

Biofilm tworzony przez grzyby – struktura, *quorum sensing*, zmiany morfogenetyczne, oporność na leki¹

Biofilm caused by fungi – structure, *quorum sensing*, morphogenetic changes, resistance to drugs

Magdalena Nowak¹, Piotr Kurnatowski^{1,2}

¹Katedra Biologii i Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Plac J. Hallera 1, 90-647 Łódź

²Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Żołnierska 14 c, 10-561 Olsztyn

Adres do korespondencji: Magdalena Nowak, Katedra Biologii i Genetyki Medycznej, UM, Plac. Hallera 1, 90-647 Łódź

ABSTRACT. Formation of fungal biofilms in patients with implanted biomedical prosthesis constitutes very serious clinical problems. The biofilm can lead to dysfunction of implanted material and can be a reservoir for chronic and systemic infections. Numerous investigations demonstrated differences in quantity and structure of biofilms that had been formed by various species of fungi belonged to *Candida* genus. Stages of biofilm formations had been examined carefully in *in vitro* conditions. Biofilm formation begin with adhesion of fungi to the surface, microcolonies are formed subsequently. At the end of the process, extracellular material is excreted, and its formula, that is various in different fungi *Candida* species, contribute to its resistance to antifungal drugs. Farnesol and tyrosol are two *quorum-sensing* molecules. They are acting inversely, regulating formation of „germ tubes” and influencing morphogenetic conversion between yeast and filamentous forms, which plays a very important role in pathogenicity and formation of biofilm. Drug resistance of fungi from *Candida* has been shown to create a very important clinical problem. Many experiments *in vitro* confirm significantly lower activity of antifungal drugs toward *Candida* biofilm than toward *Candida*, in the form of planctonic cells. Surprisingly, some non-steroidal anti-inflammatory drugs can inhibit biofilm formation.

Key words: biofilm, fungi, structure, *quorum sensing*, morphogenetic changes, resistance to drugs

Wstęp

Wiele mikroorganizmów w ich naturalnym siedlisku przylega do określonej powierzchni tworząc tzw. biofilm. Ma on ogromne znaczenie, ponieważ oszacowano, że znaczny odsetek infekcji wywołanych przez drobnoustroje u ludzi związanych jest z jego tworzeniem się, zwłaszcza na biomedycznych implantach, takich jak: sztuczna zastawka serca, cewnik moczowy, silikonowe implanty piersiowe, protezy stawów czy protezy głosowe [1–5].

Grzybem tworzącym biofilm jest m.in. *Candida albicans*, który jest także najczęstszym czynnikiem

etiologicznym kandydoz narządowych i uogólnionych u ludzi. W ostatnich latach zaobserwowano także rosnący (niemal dwukrotnie większy) udział gatunków innych niż *Candida albicans*, takich jak: *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* czy *C. tropicalis* [6]. Przyczyną tego zjawiska może być szeroko rozpowszechnione stosowanie leków przeciwgrzybiczych z grupy azoli, co w konsekwencji prowadzi do powstania szczepów opornych i sprawia, że śmiertelność pacjentów z kandydemią dochodzi nawet do 40%, a w przypadku grzybic narządowych do 90%! [7].

Istnieje szereg czynników sprzyjających rozwo-

¹ Finansowane z działalności statutowej UM: 503-1013-1

jowi grzybicy. Należą do nich niedobory immunologiczne pierwotne (uwarunkowane genetycznie) oraz wtórne (nabyte). Grzybicom sprzyjają: głód i niedobory pokarmowe, choroby nowotworowe i autoimmunologiczne, zaburzenia przemiany materii i gruczołów dokrewnych, zespół AIDS, terapia środkami immunosupresyjnymi, cytotoksycznymi oraz lekami antykoncepcyjnymi, a także leczenie chirurgiczne, takie jak: transplantacje, hemodializa, cewnikowanie, wszczepianie tkanek i protez [8].

