



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ

ΑΣΗΜΙΝΑ ΣΑΦΑΡΙΚΑ
ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ
ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ

Δ΄ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΤΤΙΚΟΝ

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Στο μεγαλύτερο μέρος της ιστορίας της μικροβιολογίας οι μικροοργανισμοί θεωρούνταν πλαγκτονικοί, δηλαδή ελεύθερα αιωρούμενα κύτταρα, τα οποία περιγράφονταν με βάση τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης τους σε ειδικά καλλιεργητικά υλικά .Όμως....

- Ο Leeuwenhoek , παρατήρησε για πρώτη φορά με το πρωτόγονο μικροσκόπιο του την ύπαρξη μικροοργανισμών στην οδοντική πλάκα
- Το 1933 ο Henriki παρατήρησε ότι τα βακτήρια δεν αιωρούνται στο νερό αλλά τείνουν να προσκολλώνται σε επιφάνειες μέσα σε αυτό.
- Το 1943 ο Zobell παρατήρησε ότι ο αριθμός των μικροοργανισμών στις επιφάνειες είναι μεγαλύτερος από ότι στο περιβάλλον θαλάσσιο νερό.
- Λεπτομερέστερη μελέτη των βιομεμβρανών έγινε αργότερα με την ανακάλυψη του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου που επέτρεψε πολύ μεγαλύτερες μεγεθύνσεις από ότι το οπτικό.

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

- Το 1969 με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σκέδασης και διέλευσης έγινε φανερή η συμμετοχή περισσότερων ειδών μικροοργανισμών σε βιομεμβράνες σε μονάδα επεξεργασίας αποβλήτων(Jones et al) Οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι το υλικό που περιβάλλει τα κύτταρα στις δομές αυτές ήταν πολυσακχαρίτης.
- Η μελέτη της εξωκυττάριας πολυμερούς ουσίας ή γλυκοκάλυκα από τον Charaklis το 1973 έδειξε την αυξημένη αντοχή των προσκολλημένων βακτηρίων σε απολυμαντικά όπως η χλωρίνη.

ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ-ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Υπολογίζεται ότι το 65% των λοιμώξεων στον άνθρωπο οφείλονται σε μικρόβια που ασκούν τη λοιμογόνο τους δράση μέσω των βιομεμβρανών. Οι κυριότερες λοιμώξεις είναι:

- Η ενδοκαρδίτιδα φυσικών βαλβίδων, η οποία οφείλεται κατά
 - 56% σε στρεπτόκοκκους (*S. viridans*, *Enterococci*, *S. pneumoniae*, *S. bovis*)
 - 25% σε σταφυλοκόκκους, καθώς και σε Gram αρνητικά βακτήρια και μύκητες.

Εξ' αιτίας της ανάπτυξης των βιομεμβρανών στο ενδοθήλιο των βαλβίδων προκαλούνται αλλοιώσεις σε αυτές. Επιπλέον είναι δυνατόν τμήματα της βιομεμβράνης να αποσπαστούν και η λοίμωξη να διασπαρεί στον οργανισμό με ενδεχόμενες σοβαρές επιπλοκές.

ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ-ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

- Η μέση πυώδης ωτίτιδα είναι πλέον μια από τις πιο κοινές παθήσεις της παιδικής ηλικίας, η οποία οφείλεται στο σχηματισμό βιομεμβράνης πάνω στο βλεννογόνο του μέσου ωτός. Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν συνήθως είναι οι ακόλουθοι : *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *P.aeruginosa*, β αιμολυτικοί στρεπτόκοκκοι, εντεροβακτηριακά.
- Η χρόνια βακτηριακή προστατίτιδα ,στην οποία το συχνότερο αίτιο είναι ο σχηματισμός βιομεμβράνης από: *E.coli*, άλλα εντεροβακτηριακά (*Proteus*, *Klebsiella*, *Serratia*), *P.aeruginosa*, *E.faecalis*.

ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ-ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

- Η κυστική νόσος των πνευμόνων, νόσος με υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα, στην οποία η ανάπτυξη βιομεμβρανών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Ο επικρατέστερος αποικιστής στις βιομεμβράνες αυτές είναι η *P.aeruginosa*.
- Η περιοδοντίτιδα
- Οι λοιμώξεις που σχετίζονται με βιοιατρικά υλικά και εμφυτεύματα, όπως προσθετικές βαλβίδες, ενδοφλέβιοι καθετήρες, ουροκαθετήρες, τεχνητές αρθρώσεις.

Location	Organism	Reference
Lungs of patients with Cystic Fibrosis	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Haemophilus influenza</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> complex	Lopes et al. (2015)
Pacemakers	<i>Staphylococci</i> , <i>Streptococci</i>	Greenspon et al. (2008)
Prosthetic heart valves	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococci</i> , Gram-negative bacilli, Diphtheroids, <i>Enterococci</i> and <i>Candida</i> spp.	Donlan (2001)
Wounds (equine)	<i>Staphylococci</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterococci</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Clostridium</i> etc.	Westgate et al. (2011)
Wounds (dog)	<i>Staphylococcus intermedius</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus canis</i>	Swanson et al. (2014)
Contact Lenses	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Klebsiella</i> spp.	El-Ganiny et al. (2017)
Orthopaedic implants	<i>Staphylococci</i> , <i>Pseudomonas</i> genus, <i>Enterococci</i> , <i>Streptococci</i>	Arciola et al. (2015)
Breast implants	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Seng et al. (2015)
Dental	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i>	Huang et al. (2011)

ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ-ΞΕΝΑ ΣΩΜΑΤΑ

Candida albicans

Τεχνητό προσθετικό φωνής
Καθετήρας κεντρικής φλέβας
Ενδομήτριο σπείραμα

Coagulase-negative
staphylococci

Τεχνητή πρόθεση ισχίου
Τεχνητό προσθετικό φωνής
Καθετήρας κεντρικής φλέβας
Ενδομήτριο σπείραμα
Τεχνητή βαλβίδα καρδιάς
Ουροκαθετήρας

Enterococcus spp

Τεχνητή πρόθεση ισχίου
Καθετήρας κεντρικής φλέβας
Ενδομήτριο σπείραμα
Τεχνητή βαλβίδα καρδιάς
Ουροκαθετήρας

Klebsiella pneumoniae

Καθετήρας κεντρικής φλέβας
Ουροκαθετήρας

Pseudomonas aeruginosa

Τεχνητή πρόθεση ισχίου
Καθετήρας κεντρικής φλέβας
Ουροκαθετήρας

Staphylococcus aureus

Τεχνητή πρόθεση ισχίου
Καθετήρας κεντρικής φλέβας
Ενδομήτριο σπείραμα
Τεχνητή βαλβίδα καρδιάς

ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ-ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Τα κύρια συστατικά που συνιστούν μια βιομεμβράνη είναι:

- Τα μικροβιακά κύτταρα
- Το στρώμα του εξωκυττάριου πολυμερούς
- Η επιφάνεια προσκόλλησης

Το 15% του όγκου της μεμβράνης αποτελείται από τα κύτταρα των βακτηρίων και το 85% από γλυκοκάλυκα.

Επειδή ο γλυκοκάλυκας συγκρατεί μεγάλη ποσότητα νερού η επιφάνεια που καλύπτεται από βιομεμβράνη είναι ζελατινώδης και γλιστερή.

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

- Ορισμένα είδη (*S.epidermidis*, *L.pneumophila*, *P.mirabilis*, *S.mutans*, *S.aureus*, *E.coli*, *C.albicans*, *B.cepacia*, *Enterococcus spp*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *C.parapsilosis*, *V.cholerae*) παρουσιάζουν εντονότερη τάση δημιουργίας βιομεμβρανών.
- Παρ'ότι κάποια από αυτά τα είδη περιλαμβάνονται στη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του ανθρώπου (π.χ. *S.epidermidis* και *E.coli* που αποικίζουν φυσιολογικά το δέρμα και το γαστρεντερικό σύστημα αντίστοιχα) σε κατάλληλες συνθήκες σχηματίζουν βιομεμβράνες και αποτελούν αιτία λοιμώξεων (π.χ. κατά τη χρήση ενδοφλέβιων καθετήρων, ουροκαθετήρων). Η *P.aeruginosa* μικροοργανισμός του φυσικού περιβάλλοντος αλλά και ευκαιριακό παθογόνο για ανοσοκατασταλμένους παρουσιάζει υψηλή τάση δημιουργίας βιομεμβράνης και αποτελεί σημαντική αιτία θανάτου σε ασθενείς που πάσχουν από κυστική ίνωση.

ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟ ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ- ΓΛΥΚΟΚΑΛΥΚΑΣ

Το στρώμα του γλυκοκάλυκα αποτελείται από:

- Πολυσακχαρίτες που παράγουν τα ίδια τα βακτήρια (κολανικό το *E.coli*, αλγινικό η *P.aeruginosa*, γλυκοζαμινογλυκάνη ο *S.epidermidis*)
- Εξωγενείς ουσίες που ποικίλουν ανάλογα με το περιβάλλον που αναπτύσσεται η βιομεμβράνη (νουκλεικά οξέα ,πρωτείνες, μέταλλα ,σωματίδια αργίλου)
- Προϊόντα μεταβολισμού των βακτηρίων και νερό σε υψηλό ποσοστό (95-97%)

ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ

- Η επιφάνεια προσκόλλησης μπορεί να είναι έμβια όπως κάποιος ιστός ή κάποιο αδρανές υλικό π.χ. καθετήρες, εμφυτεύματα, φακοί επαφής, δίκτυο νερού.

ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Κατά τη διαδικασία σχηματισμού της βιομεμβράνης διακρίθηκαν τα ακόλουθα πέντε στάδια όπως μελετήθηκαν και περιγράφηκαν κατά τη διαδικασία αυτοματοποιημένης χορήγησης νερού σε πειραματόζωα

1. Σχηματισμός ρυθμιστικού υμενίου-στρώματος

Τη στιγμή που ένας καθαρός σωλήνας γεμίζει με νερό αρχίζει ο σχηματισμός της βιομεμβράνης. Τα πρώτα συστατικά που συνδέονται με την επιφάνεια δεν είναι τα βακτήρια αλλά ίχνη οργανικών ουσιών που συνδέονται με την επιφάνεια. Το στρώμα αυτό αναφέρεται ως «conditioning film» ή «conditioning layer» και εξουδετερώνει το υπερβολικό φορτίο και την ελεύθερη ενέργεια της επιφάνειας, τα οποία μπορεί να εμποδίσουν ένα βακτηριακό κύτταρο να την προσεγγίσει αρκετά, ώστε να αρχίσει η διαδικασία της προσκόλλησης. Επιπλέον τα οργανικά αυτά μόρια αποτελούν και πηγή θρεπτικών στοιχείων για τους μικροοργανισμούς.

