

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKЕ MEDICINE
KATEDRA ZA MIKROBIOLOGIJU**



Dušan R. Milivojević, DVM

Ispitivanje odabranih faktora virulencije kod
izolata *Pseudomonas aeruginosa* i njihova
osetljivost na komplekse srebra

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY**



Dušan R. Milivojević, DVM

Evaluation of selected virulence factors in
Pseudomonas aeruginosa isolates and their
susceptibility to silver complexes

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018.

Mentori:

Dr Dušan Mišić, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Dr Lidija Šenerović, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Marina Radojičić, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Dr Ivana Morić, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Dr Jelena Ašanin, naučni saradnik, Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane

Ispitivanje odabranih faktora virulencije kod izolata *Pseudomonas aeruginosa* i njihova osetljivost na komplekse srebra

Rezime

Pseudomonas aeruginosa je ubikvitaran, oportunistički patogen, uzročnik infekcija kod životinja i ljudi, koje su najčešće povezane sa kompromitovanim imunološkim sistemom domaćina. Patogeneza pseudomonasne infekcije je multifaktorijalan proces koji uključuje produkciju faktora virulencije vezanih za ćeliju, odnosno faktora virulencije koji se sekretuju, složenu međubakterijsku komunikaciju putem četiri sistema, kao i sposobnost prelaska iz planktonske životne forme u formu biofilma. Značaj ove vrste za medicinu i veterinu potvrdila je Svetska zdravstvena organizacija u izveštaju objavljenom 2017. godine, po kom *P. aeruginosa* pripada kritičnoj grupi bakterijskih vrsta za koje je potrebno hitno razviti nove terapije jer, zbog sve učestalije pojave multirezistentnih sojeva, ova vrsta predstavlja ozbiljnu pretnju javnom zdravlju.

U okviru ove disertacije uporedno su analizirani faktori virulencije izolata *P. aeruginosa* izolovanih iz uzoraka obolelih životinja i ljudi, kao što su sposobnost formiranja biofilma (ukupan biofilm i biofilm na granici vazduh-tečnost), proizvodnja piocijanina, hemolitička aktivnost, sposobnost manifestovanja tri tipa pokretljivosti (plivanje, rojenje i grčenje), kao i citotoksični efekat na ćelijama iz ćelijske linije A549. Filogenetska srodnost i grupisanje odabranih izolata *P. aeruginosa* proučavana je na osnovu parcijalne sekvence gena za 16S rRNK. Ispitivanje postojanja korelacija između odabranih faktora virulencije urađeno je primenom robusne rang korelacije. Grupisanje izolata je izvedeno metodom hijerarhijske klasterizacije na osnovu euklidske udaljenosti normalizovane vrednostima sedam ispitivanih faktora virulencije i citotoksičnosti. Metodom mašinskog učenja konstruisan je prediktivni model na osnovu koga je određena značajnost ispitivanih faktora virulencije u predviđanju citotoksičnog potencijala izolata *P. aeruginosa*. Ispitivanje razlika između faktora virulencije izolata različitog porekla (izolati poreklom od ljudi u odnosu na izolate poreklom od životinja, odnosno izolati poreklom iz uzorka tečnosti u odnosu na izolate poreklom iz briseva) je izvedeno Wilcoxon Rank-Sum testom i Relative effect testom. Nematoda *Caenorhabditis elegans* i embrioni ribice *Danio rerio* su korišćeni kao model sistemi za

ispitivanje virulentnosti izolata *in vivo* i za utvrđivanje postojanja korelacije citotoksičnosti određene *in vitro* sa virulencijom *in vivo*.

Aktivnost puteva međubakterijske komunikacije (Las, Rhl i PQS sistema) je ispitivana merenjem proizvodnje signalnih molekula i određivanjem ekspresije gena metodom real time PCR. Hemolitička aktivnost je takođe analizirana određivanjem ekspresije *plcH* gena. Analiza ekstracelularnog matriksa biofilma, je izvedena fenotipski, kao i upoređivanjem ekspresije odgovarajućih gena metodom real time PCR.

Takođe, ispitivana je aktivnost dva kompleksa srebra(I) sa ftalazinom sa ciljem provere njihovog antibakterijskog i antibiofilm potencijala, kao i efekat na pokretljivost i sposobnost produkcije piocijanina kod odabranih izolata *P. aeruginosa*. Citotoksičnost ispitivanih kompleksa srebra(I) sa ftalazinom je određen na ćelijama iz ćelijske linije MRC5.

Sakupljena su ukupno 202 izolata *P. aeruginosa* iz različitih vrsta uzoraka poreklom od životinja (n = 121) i ljudi (n = 81) i testirana je njihova sposobnost formiranja biofilma na zidovima bunarčića mikrotitracionih ploča (ukupan biofilm). Od ukupnog broja izolata, 191 izolat (95%) je imao sposobnost proizvodnje biofilma u *in vitro* uslovima. Na osnovu količine proizvedenog biofilma u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1 izabrano je 40 izolata (30 boljih proizvođača biofilma i 10 slabijih proizvođača biofilma u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1) kod kojih su detaljnije ispitivani odabrani faktori virulencije i citotoksični efekat na ćelijama A549. Na filogenetskom stablu nije uočeno klasterovanje koje bi ukazalo na filogenetske razlike između grupa izolata.

Statističkom analizom je utvrđena najveća pozitivna korelacija između hemolitičke aktivnosti i sposobnosti rojenja, dok je najveća negativna korelacija zabeležena između sposobnosti izolata da formiraju biofilm na granici vazduh-tečnost i sposobnosti rojenja. Citotoksičnost je pozitivno korelisana sa hemolitičkom aktivnošću, dok je umereno negativno korelisana sa sposobnošću izolata da plivaju. Rezultati dobijeni hijerarhijskim klasterovanjem su pokazali da nema jasnog klasterovanja među izolatima ni prema poreklu ni prema faktorima virulencije. Prediktivni model dobijen primenom mašinskog učenja je ukazao da od analiziranih virulentnih karakteristika, ukupni biofilm bi mogao poslužiti kao parametar za predikciju citotoksičnosti izolata *P. aeruginosa*. Na osnovu rezultata dobijenih primenom Wilcoxon Rank-Sum testa i Relative effect testa, utvrđeno je da najveće razdvajanje između izolata poreklom iz uzoraka tečnosti i onih poreklom iz briseva postoji u sposobnosti proizvodnje A-L biofilma, dok je najveće razdvajanje između grupa izolata poreklom od životinja u odnosu na one poreklom od ljudi u citotoksičnosti. Kapacitet virulencije izolata ispitivan u *in vivo* uslovima nije dobro korelirao sa citotoksičnošću ispitivanom *in vitro*, ali se

u oba *in vivo* model sistema, pod ispitivanim uslovima, piocijanin izdvojio kao najvažniji faktor virulencije koji je dovodio do smrti nematoda, odnosno embriona zebrića.