Biofilm i jego struktura

Różnice w budowie biofilmów utworzonych przez różne gatunki grzybów z rodzaju *Candida*

Na podstawie oznaczeń suchej masy, badań kolorymetrycznych oraz analiz radioizotopowych wykazano różnice w budowie biofilmów utworzonych przez różne gatunki grzybów z rodzaju *Candida*. Szczepy *C. parapsilosis*, *C. kefyr* oraz *C. glabrata* produkują słabszy biofilm w porównaniu do *C. albicans* [1]. Z drugiej strony zaobserwowano, że gatunki inne niż *Candida albicans*, szczególnie *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* mogą wytwarzać znaczną masę biofilmu, jeśli były uprzednio hodowane na podłożu zawierającym 8% glukozę. Zjawisko to stwarza ryzyko wystąpienia kandydemii u pacjentów żywionych pozajelitowo, ponieważ stężenie glukozy w podawanych roztworach jest zazwyczaj wysokie [9].

Kuhn i wsp. [2] oceniali biofilmy różnych gatunków grzybów z rodzaju *Candida* na powierzchniach bioprotetycznych. Autorzy stwierdzili obfitsze wytwarzanie biofilmu przez *C. albicans* w porównaniu z *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, czy *C. tropicalis*. Oceniając inwazyjne i nieinwazyjne szczepy *Candida albicans* okazało się, że szczepy inwazyjne wykazywały obfitszy wzrost biofilmu o mniejszej aktywności w porównaniu ze szczepami nieinwazyjnymi, które produkowały mniej biofilmu, ale bardziej aktywnego. Na podstawie badania mikroskopowego wykazano różnice w budowie zależną od gatunku; biofilm *Candida albicans* składa się z podstawowej warstwy blastospor, pokrytej macierzą zbudowaną z egzopolisacharydów oraz strzępek, natomiast utworzony przez *C. parapsilosis* ma mniejszą objętość i zbudowany jest wyłącznie ze zbitych w jedną masę blastospor.

Henriques i wsp. [10] zaobserwowali, że nie wszystkie gatunki grzybów mogą wytwarzać dojrzały biofilm, np. *Saccharomyces cerevisiae* przyle-

ga do powierzchni, ale nie tworzy biofilmu; zdolność do tworzenia biofilmu jest jedną z cech patogenności grzybów z rodzaju *Candida*. Podczas badania wytworzonych przez *C. albicans* i *C. dubliniensis* biofilmów zaobserwowano, że ich biomasa wzrasta z czasem, natomiast aktywność maleje. Zjawisko to najprawdopodobniej związane jest z występowaniem biofilmu zbudowanego z kilku warstw, przy czym warstwa podstawowa może nie być tak aktywna, jak powierzchnia. Tworzenie się pseudostrzępek uznane jest za jeden z czynników patogenności rodzaju *Candida*, który determinuje m.in. przyleganie.

Al-Fattani i wsp. [11] porównywali macierze biofilmów utworzone przez *Candida albicans* i *Candida tropicalis*. Okazało się, że macierze te zbudowane są z węglowodanów, białek, heksozamin, kwasu fosforowego oraz kwasu uronowego. Jednak dominującym składnikiem macierzy biofilmu utworzonego przez *C. albicans* jest glukoza, natomiast w przypadku *C. tropicalis* – heksozamina. Na podstawie wykazanych różnic autorzy ci stwierdzili, że skład macierzy biofilmu jest ważnym czynnikiem w jego oporności na leki przeciugrzybicze.

Istotnym czynnikiem wpływającym na wzrost tworzącego się biofilmu jest rodzaj kolonizowanej powierzchni. Hawser i wsp. [1] porównywali tworzenie się biofilmu *Candida albicans* na różnych materiałach, z których wykonane są cewniki. Zaobserwowali oni obfitszy wzrost biofilmu na powierzchni lateksowej i elastomerze silikonowym w porównaniu z materiałem wykonanym z polichlorku winylu. Na powierzchni poliuretanowej i silikonowej ilość wytworzonego biofilmu była znacznie mniejsza. Struktura biofilmu *Candida albicans* tworzona na różnych materiałach różni się i jest zależna od rodzaju powierzchni [12].