Η φύση του ρυθμιστικού υμενίου μπορεί να είναι τελείως διαφορετική σε επιφάνειες του ανθρώπου-ξενιστή. Το ρυθμιστικό υμένιο που σχηματίζεται στην επιφάνεια των δοντιών φαίνεται ότι αποτελείται από λευκωματίνη, λυσοζύμη, γλυκοπρωτείνες, φωσφολιπίδια

ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

2. Προσκόλληση των πρωταρχικών κυττάρων

Καθώς το νερό κυλά στο σωλήνα τα βακτηριακά κύτταρα που κινούνται ελεύθερα(πλαγκτονικά) αρχίζουν να πλησιάζουν την επιφάνεια και εισέρχονται στο βασικό υδροδυναμικό στρώμα. Η προσέγγιση γίνεται είτε τυχαία με τη ροή του υγρού είτε με την επίδραση χημειοτακτικών παραγόντων στα κινητά βακτήρια. Το ερέθισμα εδώ αποτελεί η διαβάθμιση της συγκεντρωσης θρεπτικών συστατικών, που έχει ως αποτέλεσμα την κίνηση του βακτηρίου προς τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις(χημειοταξία)

Όταν η απόσταση από την επιφάνεια γίνει μικρότερη από 1nm, αναπτύσσονται μεταξύ αυτής και του βακτηρίου ελκτικές και απωστικές δυνάμεις όπως υδρόφοβες, ηλεκτροστατικές, δυνάμεις Van der Waals. Οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις είναι συνήθως απωθητικές γιατί τα περισσότερα βακτήρια όπως και τα αδρανή υλικά είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένα. Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται ως αντιστρεπτή προσκόλληση . Η σύνδεση σταθεροποιείται με την παραγωγή πολυσακχαριτών που αλληλεπιδρούν με μόρια της επιφάνειας και ειδικά σημεία του κυτταρικού τοιχώματος

ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

3.Σχηματισμός της εξωκυττάριας πολυμερούς ουσίας

Τα βακτήρια μετά από την προσκόλληση αρχίζουν και εκκρίνουν ένα κολλώδες πολυμερές, που συγκρατεί τη βιομεμβράνη και τη στερεώνει στην επιφάνεια. Επιπλέον το πλέγμα αυτό του πολυμερούς παρέχει προστασία στα βακτήρια από τα βιοκτόνα αλλά και συγκρατεί θρεπτικά στοιχεία από το περιβάλλον υγρό.

Καθώς η συγκέντρωση των θρεπτικών αυξάνεται τα πρωταρχικά μητρικά κύτταρα αρχίζουν να αναπαράγονται. Τα θυγατρικά κύτταρα παράγουν το δικό τους εξωκυτταρικό πολυμερές αυξάνοντας έτσι το συνολικό όγκο του γλυκοκάλυκα.

ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

4. Δευτερογενείς αποικιστές.

Όπως γίνεται η παγίδευση θρεπτικών συστατικών από το γλυκοκάλυκα κατά ανάλογο τρόπο παγιδεύονται με φυσική συγκράτηση και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και άλλοι τύποι βακτηριακών κυττάρων. Αυτοί οι δευτερογενείς αποικιστές μεταβολίζουν κάποια από τα απόβλητα των πρωτογενών αποικιστών, ενώ τα δικά τους απόβλητα θα χρησιμοποιηθούν από άλλα βακτήρια αντίστοιχα.

ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

5.Ωριμη βιομεμβράνη. Λειτουργεί όπως ένας ζωντανός οργανισμός. Είναι μια πολύπλοκη κοινότητα φτιαγμένη από διαφορετικά είδη, όπου το καθένα είναι προσαρμοσμένο στο μικροπεριβάλλον του, συνεργάζονται όμως προκειμένου να μεταβολίσουν τα διάφορα θρεπτικά συστατικά. Τα διάφορα ένζυμα που διαθέτει κάθε είδος συμβάλλουν στην αποικοδόμηση στοιχείων που το καθένα μόνο του δεν θα μπορούσε να κάνει. Ένα δίκτυο καναλιών-σηράγγων διευκολύνει τη μεταφορά νερού, ενζύμων, θρεπτικών ουσιών, αποβλήτων και οξυγόνου σε όλη την έκταση της βιομεμβράνης. Αυτό γίνεται δυνατό λόγω της διαβάθμισης συγκέντρωσης χημικών ουσιών και ιόντων ανάμεσα στις μικροζώνες, η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη και τη συνύπαρξη ετερογενών πληθυσμών μικροοργανισμών

Για να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη μιας ώριμης βιομεμβράνης απαιτούνται από λίγες ώρες ως μερικές εβδομάδες ανάλογα με τις εκάστοτε υπάρχουσες συνθήκες.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΜΕΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Οι μικροοργανισμοί στην προσκολλημένη τους μορφή παρουσιάζουν κάποιες ιδιότητες -πλεονεκτήματα που αφορούν στην

- Αλλαγή φαινοτύπου-ρύθμιση γονιδίων
- Οριζόντια μεταφορά γονιδίων
- Κυτταρο-κυτταρική επικοινωνία

ΑΛΛΑΓΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ-ΡΥΘΜΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Μετά από την επιτυχημένη προσκόλληση αρχίζει να διαφαίνεται κάποια αλλαγή στο φαινότυπο του μικροβίου που οφείλεται στην ενεργοποίηση κάποιων γονιδίων και στην απενεργοποίηση κάποιων άλλων. Παρατηρείται δηλαδή αλλαγή ορισμένων μεταβολικών δραστηριοτήτων του μικροοργανισμού όπως π.χ. ο ρυθμός ανάπτυξης, η αναπνοή, η πρόσληψη οξυγόνου, η μεταφορά ηλεκτρονίων.

