

Received: 2014.07.16
Accepted: 2015.08.06
Published: 2015.12.31

Egzopolimery macierzy biofilmu jako czynniki wirulencji mikroorganizmów w rozwoju chorób człowieka

Extracellular matrix as a microbial virulence factor in the development of human diseases

Magdalena Moryl

Zakład Immunobiologii Bakterii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki
Department of Immunobiology of Bacteria, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz

Streszczenie

Polimery zewnątrzkomórkowe składające się na macierz biofilmu (ECM) charakteryzują się zróżnicowaną budową. Największa pod względem objętościowym jest frakcja polisacharydowa złożona z homo- lub heteropolisacharydów. Pozostałe składniki ECM to białka, eDNA, glikoproteiny i lipidy. Komponenty macierzy chronią komórki przed otaczającym środowiskiem, uczestniczą w procesie powstawania oraz dojrzewania biofilmu, stabilizują strukturę biofilmu, a także są źródłem składników odżywczych i wody dla komórek. Polimery zewnątrzkomórkowe wytwarzane w biofilmie mogą być istotnym czynnikiem chorobotwórczości w rozwoju różnych chorób człowieka, np. w zakażeniach *Pseudomonas aeruginosa* występujących w przebiegu mukowiscydozy. *P. aeruginosa* syntetyzuje trzy główne egzopolisacharydy: Pel, Psl i alginian, a także liczne białka zewnątrzkomórkowe – lektyny oraz białka o charakterze enzymatycznym, takie jak: PasP, chitynaza, aminopeptydazy, proteaza IV, które ułatwiają tej bakterii zasiedlanie tkanki płucnej i stymulują rozwój choroby podstawowej.

Chorobą, w rozwoju której istotną rolę odgrywa macierz zewnątrzkomórkowa drobnoustrojów, jest próchnica. Schorzenie to jest związane z rozwojem biofilmu wielogatunkowego na powierzchni zębów. Polimery będące częścią tej struktury wykazują skomplikowaną budowę, odmienną u różnych pacjentów. Warunki otaczającego środowiska, np. obecność sacharozy, w bardzo istotny sposób wpływają na syntezę polimerów zewnątrzkomórkowych: mutanu i dekstranu.

Infekcje przebiegające z tworzeniem biofilmów na powierzchni implantów medycznych są istotnym problemem medycznym i ekonomicznym. Głównym składnikiem macierzy tych biofilmów są substancje o charakterze cukrowym (np. adhezyna PIA, kwas tejchojowy EC-TA), a także białka zewnątrzkomórkowe i powierzchniowe.

Badania nad strukturą macierzy oraz analiza czynników regulujących jej syntezę są niezbędne, ich wyniki mogą być wykorzystane do opracowania technik eradykacji biofilmu i lepszej kontroli infekcji związanych z jego rozwojem.

Słowa kluczowe: polimery zewnątrzkomórkowe • biofilm • mukowiscydoza • próchnica • implanty

Summary

Extracellular polymers which build a biofilm matrix possess a complicated structure, where the polysaccharide fraction, composed of homo- or heteropolysaccharides, is the largest. Other important components are proteins, eDNA, glycoproteins and lipids. The matrix has a protective function against the surrounding environment, plays a role in biofilm formation and maturation processes, stabilizes the biofilm structure, and also is a source of nutrients and water for the cells. It is noteworthy that the biofilm matrix is a virulence factor and plays an important role in the pathogenesis of many human diseases.

Pseudomonas aeruginosa growing in the lungs of patients with cystic fibrosis produces three major exopolysaccharides (Pel, Psl and alginate) and synthesizes numerous proteins such as lectins and enzymes, e.g. PasP, chitinase, aminopeptidase, and protease IV, which facilitate the tissue colonization.

Extracellular polymers play a significant role in the course of caries, which is associated with the development of multi-species biofilm on the teeth surface. The structure of the matrix surrounding that biofilm is complicated – different for each patient. The components of the matrix are constantly changing depending on the environmental conditions, e.g. the presence of sucrose affects the synthesis of mutan and dextran.

Infections associated with biofilm formation on implants pose significant medical and economic problems. The main components of the matrices are saccharides (e.g., PIA, EC-TA), as well as surface and extracellular proteins.

Studies on the matrix structure and the factors regulating its synthesis are necessary to develop techniques for biofilm eradication and better control of biofilm-related infections.

Keywords: extracellular polymeric substances • biofilm • cystic fibrosis • caries • implants

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1192026>

Word count: 5297
Tables: 2
Figures: 1
References: 76

Adres autorki: dr Magdalena Moryl, Zakład Immunobiologii Bakterii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, email: magdabar@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **Aap** – białko związane z akumulacją komórek (accumulation associated protein), **Ami** – autolizyna amidaza (autolysin amidase), **Bap** – białko związane z biofilmem (biofilm-associated protein), **Bcc** – *Burkholderia cepacia* complex, **Clf** – czynnik skupiania, koagulaza związana (clumping factor), **Cna** – białka wiążące kolagen (collagen-binding proteins), **DspB** – dyspersyna B, **EC-TA** – zewnątrzkomórkowe kwasy teichojoyowe (extracellular teichoic acids), **ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa (extracellular matrix), **eDNA** – zewnątrzkomórkowy kwas deoksyrybonukleinowy (extracellular deoxyribonucleic acid), **Emp** – białko wiążące białka macierzy zewnątrzkomórkowej (extracellular matrix protein binding protein), **EPS** – polisacharydy zewnątrzkomórkowe (extracellular polysaccharides), **FnBP** – białko wiążące fibronektynę (fibronectin binding protein), **Ftf** – fruktozylotransferazy, **Gbp** – białka wiążące glukany (glucan-binding proteins), **Gtf** – glikozylotransferazy, **Lap** – białka adhezyjne o dużej masie cząsteczkowej (large adhesion proteins), **Lec** – lektyny, **LPS** – lipopolisacharyd, **PasP** – proteaza *Pseudomonas aeruginosa* o niskiej masie cząsteczkowej (*Pseudomonas aeruginosa* small protease), **Pel** – polisacharyd będący częścią macierzy *Pseudomonas aeruginosa* (pellicle), **PGA** – poli-γ-glutaminian, **PIA** – wewnątrzkomórkowa adhezyna polisacharydowa (polysaccharide intercellular adhesin), **PNAG** – poli N-acetyloglukozamina, **Psl** – polisacharyd będący częścią macierzy *P. aeruginosa* (polysaccharide synthesis locus), **Sas** – białka powierzchniowe *S. aureus* (*S. aureus* surface proteins), **Spa** – paciorkowcowy antygen ochronny (*Streptococcal* protective antigen), **Ssp** – paciorkowcowe białko powierzchniowe (*Streptococcal* surface protein), **WTA** – kwasy teichojoyowe ściany komórkowej (wall teichoic acids).



WPROWADZENIE

Mikroorganizmy najczęściej występują w jednej z dwóch postaci wzrostu – osiadłej i planktonowej (zdolnej do przemieszczania). Drobnoustroje przytwierdzone do podłoża stałego, otoczone wydzielanymi przez siebie polimerami zewnątrzkomórkowymi (ECM – extracellular matrix) tworzą złożoną strukturę, zarówno pod względem budowy, jak i funkcji, nazwaną biofilmem. Wiele uwagi poświęca się analizie zmian, jakie zachodzą w komórkach drobnoustrojów podczas przechodzenia w inną postać wzrostu, np. z planktonowej na osiadłą. Badane są różnice w ekspresji genów tych dwóch typów komórek (planktonowych i osiadłych), a także ich cechy fenotypowe. Jedną z istotnych zmian, jakie obserwuje się u komórek żyjących w biofilmie, jest wzmożona synteza polimerów zewnątrzkomórkowych tworzących macierz.

Grubość warstwy biopolimerów w biofilmie zależy od gatunku mikroorganizmu; szacuje się, że najczęściej wynosi 0,2-1,0 μm , często jednak bywa zdecydowanie cieńsza – 10-30 nm [11]. Budowa i skład chemiczny ECM dla danego gatunku mogą się zmieniać w zależności od warunków hodowli, mikroflory towarzyszącej czy stadium, w którym znajdują się komórki. Wiele bakterii może wytwarzać kilka różnych egzopolimerów, w różnych proporcjach. W środowisku naturalnym (np. na powierzchniach zanurzonych w wodzie czy na tkankach organizmu podczas rozwoju infekcji) biofilm najczęściej jest uformowany z wielu gatunków mikroorganizmów. Jeśli uwzględnimy, że każdy z drobnoustrojów wydziela inne polimery zewnątrzkomórkowe, a każda z populacji tworzących biofilm jest w odmiennym stadium dojrzewania i inaczej reaguje na bodźce ze środowiska, to uświadomimy sobie jak złożoną i unikatową strukturą jest macierz biofilmu [63].

Egzopolimery macierzy są głównymi komponentami w rozwoju i funkcjonowaniu biofilmu bakteryjnego. Początkowo uważano, że ochrona przed czynnikami szkodliwymi: fizycznymi (np. promieniowanie UV), chemicznymi (leki, środki dezynfekcyjne) czy biologicznymi (bakteriofagi, pierwotniaki, czynniki układu odpornościowego gospodarza) jest podstawową funkcją macierzy. Po wielu latach badań uznano jednak, że polimery zewnątrzkomórkowe pełnią też inne role – stabilizują strukturę biofilmu, nadają jej kształt, są również niezbędne w procesie powstawania i dojrzewania biofilmu [11,43]. Jako przykład takich substancji wymienić można białka zewnątrzkomórkowe, które uczestniczą w procesie adhezji do powierzchni stałych czy eDNA (extracellular DNA), który determinuje prawidłowy rozwój komórek w biofilmie. Nie należy zapominać o jeszcze jednej niezwykle istotnej roli polimerów zewnątrzkomórkowych – stanowią swego rodzaju magazyn składników odżywczych i wody dla komórek żyjących w społeczności osiadłej, np. hydrofilowe egzopolimery zatrzymują w obrębie struktury biofilmu wodę, która może zostać wykorzystana przez komórki bakterii w warunkach skrajnego odwodnienia środowiska wzrostu. Polisacha-

rydy zewnątrzkomórkowe obecne w strukturze matriks w warunkach głodowych mogą być źródłem pierwiastków biogenych.