Chandra i wsp. [13] zbadali etapy tworzenia się biofilmu na dwóch różnych materiałach: polimeta-krylanie metylu (produkt polimeryzacji estru metylowego kwasu metakrylowego) – wykorzystywanego do konstrukcji protez i silikonowym elastomerze – modelowym materiale wykorzystywanym do produkcji cewników, czy protez głosowych.

Zaobserwowano, że formowanie się biofilmu na powierzchni polimetylmetakrylowej oraz silikonowym elastomerze przebiega w trzech odległych rozwojowo fazach:

1. wczesna (~0–11 h),
2. pośrednia (~12–30 h),
3. dojrzwania (~38–72 h).

Przez pierwsze dwie godziny większość komó-

rek *C. albicans* występuje w postaci blastospor, które przylegają do powierzchni. Po upływie trzech, czterech godzin pojawiają się wyraźne mikrokolonie. Jeszcze przed upływem jedenastu godzin *C. albicans* tworzy grubą warstwę utworzoną z agregujących komórek na nierównościach powierzchni modelu doświadczalnego. Fazę pośrednią charakteryzuje pojawienie się materiału pozakomórkowego. Podczas ostatniej fazy, wraz z czasem inkubacji, wzrasta ilość materiału pozakomórkowego, aż do momentu całkowitego pokrycia powierzchni przez komórki grzyba. Eksperyment został wykonany, po uprzednim namnażaniu komórek grzyba w podłożu stymulującym wzrost blastospor (YNB) oraz stymulującym wzrost strzępek (RPMI 1640). Po upływie 72 godzin okazało się, że tak powstałe biofilmy nie różnią się znacząco, biorąc pod uwagę suchą biomasę, czy aktywność metaboliczną. Otrzymane dane sugerują, że zarówno forma blastospor, jak i strzępek umożliwia tworzenie biofilmu, którego struktura jest podobna i jak wykazano w mikroskopie fluorescencyjnym nie zależy od stosowanego podłoża stymulującego wzrost poszczególnych postaci morfologicznych.

Komórki *C. albicans*, które rosną na silikonowym elastomerze tworzą zlewającą się warstwę spójnie ułożonych blastospor. W fazie dojrzewania blastospor tworzą warstwę o grubości 10–12 µm, pokrytą obfitą macierzą (o grubości około 450 µm), składającą się z materiału pozakomórkowego oraz elementów strzępek, pochodzących z warstwy podstawowej, następnie przenikających przez materiał pozakomórkowy i występujących zarówno w sąsiedztwie blastospor, jak i na całej grubości biofilmu.

Porównując biofilm *C. albicans* otrzymany z dożylnego cewnika od pacjenta z fungemią, z biofilmem otrzymanym w warunkach *in vitro*, przekonano się, że obydwa są morfologicznie podobne, mają wysoce heterogenną strukturę, a materiał pozakomórkowy nie jest wykrywany na wczesnym etapie ich tworzenia się [13].

QS w biofilmie *C. albicans*

Jednym z ważnych mechanizmów regulujących czynności życiowe oraz aktywność metaboliczną mikroorganizmów jest system *quorum sensing* (QS). System ten jest dobrze poznanym mechanizmem wewnątrzgatunkowego oraz międzygatunkowego komunikowania się bakterii. Postuluje się również jego znaczącą rolę w przypadku tworzenia

się biofilmu grzybiczego. Wykazano, że *C. albicans* posiada zdolność transformacji morfologicznej komórek pączkujących do strzępek i ta cecha jest jednym z ważnych czynników determinujących zjadliwość. Częsteczką sygnałową dla tego gatunku jest farnesol – organiczny związek chemiczny z grupy alkoholi seskwiterpenowych. Gromadzenie się farnesolu blokuje zmianę morfologiczną z komórek pączkujących do formy strzępek w przypadku znacznego zagęszczenia komórek. Ponadto egzogeny farnesol hamuje tworzenie się „germ tubes”, normalnie inicjowane przez surowicę, aminokwas prolinę oraz N-acetyloglukozaminę [14].