Για να σχηματιστεί επομένως βιομεμβράνη δεν αρκεί απλή συνάθροιση κυττάρων όπως συμβαίνει σε καλλιέργειες βακτηρίων σε στερεά θρεπτικά υλικά αλλά θα πρέπει οι μικροοργανισμοί να εκφράσουν το φαινότυπο που αντιστοιχεί στην προσκολλημένη μορφή τους.

ΟΡΙΖΟΝΤΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

- Η βιομεμβράνη αποτελεί ιδανική θέση ανταλλαγής πλασμιδιακού DNA για τα προσκολλημένα μικροβιακά κύτταρα
- Βακτήρια που διαθέτουν κάποια συζευκτικά πλασμίδια φαίνεται να αναπτύσσουν ευκολότερα βιομεμβράνες από ανάλογα στελέχη που δεν τα έχουν. Γονίδια των πλασμιδίων αυτών εκφράζουν παράγοντες που ωθούν τα πλαγκτονικά βακτήρια να σχηματίσουν ή να ενσωματωθούν σε βιομεμβράνες. Ο πιθανός λόγος για την προαγωγή της σύζευξης είναι ότι το περιβάλλον της βιομεμβράνης παρέχει συνοχή και στενή επαφή κυττάρου με κύτταρο.
- Οι μικροοργανισμοί διαθέτουν μηχανισμούς που τους οδηγούν να δημιουργούν ή να ανευρίσκουν τις συνθήκες εκείνες, οι οποίες ευνοούν τη διασπορά των γονιδίων που αφορούν σε χαρακτηριστικά σχετιζόμενα με τη διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό τους, όπως είναι η αυξημένη μολυσματικότητα ή η αύξηση της αντοχής τους στα αντιβιοτικά. Τέτοια γονίδια μπορεί να βρίσκονται στα πλασμίδια, οπότε μέσα από τη δομή της βιομεμβράνης παρέχεται ο μηχανισμός και οι συνθήκες που θα βοηθήσουν στην επιλογή, την προαγωγή και τη διασπορά των ουσιωδών αυτών χαρακτηριστικών.

ΚΥΤΤΑΡΟ-ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ

- Η συγκέντρωση μικροοργανισμών του ίδιου είδους ή και διαφορετικών ειδών οδηγεί σε σχηματισμό βιομεμβράνης μέσα από μηχανισμούς χημικών σημάτων.
- Τα σήματα αυτά συγκεντρώνονται τοπικά έξω από το κύτταρο και όταν η συγκέντρωσή τους φτάσει σε ένα οριακό σημείο, τότε γίνεται αντιληπτό από τα κύτταρα ότι ο πληθυσμός έχει φτάσει σε μια ελάχιστη πυκνότητα –a quorum- και αρχίζει η διαδικασία τροποποίησης της έκφρασης των γονιδίων
- Αυτός ο μηχανισμός χημικής επικοινωνίας που αφορά στην πυκνότητα του πληθυσμού χαρακτηρίζεται ως κυτταρο-κυτταρική επικοινωνία (quorum sensing)
- Στις δυο κατηγορίες μικροοργανισμών, Gram(+)(-), το σύστημα αυτό περιλαμβάνει την ανίχνευση μορίων-σημάτων που καλούνται αυτοεπαγωγείς

ΑΙΤΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

- Η προσκόλληση των μικροοργανισμών στις επιφάνειες και η επακόλουθη ανάπτυξη τους σε δομή βιομεμβράνης μπορεί να θεωρηθεί ως ένας μηχανισμός επιβίωσης.
- Οι κύριες αιτίες για τη συμπεριφορά αυτή είναι η εύρεση τροφής και η προστασία από τα βιοκτόνα

ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ-ΕΥΡΕΣΗ ΤΡΟΦΗΣ

Τα βακτήρια έχουν τον τρόπο να ανευρίσκουν τις επιφάνειες και να εκμεταλλεύονται ακόμα και τις ελάχιστες πηγές θρεπτικών στοιχείων. Τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν είναι τα ακόλουθα:

- Συγκέντρωση των οργανικών στοιχείων στην επιφάνεια
- Συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών του περιβάλλοντος υγρού από το εξωκυτταρικό πολυμερές
- Αξιοποίηση των αποβλήτων των βακτηρίων από τους δευτερογενείς αποικιστές.
- Η σύνθεση διαφορετικών ενζύμων από τα διάφορα είδη αυξάνει τη δυνατότητα διάσπασης ουσιών, που ενδεχόμενα το κάθε βακτήριο από μόνο του δεν θα μπορούσε να κάνει.

ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ-ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ

Αντοχή στα αντιβιοτικά-άμυνα του ξενιστή

Η αντιμετώπιση των λοιμώξεων που προκαλούνται από τη δημιουργία βιομεμβρανών είναι εξαιρετικά δύσκολη με τη χρήση αντιβιοτικών. Οι μηχανισμοί του φαινομένου της αύξησης αντοχής μπορεί να εξηγηθούν με τις παρακάτω διαδικασίες.

- Καθυστερημένη ή αδύνατη διείσδυση του αντιβιοτικού μέσα από το στρώμα του εξωκυτταρικού πολυμερούς, είτε με το σχηματισμό συμπλεγμάτων και την επακόλουθη αδρανοποίηση τους, είτε με την παραγωγή ενζύμων που τα υδρολύουν.
- Διαμόρφωση μικροπεριβάλλοντος στο εσωτερικό της βιομεμβράνης (π.χ. μείωση του ΡΗ και της ΡΟ₂, δεν επιτρέπει σε πολλά αντιβιοτικά όπως οι αμινογλυκοσίδες να ασκήσουν αντιμικροβιακή δράση.
- Αλλαγές στην σύσταση των πρωτεϊνών του κυτταρικού τοιχώματος, κατά την μετάπτωση τους στην προσκολλημένη μορφή με αποτέλεσμα κάποιοι από τους στόχους των αντιβιοτικών να μην υπάρχουν πια.