Za analizu ekspresije gena virulencije odabrana su tri izolata na osnovu njihove sposobnosti da formiraju biofilm, kao i *P. aeruginosa* PAO1. Na podlogama sa Congo red i Coomassie blue bojama, četiri ispitivana izolata su imala različite fenotipove zbog različitih sposobnosti da proizvode pojedine polisaharide matriksa biofilma (Psl, Pel i alginat). Postojanje razlika je potvrđeno analizom ekspresije gena ključnih za sintezu tih komponenata, pri čemu je ekspresija *pslA* i *pelA* gena kod kliničkih izolata u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1 bila veća kada su bakterije gajene u planktonskoj kulturi, nego kada su gajene u formi biofilma, dok je ekspresija *muca* gena bila veća kod izolata gajenih u formi biofilma. Izolat BU31A, najbolji proizvođač biofilma, je pokazao najveću ekspresiju *muca* gena. Ekspresija gena značajnog za sintezu hemolitičke fosfolipaze C (*plcH*) kod kliničkih izolata gajenih u formi planktonskih ćelija i u formi biofilma bila je slična vrednostima dobijenim za *P. aeruginosa* PAO1. Ekspresija gena za ramnoziltransferazu (*rhlA*) bila je 90 puta veća kod kliničkog izolata BR2A, gajenog u formi biofilma u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1, što koincidira sa malom količinom ukupnog biofilma koju ovaj izolat formira. Ekspresija komponenti Rhl i Las sistema međubakterijske komunikacije bila je znatno veća kod izolata BR2A u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1, ali i na druga dva klinička izolata. Komponente PQS sistema međubakterijske komunikacije su bile znatno više ekspimirane kod izolata BU31A gajenog u formi biofilma u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1. Kvantifikacijom autoinducera u supernatantu izabranih izolata utvrđeno je da najbolji proizvođač biofilma, izolat BU31A, u stacionarnoj fazi rasta proizvodi deset puta manju količinu signalnih molekula za sva tri ispitivana sistema međubakterijske komunikacije u odnosu na referentni soj *P. aeruginosa* PAO1 i druga dva ispitivana izolata.

Dva kompleksa srebra(I) sa ftalazinom su pokazala značajno antipseudomonasno delovanje na bakterije gajene u tečnoj podlozi sa vrednostima MIK od 2,5 µg/ml do 25 µg/ml, dok je vrednost IC₅₀ iznosila 18 µg/ml, odnosno 8,3 µg/ml na ćelijama iz ćelijske linije MRC5. Oba kompleksa su pokazala sposobnost inhibicije formiranja biofilma (do 30%) kod odabranih izolata *P. aeruginosa* poreklom od ljudi i životinja na koncentracijama nižim od vrednosti MIK, ali nije primećena dozna zavisnost. Oba kompleksa su pokazala značajnu sposobnost degradacije već formiranog biofilma i do 90%, u zavisnosti od vrste izolata u koncentracijama koje su bile dva puta više od vrednosti MIK. Kompleksi srebra(I) su pokazali i sposobnost inhibicije pokretljivosti, ali nisu imali uticaj na sposobnost izolata da proizvode piocijanin.

Ključne reči: *Pseudomonas aeruginosa*, virulentnost, biofilm, kompleksi srebra(I)

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Mikrobiologija

UDK broj: 579.62:579.841.1:578.72

Evaluation of selected virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolates and their susceptibility to silver complexes

Summary

Pseudomonas aeruginosa, an ubiquitous, opportunistic pathogen that causes infections in animals and humans, is commonly associated with a immunocompromised host. The pathogenesis of a pseudomonal infection is a multifactorial process that includes virulence factors associated with the cell, secreted outside the cell, a branched network of four systems of inter-bacterial communication (quorum sensing), and the ability to switch from planktonic lifestyle to biofilm. World Health Organization has published a priority pathogen list in 2017 where *P. aeruginosa* was classified as one of the most critical pathogen for which development and introduction of new therapeutics is urgently needed because the increasing occurrence of multiresistant strains which pose a serious threat to the public health.

Within this dissertation, the virulent factors of *P. aeruginosa* isolates obtained from samples of diseased animals and humans are compared, including the ability of isolates to form biofilms (total biofilm and air-liquid biofilm), produce pyocyanin, perform hemolysis, manifest three types of motility (swimming, swarming and twitching) as well as their cytotoxic potentials on lung carcinoma cells (A549). Phylogenetic analysis was performed using partial sequences of 16S rRNA gene of the selected isolates. A study of the correlations among the virulence factor was performed by Robust rank correlation method. Grouping of the isolates was carried out by the method of hierarchical clustering based on the Euclidean distance normalized by the seven investigated virulence factors and cytotoxicity. Using the method of machine learning, a predictive model was constructed to evaluate the significance of the investigated virulence factors in predicting the cytotoxic potential of *P. aeruginosa* isolates. The differences between the virulence factors of isolates of different origin (isolates from humans in relation to isolates from animals, or isolates from a liquid samples in relation to isolates from swab samples) was studied using the Wilcoxon Rank-Sum test and the Relative Effect test. Nematode *Caenorhabditis elegans* and *Danio rerio* fish embryos were used as *in vivo* models for virulence testing and analysis of correlation between cytotoxicity determined *in vitro* and virulence *in vivo*.

The activity quorum sensing (Las, Rhl and PQS systems) was analyzed by measuring the production of signal molecules and determining the genes' expressions by the real time PCR method. Hemolytic activity was also analyzed by determining the expression of the *plcH* gene. The analysis of the extracellular matrix of biofilm was performed phenotypically and by corresponding genes' expression comparison.

The activity of two silver(I) complexes with phthalazine was also tested for their antibacterial and antibiofilm potentials, as well as the effect on the mobility and ability to produce pyocyanin in selected *P. aeruginosa* isolates. The cytotoxicity of the investigated silver(I) complexes with phthalazine was determined on cells from MRC5 cell line (human lung fibroblasts).

A total of 202 *P. aeruginosa* isolates from different samples of animals (n = 121) and humans (n = 81) were collected and tested for the ability to form the biofilm on the walls of the microtiter plate wells (total biofilm). Of the collected number of isolates, 191 isolates (95%) had the ability to produce biofilms *in vitro*. Based on the amount of biofilm produced compared to the *P. aeruginosa* PAO1 reference strain, 40 isolates (30 better biofilm producers and 10 poorer biofilm producers than *P. aeruginosa* PAO1) were selected for further investigation of virulence factors and cytotoxic potential for A549 cells. On the phylogenetic tree there was no clustering that would indicate phylogenetic differences between groups of isolates.

Statistical analysis showed the highest positive correlation between hemolytic and swarming abilities, while the highest negative correlation was recorded between the ability of the isolates to form a biofilm at the air-fluid interface and their ability to swarm. Cytotoxicity was positively correlated with hemolytic activity, while moderately negatively correlated with swimming ability. The results obtained by hierarchical clustering showed that there was no clear clustering of isolates either by origin or by virulence factors. The predictive model constructed by the machine learning approach indicated the total biofilm as the most promising parameter that could be used to determine the cytotoxicity of the *P. aeruginosa* isolates. Based on results obtained using the Wilcoxon Rank-Sum and the Relative Effect tests, it has been found that the greatest separation between the isolates originating in the liquid samples and those from the swabs are in their ability to produce A-L biofilm. On the other hand, the largest separation between isolates from animals and humans is in cytotoxicity. The virulence capacity of the isolates tested under *in vivo* conditions was not well correlated with the cytotoxicity tested *in vitro*, but in both *in vivo* model systems, under

the conditions examined, piocyanin was singled out as the most important virulence factor that led to the death of nematode and zebrafish embryos.