Po przeniesieniu hodowli *C. albicans* na świeże podłoże, zauważono znaczne opóźnienie wzrostu grzyba. „Faza opóźnienia” (ang. „lag phase”) jest znoszona przez dodanie pożywki pochodzącej ze znacznie zagęszczonej hodowli, która zawiera aktywny składnik – tyrozol, uwalniany stale do pożywki w czasie wzrostu grzyba. Tyrozol (etanolo-2 [4-hydroksyfenylo] etanol), pochodna tyrozyny, jest kolejną cząsteczką sygnałową *C. albicans*, która działa przeciwnie do farnesolu. W odpowiednich warunkach tyrozol sprzyja tworzeniu się „germ tubes”. Wynika z tego, że morfogeneza *C. albicans* jest regulowana przez tyrozol (stymulacja) oraz farnesol (hamowanie) [15].

Badania Alem i wsp. [14] dowiodły, że tyrozol jest produkowany zarówno przez biofilm *C. albicans*, jak również przez pojedyncze komórki grzyba, przy czym biofilm wydzielal przynajmniej 50% więcej tyrozolu niż pojedyncze komórki. Autorzy ci zbadali efekty tyrozolu i farnesolu pochodzenia egzogenego na tworzenie się biofilmu. Dodanie farnesolu we wczesnym etapie hamowało tworzenie biofilmu (farnesol blokuje zmianę komórek pączkujących *C. albicans*, natomiast nie zapobiega wydłużaniu się uprzednio utworzonych strzępek). W odróżnieniu od farnesolu, dodanie tyrozolu w początkowym etapie powstawania biofilmu nie wywierało żadnego wpływu na jego tworzenie się. Dojrzały, 48-godzinny biofilm, który wzrastał, w obecności bądź braku tyrozolu, miał podobną budowę morfologiczną, natomiast zaobserwowano, że tyrozol wzmacniał tworzenie się strzępek między drugą a szóstą godziną rozwoju. Przypuszcza się, że podobnie jak farnesol, egzogeny tyrozol działa tylko na wczesną fazę tworzenia się biofilmu, zanim zaczęną tworzyć się strzępki.

Aby zbadać względne znaczenie tyrozolu i farnesolu na tworzenie się biofilmu dodano jednocześnie obydwa związki w fazie początkowej procesu.

Zahamowanie tworzenia się biofilmu przez wyższe stężenie farnezołu (1mM) było nie zmienione przez tyrozol badany w różnych stężeniach, włączając stężenie ekwimolarnie. Ponadto biofilm utworzony w obecności farnezołu i tyrozolu składał się w głównej mierze z komórek pączkujących, co potwierdza wnioski, że farnezoł ma dominujący wpływ na morfologię komórki.

Znaczenie fizjologiczne tyrozolu i farnezołu w warunkach *in vivo* najprawdopodobniej zależne jest od ich poszczególnych stężeń w odpowiednim etapie tworzenia się biofilmu oraz od stężenia cząsteczek QS, które inicjują lub hamują ekspresję genów.

Aby zbadać względne stężenia tych cząsteczek produkowanych na różnych etapach tworzenia się biofilmu, zbadano supernatanty. Otrzymane wyniki sugerują, że aktywność tyrozolu przewyższa aktywność farnezołu po 14 godzinach, natomiast po upływie 24 h jest odwrotnie. Ponadto produkcja farnezołu zwiększa się znacznie podczas fazy późnej tworzenia biofilmu (48 do 72 h). Wyniki badań Alem i wsp. [14] sugerują, że tyrozol pobudza tworzenie się strzępek podczas fazy wczesnej i pośredniej rozwoju biofilmu, natomiast farnezoł może pełnić kluczową rolę w fazie późnej poprzez pobudzanie uwalniania komórek pączkujących z biofilmu i umożliwianie rozprzestrzenienia się komórek grzybów w celu kolonizacji nowych powierzchni.