BUDOWA MACIERZY

Podstawowym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej jest woda, która może stanowić nawet 97% całej matriks [63]. Ponadto macierz tworzą: egzopolisacharydy (EPS – extracellular polysaccharides), białka, kwasy nukleinowe, glikoproteiny, a także lipidy. Coraz częściej jako budulec matriks wymienia się kwasy lipoteichojurowe i lipopolisacharyd (LPS) [74]. Wielu badaczy podkreśla, że struktura macierzy w biofilmie pałeczek Gram-ujemnych może wykazywać duże podobieństwo do lipopolisacharydu. W przypadku bakterii z rodzaju *Proteus* oceniono, że zawartość LPS w macierzy biofilmu waha się w granicach 50-90% [1,53,70].

POLISACHARYDY

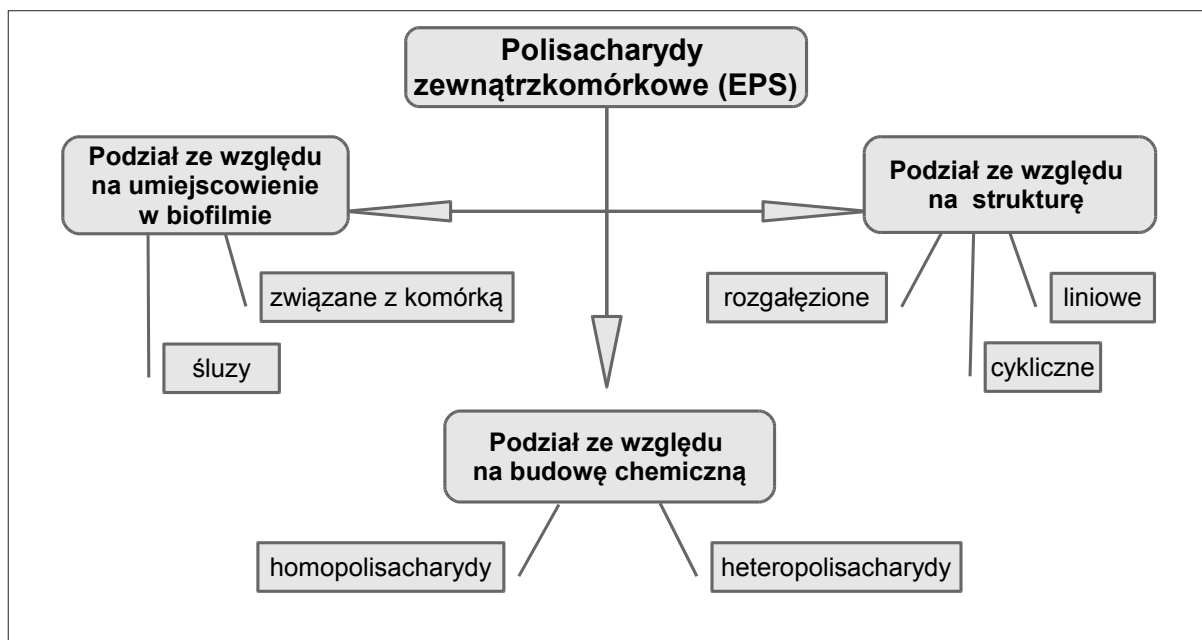
Najbardziej istotnym pod względem objętościowym składnikiem macierzy są polisacharydy, głównie cukrowce obojętne lub kwasy uronowe, najczęściej tworzące długie łańcuchy o masie cząsteczkowej 0,5-2 x 10⁶ Da. Wielu badaczy dzieli polisacharydy macierzy na różne grupy. Niżej przedstawiono najczęściej stosowane klasyfikacje (ryc. 1):

1. Podział ze względu na postać (strukturę), w której występują egzopolisacharydy – wyróżnia się trzy główne postaci: liniową, rozgałęzioną bądź cykliczną [60].
2. Podział ze względu na umiejscowienie w biofilmie – wyróżnia się wielocukry związane z komórką (egzopolisacharyd otoczkowy, związany z komórką przez lipidy, np. zawierające glicerol) i egzopolisacharydy niezwiązane z komórką – często określane mianem śluzu.
3. Podział ze względu na budowę chemiczną – na homopolisacharydy i heteropolisacharydy [11,63]. Ostatnia z wymienionych klasyfikacji jest najczęściej stosowanym podziałem sacharydów macierzy.

Homopolisacharydy są złożone tylko z jednego rodzaju cukrów prostych: D-glukozy lub L-fruktozy, najczęściej są trudno rozpuszczalne w wodzie. Większość autorów dzieli je na trzy grupy:

- α -D-glukany, zbudowane z monomerów D-glukozy, połączonych wiązaniem α [1,6],
- β -D-glukany, zbudowane z monomerów D-glukozy, połączonych wiązaniem β [1,3],
- fruktany, zbudowane z podjednostek fruktozy, połączonych wiązaniem β (2, 6) [11,21].

Przykładem homopolisacharydów jest PNAG (poli-N-acetyloglukozamina) wytwarzana przez *Staphylococcus*



Ryc. 1. Stosowane klasyfikacje polisacharydów zewnątrzkomórkowych [11,60,63]

aureus i *Staphylococcus epidermidis* czy celuloza wydzielana m.in. przez *Gluconacetobacter xylinus* oraz *Escherichia coli*. Do grupy α -D-glukanów zalicza się dekstran wytwarzany przez *Leuconostoc mesenteroides*, do β -D-glukanów - kurdlan wydzielany przez *Agrobacterium* spp., a do fruktanów - lewan syntetyzowany przez wiele grup bakterii, np. *Bacillus* spp. [11,21].

Heteropolisacharydy najczęściej mają ładunek ujemny, dzięki obecności w ich budowie np. grup fosforanowych, siarczanowych, kwasów uronowych. Cecha ta sprawia, że polimery są dobrze rozpuszczalne w wodzie. Są to związki zbudowane z powtarzających się jednostek węglowodanowych, zawierających najczęściej np. D-glukozę, L-fruktozę, L-ramnozę, kwas D-glukuronowy, kwas L-guluronowy, N-acetyloglukozaminę czy też N-acetylogalaktozaminę. Przykładem takich związków jest alginian wytwarzany przez *Pseudomonas aeruginosa* czy różne polisacharydy wytwarzane przez bakterie kwasu mlekowego [8,11,21,47]. O właściwościach polisacharydów decyduje wiele różnych czynników, m.in. rodzaj wiązań między monomerami oraz typ rozgałęzienia cząsteczki.

Najczęściej drobnoustroje należące do różnych gatunków syntetyzują odmienne składniki cukrowe, zdarza się jednak, że odmienne gatunki bakterii mają zdolność syntezy identycznego związku, np. PNAG jest syntetyzowany zarówno przez bakterie Gram-dodatnie: *S. epidermidis*, *S. aureus*, jak i Gram-ujemne: *E. coli* czy *Yersinia pestis* [36].

BIAŁKA

Niezwykle istotnym komponentem macierzy są białka; mogą pochodzić zarówno z żywych, jak i martwych

komórek biofilmu. Obecność w macierzy białek, będących składnikiem cytosolu komórki, może sugerować, że pochodzą z martwych komórek lub są transportowane przez pęcherzyki błonowe [67]. Białka matrycy to najczęściej makromolekuły o masie 10-200 kDa, które zawierają 40-60% aminokwasów hydrofobowych (brak aminokwasów siarkowych) [11]. Wielu badaczy dzieli białka występujące w macierzy według pełnionej funkcji; najczęściej wyróżnia się białka o charakterze enzymatycznym oraz lektyny.

Lektyny to białka zdolne do rozpoznawania i wiązania się do swoistych fragmentów oligosacharydowych, występujących w obrębie różnych wielocukrów. Lektyny są najczęściej izolowane z tkanek roślinnych, zwierzęcych lub z mikroorganizmów [30,66]. U tych ostatnich odgrywają rolę w patogenezie zakażeń, np. w adhezji, zarówno do komórek innych drobnoustrojów, jak i powierzchni abiotycznych i biotycznych, tj. tkanek makroorganizmu. Lektyny najczęściej są umiejscowione na fimbriach, w błonie zewnętrznej lub peptydoglikanie, a ich rola w strukturze biofilmu nie jest dokładnie poznana. Najczęściej uznaje się, że mają udział w procesach adhezyjnych, a więc zapoczątkowują proces tworzenia biofilmu. Ich funkcji upatruje się również w agregacji form planktonowych, a także w procesie wiązania komórek i EPS [30].

Bardzo ważną grupą białek macierzy są enzymy, zwłaszcza liazy i polisacharazy. Liazy alginianowe trawią wiązania glikozydowe α (1, 4) lub β (1, 4), a produktami reakcji są nienasycone kwasy uronowe i oligosacharydy złożone z 2-5 jednostek węglowodanowych. Polisacharazy natomiast to grupa enzymów, które katalizują hydrolityczny rozpad wiązań glikozydowych w polisacharydach [60].



