinberg M, Aliberti S, Goeminne PC, Hill AT, Fardon TC, et al. The independent contribution of *Pseudomonas aeruginosa* infection to long-term clinical outcomes in bronchiectasis. *Eur Respir J.* 2018;51(2):1701953.
43. Tager AM, Wu J, Vermeulen MW. The effect of chloride concentration on human neutrophil functions: potential relevance to cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19(4):643–52.
44. Travis SM, Conway BAD, Zabner J, Smith JJ, Anderson NN, Singh PK, et al. Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20(5):872–9.
45. Pier GB, Grout M, Zaidi TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Med. Sci.* 1997;94(22):12088–93.

46. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, Dadashi M, Badr S, Duan K. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. BMC Pulm Med. 2016;16(1):174.
47. Murray TS, Egan M, Kazmierczak BI. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. Curr Opin Pediatr. 2007;19(1):83–8.
48. Malhotra S, Limoli DH, English AE, Parsek MR, Wozniak DJ. Mixed communities of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* exhibit enhanced resistance to host antimicrobials. Bomberger JM, editor. MBio. 2018;9(2):e00275-18.
49. Edmondson C, Davies JC. Current and future treatment options for cystic fibrosis lung disease: Latest evidence and clinical implications. Ther Adv Chronic Dis. 2016 May;7(3):170–83.
50. Döring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: Current and future strategies. J Cyst Fibros. 2012;11(6):461–79.
51. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Molin S, Yang L, Hansen SK, Rau MH, et al. Initial *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: characteristics of eradicated and persistent isolates. Clin Microbiol Infect. 2012;18(6):567–74.
52. Ratjen F, Moeller A, McKinney ML, Asherova I, Alon N, Maykut R, et al. Eradication of early *P. aeruginosa* infection in children <7 years of age with cystic fibrosis: The early study. J Cyst Fibros. 2018 Apr. doi: 10.1016/j.jcf.2018.04.002. [Epub ahead of print]
53. MSD priručnik dijagnostike i terapije: Cistična fibroza [Internet]. [pristupljeno 11.05.2018.]. Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/pedijatrija/cisticna-fibroza>
54. Döring G, Hoiby N, Consensus Study Group. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. J Cyst Fibros. 2004;3(2):67–91.
55. Pressler T, Frederiksen B, Skov M, Garred P, Koch C, Høiby N. Early rise of anti-*Pseudomonas* antibodies and a mucoid phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* are risk factors for development of chronic lung infection—A case control study. J Cyst Fibros. 2006;5(1):9–15.
56. Hansen CR, Pressler T, Høiby N. Early aggressive eradication therapy for intermittent *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients: 15 years experience. J Cyst Fibros. 2008;7(6):523–30.
57. Drug Development Pipeline | CFF Clinical Trials Tool [Internet]. [pristupljeno 12-05.2018.]. Dostupno na: <https://www.cff.org/Trials/Pipeline>
58. Trapnell BC, McColley DG, Kissner R, Rosen MW, McKevitt JM, Moorehead M, Montgomery L, Geller AB, David E. Fosfomycin/tobramycin for inhalation in patients with cystic fibrosis with *Pseudomonas* airway infection. Am J Respir Crit Care Med. 2012;185(2):171–8.
59. Herrmann G, Yang L, Wu H, Song Z, Wang H, Høiby N, et al. Colistin-tobramycin combinations are superior to monotherapy concerning the killing of biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis. 2010;202(10):1585–92.

60. Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol.* 2008;68(1):223–40.
61. Schuster A, Haliburn C, Döring G, Goldman MH, Freedom Study Group. Safety, efficacy and convenience of colistimethate sodium dry powder for inhalation (Colobreathe DPI) in patients with cystic fibrosis: a randomised study. *Thorax.* 2013;68(4):344–50.
62. Konstan MW, Flume PA, Kappler M, Chiron R, Higgins M, Brockhaus F, et al. Safety, efficacy and convenience of tobramycin inhalation powder in cystic fibrosis patients: The EAGER trial. *J Cyst Fibros.* 2011;10(1):54–61.
63. Ehsan Z, Wetzel JD, Clancy JP. Nebulized liposomal amikacin for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Expert Opin Investig Drugs.* 2014;23(5):743–9.
64. Elborn JS, Flume PA, Cohen F, Loutit J, VanDevanter DR. Safety and efficacy of prolonged levofloxacin inhalation solution (APT-1026) treatment for cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *J Cyst Fibros.* 2016;15(5):634–40.
65. Marić S, Vraneš J. Characteristic and significance of microbial biofilm formation. *Periodicum Biologorum.* 2007;109(2):115–121.
66. Hurley MN, Cámara M, Smyth AR. Novel approaches to the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2012;40(4):1014–23.
67. Tateda K, Comte R, Pechere J-C, Kohler T, Yamaguchi K, Van Delden C. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(6):1930–3.
68. Ciofu O. *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal beta-lactamase in patients with cystic fibrosis and chronic lung infection. Mechanism of antibiotic resistance and target of the humoral immune response. *APMIS Suppl.* 2003;(116):1–47.
69. Ciofu O, Lykkesfeldt J. Antioxidant supplementation for lung disease in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;(8):CD007020.
70. Lamont IL, Konings AF, Reid DW. Iron acquisition by *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis. *BioMetals.* 2009;22(1):53–60.
71. Halwani M, Yebio B, Suntres ZE, Alipour M, Azghani AO, Omri A. Co-encapsulation of gallium with gentamicin in liposomes enhances antimicrobial activity of gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(6):1291–7.
72. Moreau-Marquis S, O'Toole GA, Stanton BA. Tobramycin and FDA-approved iron chelators eliminate *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on cystic fibrosis cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;41(3):305–13.

ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODATCI:

Ime i prezime: Marcela Mendek

Datum rođenja: 18.09.1993.

Mjesto rođenja: Zagreb

Adresa: Čaplinec 4, Zagreb

Kontakt: mobitel – 0995082383

E –mail: marcela.mendek@student.mef.hr

OBRAZOVANJE:

2012.-2018. – Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu

2008 -2012. – XVIII. gimnazija, jezična gimnazija, Zagreb

2000.-2008. – Osnovna škola Ksavera Šandora Gjalskog, Zagreb

DODATNE AKTIVNOSTI:

2014.-2017. – Demonstrator na Katedri za fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta
sveučilišta u Zagrebu

2015-2018. – Demonstrator na Katedri za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog
fakulteta sveučilišta u Zagrebu

OSOBNİ VJEŠTINE:

Jezici: engleski jezik: razina C1, medicinski engleski,

talijski jezik: razina B2

Rad na računalu: poznavanje i rad u MS Office, medicinska informatika i statistika