Przypuszcza się, że istnieją inne cząsteczki QS, które także uczestniczą w rozwoju biofilmu. Fenyloetanol i tryptofol są to dwa inne, obok tyrozolu, alkohole aromatyczne produkowane przez *C. albicans*. Udowodniono ich działanie hamujące na tworzenie się „germ tubes” i rozwój biofilmu w wysokich stężeniach [15].

Zmiany morfogenetyczne w procesie tworzenia się biofilmu *C. albicans*

Odwracalna zmiana morfogenetyczna z formy komórek pączkujących do formy strzępek zdaje się odgrywać istotną rolę w chorobotwórczości i tworzeniu biofilmu. Dowiedziono, że strzępki są niezbędnym elementem, który stabilizuje biofilm oraz tworzy strukturę warstwową dojrzałego biofilmu [16], aczkolwiek formy morfologiczne, są zdolne do tworzenia biofilmu. Baillie i wsp. [16] badali nie zmutowane oraz zmutowane szczepy *C. albicans*, niezdolne do tworzenia strzępek lub wytwarzające tylko strzępki. Na podstawie badań w mikroskopie elektronowym, skaningowym zauważono, że nie

zmutowany szczep *Candida albicans* utworzony na krążkach cewnikowych składał się z dwóch wyraźnych warstw: warstwy podstawowej ze ściśle ułożonymi blastosporami oraz położonej na niej luźnej warstwy strzępek. Biofilm utworzony przez zmutowany szczep nie zawierał strzępek i charakteryzował się występowaniem tylko podstawowej warstwy blastospor, natomiast mutant nie wytwarzający blastospor tworzył biofilm zbudowany z grubszej warstwy strzępek, który można było z łatwością usunąć z badanej powierzchni. Dane te sugerują, że podstawowa warstwa komórek odgrywa istotną rolę w „zakotwiczeniu się” biofilmu *Candida* na odpowiedniej powierzchni [16].

Aby przekonać się, czy zdolność do tworzenia strzępek jest niezbędnym czynnikiem do tworzenia się biofilmu Ramage i wsp. [17] porównywali zmutowane i nie zmutowane szczepy *C. albicans*, niezdolne do tworzenia strzępek. Badania w mikroskopie elektronowym, skaningowym wykazały, że mutanty deltaefg1 i deltaph1/deltaefg1 nie były zdolne do wytworzenia strzępek i nie utworzyły biofilmu, ale warstwę luźno przymocowanych do powierzchni, wydłużonych komórek [18].

Oporność na leki przeciwgrzybicze

Na podstawie wielu badań wykazano, że wraz ze wzrostem biofilmu rośnie jego oporność na leki przeciwgrzybicze [16, 19–23].

Hawser i wsp. [19] zbadali wrażliwość biofilmu *C. albicans* utworzonego *in vitro* na krążkach cewnikowych z polichlorku winylu, na różne leki przeciwgrzybicze: amfoterycynę B, flucytozynę, itraconazol, flukonazol oraz ketokonazol. Dla porównania określili także działanie leków przeciwgrzybiczych na pojedyncze komórki grzyba. Okazało się, że wszystkie leki wykazały znacznie mniejszą aktywność w stosunku do biofilmu (48-godzinny) niż w stosunku do *C. albicans* w postaci pojedynczych komórek. Najbardziej skutecznym okazał się flukonazol (MIC=0,4 µg/ml), natomiast najslabszą aktywność wykazała amfoterycyna B (MIC=1,3 µg/ml).