Funkcja białek enzymatycznych jest niezwykle istotna, biorą udział w biosyntezie EPS, gdzie regulują długość łańcuchów cukrowych (np. glikozylotransferazy). W warunkach głodowych umożliwiają rozpad macierzy zewnątrzkomórkowej, a zdegradowane polimery mogą być źródłem substancji odżywczych dla rosnących komórek. Warto wspomnieć, że wytwarzanie enzymów degradujących macierz może być także sposobem regulacji grubości biofilmu, polegającej na odrywaniu się komórek z biofilmu i zasiedlaniu przez nie nowych powierzchni. Nie należy również zapominać, że obecność białek enzymatycznych i ich aktywność w macierzy jest sposobem obrony drobnoustrojów, zarówno przed czynnikami obronnymi makroorganizmu, jak i przed innymi mikroorganizmami współtworzącymi biofilm. Białka te są np. zaangażowane w degradację komórek gospodarza, a uwalniające się w tym procesie substancje mogą stanowić źródło pierwiastków biogenych dla mikroorganizmów w biofilmie [67]. Sugeruje się, że wiele białek enzymatycznych macierzy jest związanych z pęcherzykami membranowymi, których obecność niejednokrotnie potwierdzano w macierzy [56].

Ważną grupą białek macierzy są również proteiny wiążące DNA; zidentyfikowano je u wielu gatunków bakterii, np. *E. coli* czy *Haemophilus influenzae*, są odpowiedzialne m.in. za zmianę architektury DNA, a tym samym oddziałują na transkrypcję genów i funkcje eDNA [67].

ZEWNĄTRZKOMÓRKOWY DNA (EXTRACELLULAR DNA - eDNA)

Rola zewnątrzkomórkowego DNA w strukturze biofilmu od wielu lat budzi dyskusje. Wcześniejsze doniesienia marginalizowały funkcję eDNA, sugerując, że jego obecność w biofilmie jest przypadkowa i pochodzi jedynie z rozpadu komórek. Obecnie liczne doniesienia podkreślają niezwykle istotną rolę eDNA w procesie rozwoju biofilmu różnych gatunków bakterii, np. *P. aeruginosa* czy *Burkholderia cepacia*, gdzie cząsteczka ta jest komponentem strukturalnym, umożliwiającym formowanie i stabilizację struktury biofilmu [41,72]. Wykorzystując różne gatunki drobnoustrojów udowodniono, iż dodatek DN-azy do środowiska, w którym tworzony jest biofilm, powoduje znaczne ograniczenie masy biofilmu, a także wzrost jego wrażliwości na antybiotyki [25,29,61]. Bardzo dużo uwagi poświęca się roli eDNA w oporności biofilmu różnych gatunków na antybiotyki. Prawdopodobnie uczestniczą dwa mechanizmy w ochronie komórek przed działaniem antybiotyków. Pierwszy zakłada, że eDNA stanowi rodzaj tarczy – ekranu, który opóźnia przenikanie leków do wnętrza biofilmu. Drugi mechanizm polega na wiązaniu przez eDNA kationów obecnych w środowisku wzrostu biofilmu. Obniża to stężenia kationów w otoczeniu komórek, co aktywuje geny *pmr*, odpowiedzialne za syntezę spermidyny. Skutkiem tych procesów jest powstanie płaszcza ochronnego z polikationu spermidyny na powierzchni struktury biofilmu, który zapobiega przyłączaniu leków przeciwbakteryjnych do właściwych receptorów, znajdujących się np. w błonie zewnętrznej [9]. Przepuszczalna rola zewną-

trzkomórkowego DNA może również polegać na horyzontalnej wymianie materiału genetycznego między komórkami w biofilmie.

Ciekawego odkrycia dokonali Walker i wsp., którzy udowodnili, że DNA makroorganizmu również odgrywa rolę w stabilizacji i formowaniu struktury biofilmu tworzonego przez mikroorganizmy [71]. Podczas zasiedlania tkanek ekspresji ulegają czynniki wirulencji drobnoustrojów (np. ramnolipid u *P. aeruginosa* w przebiegu mukowiscydozy), które mogą doprowadzić do lizy granulocytów (leukocytów polimorfojadrowych), gdy zawodzi wrodzona odpowiedź immunologiczna. Podczas rozpadu tych komórek dochodzi do uwolnienia DNA i innych składników, które zostają włączone w strukturę macierzy biofilmu tworzonego przez te patogeny.

FUNKCJE I RODZAJE ECM

Pod względem funkcji w biofilmie polimery zewnątrzkomórkowe można podzielić na siedem różnych kategorii: ECM o charakterze strukturalnym, sorpcyjnym, powierzchniowo czynnym, aktywnym, informacyjnym, odżywczym oraz o aktywności redoks [13]. Główną część macierzy stanowią polimery budulcowe (strukturalne), które chronią komórki bakteryjne przed działaniem środowiska zewnętrznego. W skład tych egzopolimerów wchodzi na ogół sacharydy obojętne i amyloidy. Inne ważne elementy macierzy – polisacharydy obdarzone ładunkiem lub hydrofobowe, odpowiadają za wymianę jonową oraz za właściwości sorpcyjne egzopolimerów. Związki te są odpowiedzialne za interakcje komórka–powierzchnia. Przykładem takiego egzopolimeru jest poli- γ -glutaminian (γ -PGA) wytwarzany przez *B. subtilis*. Na ECM o charakterze aktywnym składają się wydzielane zewnątrzkomórkowo enzymy, których rola polega głównie na degradacji łańcuchów polisacharydowych. Niezwykle ważną funkcję pełnią również polimery zaliczane do kategorii powierzchniowo czynnej. Są to związki o charakterze amfifilowym, najczęściej wchodzące w skład pęcherzyków błonowych. Polimery te uczestniczą m.in. w interakcjach z powierzchnią, na której tworzy się biofilm. Przykładem takiego związku jest surfaktyna – cykliczny lipopeptyd wytwarzany przez *B. subtilis* [13,40,43]. Inne związki z tej kategorii ECM, mające właściwości antibakteryjne i przeciwgrzybowe, biorą udział w procesie adhezji podczas formowania biofilmu. Lektyny i eDNA są składnikami macierzy o funkcji informacyjnej, uczestniczą w rozpoznawaniu informacji genetycznej. Rola egzopolimerów o aktywności redoks jest słabiej poznana, związki te mogą być donorami bądź akceptorami elektronów [13]. Ważną funkcję w życiu biofilmu pełni macierz o funkcji odżywczej. Zbudowana z różnych polimerów, głównie heteropolisacharydów, które w razie niedoborów energetycznych są trawione i stanowią źródło składników odżywczych: węgla, azotu i fosforu. Funkcje poszczególnych składników ECM podsumowano w tabeli 1.

Tabela 1. Funkcje wybranych składników macierzy w biofilmie

Składnik macierzy	Przykłady związków	Funkcja w biofilmie	Piśm.
Polisacharydy	Homopolisacharydy/PNAG, dekstran	Strukturalna (budulcowa) Stabilizacyjna Adhezja Odżywcza Retencja wody Komunikacja między komórkami (QS) Ochronna	[4,13,27,33,39]
	Heteropolisacharydy/alginian		
Białka	Lektyny/LecA, LecB, GbpA-D	Adhezja Koagregacja komórek Komunikacja między komórkami (QS)	[13,19,30]
	Enzymy: liazы i polisacharazy/ proteazy, chitynaza	Enzymatyczna Regulacja grubości biofilmu Uwalnianie komórek potomnych Ochrona przed układem odpornościowym	[13,60,67]
eDNA	-	Stabilizacyjna Zwiększanie oporności na antybiotyki Horyzontalny transfer genów	[9,13,41,72]
Biosurfaktanty	Ramnoflipid, surfaktyna	Interakcje z powierzchnią Strukturalna Uwalnianie komórek z biofilmu Ochrona przed układem odpornościowym	[5,13,40,43]
Pęcherzyki błonowe	-	Transport składników do macierzy Utrzymanie asymetrii lipidów w membranach zewnętrznej	[13,39]
LPS	-	Stabilizacyjna Warunkowanie hydrofobowości komórek	[39]

Wpływ środowiska zewnętrznego na syntezę egzopolimerów

Mikroorganizmy w biofilmie regulują ilość i skład wytwarzanych przez nie polimerów zewnątrzkomórkowych. Największe ich zróżnicowanie jest widoczne w biofilmach wielogatunkowych, np. biofilmu płytki nazębnej. Najważniejszymi czynnikami, od których zależy skład i ilość powstających egzopolimerów są: gatunek mikroorganizmu, który go wytwarza, faza wzrostu drobnoustrojów lub etap dojrzewania biofilmu, a także środowisko wzrostu drobnoustrojów. Czynniki środowiskowe, takie jak: stężenie tlenu, źródło węgla i innych pierwiastków biogenych, temperatura oraz pH, mają ogromny wpływ na strukturę macierzy [11,70].

Wielu autorów uważa, że w środowiskach bogatych w substancje odżywcze, np. glukozę czy sacharozę,

mikroorganizmy syntetyzują EPS z większą intensywnością [28,42]. Petry i wsp. sugerują ponadto, że glukoza obecna w środowisku może być wykorzystywana do budowy EPS w późnej fazie stacjonarnej wzrostu drobnoustrojów [48]. Duży wpływ na wytwarzanie EPS ma odpowiednie pH środowiska wzrostu mikroorganizmów, przy czym największą syntezę egzopolimerów wykazywano w pH bliskim obojętnego [48,50]. Możliwe, że hodowla drobnoustrojów w obniżonym pH wiąże się z ograniczeniem intensywności wzrostu bakterii w postaci biofilmu, a niekoniernie z redukcją stężenia wytwarzanych polisacharydów [28]. Temperatura wzrostu ma również istotny wpływ na wytwarzanie macierzy, a najbardziej wydajna synteza, w przypadku większości drobnoustrojów, zachodzi w dość wąskim jej zakresie. Wydajność wytwarzania EPS jest zależna od fazy wzrostu drobnoustroju, przy czym obserwowano różnice



w zależności od gatunku mikroorganizmu. Na przykład u *P. aeruginosa* i *S. epidermidis* najwięcej wytwarzanych polimerów stwierdzono pod koniec fazy logarytmicznej wzrostu oraz na początku fazy stacjonarnej, natomiast w przypadku np. *Enterobacter aerogenes* w tych fazach nie wykazano wytwarzania EPS [11,63].