Based on their ability to form biofilm three isolates were selected for further analysis of virulence genes expression and compared to *P. aeruginosa* PAO1. On the Congo Red and Comassie Blue agar plates, the four investigated isolates had different phenotypes due to the different abilities to produce specific polysaccharides, components of the biofilm matrix (Psl, Pel, and alginate). Differences were further confirmed by the analysis of the expression of genes crucial for the synthesis of these components, where the expressions of *pslA* and *pelA* genes in clinical isolates were greater in comparison to *P. aeruginosa* PAO1 when bacteria were cultivated in planktonic culture than when grown in biofilm form, while the expression of *mucA* gene was higher in isolates grown in biofilm form. Isolate BU31A, the best biofilm producer, has shown the highest expression of *mucA* gene. Expression of a gene involved in the synthesis of haemolytic phospholipase C (*plcH*) in clinical isolates in both planktonic and biofilm forms was similar to the values obtained for *P. aeruginosa* PAO1. Expression of gene for ramnoziltransferase (*rhlA*) was 90 times higher in clinical isolate BR2A, grown in the form of biofilm compared to *P. aeruginosa* PAO1, which coincides with a small amount of total biofilm that this isolate forms. The expression of the Rhl and Las components of inter-bacterial communication was significantly higher in BR2A isolates compared to *P. aeruginosa* PAO1, but also compared to the other two clinical isolates. The components of the PQS inter-bacterial communication system were significantly more expressed in the isolate BU31A, grown in biofilm in comparison to *P. aeruginosa* PAO1. Quantification of the autoinducers in the supernatant of the selected isolates revealed that the best biofilm producer, BU31A isolate, in the stationary growth phase produces ten times smaller amount of signaling molecules of all three tested quorum sensing systems compared to *P. aeruginosa* PAO1 and the other two tested isolates.

Two silver(I) complexes with phthalazine showed significant antipseudomonal potential on bacteria grown in a liquid medium with MIC values of 2.5 µg/mL to 25 µg/mL, while IC₅₀ was 18 µg/ml and 8.3 µg/ml, respectively, on MRC5 cells. Both complexes showed the ability to inhibit the formation of biofilms (up to 30%) in selected *P. aeruginosa* isolates obtained from humans and animals at concentrations lower than MIC, but no dosage dependence was observed. Both complexes showed a significant degradation capacity of preformed biofilm up to 90%, depending on the type of isolates in concentrations that were twice as high as the MIC values. Silver(I) complexes also showed the ability to inhibit motility, but did not have any effect on piocyanin production in tested isolates.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, virulence, biofilm, silver(I) complexes

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Microbiology

UDC number: 579.62:579.841.1:578.72

Put do završetka ove doktorske disertacije bio je zanimljiv i izazovan, a na momente je delovao dug i nedostižan. Moj dolazak u Laboratoriju za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, IMGGI-a u leto 2014. godine, bio je splet nekoliko srećnih okolnosti. S tim u vezi, zahvalnost dugujem mentoru, profesoru Dušanu Mišiću, bez čije preporuke se ne bih pojavio pred vratima, za mene tada nepoznatog instituta. Zahvalnost svakako dugujem i dr Branki Vasiljević, rukovodiocu laboratorije, jer mi je pružila šansu. Veliku zahvalnost dugujem dr Lidiji Šenerović, mom drugom mentoru u okviru čije grupe je rađena ova disertacija, na osmišljavanju i dizajniranju eksperimenata i pomoći pri tumačenju dobijenih rezultata.

Tokom izrade ove disertacije bilo je uspona i padova, momenata kada su rezultati eksperimenata bili povod za slavlje i momenata kada nije bilo rezultata, ali je atmosfera u laboratoriji uvek bila ohrabrujuća. Zbog toga, hvala koleginicama iz Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama na divnoj atmosferi i pomoći. Dr vet. med. Strahinji Mediću iz veterinarske laboratorije „Vetlab“ i dr Radmili Popović iz odeljenja za mikrobiologiju i parazitologiju regionalne bolnice Valjevo hvala na omogućenom pristupu značajnim i jedinstvenim uzorcima, kao i na ljubaznosti i kolegijalnosti. Nevenu Šumonji iz Instituta Vinča, omiljenom statističaru punom razumevanja i strpljenja za nas laike, hvala na uspostavljenoj saradnji i velikoj pomoći oko statističke obrade podataka. Kolegi dr Aleksandru Paviću, stručnjaku za zebrice, hvala na pomoći oko in vivo eksperimenata. Grupi profesora Miloša Đurana sa Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Kragujevcu hvala na naporima da se sintetišu i okarakterišu kompleksi srebra, korišćeni u analizama u okviru ove disertacije.

Poslednji, ali podjednako izazovan, segment završetka ove disertacije bio je pisanje. Zahvalnost dugujem svim članovima komisije na komentarima, predlozima i pomoći tokom pisanja. Ipak, moram da istaknem veliku zahvalnost dr Ivani Morić „diktatoru za srpski jezik i pravopis“ i dr Jeleni Ašanin koje su svojim detaljnim pristupom kao i konstruktivnim i veoma korisnim sugestijama doprinele da konačna verzija ove disertacije bude još bolja.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Jasmini Nikodinović Runić, koja mi je svojim savetima nesebično pomagala od početka izrade ove disertacije.

Na kraju, ali ne i najmanje bitno, zahvalnost na beskrajnoj podršci dugujem porodici i prijateljima.

Tijani, mom malom, vernom Sančo Pansi, hvala na neizmernom strpljenju.

Posvećeno mojim roditeljima

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	5
2.1. Osnovne karakteristike vrste <i>P. aeruginosa</i>	5
2.1.1. Taksonomija <i>P. aeruginosa</i>	5
2.1.2. Mikrobiološke karakteristike <i>P. aeruginosa</i>	6
2.1.3. Rasprostranjenost <i>P. aeruginosa</i>	8
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> kao uzročnik infekcija.....	8
2.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> kao uzročnik infekcija kod životinja.....	9
2.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> kao uzročnik infekcija kod ljudi.....	13
2.3. Patogeneza pseudomonasne infekcije i faktori virulencije neophodni za njeno uspostavljanje	17
2.3.1. Patogeneza pseudomonasne infekcije	17
2.3.2. Faktori virulencije <i>P. aeruginosa</i>	18
2.3.2.1. Međubakterijska komunikacija (<i>quorum sensing</i>).....	18
2.3.2.2. <i>Flagela</i>	23
2.3.2.3. <i>Pili</i>	23
2.3.2.4. <i>Lipopolisaharidi</i>	24
2.3.2.5. <i>Sekrecioni sistemi tipa I i tipa II</i>	25
2.3.2.6. <i>Fosfolipaza C</i>	26
2.3.2.7. <i>Proteinaze</i>	27
2.3.2.8. <i>Egzotoksin A</i>	27
2.3.2.9. <i>Sekrecioni sistem tipa III</i>	28
2.3.2.10. <i>Piocijanin</i>	29
2.3.2.11. <i>Ramnolipidi</i>	30
2.3.2.12 <i>Siderofore</i>	31
2.3.2.13. <i>Cijanovodonik (HCN)</i>	32
2.3.2.14. <i>Lektini</i>	32
2.3.2.15. <i>Biofilmovi P. aeruginosa</i>	33