Chandra i wsp. [20] oceniali zależność między stopniem rozwoju biofilmu na silikonowym elastomerze a opornością biofilmu *Candida* na leki przeciwgrzybicze. Wyznaczono MIC dla różnych leków: amfoterycyny B, nystatyny, flukonazolu i chlorheksydy w poszczególnych fazach wzrostu biofilmu. W fazie przejściowej wartość MIC dla amfoterycyny B, flukonazolu, nystatyny i chlorheksy-

dyny wynosiła odpowiednio 0,5; 1, 8 oraz 16 µg/ml. Wraz ze wzrostem biofilmu wartość MIC stopniowo wzrastała. Po upływie 72 h badany szczep *C. albicans* był wysoce oporny a wartość MIC wynosiły odpowiednio: 8, 128, 32 oraz 256 µg/ml. Stopniowe narastanie oporności związane było ze współistniejącym wzrostem aktywności metabolicznej rozwijającego się biofilmu [20, 21].

Zbadano także wrażliwość biofilmu *Candida albicans*, utworzonego na podłożu wykonanym z polimetakrylanu metylu, wykorzystywanego do produkcji protez zębowych, na wybrane leki przeciwgrzybicze. W porównaniu do *C. albicans* występującego w postaci pojedynczych komórek, biofilm wykazał oporność wobec amfoterycyny B, nystatyny, flukonazolu i chlorheksydyny [22].

Kuhn i wsp. [21] zbadali biofilmy utworzone przez różne gatunki grzybów z rodzaju *Candida* na elastomerze silikonowym. W przypadku *C. albicans* zaobserwowali szybki wzrost oporności badanych szczepów na flukonazol, natomiast te same szczepy, które rosły w postaci pojedynczych komórek zachowały wrażliwość.

Odrębnie sprawdzano wrażliwość biofilmów *C. albicans* i *C. parapsilosis* powstałych na elastomerach silikonowych na leki o działaniu przeciwgrzybiczym. Okazało się, że grzyby tworzące biofilmy wykazywały oporność na flukonazol, nystatynę, chlorheksydynę, terbinafinę, amfoterycynę B, worikonazol oraz rawukonazol. Natomiast forma liposomalna amfoterycyny B, kompleks lipidowy amfoterycyny B, kaspofungina i mikafungina były aktywne wobec biofilmów wytworzonych przez te gatunki. Zwraca uwagę fakt, że biofilm *C. parapsilosis* w porównaniu do biofilmu *C. albicans* okazał się tak samo oporny na wyżej wymienione leki przeciwgrzybicze, mimo znacznie mniej skomplikowanej budowy oraz wytwarzania znacznie mniejszej ilości substancji pozakomórkowej [20, 21].

Lewis i wsp. [24] badali biofilmy *C. albicans*, *C. glabrata* oraz *C. parapsilosis* (produkujący śluz) tworzone *in vitro* na centralnych cewnikach dożylnych. Sprawdzone wrażliwość biofilmów na amfoterycynę B, flukonazol oraz worikonazol. Okazało się, że amfoterycyna wykazała największą, a flukonazol najmniejszą aktywność wobec zbadanych szczepów. Zauważono także, że wprawdzie wszystkie leki hamowały wzrost grzybów, jednakże nie udało się całkowicie wyeliminować ich kolonizacji.