MACIERZ JAKO CZYNNIK CHOROBTWÓRCZOŚCI W ZAKAŻENIACH BAKTERYJNYCH W PRZEBIEGU MUKOWISCYDOZY

Macierz biofilmu jest czynnikiem wirulencji i odgrywa ogromną rolę w patogeniezie wielu schorzeń człowieka, m.in. w przebiegu mukowiscydozy, gdzie w tkance płucnej w czasie infekcji wywołanej *P. aeruginosa* dochodzi do rozwoju biofilmu. Pałeczki *P. aeruginosa* wytwarzają trzy główne egzopolisacharydy: Pel, Psl i alginian, pełniące różne funkcje w ich biofilmie [37]. Budowę chemiczną tych związków przedstawiono w tabeli 2. Alginian jest kodowany przez operon złożony z 12 genów (PA3540-PA3551), Psl przez operon złożony z 15 genów, z czego 11 jest istotnych w wytwarzaniu Psl w biofilmie – (PA2231-PA2242), natomiast Pel przez operon złożony z 7 genów (PA3058-PA3064) [39,54,58]. Alginian to wysokocząsteczkowy O-acetylowany polimer zawierający w swojej strukturze kwasy L-glukuronowy i D-mannuronowy połączone wiązaniem β (1, 4), który jest uważany za niezwykle ważny czynnik wirulencji *P. aeruginosa*. Odpowiada za groźne, często śmiertelne zakażenia tą pałeczką w przebiegu mukowiscydozy. Szczepy izolowane od pacjentów dotkniętych tą chorobą bardzo często mają tzw. fenotyp śluzowy – wytwarzają alginian w dużej ilości. Jest to spowodowane mutacją w genie *mucA*, co prowadzi do niekontrolowanej (przez sigma factor) ekspresji tego związku. Częstość tej mutacji wśród izolowanych szczepów jest bardzo duża, a bezpośredni wpływ na to zjawisko ma przewlekły stan zapalny w tkance płucnej (np. obecność reaktywnych form tlenu) [39]. Wykazano, że alginian nie jest niezbędny w procesie tworzenia biofilmu *P. aeruginosa*, jednak u szczepów go wytwarzających pełni rolę ochronną – zwiększając ich oporność na antybiotyki, a także składniki układu odpornościowego gospodarza [54,59]. Szczepy syntetyzujące ten związek są nawet 1000 razy bardziej odporne na antybiotyki (np. tobramycynę) w porównaniu do bakterii niewytwarzających śluzu [30]. Alginian jest także immunogenem, w surowicy chorych na mukowiscydozę wykrywane są przeciwciała przeciwko temu polisacharydowi. Może również wyłapywać wolne rodniki, uwalniane przez komórki odpornościowe, chroniąc w ten sposób ukryte w śluzie bakterie przed działaniem układu odpornościowego. Polisacharyd ma ponadto właściwości retencyjne – zatrzymuje wodę i składniki odżywcze [39]. Udowodniono, że związek ten ułatwia powstawanie charakterystycznej dla *P. aeruginosa* struktury biofilmu, a jego nadmierne wytwarzanie znacząco zmienia architekturę biofilmu [54].

Drugi z syntetyzowanych przez *P. aeruginosa* polisacharydów – Psl jest niezbędny do powstania biofilmu. We wstępnym etapie jego tworzenia umożliwia

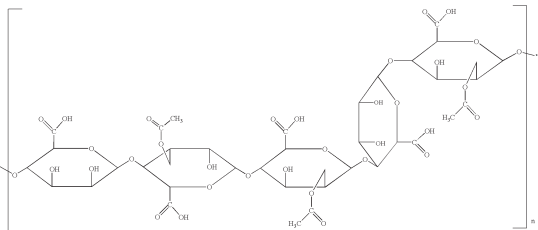
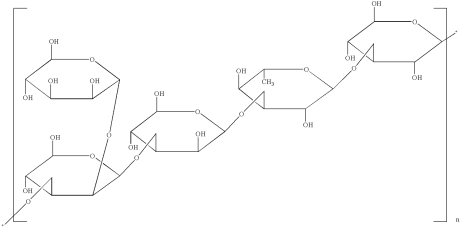
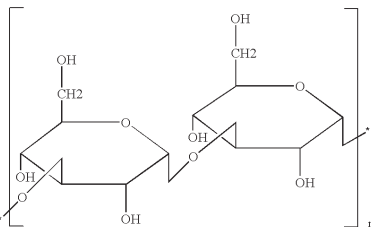
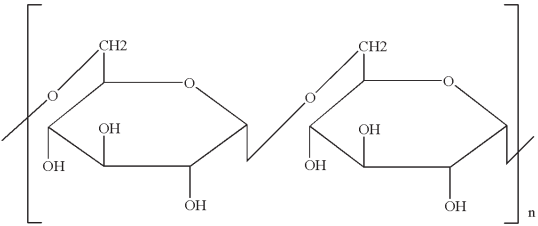
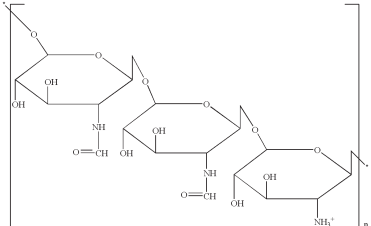
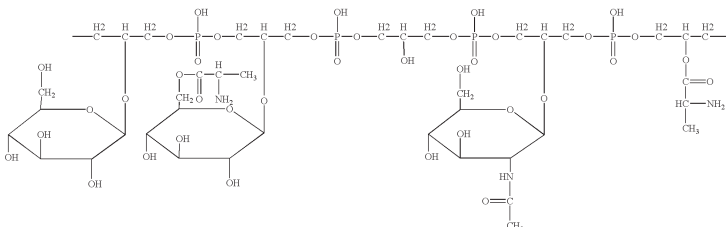
przywieranie komórek do podłoża, tworząc rodzaj rusztowania, do którego przylaczają się komórki drobnoustrojów. Po zakończeniu procesu adhezji jest natomiast związany z tworzeniem charakterystycznych grzybkowatych struktur mikrokolonii [18,54]. Związek uczestniczy ponadto w interakcjach komórka-komórka, m.in. w komunikacji międzykomórkowej czy koagregacji. Psl składa się z powtarzających się fragmentów pentasacharydowych, zawierających D-mannozę, D-glukozę i L-ramnozę. Najczęściej występuje w dwóch postaciach, jako składnik związany z komórką, o dużej masie cząsteczkowej i jako postać rozpuszczalna, o mniejszej masie cząsteczkowej [15]. Istotne, zwłaszcza w mukowiscydozie, jest to, że Psl pełni rolę w różnicowaniu biofilmu, podczas zakażenia zmieniają się bowiem rozmieszczenia tego wielocukru w matrycy biofilmu [54].

Inny z istotnych związków syntetyzowanych w biofilmie *P. aeruginosa* to Pel – polisacharyd bogaty w glukozę, o budowie zbliżonej do celulozy (nie jest znana szczegółowa struktura chemiczna). Stanowi rusztowanie dla komórek we wczesnym etapie powstawania biofilmu, a także pełni funkcję w interakcjach komórka-komórka. Nazwa Pel pochodzi od pellicle – błonka, gdyż związek ten odpowiada za tworzenie błonki na granicy faz cieczej-powietrze, a także za wzrost *P. aeruginosa* w postaci pomarszczonych kolonii [18,39]. Wykazano, że szczepy *P. aeruginosa* najczęściej wytwarzają polisacharydy Psl i Pel jednocześnie – z matriks biofilmu są izolowane wtedy duże ilości glukozy i mannozy. Stwierdzono natomiast, że syntezy Psl/Pel i alginianu mogą się wzajemnie wykluczać [30].

Innymi istotnymi patogenami odpowiedzialnymi za groźne infekcje u chorych na mukowiscydozę są gatunki *Burkholderia cepacia* complex (Bcc). Egzopolimery wytwarzane przez te drobnoustroje mają istotne znaczenie w rozwoju choroby. Cepacian to związek złożony z powtarzających się rozgałęzionych jednostek siedmio-sacharydowych. Oprócz cepacianu, wspólnego dla większości Bcc, w macierzy biofilmu tych drobnoustrojów wykryto co najmniej sześć innych związków polisacharydowych, m.in. PNAG, PGA, które są niezbędne zarówno w procesie powstawania, jak i stabilizowania struktury dojrzałego biofilmu pojawiającego się w przebiegu zakażenia tymi mikroorganizmami. Wykazano, iż cepacian zawarty w macierzy biofilmu jest odpowiedzialny za hamowanie antybakteryjnego działania peptydów, osłabienie chemotaksji neutrofilów, a także jest akceptorem reaktywnych form tlenu [10,75].