2.4. Tretmani infekcija izazvanih vrstom <i>P. aeruginosa</i>	43
2.4.1. Urođeni i stečeni mehanizmi rezistencije na antibiotike kod vrste <i>P. aeruginosa</i>	44
2.4.2. Otpornost <i>P. aeruginosa</i> u biofilmu na antibakterijske agense	45
2.4.3. Strategija borbe protiv biofilmova	49
2.4.4. Joni metala u borbi protiv <i>P. aeruginosa</i>	51
2.4.5. Strategija tretmana pseudomonasnih infekcija kompleksima srebra	52
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	55
4. MATERIJAL I METODE	57
4.1. Poreklo ispitivanih izolata <i>Pseudomonas aeruginosa</i> i njihova karakterizacija	57
4.1.1. Poreklo ispitivanih izolata <i>P. aeruginosa</i>	57
4.1.2. Identifikacija bakterijskih izolata	58
4.1.3. Čuvanje izolata <i>P. aeruginosa</i> u laboratoriji	58
4.2. Karakterizacija virulencije izolata <i>P. aeruginosa</i>	59
4.2.1. Mikrobiološke podloge	59
4.2.2. Sposobnost izolata <i>P. aeruginosa</i> da formiraju biofilm u mikrotitracionim pločama (ukupan biofilm)	60
4.2.3. Sposobnost izolata <i>P. aeruginosa</i> da formiraju biofilm na granici vazduh-tečnost (A-L biofilm)	61
4.2.4. Ispitivanje različitih vrsta pokretljivosti izolata <i>P. aeruginosa</i>	62
4.2.4.1. Plivanje	62
4.2.4.2. Rojenje	62
4.2.4.3. Grčenje	63
4.2.5. Ispitivanje hemolitičke aktivnosti izolata <i>P. aeruginosa</i>	63
4.2.6. Ispitivanje proizvodnje piocijanina izolata <i>P. aeruginosa</i>	64
4.3. Ispitivanje citotoksičnosti i infektivnosti izolata <i>P. aeruginosa</i>	65
4.3.1. Ispitivanje citotoksičnosti izolata <i>P. aeruginosa</i> na ćelijama iz ćelijske linije A549	65

4.3.2. Ispitivanje infektivnosti izolata <i>P. aeruginosa</i> u model sistemu <i>Caenorhabditis elegans</i> AU 39 (<i>glp-4</i> ; <i>sek -1</i>)	66
4.3.3. Ispitivanje infektivnosti izolata <i>P. aeruginosa</i> u model sistemu embriona zebrice (<i>Danio rerio</i>).....	69
4.4. Analiza biofilмова fluorescentnom mikroskopijom	72
4.4.1. Posmatranje biofilмова izolata <i>P. aeruginosa</i> formiranih na sloju ćelija A549	72
4.4.2. Posmatranje biofilмова izolata <i>P. aeruginosa</i> formiranih u prisustvu kompleksa srebra(I) sa ftalazinom	73
4.5. Kvantifikacija proizvodnje quorum sensing autoinducera (senzornih molekula).....	74
4.5.1. Ispitivanje produkcije acil homoserin laktona (AHL).....	74
4.5.2. Ispitivanje produkcije 2-heptil-3-hidroksi-4-hinolona	76
4.6. Analiza proizvodnje egzopolisaharida – Congo red agar test.....	76
4.7. Molekularno-biološke metode	77
4.7.1. Izolacija ukupne DNK.....	77
4.7.2. Umnožavanje gena za 16S rRNK.....	77
4.7.3. Agarozna gel elektroforeza	78
4.7.4. Sekvenciranje DNK.....	79
4.7.5. Obrada DNK sekvenci i filogenetska analiza	79
4.7.6. Izolacija ukupne RNK.....	80
4.7.7. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) na osnovu izolovane RNK	81
4.7.8. Umnožavanje cDNK metodom Real Time PCR.....	82
4.8. Ispitivanje osetljivosti izolata <i>P. aeruginosa</i> na komplekse srebra(I)	84
4.8.1. Određivanje vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) kompleksa srebra.....	84
4.8.2. Određivanje citotoksičnosti kompleksa srebra(I).....	85
4.8.3. Ispitivanje efekta kompleksa srebra(I) na formiranje biofilмова	86
4.8.4. Ispitivanje efekta kompleksa srebra na već formirani biofilm.....	86

4.8.5. Ispitivanje efekta kompleksa srebra na pokretljivost izolata <i>P. aeruginosa</i>	87
4.8.6. Ispitivanje efekta kompleksa srebra na proizvodnju piocijanina	87
4.9. Statistička analiza.....	88
5. REZULTATI.....	92
5.1. Odabir izolata <i>P. aeruginosa</i> na osnovu sposobnosti da formiraju ukupan biofilm	92
5.2. Karakterizacija virulencije odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i>	95
5.2.1. Rezultati ispitivanja sposobnosti odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i> da formiraju biofilme	95
5.2.2. Rezultati ispitivanja hemolitičke aktivnosti odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i>	96
5.2.3 Rezultati ispitivanja proizvodnje piocijanina kod odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i>	97
5.2.4. Rezultati ispitivanja pokretljivosti odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i>	98
5.3. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti i infektivnosti odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i>	101
5.3.1. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i> na ćelijama iz ćelijske linije A549	101
5.3.2. Rezultati ispitivanja infektivnosti odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i> na <i>in vivo</i> model sistemima.....	105
5.3.2.1. Rezultati ispitivanja infektivnosti odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i> na model sistemu <i>C. elegans glp-4; sek-1</i>	105
5.3.2.2. Rezultati ispitivanja infektivnosti odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i> na model sistemu embriona zebrice (<i>Danio rerio</i>).....	107
5.4. Rezultati ispitivanja filogenetske srodnosti i grupisanja odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i> na osnovu parcijalne sekvence gena za 16S rRNK	109
5.5. Statističke analize: korelacija, klasterovanje i prediktivnost	111
5.5.1. Analiza korelacije.....	111
5.5.2. Rezultati ispitivanja klasterovanja odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i>	112
5.5.3. Predikcija citotoksičnosti izolata <i>P. aeruginosa</i> na osnovu ispitivanih faktora virulencije.....	113
5.5.4. Rezultati ispitivanja statističke razlike između grupa izolata	114

5.6. Rezultati analize ekspresije gena virulencije	117
5.6.1. Rezultati analize ekspresije gena uključenih u sintezu ekstracelularnog matriksa biofilmova kod odabranih izolata.....	117
5.6.2. Rezultati analize aktivnosti Las, Rhl i PQS puteva međubakterijske komunikacije <i>P. aeruginosa</i>	120
5.6.3. Rezultati analize ekspresije gena uključenih u sintezu hemolitičke fosfolipaze C i ramnolipida.....	122
5.7. Rezultati ispitivanja osetljivosti odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i> na komplekse srebra(I) sa ftalazinom	124
5.7.1. Rezultati testiranja antibakterijske aktivnosti i citotoksičnosti kompleksa srebra(I) sa ftalazinom.....	124
5.7.2. Rezultati efekat kompleksa srebra(I) sa ftalazinom na biofilmove odabranih izolata <i>P. aeruginosa</i>	125
5.7.3. Rezultati efekata kompleksa srebra(I) sa ftalazinom na pokretljivost izolata <i>P. aeruginosa</i>	129
5.7.4. Rezultati efekat kompleksa srebra(I) sa ftalazinom na proizvodnju piocijanina kod izolata <i>P. aeruginosa</i>	130
6. DISKUSIJA	131
6.1. Karakterizacija ispitivanih faktora virulencije kod izolata <i>P.aeruginosa</i>	131
6.2. Analiza ekspresije gena virulencije.....	138
6.3. Ispitivanje osetljivosti izolata <i>P. aeruginosa</i> na komplekse srebra	143
7. ZAKLJUČCI	147
8. LITERATURA	149