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

- Η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή στις βιομεμβράνες είναι πολύπλοκη και συχνά αντιφατική. Οι βιομεμβράνες μπορούν και να καταστείλουν αλλά και να υπερδιεγείρουν το ανοσολογικό σύστημα και είναι πιθανό ότι αυτή η διαφοροποιημένη απάντηση εξαρτάται από σημαντικούς παράγοντες που περιλαμβάνουν την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή , την ανατομική θέση της βιομεμβράνης , τα είδη που συνθέτουν την βιομεμβράνη και τα ειδικά για τη σύνδεση με το αντιγόνο κύτταρα του ανοσοποιητικού.

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ

ΣΥΝΟΨΙΖΟΝΤΑΣ

- Οι αμυντικοί μηχανισμοί του ξενιστή όπως η φαγοκυττάρωση και η έκλυση ανοσοσφαιρινών αποδεικνύονται όχι μόνο ανεπαρκείς για την αντιμετώπιση της λοίμωξης αλλά και επιβλαβείς για τον ασθενή αφού δεν μπορούν να προσεγγίσουν τα βακτηριακά κύτταρα στο εσωτερικό των βιομεμβρανών.
- Επιπλέον ακόμα κι αν επιτευχθεί σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος η οψωνινική δράση των αντισωμάτων δεν μπορεί να ασκηθεί ενώ το συμπλήρωμα αδρανοποιείται από τον εξωκυττάριο πολυσακχαρίτη. Τα μακροφάγα που συγκεντρώνονται αδυνατούν να φαγοκυτταρώσουν τα βακτήρια που προστατεύονται στο εσωτερικό της βιομεμβράνης και ταυτόχρονα εκλύοντας τα ένζυμα τους κινητοποιούν μικρόβια που βρίσκονται στην επιφάνεια της βιομεμβράνης με αποτέλεσμα τη διασπορά της λοίμωξης. Φλεγμονώδεις ουσίες που εκλύονται ταυτόχρονα προκαλούν βλάβες στους γύρω ιστούς.

BIOMEMBRANES-ANTIBIOTIKA

1. Επίτευξη υψηλής συγκέντρωσης αντιβιοτικών μέσω τοπικής χορήγησης

- Η τοπική χορήγηση εξασφαλίζει υψηλές συγκεντρώσεις στο σημείο της λοίμωξης απευθερώνοντας αντιβιοτικά απευθείας στο σημείο της λοίμωξης με χαμηλότερες ή ακόμα και μη ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις στον ορό και αποφεύγοντας συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες.
- Τα αντιβιοτικά σε μορφή νεφελοποιητή είναι η θεραπεία εκλογής στην κατασταλτική ή θεραπεία συντήρησης στην κυστική ίνωση επί απουσίας παρόξυνσης. Η χορήγηση των αντιβιοτικών με μορφή εισπνοής βελτίωσε τα συμπτώματα από τους πνεύμονες μειώνοντας αποτελεσματικά το βακτηριακό φορτίο στα πτύελα και ήταν καλά ανεκτή

Summary of current topical antibiotic treatment regimens according to the site of biofilm infection

Biofilm site of infection	Antibiotic regimen	Duration	Route of administration	References
Lung infection in CF	0.5–2 MU colistin, twice daily 300 mg tobramycin, twice daily	Continuous 28 days on/off cycles	Inhalation Inhalation	(86–91)
	112 mg tobramycin dry powder, twice daily 75 mg aztreonam, three times daily	On/off cycles 28 days on/off cycles	Inhalation Inhalation	
	32.5 mg or 65 mg ciprofloxacin, once daily 240 mg levofloxacin, twice daily	28 days 28 days on/off cycles	Inhalation Inhalation	
Lung infection in non-CF bronchiectasis	1 MU colistin, twice daily 300 mg tobramycin, twice daily	Continuous 28 days	Inhalation Inhalation	(92–96)
	32.5 mg ciprofloxacin, twice daily 80 mg gentamicin, twice daily	28 days Continuous	Inhalation Inhalation	
Rhinosinusitis	3 drops ofloxacin 0.3%, three times daily	28 days	Nasal drops	(97)
Wounds	125 mg mupirocin + saline, twice daily	–	Rinonasal rinses	(98)
	Mupirocin 2% ointment	–	Cutaneous	(99)
Endotracheal tubes	Metronidazole 0.8% gel	–	Cutaneous	(100)
	Silver sulfadiazine 1% cream	7 days	Cutaneous	(101)
Catheters	120 mg vancomycin HCL + 2 mL saline, three times daily	14 days	Inhalation	(78, 103–109)
	80 mg gentamicin + 2 mL saline, three times daily	14 days	Inhalation	
	3 mg/mL minocycline + 30 mg/mL EDTA	12–24 h	Catheter lumen	
	2 mg/mL linezolid + 2000 U/mL heparin	12–24 h	Catheter lumen	
	2.5 mg/mL vancomycin + 2500 or 5000 U/mL heparin	12–24 h	Catheter lumen	
	5 mg/mL cefazoline + 2500 or 5000 U/mL heparin	12–24 h	Catheter lumen	
	10 mg/mL cotrimoxazole + 2500 U/mL heparin	12–24 h	Catheter lumen	
	50 mg/mL daptomycin	24 h	Catheter lumen	
	10 mg/mL tigecycline	24 h	Catheter lumen	
	10 mg/mL rifampicin	24 h	Catheter lumen	
0.5 mg/mL ceftazidime	12–24 h	Catheter lumen		
0.2 mg/mL ciprofloxacin + 5000 U/mL heparin	12–24 h	Catheter lumen		
1 mg/mL gentamicin + 2500 U/mL heparin	12–24 h	Catheter lumen		
2 mg/mL liposomal amphotericin B	8–12 h	Catheter lumen		
Orthopedic procedures	Minocycline-rifampin	–	Coating	(110–113)
	1 g tobramycin + 12 or 24 MU colistin + 40 g polymethylmethacrylate	–	Intraoperative (beads)	
	40 mg/mL tobramycin + 1 g vancomycin + 10 mL packet of calcium sulfate	–	Intraoperative (beads)	
	2 mg/mL gentamicin aqueous solution	–	Intraoperative (injection)	

ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ-ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

2.Συνδυασμένη αντιμικροβιακή θεραπεία

Οι βιομεμβράνες είναι κοινότητες μικροβίων, οι οποίες παρουσιάζουν όχι μόνο διαφορετικές δομικές περιοχές, αλλά επίσης διαφορετικές μεταβολικές φάσεις.Συνδυάζοντας κάποια αντιβιοτικά(όπως σιπροφλοξασίνη, τομπραμυκίνη ή β-λακτάμες) που επιτίθενται σε μεταβολικά ενεργά στρώματα , με άλλα όπως η κολιστίνη που κατά προτίμηση θανατώνουν τα κύτταρα της βιομεμβράνης με χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα παρέχεται μια λογική προσέγγιση για την καθιέρωση της θεραπείας με συνδυασμούς αντιβιοτικών.

ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ-ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

2.Συνδυασμένη αντιμικροβιακή θεραπεία

- Έχει βρεθεί ότι η συνδυασμένη θεραπεία με κλαριθρομυκίνη και δαπτομυκίνη είναι χρήσιμη στην εκρίζωση των σταφυλοκοκκικών βιομεμβρανών που σχηματίζονται σε ορθοπαιδικές συσκευές.(Fujimura S et al, J Infect Chemother 2015;21:756–9)

ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ-ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

3.Ενισχυτικά της αντιμικροβιακής δράσης

- Η *in vivo* αντοχή των βιομεμβρανών στα αντιβιοτικά οφείλεται εν μέρει στη χαμηλή τάση οξυγόνου στο σημείο της λοίμωξης, το οποίο βλάπτει την αποτελεσματικότητα των εξαρτώμενων από την μερική τάση οξυγόνου βακτηριοκτόνων αντιβιοτικών και μειώνει τον μεταβολισμό του μικροβίου.

Η φθοριοκινολόνη σιπροφλοξασίνη, είναι ένα αντιβιοτικό η δραστηριότητα του οποίου επηρεάζεται από την χαμηλή τάση του οξυγόνου στη βιομεμβράνη(Kragh KN et al. *Infect Immun* 2014;82:4477–86)

- Η θεραπεία με υπερβαρικό οξυγόνο (HBOT) (100%, 2.8 bar) ενισχύει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με αντιβιοτικά στην πλαγκτονική *P. aeruginosa*. Έχει επίσης αποδειχτεί ότι έχει δράση στην *P. aeruginosa* που έχει αναπτυχθεί στη βιομεμβράνη και που έχει θεραπευτεί με φθοριοκινολόνες. Αν και απαιτείται βελτιστοποίηση της θεραπείας με υπερβαρικό οξυγόνο πριν προχωρήσουν οι κλινικές μελέτες, η κλινική σημασία αυτού του ευρήματος μπορεί να εφαρμοστεί σε σημαντικές λοιμώξεις που σχετίζονται με βιομεμβράνες όπως λοιμώξεις τραυμάτων, οστών, χοληφόρων, οι οποίες σχετίζονται αποδεδειγμένα με μικροαεροφίλες ή αναερόβιες συνθήκες υποδεικνύοντας ότι η HBOT έχει τη δυνατότητα να βελτιώνει την έκβαση της θεραπείας με αντιβιοτικά αυτών των τύπων λοιμώξεων. (Cimsit M et al. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7:1015–26)

Συμπερασματικά η θεραπεία με υπερβαρικό οξυγόνο (HBOT) μπορεί να θεωρηθεί ως ενισχυτική της δράσης των βακτηριοκτόνων αντιβιοτικών και των κυττάρων του ανοσοποιητικού.

ΒΙΟΜΕΜΒΡΑΝΕΣ-ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

3 Ενισχυτικά της αντιμικροβιακής δράσης

Μελέτες σε βιομεμβράνες από *P.aeruginosa* που αναπτύσσονται σε θάλαμους ροής έχουν αποδείξει ότι τα αντιβιοτικά τομπραμυκίνη, σιπροφλοξασίνη και τετρακυκλίνη σκοτώνουν κατά προτίμηση τα μεταβολικώς ενεργά μικρόβια που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της βιομεμβράνης, ενώ τα μη αναπτυσσόμενα μικρόβια στο εσωτερικό της βιομεμβράνης επιβιώνουν από τη θεραπεία με αυτά τα αντιβιοτικά. Παρ'όλα αυτά κάποια αντιμικροβιακά όπως η κολιστίνη, το EDTA, η χλωρεξιδίνη σκοτώνουν κατά προτίμηση τα μη αναπτυσσόμενα βακτήρια στο εσωτερικό της βιομεμβράνης. Αντιθέτως η κολιστίνη, το EDTA και η χλωρεξιδίνη δεν σκοτώνουν τα ενεργώς μεταβολικά βακτήρια της βιομεμβράνης, καθώς είναι ικανά να προκαλέσουν την έκφραση αμυντικών μηχανισμών όπως αντλίες εκροής και *pmr* γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν τα ένζυμα, τα οποία προσθέτουν αμινο αραβινόση στο LPS και ως εκ τούτου προλαμβάνει τη σύνδεση των αντιμικροβιακών στην επιφάνεια των βακτηρίων.