W rozwoju zakażeń bakteryjnych u chorych na mukowiscydozę ogromne znaczenie mają również inne składniki macierzy – eDNA i białka. Zewnątrzkomórkowy DNA wpływa na ograniczenie wrażliwości patogenów na stosowane antybiotyki, m.in. tobramycynę i czynniki układu odpornościowego makroorganizmu [41]. Białkowe wyrostki – fimbrie, które również można traktować jako element macierzy, a także lektyny, pośredniczą w przyleganiu komórek do powierzchni – odpowiadają za

Tabela 2. Uproszczona budowa chemiczna wybranych polisacharydów zewnątrzkomórkowych

Związek	Typ wiązania chemicznego	Wzór chemiczny	Piśm.
Alginate	β (1,4)		[15,33]
PSL	β (1,3) α (1,3) α (1,2)		[15]
Mutan	α (1,3)		[12]
Dekstran	α (1,6)		[12]
PNAG	β (1,6)		[15]
EC-TA	α (1-3)		[33,55]



proces tworzenia biofilmu [30]. Szczególnie istotną rolę w zakażeniach *P. aeruginosa* u chorych na mukowiscydozę przypisuje się lektynom LecA i LecB. LecA (PA-IL) jest kodowana przez gen *lecA* i wiąże się z pochodnymi D-galaktozy, natomiast LecB (PA-III), kodowana jest przez gen *lecB* i jest swoista dla L-fukozy. Białka te mają znaczenie w procesie komunikacji międzykomórkowej - *quorum sensing*, a także najprawdopodobniej uczestniczą w procesie tworzenia biofilmu w drogach oddechowych. Możliwe, że są również zaangażowane w interakcje między komórkami drobnoustrojów, np. w koagregacji. Białka CdrA to związki istotne w rozprzestrzenianiu infekcji *P. aeruginosa*. Wiążąc się do składników cukrowych macierzy - Psl, umacniają wiązanie tego wielocukru do komórek bakterii w biofilmie, zwiększając tym samym integralność biofilmu i promując jej rozwój na powierzchni tkanki [6,67]. Niektóre białka mają istotne znaczenie w regulacji procesów formowania i dojrzewania biofilmu (białka LapD), inne (LapA) pełnią funkcję cząsteczki łączącej komórki drobnoustrojów [19].

Z macierzy *P. aeruginosa* izolowano również białka o charakterze enzymatycznym, tj. PasP, chitynazę, aminopeptydazy, proteazę IV [67]. Istotnymi czynnikami zjadliwości są również inne składniki macierzy, m.in. LPS, który pośredniczy w utrzymaniu stabilności biofilmu i wpływa na zmianę hydrofobowości komórki. Pęcherzyki błonowe mają ogromny udział w rozwoju biofilmu - oddziałują z innymi składnikami macierzy, m.in. z eDNA, dostarczają duże ilości LPS do macierzy, pozwalają zachować wewnętrzną asymetrię lipidów w membranie zewnętrznej, a także transportują do macierzy składniki przestrzeni peryplazmatycznej, tj. proteazy, fosfatazy, lipazy, autolizyny i toksyny [39]. Charakterystycznym czynnikiem chorobotwórczości, związanym z macierzą biofilmu *P. aeruginosa*, jest ramnolipid. Synteza tego biosurfaktantu ułatwia adaptację komórek mikroorganizmu do trudnych warunków otoczenia (sugeruje się, że ułatwia asymilację węglowodórów). Związek ponadto działa cytotoksycznie, np. na neutrofile, co prowadzi do rozwoju bardzo uporczywych infekcji. Ramnolipid ma również ogromne znaczenie w procesie formowania struktury biofilmu, bierze udział w rozwoju mikrokolonii przypominających kształtem grzyby czy wieże, a także odpowiada za kształtowanie się tzw. kanałów wodnych. Udowodniono również, że pośredniczy w uwalnianiu komórek potomnych z biofilmu [5].

Wszystkie składniki macierzy są zintegrowane i wspólnie stanowią niezwykle istotny czynnik wirulencji patogenów, wywołujących groźne zakażenia w obrębie płuc u chorych na mukowiscydozę.

ROLA POLIMERÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH W ROZWOJU PRÓCHNICY

Chorobą, w rozwoju której ogromne znaczenie mają polimery zewnątrzkomórkowe wydzielane przez drobnoustroje, jest próchnica. Dowodem na poparcie tej tezy są badania nad składem biofilmów izolowanych z jamy

ustnej. Airesa i wsp. oszacowali, że 40% suchej masy biofilmu nazębnego stanowią polisacharydy [2], natomiast Bowen i Koo wykazali, że 10-20% masy płytki nazębnej stanowią glikan i fruktan, natomiast białka to aż 40% [7]. W badanych macierzach były również inne składniki, np. lipidy i jony pierwiastków: Ca, Mg, P, F.

W jamie ustnej biofilm jest tworzony przez wiele różnych gatunków drobnoustrojów (przypuszcza się, że nawet 19000 gatunków), zatem i budowa macierzy w tej strukturze jest niezwykle złożona, inna u każdego pacjenta. Ulega ciągłym zmianom w zależności od warunków środowiska, interakcji między mikroorganizmami oraz między bakteriami, a białkami gospodarza [57].

Rola EPS w rozwoju próchnicy polega na ułatwianiu adhezji drobnoustrojów do powierzchni zębów oraz zapewnieniu integralności i stabilności struktury biofilmu [34]. Polimery utrudniają również dyfuzję substancji do wnętrza i na zewnątrz biofilmu. Dzięki tym właściwościom macierz może być rezerwuarem, np. jonów metali lub substancji odżywczych dla komórek drobnoustrojów, o czym już wspomniano w rozdziale dotyczącym funkcji ECM [32]. Znaczna ilość wytwarzanej macierzy osłaniającej komórki drobnoustrojów powoduje wzrost masy biofilmu i porowatości jego struktury, co ułatwia akumulację cukrów na powierzchni macierzy. Stwierdzono, że obecność produktów rozkładu sacharozy w strukturze biofilmu przyczynia się do obniżenia zawartości jonów wapnia, fluoru i fosforu w tkance zębowej, co w połączeniu z niskim pH środowiska oraz ograniczeniem dyfuzji substancji demineralizuje szkliwo i zwiększa chorobotwórczą rolę biofilmu [31,45].

Na rozwój i dojrzewanie biofilmu nazębnego szczególnie wpływ ma otaczające środowisko, obecność związków pokarmowych w dużym stężeniu, zwłaszcza cukrów, np. sacharozy, zmiany pH wywołane rozkładem określonych węglowodanów. To środowisko zewnętrzne determinuje rozwój konkretnych grup drobnoustrojów, np. obecność sacharozy stymuluje namnażanie *Streptococcus mutans* i pałeczek *Lactobacillus*, a hamuje wzrost *Streptococcus sanguinis*. W wyniku tych zmian środowiskowych następuje zachwianie balansu w społeczności bakteryjnej, co prowadzi do zmian w strukturze biofilmu, a także w składzie i ilości EPS [46]. Zatem to obecność sacharozy wzmacnia znaczenie EPS jako czynnika chorobotwórczości drobnoustrojów powodujących próchnicę.

Drobnoustrojem odpowiedzialnym za rozwój próchnicy jest m.in. *S. mutans*. Bakterie te, a także inne obecne w jamie ustnej, np. *S. sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus* spp. syntetyzują glikozylotransferazy (Gtf), które katalizują rozkład sacharozy i przyłączenie powstałej reszty glikozy do łańcucha akceptora np. łańcucha oligosacharydowego. Enzymy te są niezbędne do syntezy egzopolisacharydów występujących w biofilmie - mutanu i dekstranu, zbudowanych z reszt D-glikozy, połączonych odpowiednio wiąza-

niami α (1, 3) lub α (1, 6) (tabela 2) [21,73]. Za syntezę mutanu odpowiada glukozylotransferaza B, za syntezę dekstranu glukozylotransferaza-D. *S. mutans* wytwarza dodatkowo glukozylotransferazę-C, która odpowiada za syntezę mieszaniny wymienionych wyżej polimerów [2,7]. Enzymy te w części N-terminalnej, składają się z fragmentu wspólnego dla wszystkich typów (38 aminokwasów) i zmiennego – charakterystycznego dla danego typu enzymu (200 aminokwasów). Część C-terminalna również jest zróżnicowana w zależności od rodzaju enzymu. Gtf B i C mają inną budowę części C-terminalnej, natomiast Gtf B i D wykazują podobieństwo w jej strukturze [7].

Za rozkład sacharozy i syntezę składników EPS odpowiadają również inne enzymy syntetyzowane przez *S. mutans* – fruktozylotransferazy (Ftf), które katalizują powstanie fruktanów połączonych wiązaniem α (2, 6), np. lewanu. Ze względu na to, że biofilm powstający na powierzchni zębów jest złożony z wielu gatunków mikroorganizmów otoczonych wspólną matriks enzymy wydzielane np. przez *S. mutans* oddziałują na inne drobnoustroje współtworzące biofilm. Sacharoza dostępna powszechnie w środowisku biofilmu, podobnie jak inne cukry: glukoza, fruktoza, maltoza czy skrobia, mogą być równocześnie rozkładane, np. w procesie fermentacji przez drobnoustroje w biofilmie. W wyniku ich rozkładu powstają kwaśne produkty sprzyjające procesom demineralizacji szkliwa nazębnego [74]. Udowodniono, że im bogatsze w różne sacharydy jest środowisko, w którym dochodzi do formowania biofilmu, tym jego struktura jest bardziej złożona, a przez to jest bardziej niebezpieczny – szybciej prowadzi do zmian próchnicznych na zębach. Ponadto obecność rozbudowanego polimeru powierzchniowego sprzyja adhezji innych gatunków drobnoustrojów [51].