Spisak skraćenica

3-okso-C12-HSL		N-(3-oksododekanoil)-L-homoserin lakton
a.j.		arbitrarna jedinica
ACP	<i>eng.</i>	acyl carrier protein
AHL		acil-homoserin lakton
AI	<i>eng.</i>	Autoinducer
A-L biofilm		Air-Liquid biofilm
AUPRC	<i>eng.</i>	Area Under Precision Operator Curve
AUROC	<i>eng.</i>	Area Under Receiver Operator Curve
BT		balansirana tačnost
C4-HSL		N-butiril-L-homoserin lakton
c-di-GMP		ciklični diguanozin -5' monofosfat
cDNK		komplementarna DNK
CF		cistična fibroza
CFU	<i>eng.</i>	Colony-Forming Units
Cup fimbriae	<i>eng.</i>	chaperone-usher pathway fimbriae
DAPI		4,6-diamidin-2-fenilindol
DFO		dezferioksamin
DMSO		dimetil sulfoksid
ECM		ekstracelularni matriks
eDNK		ekstracelularna DNK
FBS	<i>eng.</i>	Fetal Bovine Serum
Fur protein	<i>eng.</i>	Ferric uptake regulator protein
GAC	<i>eng.</i>	Global activator of antibiotic and cyanide synthesis
HAP	<i>eng.</i>	Hospital-associated pneumonia
IQS	<i>eng.</i>	Integrated Quorum Sensing System
KSKG		koren srednje kvadratne greške
LA		Luria Bertani agar
LB		Luria Bertani bujon
LOOUV	<i>eng.</i>	Leave-one-out unakrsna validacija
LPS		lipopolisaharid
MIK		minimalna inhibitorna koncentracija
NGM	<i>eng.</i>	Nematode Growth Medium
OD	<i>eng.</i>	Optical Density
PBS	<i>eng.</i>	Phospahte Buffered Saline
PCR	<i>eng.</i>	Polymerase Chain Reaction
PI	<i>eng.</i>	Propidium Iodide
PQS	<i>eng.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Quinolone Signal
QS	<i>eng.</i>	Quorum Sensing
ROS	<i>eng.</i>	Reactive Oxygen Species

rRNK	ribozomalna RNK
SCV	<i>eng.</i> Small-Colony Variant
SD	Standardna devijacija
Spf	sati posle fertilizacije
sRNA	<i>eng.</i> small RNA
TE	tris-EDTA
TSB	tripton soja bujon
UV-10	desetostruka unakrsna validacija
VAP	<i>eng.</i> Ventilator-associated pneumonia

1. UVOD

Pseudomonas aeruginosa je Gram-negativni, ubikvitarni, oportunistički patogen, uzročnik infekcija kod životinja i ljudi. Patogeneza pseudomonasne infekcije je multifaktorijski proces koji obuhvata čitav arsenal faktora virulencije čiju ekspresiju koordinišu četiri sistema međubakterijske komunikacije, dok je perzistentnost pseudomonasnih infekcija omogućena sposobnošću ove vrste da formira biofilm (Moradali *i sar.*, 2017). Terapija pseudomonasnih infekcija je otežana usled sposobnosti ove vrste da razvije rezistenciju na antibiotike (Streeter i Katouli, 2016). Svetska zdravstvena organizacija je u februaru 2017. godine uvrstila sojeve *P. aeruginosa* rezistentne na karbapenem u grupu kritičnih bakterija koje predstavljaju veliku pretnju za čovečanstvo i za koje je hitno potrebno pronaći nove antibiotike i/ili zamene za antibiotike.

Pseudomonas aeruginosa može biti deo tranzitne mikrobiote prisutne na koži i sluznici zdravih životinja i ljudi, ali može i da dovede do infekcija i ozbiljnih oboljenja usled oštećenja kože i sluznica (kateterizacija/intubacija pacijenata, rane nastale kao rezultat opekotina, hirurške rane), imunodeficientnih stanja, kao i promena u saprofitnoj mikrobioti usled korišćenja antibiotika (Lister *i sar.*, 2009). Kod životinja ova vrsta izaziva čitav dijapazon infektivnih oboljenja (oboljenja respiratornog trakta, cistitise, mastitise, endometritise, hronične infekcije rana, otitise) koja kod odraslih životinja nisu praćena visokom stopom mortaliteta (Westman *i sar.*, 2010). Smrtonosna hemoragična pneumonija sreće se kod kanadske kune (*Neovison vison*) inficirane ovom vrstom i smatra se da je reč o preosetljivosti ovih životinja na *P. aeruginosa* (Salomonsen *i sar.*, 2013). Kod ljudi ova bakterija je povezana sa imunokompromitovanim stanjima i jedna je od najčešćih uzročnika nozokomijalnih infekcija na odeljenjima intenzivne nege (Driscoll *i sar.*, 2007).

Pseudomonas aeruginosa ostvaruje svoj infektivni potencijal preko velikog broja faktora virulencije i sekundarnih metabolita. Kod laboratorijskih sojeva *P. aeruginosa* utvrđeno je da najvažnije virulentne sisteme čine međubakterijska komunikacija (*eng.* Quorum Sensing, QS), sekretorni sistem tipa III i lipopolisaharid (LPS) (Le Berre *i sar.*, 2011). Međubakterijska komunikacija je globalni regulatorni

sistem koji koordiniše ekspresiju gena kao odgovor na promene gustine bakterijske populacije koristeći signalne molekule male molekulske mase, ne samo kod vrsta iz roda *Pseudomonas*, već i kod drugih vrsta bakterija. Ovaj sistem reguliše produkciju velikog broja faktora virulencije *P. aeruginosa* među kojima su elastaza, piocijanin, proteaze i ramnolipidi ključni za razvoj infekcije (Lyczak *i sar.*, 2000, 2002). Virulentne karakteristike *P. aeruginosa* variraju od soja do soja, odnosno od klona do klona u okviru populacije. Poređenjem genoma soja *P. aeruginosa* PAO1 sa genomima različitih kliničkih i sredinskih izolata došlo se do saznanja da različiti izolati imaju proširen genetički repertoar u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1, usled čega imaju i izmenjen patogeni potencijal (Head i Yu, 2004). Ove intra-klonalne i inter-klonalne varijacije među različitim izolatima *P. aeruginosa* omogućava veliki mutageni potencijal genoma ove bakterije i to kroz akumulaciju mutacija ili horizontalnim transferom genetičkih elemenata (Klockgether *i sar.*, 2011; Spencer *i sar.*, 2003). Istraživanja koja se bave izučavanjem korelacije virulentnih karakteristika i patogenog potencijala *P. aeruginosa* su uglavnom fokusirana na uzorke dobijene od obolelih ljudi (Fonseca *i sar.*, 2007; Jeukens *i sar.*, 2014; Le Berre *i sar.*, 2011; Olejnickova *i sar.*, 2014). Ovakve studije na uzorcima dobijenim iz inficiranih životinja su manje opsežne i obično fokusirane na jednu vrstu životinje (Haenni *i sar.*, 2015; Kidd *i sar.*, 2011; Lin *i sar.*, 2012; Poonsuk i Chuanchuen, 2012; Qi *i sar.*, 2014; Scaccabarozzi *i sar.*, 2015).