Table 3. Mechanisms followed by different Anti-biofilm molecules.

S. N.	Mechanism of action	Molecules associated
1.	Inhibition of AHL-mediated quorum sensing pathway	Halogenated furanone compounds, Quercetin
2.	Inhibition of (p)ppGpp regulated stringent response	Peptide-1018, Peptide-1038
3.	Dispersion of Extracellular Polymeric Substance (EPS) of biofilm	Deoxyribonuclease I and glycoside hydrolase dispersin B
4.	Cleavage of peptidoglycan	Tannic acid, Endolysins (PlyC), Epigallocatechin gallate (EGCG)
5.	Biofilm disassembly	A cyclic autoinducing peptide (AIP), Nuclease, extracellular proteases (eg. <i>sarA</i> , <i>sigB</i> , <i>Esp</i>), antiamyloid molecules (AA-861, parthenolides), Tyrosine, Ethyl-pyruvate
6.	Neutralization/disaggregation of LPS	Polymyxin (B and E), Gramicidin S, Sushi peptides, PMAP-23
7.	Alteration of membrane permeabilization	Lantibiotics (nisin, gallidermin), Lytic peptides (PTP-7), Sophorolipids, Polyhexamethylene biguanide, Chlorhexidine, Pentasilver hexaoxoid
8.	Inhibition of cell division or cell survival	Pyrrhocoricin, Microcin B17
9.	Inhibition of macromolecule synthesis and adhesion of cells	Buforin II, PR-39, Indolicidin, LL-37, Bacteriocins, Cadexomer iodine, Mannosides, Pilicides
10.	Inhibition of biofilm by polysaccharides	EPS273, Psl and Pel, K2, PAM galactan, A101, PslG, Polysaccharides of algae, plants and animals
11.	Inhibition of c-di-GMP signaling system	LP 3134, LP 3145, LP 4010, LP 1062, ebselen, ebselen oxide Desformylfluorobromine
12.	Inhibition of curli biosynthesis	Analogues of FN075 and BibC6 of ring-fused 2-pyridones

ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

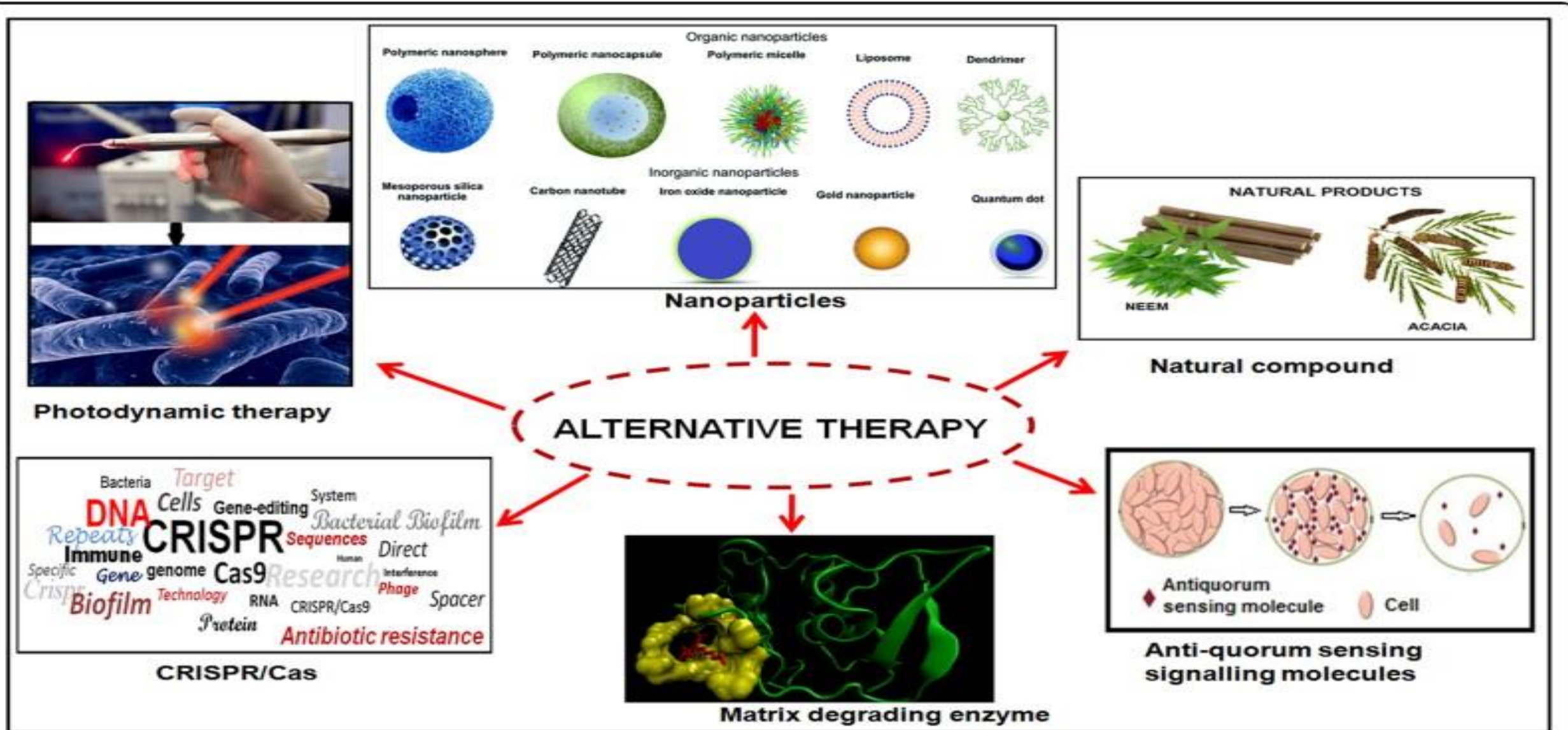


Fig. 2 Diagrammatic representation of the alternative approaches against antibiotic resistant biofilms communities

ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

- Η δημιουργία βιομεμβρανών ελέγχεται από τα γονίδια σηματοδότησης quorum sensing (QS) και τα προϊόντα τους. Διάφοροι αναστολείς/παράγωγα είναι ικανοί να διαταράξουν τον καταρράκτη σηματοδότησης QS και χρησιμοποιούνται ως εναλλακτική θεραπεία για τις λοιμώξεις που σχετίζονται με βιομεμβράνες. Η αλογονωμένη φουρανόνη (Halogenated furanone) που απομονώθηκε από *Delisea pulchra* (θαλάσσια φύκη) διακόπτουν την QS σηματοδότηση στα βακτήρια. Μια ακυλική διαμίνη (ADM 3), έδειξε καλύτερη αντιμικροβιακή και έναντι βιομεμβρανών δράση. Η εξασθένιση της βακτηριακής QS σηματοδότησης με το εκχύλισμα ginseng, εκχύλισμα σκόρδου, και την αζιθρομυκίνη έχει ανασταλτική δράση έναντι μικροβιακών και μυκητιασικών βιομεμβρανών. Το μόριο σηματοδότησης μονοξειδίου του αζώτου (NO) διασκορπίζει τις βιομεμβράνες στην *P. aeruginosa* και ενισχύει τη δραστηριότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων μέσω των c-di-GMP-degrading phosphodiesterases, που προκαλούν μετάπτωση στην πλαγκτονική μορφή ανάπτυξης.

ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

- Φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) χρησιμοποιείται για διάφορους τύπους λοιμώξεων, από βακτήρια, μύκητες, ιούς, πρωτόζωα ακόμα και παράσιτα. Η PDT έχει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών θεραπειών χάρη στην ικανότητα της να συνδέεται εκλεκτικά με τις μεμβράνες των παθογόνων κυττάρων και της ικανότητας για ακριβή παράδοση του φωτός στον επηρεασμένο ιστό για τη μέγιστη καταστροφή των μικροβίων καθώς επίσης και την ελάχιστη καταστροφή του ξενιστή. Έχει αποδειχτεί ότι η PDT θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ώστε να ελαττωθούν τα σχετιζόμενα με τις βιομεμβράνες ζητήματα στις λοιμώξεις από *S.mutans* (Lama et al., 2016; 2017; 2018)

ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Τα νανομόρια θεωρούνται μια εναλλακτική των αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση της πολυμικροβιακής αντοχής και τις λοιμώξεις που οφείλονται σε βιομεμβράνες. Οι περιορισμοί των συμβατικών αντιβιοτικών θεραπειών (μειωμένη διείσδυση και η συγκράτηση στο κύτταρο ή τη βιομεμβράνη) μπορεί να ξεπεραστεί με τους νανο- σχηματισμούς τους, που έχουν την ικανότητα να διαπερνούν τους βιολογικούς φραγμούς. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τύποι νανομορίων, μεταλλικά νανομόρια, οργανικά νανομόρια, πράσινα νανομόρια και οι συνδυασμοί αυτών (Kulshrestha et al). Έχει αναφερθεί η κατασταλτική δράση του CaF₂-NPs σε γονίδια που σχετίζονται με σημαντικούς λοιμογόνους παράγοντες (vicR, gtfC, ftf, spaP, comDE) του *S. mutans* και ως αποτέλεσμα η καταστολή της ενζυμικής δραστηριότητας που σχετίζεται με την σύνθεση της γλυκάνης, την προσκόλληση των κυττάρων, την παραγωγή οξέος, την αντοχή στα οξέα και το quorum sensing που οδηγεί στην αναστολή της βιομεμβράνης

ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

- Η εξωκυττάρια πολυσακχαριδική ουσία της βιομεμβράνης προστατεύει τους μικροοργανισμούς από διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Η αποδιοργάνωση της εξωκυττάριας πολυσακχαριδικής ουσίας θα εκθέσει τα απελευθερωμένα καθώς και τα κύτταρα που παραμένουν στη βιομεμβράνη σε αυτούς τους παράγοντες. Υπάρχουν συγκεκριμένα ένζυμα όπως η πολυσακχαριδάση και η DNαση που είναι ικανές να διασπάσουν τους εξω-πολυσακχαρίτες. Παρομοίως η DNαση και η Dispersin B είναι τα κύρια ένζυμα που λειτουργούν ως δυνητικοί παράγοντες έναντι βιομεμβρανών.