Trzeba pamiętać, że istnieje drugi mechanizm rozwoju biofilmu na tkance zębów, niezależny od obecności sacharozy w środowisku jamy ustnej. W proces ten są zaangażowane białka zawarte w ślinie, takie jak np. aglutyniny, mucyna czy kwasowe białka bogate w prolinę, które przyspieszają proces tworzenia biofilmu wchodząc w interakcje z adhezyną P1 (reprezentowaną przez białka: Spa P, SspA, SspB), obecną na powierzchni komórek np. *S. mutans*. Rodzina białek P1 bierze udział w agregacji komórek mikroorganizmów, a także jest zaangażowana w interakcje między komórkami, co wykazano na przykładzie *Streptococcus gordonii* i *Porphyromonas gingivalis* [32]. W rozwoju biofilmu próchnicznego bardzo ważną rolę pełnią enzymy obecne w jamie ustnej, syntetyzowane przez makroorganizm, np. amylazy, dekstrynazy, lewanazy, które znacząco wpływają na rozwój macierzy zewnątrzkomórkowej biofilmu, m.in. na sposób rozgałęzienia łańcuchów cukrowych czy zmianę miejsc wiązania drobnoustrojów na powierzchni EPS [23]. Warto również zwrócić uwagę na rolę białek zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez bakterie w formowaniu biofilmu nazębnego. Szczególnie istotną rolę w procesie tworzenia biofilmu w jamie ustnej pełnią lektyny, które m.in.

pośredniczą w koagregacji komórek mikroorganizmów, co ma znaczny wpływ na wzmoczoną ich adhezję. Przykładem są cztery lektyny GbpA-D (glucan-binding proteins) wytwarzane przez *S. mutans* czy lektyny wytwarzane przez inny patogen zębów – *Eikenella corrodens* [30].

Produkty przemiany materii drobnoustrojów żyjących w jamie ustnej i obecność wydzielanej przez nie egzopolisacharydowej osłony przyczyniają się do rozwoju groźnych chorób zębów, które w swoim przebiegu nie ograniczają się do zmian w jamie ustnej, lecz często negatywnie wpływają na funkcjonowanie całego makroorganizmu.

ROLA MACIERZY W INFIEKCIACH ZWIĄZANYCH Z ZASTOSOWANIEM IMPLANTÓW MEDYCZNYCH

Infekcje związane z wszczepianiem implantów medycznych do organizmu człowieka (cewniki do dializ, sztuczne zastawki serca, protezy ortopedyczne) funkcjonują w literaturze angielskiej pod nazwą chronic polymer-associated infections, co można przetłumaczyć jako przewlekłe zakażenia związane z rozwojem polimeru. Najczęściej za tego typu infekcje są odpowiedzialne gronkowce koagulazoujemne, np. *S. epidermidis*. Drobnoustroje te tworzą na powierzchni implantów biofilmy zamknięte w egzopolimerowej osłonie (najczęściej amorficzny materiał śluzowy). Śluz, jako główny element zawiera substancje o charakterze cukrowym, np. glukozaminę czy kwasy tejchojowe. Głównym czynnikiem chorobotwórczości gronkowców, mającym znaczenie w rozwoju biofilmu na powierzchniach abiotycznych, jest PNAG – poli-N-acetyloglukozamina, często określana jako PIA (polysaccharide intercellular adhesin). Głównym jej budulcem jest 130 reszt N-acetylo-D-glukozaminy, połączonych wiązaniem β (1, 6), co stanowi 80-85% całej cząsteczki. Na pozostałą część PIA składają się deacetylowane reszty D-glukozaaminy, zawierające fosforan i reszty bursztynianu (tabela 2), nadające cząsteczce charakter anionowy. Obecność grup N-acetylowych w strukturze PIA sprawia, że ma właściwości silnie hydrofobowe. Za syntezę i eksport monomerów jest odpowiedzialny operon *ica*, w skład którego wchodzi gen regulatorowy *icaR* i 4 geny odpowiedzialne za biosyntezę *icaADBC* [4,33]. W proces są zaangażowane również homologiczne geny *icaA* (ortolog): *pgaC* i *hmsR*, kodujące glukozylotransferazy katalizujące syntezę polimerów N-acetyloglukozaminy. Ortologi *icaB*: *pgaB* i *hmsF* są natomiast odpowiedzialne za deacetylację N-acetyloglukozaminy. Proces ten jest niezbędny w kotwiczeniu PNAG do komórek [30]. PNAG łącząc się z powierzchnią abiotyczną uczestniczy w adhezji komórek do implantów, udowodniono również udział tego wielocukru w komunikacji międzykomórkowej i ochronie komórek bakteryjnych przed mechanizmami obronnymi gospodarza (m.in. osłabia zdolność fagocytów do pochłaniania komórek bakterii) [3,4,27,33].

Zewnątrzkomórkowy kwas tejchojowy (EC-TA – extracellular teichoic acid) wyizolowany z macierzy biofilmu kilku gatunków drobnoustrojów Gram-dodatnich, jest istotnym czynnikiem ich chorobotwórczości.



Stwierdzono, iż jego budowa jest identyczna jak kwasu tejchojowego budującego ścianę komórkową tych drobnoustrojów (WTA – wall teichoic acids). Przykładowo u *S. epidermidis* oba komponenty mają taką samą strukturę i składają się z 1,3 polifosforanu glicerolu, podstawionego w pozycji drugiej glicerolu resztami α -Glc, α -GlcNAc, D-Ala i α -Glc6Ala. Kwasy tejchojowe to związki silnie polarne, charakteryzujące się ładunkiem ujemnym i dużą hydrofilowością. Ich budowa, właściwości i luźne zakotwiczenie w komórce powodują, że część z nich może zostać uwolniona do macierzy biofilmu.

W macierzach biofilmów, w których znajdują się oba zróżnicowane pod względem właściwości związki (PNAG i EC-TA) obserwuje się lepszą zdolność do regulowania hydrofilowości składników biofilmu i tworzenia biofilmu nawet w bardzo niekorzystnych warunkach środowiskowych [27]. Wykazano również, że WTA mają ogromne znaczenie w procesie tworzenia biofilmu. Vergara-Irigaray i wsp. wysunęli hipotezę, że przyłączanie PNAG do powierzchni bakterii zachodzi na zasadzie jonowych interakcji między dodatnio naładowanymi resztami aminowymi obecnymi w częściowo deacylowanym PNAG, a ujemnie naładowanym WTA [69].

Ogromne znaczenie w procesie przylegania *S. aureus* do powierzchni np. implantów medycznych mają liczne białka wydzielane poza komórki mikroorganizmów, np. Bap, FnBPs, SasG czy białko A [38,68]. Białka z rodziny Bap (biofilm-associated protein) odgrywają ważną rolę (większą niż polisacharydy) w adhezji bakterii do podłoża stałego i utrzymaniu komórek w biofilmie w dużym przybliżeniu, pośredniczą bowiem w tworzeniu się agregatów bakteryjnych. Białka te, przez ich związanie z receptorem Gp96, odpowiadają również za zahamowanie procesu internalizacji komórek *S. aureus* do fagocytów. Bakterie unikają w ten sposób odpowiedzi ze strony układu odpornościowego makroorganizmu. Białko Bap jest dużą cząsteczką (2276 aminokwasów), złożoną z 86 powtarzających się sekwencji aminokwasowych. Kodowane jest przez geny *bap*, zgrupowane w wyspie patogenności (SaPIbov2). Funkcje tego białka są regulowane obecnością w pożywce jonów wapnia [30,68].

Nie należy zapominać o istotnej roli białek powierzchniowych gronkowców w tworzeniu biofilmu na powierzchniach abiotycznych i interakcjach między komórkami. Do białek tych można zaliczyć: Sas C, Sas G, główną autolizynę Alt, ClfA, ClfB, białko Emp wiążące ECM, białka wiążące fibronektynę FnBPA i FnBPB, wiążące kolagen Cna oraz adhezyne Aap [52,62].

Istotnym składnikiem macierzy biofilmu gronkowcowego jest β -toksyna – neutralna sfingomielinaza, która wchodzi w reakcje z eDNA, stymuluje proces tworzenia biofilmu oraz stabilizuje jego strukturę [24].

Złożona budowa i wyspecjalizowane funkcje poszczególnych składników macierzy biofilmów gronkowcowych

warunkują rozwój przewlekłych i trudnych do zwalczenia infekcji, rozwijających się na implantach medycznych.

ERADYKACJA MACIERZY JAKO METODA KONTROLI INFEKЦИИ ZWIĄZANYCH Z POWSTAWANIEM BIOFILMU

Niesłychanie istotną strategią walki z biofilmem bakteryjnym jest niszczenie struktury zewnątrzkomórkowej macierzy. Degradacja ECM skutkuje utratą ważnego elementu strukturalnego biofilmu, a także bariery ochronnej, co sprawia, że komórki bakterii stają się łatwiej dostępne dla antybiotyków oraz mechanizmów obronnych gospodarza.

Metody opierają się przede wszystkim na degradacji lub odrywaniu polimerów macierzy. Opisanych jest wiele czynników chemicznych mających takie właściwości, są to m.in. enzymy lub surfaktanty. Enzymy mają najczęściej działanie swoiste – degradują konkretne polisacharydy. Ich komercyjne zastosowanie może być zatem trudne, zwłaszcza w przypadku biofilmów tworzonych przez różne gatunki mikroorganizmów, gdzie macierz zewnątrzkomórkowa jest złożona z mieszaniny różnych polimerów. Najczęściej stosowanymi enzymami są hydrolazy, np. dyspersyna B (DspB), która rozkłada polimery N-acetyloglukozaminy oraz hialuronidazy, mutanazy i dekstranazy, wykazujące aktywność m.in. wobec polimerów macierzy *S. mutans* [49,65]. Bardzo ważną rolę w degradacji macierzy pełnią proteazy (np. proteinaza K). Ich zastosowanie prowadzi bowiem do zniszczenia białek powierzchniowych, np. autolizyny Ami4b, czy internaliny B w macierzy biofilmu *Listeria monocytogenes* [35].