Jedna od najznačajnijih virulentnih karakteristika *P. aeruginosa* je sposobnost da formira biofilm, tj. strukturirane i kooperativne zajednice bakterija uronjene u ekstracelularni matriks koji proizvode, a koji im obezbeđuje preživljavanje u nepovoljnim uslovima sredine. *Pseudomonas aeruginosa* se u prirodi sreće u slobodnom planktonskom obliku i u formi biofilma, a prelazak sa jednog na drugi „životni stil” je koordinisan brojnim regulatornim mehanizmima (Lee i Yoon, 2017). Sposobnost formiranja biofilma je faktor virulencije koji objedinjuje strukture neophodne za pokretljivost i vezivanje bakterija (flagele, pile tipa IV, chaperone-usher pathway (Cup) fimbrije, lektine i drugi adhezine), sposobnost sekrecije i razgranatu mrežu međubakterijske komunikacije (Moradali *i sar.*, 2017; Rybtke *i sar.*, 2011). Proces formiranja biofilma kod *P. aeruginosa*, koji uključuje faze adhezije, maturacije i diferencijacije biofilma, je regulisan međubakterijskom komunikacijom (Davies *i sar.*, 1998). Međubakterijska komunikacija indirektno reguliše formiranje

biofilmova i kroz kontrolu rojevitog kretanja, produkciju lektina i ramnolipida (Pamp i Tolker-Nielsen, 2007). Biofilmovi se mogu formirati na različitim organskim i neorganskim površinama kao što su tkiva pacijenata, odnosno medicinska pomagala. Ekstracelularni matriks biofilmova sastoji se od fosfolipida, polisaharida, proteina, ekstracelularne DNK i vode (Flemming i Wingender, 2010). Generalno, usled specifičnog vida rasta i diferencijacije, biofilmovi mogu biti i do 1000 puta otporniji na tretman antibakterijskim agensima i imunološki odgovor domaćina od slobodnoživećih organizama iste vrste (Oppenheimer-Shaanan *i sar.*, 2013). Infekcije praćene formiranjem biofilmova su često hroničnog karaktera i odlikuju se perzistentnom inflamacijom i oštećenjem tkiva (Høiby *i sar.*, 2010). Visoka učestalost mutacija i povećan horizontalni transfer genetičkih elemenata u biofilmovima *P. aeruginosa* doprinose multirezistenciji na niz antibakterijskih agenasa, uključujući i antibiotike kao što su β -laktami, aminoglikozidi i flourohinoloni. Takođe, bakterije u biofilmu simultano ekspimiraju enzime koji degraduju antibiotike, kao i efluks pumpe koje imaju širok spektar supstrata (Høiby *i sar.*, 2010). Zbog svega navedenog biofilmovi predstavljaju jednu od nezaobilaznih meta u terapijama hroničnih infekcija. Borba protiv biofilmova obuhvata nekoliko strategija: sprečavanje adhezije ćelija na neku površinu ili tkivo, menjanje arhitekture biofilma pomoću enzima ili inhibicije međubakterijske komunikacije, kao i degradaciju već formiranog, zrelog biofilma mehaničkim ili hemijskim putem (Bjarnsholt *i sar.*, 2013).

Antibakterijska aktivnost srebra je poznata već dugo (Klasen, 2000b) i nastavlja da privlači pažnju istraživača. Jedinjenja srebra(I) pokazuju poželjnije terapijske karakteristike od ostalih vrsta metala koji deluju antibakterijski, usled veće antibakterijske aktivnosti, a manje toksičnosti za ćelije sisara (Lemire *i sar.*, 2013). Ova jedinjenja pokazala su i inhibitornu aktivnost prema biofilmovima *P. aeruginosa* (Bjarnsholt *i sar.*, 2007; Glisic *i sar.*, 2016; Savic *i sar.*, 2016b). Utvrđeno je da antibakterijska aktivnost srebra može biti najbolje iskorišćena kada se primeni u formi kompleksa, pri čemu važnu ulogu u dizajniranju kompleksa imaju vrsta donorskog atoma i jednostavnost izmene liganda (Nomiya *i sar.*, 2004). Stoga, atraktivnu klasu liganada za sintezu antibakterijskih srebro(I) kompleksa čine aromatični heterociklični ligandi koji sadrže azot (Kalinowska-Lis *i sar.*, 2016)

Malobrojna su istraživanja koja se bave utvrđivanjem značaja pojedinih virulentnih karakteristika za proces uspostavljanja infekcija izazvanih sojevima *P. aeruginosa* kod ljudi i životinja, čime bi se identifikovale nove mete za razvoj efikasnijih terapeutika za lečenje ovih infekcija (Le Berre *i sar.*, 2011). Takođe, i dalje je nerazjašnjeno da li diferencijalno ekspimirani geni u planktonskoj, odnosno biofilm formi imaju drugačiji nivo ekspresije među izolatima sa različitim potencijalom za formiranje biofilmova i na koji način te razlike, ukoliko postoje, utiču na njihov virulentni potencijal. Ovaj rad je prva uporedna analiza izolata *P. aeruginosa* u Republici Srbiji dobijenih iz različitih vrsta uzoraka poreklom od životinja i ljudi s ciljem da se uoči povezanost virulentnih determinanti i patogenosti na ćelijskom i molekularnom nivou. Takođe, osetljivost izolata poreklom od obolelih životinja i ljudi na komplekse srebra(I) sa ftalazinom biće analizirana, kako u planktonskim kulturama, tako i na njihovim biofilmovima.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Osnovne karakteristike vrste *P. aeruginosa*

2.1.1. Taksonomija *P. aeruginosa*

Pre više od jednog veka francuski vojni hirurg Sidelot (Sédillot) opisao je svoje zapažanje o plavozelenom prebojavanju gnoja na ubodnim i prostrelnim ranama kod vojnika (Pitt i Simpson, 2006). Fordos je 1860. godine uspeo da izoluje i kristalizuje malu količinu te, za Sidelota nepoznate, „supstance koja boji gnoj” i nazvao je piocijanin. U radu objavljenom iste godine opisao je piocijanin kao supstancu rastvorljivu u vodi, alkoholu, etru i hloroformu, koja u kiselim i baznim rastvorima menja boju u crvenu, odnosno u plavu (Hugh i Lessel, 1966). Godine 1872. Jožef Šroter (Joseph Schroeter) je posmatrao pojavu plavog pigmenta na krompiru i zaključio da je njegova proizvodnja uslovljena aktivnošću bakterije koju je nazvao *Bacterium aeruginosa* (Hugh i Lessel, 1966). Koristeći Pasterovu tehniku serijskih razblaženja, Karl Gisard (Carle Gessard) je uspeo da 1882. godine dobije bakterijsku kulturu koja je proizvodila plavozeleni pigment piocijanin i nazvao je *Bacillus pyocyaneus* (Pitt i Simpson, 2006). Ime vrste koja proizvodi plavozeleni pigment je više puta menjano i to 1884. godine u *Micrococcus pyocyaneus* (Zopfa), 1885. godine u *Bacillus aeruginosus* (Trevisan), 1886. godine u *Bacillus pyocyaneus* (Flügge), 1896. godine u *Bacterium pyocyaneum* (Lehman i Neuman) a naziv *Pseudomonas pyocyanea* (grčki „pseudo” – lažni, „monas” – jedinica) je prvi upotrebio Migula 1900. godine (Hugh i Lessel, 1966; Palleroni, 2015). Do sredine XX veka u upotrebi su bila dva naziva za ovu vrstu: *P. pyocyanea* i *P. aeruginosa*, ali je naziv *P. aeruginosa* postao opšteprihvaćen kao prikladniji (naziv vrste vodi poreklo od latinske reči „verdigris” što znači bakarna rđa) (Palleroni, 2010).

Sredinom sedamdesetih godina XX veka po prvi put je rRNK molekul korišćen za taksonomsku klasifikaciju prokariota i to za ponovnu klasifikaciju roda *Pseudomonas* (Palleroni, 2010). Tako su na osnovu sličnosti rRNK molekula, vrste roda *Pseudomonas* su raspoređene u pet grupa: grupu I činile su vrste koje se danas nalaze u rodu

Pseudomonas (pseudomonasi u užem smislu reči, *P. aeruginosa* i *P. fluorescens* kao najpoznatiji), vrste grupe II i grupe III danas pripadaju rodu *Burkholderia*, odnosno rodu *Delftia*, dok su vrste iz grupa IV i V premeštene u rodove *Brevundimonas* i *Stenotrophomonas* (Pitt i Simpson, 2006).

Danas rod *Pseudomonas* broji 53 vrste ubikvitarnih mikroorganizama, najvećim delom oportunističkih patogena ljudi, životinja i biljaka (Palleroni, 2015). Najpoznatija vrsta ovog roda je *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 1).