W innych badaniach sprawdzano wpływ nieste-

roidowych leków przeciwzapalnych na syntezę cyklooksygenazo-zależnych prostaglandyn grzybiczych, a w konsekwencji na tworzenie się biofilmu *C. albicans*. W doświadczeniu użyto małe krążki cewnikowe zbudowane z polichloroku winylu oraz następujące NLPZ: kwas acetylosalicylowy, etodolak, diklofenak, celekoksyb, nimesulid, ibuprofen, meloksikam, indometacynę oraz piroksykam. Zaobserwowano, że prawie wszystkie zbadane leki (oprócz indometacyny i piroksykamu) w stężeniach 1 mM hamowały tworzenie się biofilmu. Najsilniej działał kwas acetylosalicylowy, etodolak oraz diklofenak. Zauważono również, że badana w stężeniach farmakologicznych aspiryna, zależnie od zastosowanej dawki, hamuje tworzenie się biofilmu [25]. Ten sam zespół w innych badaniach potwierdził skuteczność kwasu acetylosalicylowego, diklofenaku i etodolaku wobec wydzielanych przez komórki *C. albicans* prostaglandyn. Doświadczenie przeprowadzono na szczepach *C. albicans* oraz ich morfologicznych mutantach z zablokowanymi dwiema ścieżkami sygnałowymi (*cph1/cph1* *efg1/efg1*). Szczepy-mutanty produkowały prostaglandyny w podobnych ilościach co szczepy rodzicielskie, natomiast biofilm składał się jedynie z komórek drożdżopodobnych. Otrzymane dane sugerują, że wydzielanie prostaglandyn przez *C. albicans* może być znaczącym czynnikiem patogenności w infekcjach związanych z tworzeniem się biofilmu [26].

Stepanovic i wsp. [27] otrzymali podobne wyniki skuteczności hamowania tworzenia biofilmu wytwarzanego przez *C. albicans* i inne gatunki (*C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* oraz *C. parapsilosis*) przez kwas acetylosalicylowy. Wartość MIC dla zbadanego leku zawierała się w granicach 2,17–8,67 mM, natomiast najniższe stężenie grzybobójcze kwasu acetylosalicylowego dla zbadanych szczepów grzybów wynosiło od 4,33 do 8,67 mM.

Podsumowanie

Tworzenie się biofilmu grzybiczego u pacjentów z wczepionymi biomedycznymi implantami stanowi bardzo poważny problem kliniczny. Powstały biofilm może powodować nie tylko dysfunkcję wszczepionego implantu, ale stanowi także potencjalny rezerwar lub źródło dla przewlekłych i uogólnionych infekcji [28].

Liczne badania wykazały różnice w biofilmach tworzonych przez różne gatunki grzybów z rodzaju *Candida*. Dokładnie zbadano też etapy tworzenia

się biofilmu *Candida albicans* w warunkach *in vitro*, którego formowanie się odbywa się etapowo, począwszy od procesu przylegania do powierzchni, tworzenia się mikrokolonii i wydzielania materiału pozakomórkowego, którego skład, w zależności od gatunku grzyba tworzącego biofilm, stanowi istotny czynnik decydujący o oporności na leki przeciwgrzybicze.

Cząsteczki sygnałowe systemu *quorum sensing* – farnezol i tyrozol, działając przeciwstawnie regulują morfogenezę komórek pączkujących do formy strzępek oraz wpływają na tworzenie się „germ tubes”, co wpływa na chorobotwórczość grzybów i zdolność tworzenia biofilmu.

Bardzo istotnym problemem klinicznym, związanym z tworzeniem się biofilmu grzybiczego, jest oporność grzybów z rodzaju *Candida* na standardowo stosowane leki przeciwgrzybicze. Badania *in vitro* potwierdzają znacznie mniejszą aktywność antimikotyków w stosunku do biofilmu niż w stosunku do *C. albicans* w postaci pojedynczych komórek.