Niewątpliwie największe znaczenie spośród opisywanych metod degradacji macierzy ma zastosowanie DN-azy I – enzymu trawiącego zewnątrzkomórkowy DNA. Wielokrotnie udowodniano jego skuteczność w eradykacji biofilmu tworzonych przez różne gatunki mikroorganizmów, np. *P. aeruginosa*, *S. aureus* czy *Enterococcus faecalis* [22,64]. Po zastosowaniu tego enzymu obserwowano również uwrażliwienie biofilmu na stosowane antybiotyki i biocydy. DN-azę wykorzystano już w leczeniu infekcji *P. aeruginosa* w przebiegu mukowiscydozy, stosując aerozol o nazwie handlowej Pilmozyme. Długotrwałe stosowanie preparatu bardzo korzystnie wpływało na kondycję pacjentów z mukowiscydozą [16].

Duże nadzieje w zwalczaniu biofilmów bakteryjnych wiąże się również z zastosowaniem bakteriofagów, zwłaszcza tych zdolnych do wytwarzania depolimeraz polisacharydów. Wyzolowano fagi zdolne do wytwarzania alginazy, która degraduje macierz *P. aeruginosa*. Po zadziałaniu tego enzymu odsłonięte zostają komórki drobnoustrojów, które w dalszej kolejności są „atakowane” i lizowane przez fagi [20]. Uważa się, że ich zastosowanie i samych bakteriofagów może mieć duże znaczenie w zwalczaniu wielu infekcji, np. przebiegających w mukowiscydozie czy też w niszczeniu biofilmów

na implantach medycznych, m.in. cewnikach urologicznych [14,27]. Wielu badaczy wskazuje na konieczność synergistycznego zastosowania antybiotykoterapii i bakteriofagów. Obserwowano bowiem, że enzymy wirusów modyfikują strukturę macierzy, odsłaniając tym samym receptory dla antybiotyków, znajdujące się na komórkach drobnoustrojów. Wpływa to znacząco na efektywność terapii.

Surfaktanty to czynniki często stosowane w degradacji macierzy biofilmu. Przykładem tego typu związku jest siarczan dodecyłu sodu - SDS, którego skuteczność udowodniono w zwalczaniu biofilmów tworzonych przez liczne gatunki bakterii żyjących w jamie ustnej. Często również badane jest synergistyczne zastosowanie SDS z dyspersyną B, połączenie tych dwóch związków wydaje się bardziej efektywne w eradykacji biofilmu [26].

Innym sposobem walki z biofilmem jest ograniczenie procesu powstawania macierzy. Przykładem tego typu działania jest hamowanie syntezy adhezyn zewnątrzkomórkowych. Białka powierzchniowe Aap i SasG są niezwykle istotne w procesie tworzenia biofilmu przez gronkowce (*S. epidermidis* i *S. aureus*). Do właściwego funkcjonowania wymagają obecności cynku. Udowodniono, że można skutecznie hamować syntezę macierzy zewnątrzkomórkowej tych drobnoustrojów chelatując kationy cynku z otoczenia biofilmu [17,76]. Innym sposobem zapobiegania powstawaniu macierzy jest zastosowanie przeciwpasożytniczego leku - nitazoksanidu, który działając na pasożyty wiąże adhezynę Aap, hamując w ten sposób powstawanie biofilmu metycylinoopornego *S. aureus* [76]. Inny związek - jodowany powidon w stężeniu subinhibicyjnym aktywuje represor (*icaR*)

genów *icaADBC*, odpowiedzialnych za powstawanie PNAG, blokując w ten sposób jego syntezę [44]. Znane są również inne związki hamujące syntezę gronkowcowego egzopolisacharydu PIA, są to pochodne siarkowe zawarte w czosnku - allicyna, a także dithioteritol, cysteina czy β -merkaptobetanol [76].

Opracowanie skutecznych technik zapobiegania powstawaniu macierzy bądź eradykacji już istniejącej struktury może się przyczynić do ograniczenia rozwoju biofilmu, a w związku z tym i infekcji, w których ma istotne znaczenie.

PODSUMOWANIE

Macierz biofilmu to czynnik chorobotwórczości istotny w przebiegu wielu schorzeń człowieka, m.in. w rozwoju *P. aeruginosa* w tkance płucnej, *S. mutans* na powierzchni implantów czy wielogatunkowego biofilmu w przebiegu próchnicy. Egzopolimery umożliwiają utworzenie biofilmu na powierzchni stałej, nadają mu charakterystyczny kształt i stabilizują jego strukturę. Chronią komórki w biofilmie przed substancjami szkodliwymi i czynnikami układu odpornościowego makroorganizmu, a w warunkach ekstremalnych stanowią substrat odżywczy. Wydaje się, że szczegółowe scharakteryzowanie polimerów zewnątrzkomórkowych biofilmu, poznanie zależności między różnymi składnikami, szlaków ich biosyntezy, a także związków hamujących ich powstawanie, pozwoli na opracowanie skutecznych metod zapobiegania powstawaniu macierzy bądź eradykacji już istniejącej struktury. Wdrożenie efektywnych technik walki z infekcjami związanymi z rozwojem biofilmu na powierzchniach biotycznych i abiotycznych to wyzwanie dla mikrobiologii na najbliższe lata.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Absalon C., Ymele-Leki P., Watnick P.I.: The bacterial biofilm matrix as a platform for protein delivery. *MBio.*, 2012; 3: e00127-12
- [2] Aires C.P., Tenuta L.M., Carbonero E.R., Sasaki G.L., Iacomini M., Cury J.A.: Structural characterization of exopolysaccharides from biofilm of a cariogenic streptococci. *Carbohydr. Polym.*, 2011; 84: 1215-1220
- [3] Baranowska A., Rodziewicz A.: Molekularne interakcje w biofilmach bakteryjnych. *Kosmos*, 2008; 57: 29-38
- [4] Begun J., Gaiani J.M., Rohde H., Mack D., Calderwood S.B., Ausubel F.M., Sifri C.D.: Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog.*, 2007; 3: e57
- [5] Boles B.R., Thoendel M., Singh P.K.: Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.*, 2005; 57: 1210-1223
- [6] Borlee B.R., Goldman A.D., Murakami K., Samudrala R., Wozniak D.J., Parsek M.R.: *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol. Microbiol.*, 2010; 75: 827-842
- [7] Bowen W.H., Koo H.: Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.*, 2011; 45: 69-86
- [8] Branda S.S., Vik A., Friedman L., Kolter R.: Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.*, 2005; 13: 20-26
- [9] Chiang W.C., Nilsson M., Jensen P.Ø., Høiby N., Nielsen T.E., Givskov M., Tolker-Nielsen T.: Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013; 57: 2352-2361
- [10] Cuzzi B., Herasimenka Y., Silipo A., Lanzetta R., Liut G., Rizzo R., Cescutti P.: Versatility of the *Burkholderia cepacia* complex for the biosynthesis of exopolysaccharides: a comparative structural investigation. *PLoS One*, 2014; 9: e94372
- [11] Czaczyk K., Myszka K.: Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2007; 16: 799-806
- [12] Extracellular polysaccharides & caries. <http://www.ncl.ac.uk/dental/oralbiol/oralenv/tutorials/polysaccharides/eps.htm> (15.06.2014)
- [13] Fleming H.C., Neu T., Wozniak D.J.: The EPS matrix: the „house of biofilm cells”. *J. Bacteriol.*, 2007; 189: 7945-7947