Tabela 1. Taksonomska klasifikacija vrste *P. aeruginosa* (Palleroni, 2015).

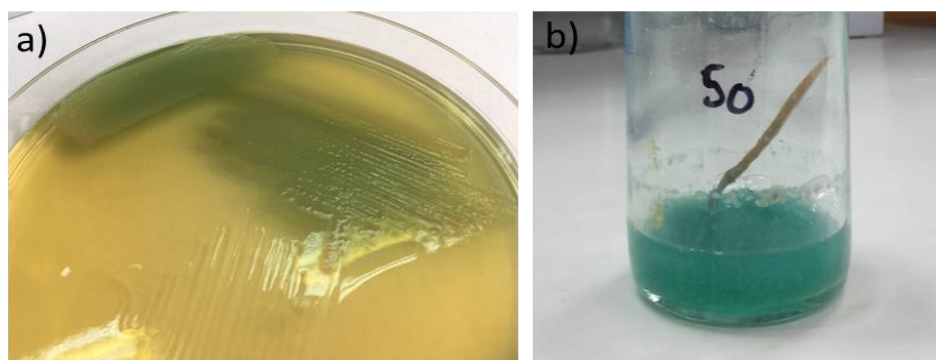
Carstvo	Bacteria
Kolo	Proteobacteria
Klasa	Gammaproteobacteria
Red	Pseudomonadales
Familija	Pseudomonadaceae
Rod	<i>Pseudomonas</i>
Vrsta	<i>P. aeruginosa</i> (Schroeter 1872, Migula 1900)

2.1.2. Mikrobiološke karakteristike *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je Gram-negativna, pokretna, štapićasta bakterija (Berra *i sar.*, 2010). Dimenzije bakterijske ćelije su 0,5-1 µm sa 1,5-5 µm (Palleroni, 2015). Raste na temperaturama od 10 °C do 42 °C, optimalno 37 °C (Markey *i sar.*, 2013). Za razliku od *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* ne raste na temperaturi od 5 °C, što je važno sa diferencijalno-dijagnostičke tačke gledišta (Markey *i sar.*, 2013). *Pseudomonas aeruginosa* je osetljiv na niske pH vrednosti i bakterijske ćelije brzo umiru već pri pH 4,5 (Palleroni, 2015). U prirodi ova vrsta naseljava različita staništa i moguće ju je izolovati iz zemljišta, biljaka, vode i sa kože životinja i ljudi (Markey *i sar.*, 2013).

Kao i druge vrste iz roda *Pseudomonas* i *P. aeruginosa* se odlikuje nutritivnom raznolikošću koja se prvenstveno manifestuje sposobnošću da različite organske sastojke koristi kao izvor ugljenika i donore elektrona, radi proizvodnje energije (Moradali *i sar.*, 2017). *Pseudomonas aeruginosa* je aerobna bakterija koja u slučaju prisustva nitrata, nitrita ili arginina kao alternativnih akceptora elektrona može da raste i u anaerobnim uslovima (Markey *i sar.*, 2013; Palleroni, 2015).

Na osnovu izgleda kolonija *P. aeruginosa* na čvrstim hranljivim podlogama razlikuju se dva osnovna tipa: velike, glatke, sa ravnim rubovima i malo uzdignutim centrom, i male, hrapave i konveksne kolonije (Palleroni, 2015). Velike kolonije su obično prevučene sivosrebrnim metalnim sjajem. Izolati *P. aeruginosa* iz kliničkih uzoraka najčešće rastu u formi velikih kolonija, dok izolati poreklom iz okruženja rastu u formi malih kolonija (Palleroni, 2015). Varijacije u rastu od velikih ka malim kolonijama se povremeno sreću, dok su varijacije od malih ka velikim kolonijama ekstremno retke. Mukoidni tip kolonija u laboratorijama obrazuju izolati poreklom iz respiratornog i urinarnog trakta obolelih ljudi i životinja (Palleroni, 2015). Kolonije *P. aeruginosa* imaju karakterističan miris na voće usled prisustva aminoacetofenona (Milic i sar., 2017). Većina sojeva daje jasnu zonu hemolize na krvnom agaru (Markey i sar., 2013). Jedna od glavnih karakteristika ove bakterije je proizvodnja plavozelenog pigmenta piocijanina (Slika 1). Pored piocijanina, ova vrsta proizvodi još tri vrste pigmentata: pioverdin, piorubrin i piomelanin. Međutim, dok neki sojevi mogu proizvoditi sve četiri vrste pigmentata, neki sojevi ne proizvode pigmente (Markey i sar., 2013). *Pseudomonas aeruginosa* je oksidaza i katalaza pozitivna bakterija, ne fermentiše glukozu, redukuje nitrate, proizvodi gas iz nitrata, ureaza je varijabilan i razlaže želatin (Markey i sar., 2013). Raste na MacConeky agaru u vidu bleđih kolonija (ne fermetiše laktozu iz medijuma) (Palleroni, 2015).



Slika 1. Rast *P. aeruginosa* a) na Luria Bertani agaru, b) u Luria Bertani bujonu.

Za ispitivanje metaboličkih i funkcionalnih karakteristika, kao i za genetičke analize vrste *P. aeruginosa* u laboratoriji se već decenijama koristi soj *P. aeruginosa* PAO1 iz laboratorije dr Brusa Holoveja iz Australije (Bruce Holloway). Ovaj soj vodi poreklo od izolata *P. aeruginosa* PAO (*Pseudomonas aeruginosa* One) koji je izolovan

iz rane pacijenta u bolnici u Melburnu, Australija (Klockgether *i sar.*, 2010). Genom *P. aeruginosa* PAO1 dužine 6,3 Mb je kompletno sekvenciran 2000. godine (Stover *i sar.*, 2000). Udeo parova G+C (guanin i citozin) u genomu soja *P. aeruginosa* PAO1 iznosi 67%. Ova činjenica je dodatno popularizovala soj PAO1, i otkrila da u laboratorijama širom sveta postoje posebne linije ovog soja čiji se fenotipovi razlikuju usled razlika u genomu (Klockgether *i sar.*, 2010).

2.1.3. Rasprostranjenost *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je ubikvitarna vrsta sposobna da kolonizuje različite ekološke niše, kao što su rizosfera i fitosfera biljaka, zemljište i gotovo sva vodena staništa (Deredjian *i sar.*, 2014). Ova vrsta može biti prisutna u fecesu, orofarinksu i na koži zdravih ljudi i životinja (Kerr i Snelling, 2009). Veoma često se sreće i u bolnicama na sanitarnoj opremi, medicinskoj opremi i opremi za čišćenje (Streeter i Katouli, 2016). Najčešći načini prenošenja ove vrste na pacijente u bolnicama su ingestija, direktni i indirektni kontakti, inhalacija aerosola iz izvora kontaminirane vode kao i aspiracija kontaminirane vode (Streeter i Katouli, 2016). Širenje sojeva *P. aeruginosa* među domaćim životinjama je najčešće putem kontaminirane pijaće i tehničke vode, a ređe direktnim kontaktom (Kidd *i sar.*, 2011; Osborne *i sar.*, 1981; Prasad *i sar.*, 1967).

Kako je ovu vrstu moguće izloviti sa svih vrsta materijala i iz svih ekoloških niša, vrlo je važno utvrditi kada je ova vrsta uzročnik infekcije, a kada sastavni deo normalne mikrobiote (Trautmann *i sar.*, 2005). Osim toga, ukoliko je ova vrsta uzročnik infekcije, važno je utvrditi da li je soj koji je infekciju izazvao endogenog ili egzogenog porekla (Smith *i sar.*, 2006). Upotrebom molekularnih metoda došlo se do zaključka da je horizontalni put prenošenja uzročnika najvažniji način prenošenja *P. aeruginosa* na odeljenjima intenzivne nege u bolnicama (Blanc *i sar.*, 2007).