Literatura

- [1] Hawser S. P., Douglas L. J. 1994. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infection and Immunity* 62: 915–921.
- [2] Kuhn D. M., Chandra J., Mukherjee P. K., Ghannoum M. A. 2002. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bio-prosthetic surfaces. *Infection and Immunity* 70: 878–888.
- [3] Chandra J., Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Hoyer L. L., McCormick T., Ghannoum M. A. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology* 183: 5385–5394.
- [4] Elving G. J., van der Mei H. C., Busscher H. J., van Weissenbruch R., Albers F. W. 2002. Comparison of the microbial composition of voice prosthesis biofilms from patients requiring frequent versus infrequent replacement. *The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology*: 111: 200–203.
- [5] Trevisani L., Sartori S., Rossi M. R., Bovolenta R., Scoponi M., Gullini S., Abbasciano V. 2005. Degradation of polyurethane gastrostomy devices: what is the role of fungal colonization? *Digestive Diseases and Sciences* 50: 463–469.
- [6] Krcmery V., Barnes A. J. 2002. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *The Journal of Hospital Infection* 50: 243–260.
- [7] Wenzel R. P., Gennings C. 2005. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *An Official Publication of The Infectious Diseases Society of America* 41, Supl 6: S389–393.
- [8] Kurnatowska A. 1995. Wybrane zagadnienia mikologii medycznej. Promedi, Łódź.
- [9] Shin J. H., Kee S. J., Shin M. G., Kim S. H., Shin D. H., Lee S. K., Suh S. P., Ryang D. W. 2002. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of blood-stream isolates with isolates from other sources. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1244–1248.
- [10] Henriques M., Azeredo J., Oliveira R. 2006. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity. *British Journal of Biomedical Science* 63: 5–11.
- [11] Al-Fattani M. A., Douglas L. J. 2006. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*: 55: 999–1008.
- [12] Baillie G. S., Douglas L. J. 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology* 48: 671–679.
- [13] Chandra J., Patel J. D., Li J., Zhou G., Mukherjee P. K., McCormick T. S., Anderson J. M., Ghannoum M. A. 2005. Modification of surface properties of biomaterials influences the ability of *Candida albicans* to form biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8795–8801.
- [14] Alem M. A., Oteef M. D., Flowers T. H., Douglas L. J. 2006. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic cell*: 5: 1770–1779.
- [15] Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J., Fink G.R. 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 5048–5052.
- [16] Baillie G. S., Douglas L.J. 1999. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Methods in Enzymology* 310: 644–656.
- [17] Ramage G., Vande Walle K., Brian L. Wickes B. L., Lopez-Ribot L. J. 2001. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana De Micología: Órgano De La Asociación Española De Especialistas En Micología* 18: 163–170.
- [18] Ramage G., Vande Walle K., López-Ribot J. L., Wickes B. L. 2002. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters* 214: 95–100.
- [19] Hawser S. P., Douglas L. J. 1995. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 2128–2131.
- [20] Chandra J., Mukherjee P. K., Leidich S. D., Faddoul F. F., Hoyer L. L., Douglas L. J., Ghannoum M.

- A. 2001. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *Journal of Dental Research* 80: 903–908.
- [21] Kuhn D. M., George T., Chandra J., Mukherjee P. K., Ghannoum M. A. 2002. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 3499–3505.
- [22] Mukherjee P. K., Chandra J., Kuhn D. M., Ghannoum M. A. 2003. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infection and Immunity* 71: 4333–4340.
- [23] Ramage G., Vande Walle K., Wickes B. L., López-Ribot J. L. 2001. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 2475–2479.
- [24] Lewis R. E., Kontoyiannis D. P., Darouiche R. O., Raad I. I., Prince R. A. 2002. Antifungal activity of Amphotericin B, Fluconazole, and Voriconazole in an *in vitro* model of *Candida* catheter-related bloodstream infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 3499–3505.
- [25] Alem M. A., Douglas L. J. 2004. Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 41–47.
- [26] Alem M. A., Douglas L. J. 2005. Prostaglandin production during growth of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology* 54: 1001–1005.
- [27] Stepanović S., Vuković D., Jesić M., Ranin L. 2004. Influence of acetylsalicylic acid (aspirin) on biofilm formation by *Candida* species. *Journal of Chemotherapy* 16: 134–138.
- [28] Douglas L. J. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* 11: 30–36.

Wpłynęło 28 lipca 2008

Zaakceptowano 31 grudnia 2008