- [14] Francolini I., Donelli G.: Prevention and control of biofilm-based medical device-related infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2010; 59: 227-238
- [15] Franklin M.J., Nivens D.E., Weadge J.T., Howell P.L.: Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front. Microbiol.*, 2011; 2: 167
- [16] Frederiksen B., Pressler T., Hansen A., Koch C., Høiby N.: Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. *Acta Paediatr.*, 2006; 95: 1070-1074
- [17] Geoghegan J.A., Corrigan R.M., Gruszka D.T., Speziale P., O'Gara J.P., Potts J.R., Foster T.J.: Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 2010; 192: 5663-5673
- [18] Ghafoor A., Hay I.D., Rehm B.H.: The role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77: 5238-5246
- [19] Gjermansen M., Nilsson M., Yang L., Tolker-Nielsen T.: Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Mol. Microbiol.*, 2010; 75: 815-826
- [20] Glonti T., Chanishvili N., Taylor P.W.: Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.*, 2010; 108: 695-702
- [21] Górska S., Grycko P., Rybka J., Gamian A.: Egzopolisacharydy bakterii kwasu mlekowego – biosynteza i struktura. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2007; 61: 805-818
- [22] Guiton P.S., Hung C.S., Kline K.A., Roth R., Kau A.L., Hayes E., Heuser J., Dodson K.W., Caparon M.G., Hultgren S.J.: Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. *Infect. Immun.*, 2009; 77: 3626-3638
- [23] Hayacibara M.F., Koo H., Vacca-Smith A.M., Kopec L.K., Scott-Anne K., Cury J.A., Bowen W.H.: The influence of mutanase and dextranase on the production and structure of glucans synthesized by streptococcal glucosyltransferases. *Carbohydr. Res.*, 2004; 339: 2127-2137
- [24] Huseby M.J., Kruse A.C., Digre J., Kohler P.L., Vocke J.A., Mann E.E., Bayles K.W., Bohach G.A., Schlievert P.M., Ohlendorf D.H., Earhart C.A.: Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 14407-14412
- [25] Izano E.A., Amarante M.A., Kher W.B., Kaplan J.B.: Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008; 74: 470-476
- [26] Izano E.A., Wang H., Ragunath C., Ramasubbu N., Kaplan J.B.: Detachment and killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms by dispersin B and SDS. *J. Dent. Res.*, 2007; 86: 618-622
- [27] Jabbouri S., Sadovskaya I.: Characteristics of the biofilm matrix and its role as a possible target for the detection and eradication of *Staphylococcus epidermidis* associated with medical implant infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2010; 59: 280-291
- [28] Jung J.H., Choi N.Y., Lee S.Y.: Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions. *Food Microbiol.*, 2013; 34:70-80
- [29] Kaplan J.B., LoVetri K., Cardona S.T., Madhyastha S., Sadovskaya I., Jabbouri S., Izano E.A.: Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J. Antibiot.*, 2012; 65: 73-77
- [30] Karatan E., Watnick P.: Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2009; 73: 310-347
- [31] Koo H., Falsetta M.L., Klein M.I.: The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J. Dent. Res.*, 2013; 92: 1065-1073
- [32] Krzyściak W., Jurczak A., Kościelniak D., Bystrowska B., Skalniak A.: The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2014; 33: 499-515
- [33] Lembre P., Lorentz C., di Martino P.: Exopolysaccharides of the biofilm matrix: a complex biophysical world. W: The complex world of polysaccharides, red.: D.N. Karunaratne. InTech, 2012, 371-392
- [34] Li B., Dobruchowska J.M., Hoogenkamp M.A., Gerwig G.J.: Structural investigation of an extracellular polysaccharide produced by the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* strain UA159. *Carbohydr. Polym.*, 2012; 90: 675-682
- [35] Longhi C., Scoarughi G.L., Poggiali F., Cellini A., Carpentieri A., Seganti L., Pucci P., Amoresano A., Cocconcelli P.S., Artini M., Costerton J.W., Selan L.: Protease treatment affects both invasion ability and biofilm formation in *Listeria monocytogenes*. *Microb. Pathog.*, 2008; 45: 45-52
- [36] Lu X., Skurnik D., Pozzi C., Roux D., Cywes-Bentley C., Ritchie J.M., Munera D., Gening M.L., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E., Waldor M.K., Pier G.B.: A poly-N-acetylglucosamine-Shiga toxin broad-spectrum conjugate vaccine for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *MBio*, 2014; 5: e00974-14
- [37] Ma L., Conover M., Lu H., Parsek M.R., Bayles K., Wozniak D.J.: Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.*, 2009; 5: e1000354
- [38] Mack D., Davies A.P., Harris L.G., Jeeves R., Pascoe B., Knobloch J.K., Rohde H., Wilkinson T.S.: *Staphylococcus epidermidis* in biomaterial associated infections. W: Biomaterials associated infection: immunological aspects and antimicrobial strategies, red. T.F. Moriarty, S.A. Zaat, H.J. Busscher, Springer Science + Business Media, New York 2013, 25-56
- [39] Mann E.E., Wozniak D.J.: *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2012; 36: 893-916
- [40] Marvasi M., Visscher P.T., Casillas Martinez L.: Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2010; 313: 1-9
- [41] Messiaen A.S., Nelis H., Coenye T.: Investigating the role of matrix components in protection of *Burkholderia cepacia* complex biofilms against tobramycin. *J. Cyst. Fibros.*, 2014; 13: 56-62
- [42] Moryl M., Kaleta A., Strzelecki K., Różalska S., Różalski A.: Effect of nutrient and stress factors on polysaccharides synthesis in *Proteus mirabilis* biofilm. *Acta Biochim. Pol.*, 2014; 61: 133-139
- [43] Nwodo U.U., Green E., Okoh A.I.: Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *Int. J. Mol. Sci.*, 2012; 13: 14002-14015
- [44] Oduwole K.O., Glynn A.A., Molony D.C., Murray D., Rowe S., Holland L.M., McCormack D.J., O'Gara J.P.: Anti-biofilm activity of sub-inhibitory povidone-iodine concentrations against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Orthop. Res.*, 2010; 28: 1252-1256
- [45] Paes Leme A.F., Bellato C.M., Bedi G., Cury A.A., Koo H., Cury J.A.: Effects of sucrose on the extracellular matrix of plaque-like biofilm formed *in vivo*, studied by proteomic analysis. *Caries Res.*, 2008; 42: 435-443
- [46] Paes Leme A.F., Koo H., Bellato C.M., Bedi G., Cury J.A.: The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. *J. Dent. Res.*, 2006; 85: 878-887
- [47] Pamp S.J., Tolker-Nielsen T.: Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 2007; 189: 2531-2539
- [48] Petry S., Furlan S., Crepeau M.J., Cerning J., Desmazeaud M.: Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000; 66: 3427-3431
- [49] Pleszczyńska M., Wiater A., Szczodrak J.: Mutanase from *Paenibacillus* sp. MP-1 produced inductively by fungal α -1,3-glucan and

its potential for the degradation of mutan and *Streptococcus mutans* biofilm. *Biotechnol. Lett.*, 2010; 32: 1699-1704

[50] Razack S.A., Velayutham V., Thangavelu V.: Influence of various parameters on exopolysaccharide production from *Bacillus subtilis*. *Int. J. Chem. Tech. Res.*, 2013; 5: 2221-2228

[51] Ribeiro C.C., Tabchoury C.P., Del Bel Cury A.A., Tenuta L.M., Rosalen P.L., Cury J.A.: Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br. J. Nutr.*, 2005; 94: 44-50

[52] Roche F.M., Meehan M., Foster T.J.: The *Staphylococcus aureus* surface protein SasG and its homologues promote bacterial adherence to human desquamated nasal epithelial cells. *Microbiology*, 2003; 149: 2759-2767

[53] Różalski A., Kwil I., Torzewska A., Baranowska M., Stączek P.: Bakterie z rodzaju *Proteus* – cechy i czynniki chorobotwórczości. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 204-219

[54] Ryder C., Byrd M., Wozniak D.J.: Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2007; 10: 644-648

[55] Sadovskaya I., Vinogradov E, Li J., Jabbouri S.: Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus epidermidis* RP62A, a reference biofilm-positive strain. *Carbohydr. Res.*, 2004; 339: 1467-1473

[56] Schooling S.R.; Beveridge T.J.: Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.*, 2006; 188: 5945-5957

[57] Seneviratne C.J., Zhang C.F., Samaranyake L.P.: Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin. J. Dent. Res.*, 2011; 14: 87-94

[58] Sharma G., Rao S., Bansal A., Dang S., Gupta S., Gabrani R.: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. *Biologicals*, 2014; 42: 1-7

[59] Stapper A.P., Narasimhan G., Ohman D.E., Barakat J., Hentzer M., Molin S., Kharazmi A., Høiby N., Mathee K.: Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J. Med. Microbiol.*, 2004; 53: 679-690

[60] Starkey M., Gray K., Chang S., Parsek M.: A sticky business: the extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms. W: *Microbial Biofilms*, red. M. Ghannoum, G.A. O'Toole. ASM Press, Washington DC, 2004, 174-192

[61] Steinberger R.E., Holden P.A.: Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005; 71: 5404-5410

[62] Sugimoto S., Iwamoto T., Takada K., Okuda K., Tajima A., Iwase T., Mizunoe Y.: *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J. Bacteriol.*, 2013; 195: 1645-1655

[63] Sutherland I.W.: Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 2001; 147: 3-9

[64] Swartjes J.J., Das T., Sharifi S., Subbiahdoss G., Sharma P.K., Krom

B.P., Busscher H.J., van der Mei H.C.: A functional DNase I coating to prevent adhesion of bacteria and the formation of biofilm. *Adv. Funct. Mater.*, 2013; 23: 2843-2849

[65] Takenaka S., Ohshima H., Ohsumi T., Okiji T.: Current and future strategies for the control of mature oral biofilms – shift from a bacteria – targeting to a matrix – targeting approach. *J. Oral Biosc.*, 2012; 54: 173-179

[66] Thompson R., Creavin A., O'Connell M., O'Connor B., Clarke P.: Optimization of the enzyme-linked lectin assay for enhanced glycoprotein and glycoconjugate analysis. *Anal. Biochem.*, 2011; 413: 114-122

[67] Toyofuku M.; Roschitzki B.; Riedel K.; Eberl L.: Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *J. Proteome Res.*, 2012; 11: 4906-4915

[68] Valle J., Latasa C., Gil C., Toledo-Arana A., Solano C., Penadés J.R., Lasa I.: Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathog.* 2012; 8: e1002843

[69] Vergara-Irigaray M., Maira-Litrán T., Merino N., Pier G.B., Penadés J.R., Lasa I.: Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Microbiology*, 2008; 154: 865-877

[70] Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P.: Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 2009;14: 2535-2554

[71] Walker T.S., Tomlin K.L., Worthen G.S., Poch K.R., Lieber J.G., Saavedra M.T., Fessler M.B., Malcolm K.C., Vasil M.L., Nick J.A.: Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect. Immun.*, 2005; 73: 3693-3701

[72] Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S.: Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 2002; 295: 1487

[73] Wiater A., Szczodrak J., Rogalski J.: Hydrolysis of mutan and prevention of its formation in streptococcal films by fungal α -D-glucanases. *Process Biochem.*, 2004; 39: 1481-1489

[74] Xiao J., Klein M.I., Falsetta M.L., Lu B., Delahunty C.M., Yates J.R. 3rd, Heydorn A., Koo H.: The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog.*, 2012; 8: e1002623

[75] Yakandawala N., Gawande P.V., Lovetri K., Cardona S.T., Romeo T., Nitz M., Madhyastha S.: Characterization of the poly- β -1,6-N-acetylglucosamine polysaccharide component of *Burkholderia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011; 77: 8303-8309

[76] Yang L., Liu Y., Wu H., Song Z., Høiby N., Molin S., Givskov M.: Combating biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2012; 65: 146-157

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.