2.2. *Pseudomonas aeruginosa* kao uzročnik infekcija

Pseudomonas aeruginosa izaziva brojna oboljenja uglavnom kod imunokompromitovanih ljudi i u poređenju sa drugim oportunističkim bakterijama ova oboljenja su praćena visokom stopom morbiditeta i mortaliteta (Driscoll *i sar.*, 2007).

Kod životinja *P. aeruginosa* izaziva čitav niz blažih oboljenja, osim u slučaju kanadske kune kod koje je pseudomonasna pneumonija praćena visokom stopom smrtnosti (Westman *i sar.*, 2010).

2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* kao uzročnik infekcija kod životinja

Pseudomonas aeruginosa se sreće u svim okruženjima u kojima žive životinje. Kod domaćih životinja ova bakterija može, usled loših uslova gajenja, dovesti do velikih ekonomskih gubitaka. Najčešća oboljenja životinja izazvana vrstom *P. aeruginosa* data su u tabeli 2.

Kod goveda *P. aeruginosa* ima važnu ulogu u nastanku epizootskih i enzootskih mastitisa (Crossman i Hutchinson, 1995; Osborne *i sar.*, 1981). Najčešće je reč o sojevima *P. aeruginosa* poreklom iz vode kojom se peru papile pre muže ili je reč o sojevima poreklom sa kontaminiranih intramamarnih injektora za aplikaciju lekova. *Pseudomonas aeruginosa* dovodi do ekonomskih gubitaka usled smanjenog prinosa mleka, kvaliteta u pogledu sastojaka i činjenice da se takvo mleko ne može koristiti u industriji (Hye *i sar.*, 2014). Respiratorne infekcije izazvane sojevima *P. aeruginosa* su relativno česte kod teladi i obično su udružene sa još nekom bakterijskom ili virusnom infekcijom (Prasad *i sar.*, 1967).

Pseudomonas aeruginosa je čest uzročnik infekcija genitalnog trakta kod konja (Quinn *i sar.*, 2011). Infektivni endometritis izazvan vrstom *P. aeruginosa* je važno genitalno oboljenje konja koje dovodi do pobačaja, smanjene fertilitnosti kobila i velikih ekonomskih gubitaka u konjarstvu (Kidd *i sar.*, 2011). Dugo vremena se smatralo da je koitus način prenošenja sojeva *P. aeruginosa* između kobila i pastuva, i genitalne infekcije izazvane sojevima *P. aeruginosa* su tretirane kao venerične bolesti. Međutim, utvrđeno je da se *P. aeruginosa* među konjima širi preko kontaminirane vode u konjušnicama (Allen *i sar.*, 2011). Veliki problem u konjarstvu predstavljaju traumatske ili hirurške rane. Traumatske rane su češće, smanjuju fizičku sposobnost konja i najčešće podležu kontaminaciji, što dodatno onemogućava pravilno zarastanje. Važan patogen u mikrobioti takvih rana kod konja je *P. aeruginosa* (Westgate *i sar.*, 2010). Kod hroničnih traumatskih rana, *P. aeruginosa* dovodi do stvaranja biofilma.

Pseudomonas aeruginosa ima veoma važnu ulogu u patogenezi oboljenja nazvanog „truljenje runa ovaca” (*eng. fleece rot*), koje se javlja usled konstantnog

vlaženja runa i kože ovaca tokom dugih kišnih sezona u Engleskoj i Australiji (Kingsford i Raadsma, 1997). Oboljenje počinje kao blagi dermatitis, ali se komplikuje bakterijskom kontaminacijom vodom macerirane kože. Pilocijanin prebojava runo duž kičme ovaca, što uz obilan eksudat predstavlja jednu od karakteristika ovog oboljenja (Slika 2) (Quinn *i sar.*, 2011). Ispitivanja su pokazala da je dominantna bakterijska vrsta izolovana iz ovih kožnih lezija *P. aeruginosa*, ali je potvrđeno prisustvo i drugih vrsta iz roda *Pseudomonas* (Kingsford i Raadsma, 1995). Uz činjenicu da ovo oboljenje oštećuje runo ovaca i dovodi do značajnih ekonomskih gubitaka, veoma je važno pomenuti da pseudomonasni eksudativni dermatitis ovaca predstavlja veoma povoljnu sredinu za razvoj kožne forme mijaze, što dodatno komplikuje oboljenje i otežava izlječenje (Kingsford i Raadsma, 1997).

Mastitis kod koza i ovaca izazvan bakterijom *P. aeruginosa* je još jedno važno oboljenje koje se može javiti u postpartusu ili u periodu zasušenja ovaca, odnosno koza, a prati ga klinička ili subklinička intramamarna infekcija (Scaccabarozzi *i sar.*, 2015).

Kod svinja, *P. aeruginosa* je uzročnik infekcija različitih delova respiratornog trakta. Najčešće je reč o koinfekciji sa nekom drugom bakterijom, kao što je *Pasteurella multocida* ili nekom virusnom infekcijom svinja. Zabeleženi su i slučajevi infekcije spoljašnjeg uha kod svinja izazvani vrstom *P. aeruginosa* (Westman *i sar.*, 2010).

Kod reptila, posebno zmija držanih u neadekvatnim uslovima u zoo vrtovima i privatnim kolekcijama, registrovan je u više navrata nekrotični stomatitis izazvan vrstom *P. aeruginosa* (Quinn *i sar.*, 2011). Najverovatnije je reč o endogenoj infekciji, jer je *P. aeruginosa* izolovan iz oralnih i kloakalnih briseva zdravih zmija (Draper *i sar.*, 1981). Međutim, *P. aeruginosa* se često izoluje iz zagađene vode u vivarijumu, što u slučaju imunokompromitovanih zmija dovodi do razmnožavanja ove bakterije na koži, odnosno u usnoj duplji zmija, a to govori u prilog egzogenoj infekciji (Lukac *i sar.*, 2013).

Krznašice (kune, rakuni, tvorovi, činčile) su posebno osetljive na respiratorne infekcije izazvane vrstom *P. aeruginosa* (Long *i sar.*, 1980). Hemoragična pneumonija, kao najteži oblik pseudomonasne infekcije dovodi do uginuća i do 50 % kanadskih kuna (*N. vison*) na farmama krznašica (Qi *i sar.*, 2014). Mada razlozi nisu jasni, kanadska kuna je jedina životinjska vrsta koja je u toj meri osetljiva i podložna akutnoj, zaraznoj i teškoj infekciji pluća izazvanoj vrstom *P. aeruginosa*. Interesantno je da je

pseudomonasna pneumonija kanadskih kuna sezonsko oboljenje koje se javlja od septembra do ranog decembra i da je glavna karakteristika iznenadna smrt uz prisustvo krvi oko nozdrva i usta (Salomonsen *i sar.*, 2013). *Pseudomonas aeruginosa* se na farmama krznašica širi veoma brzo, a najčešće preko vode, podloga za kaveze i hranilica (Qi *i sar.*, 2014).

Na farmama brojlera, usled pojave respiratornih infekcija izazvanih sojevima *Mycoplasma gallisepticum* ili *Escherichia coli* i nekim respiratornim virusima, *P. aeruginosa* se može javiti kao najvažniji sekundarni patogen koji pojačava respiratornu infekciju i dovodi do još većih gubitaka (Devriese *i sar.*, 1975).

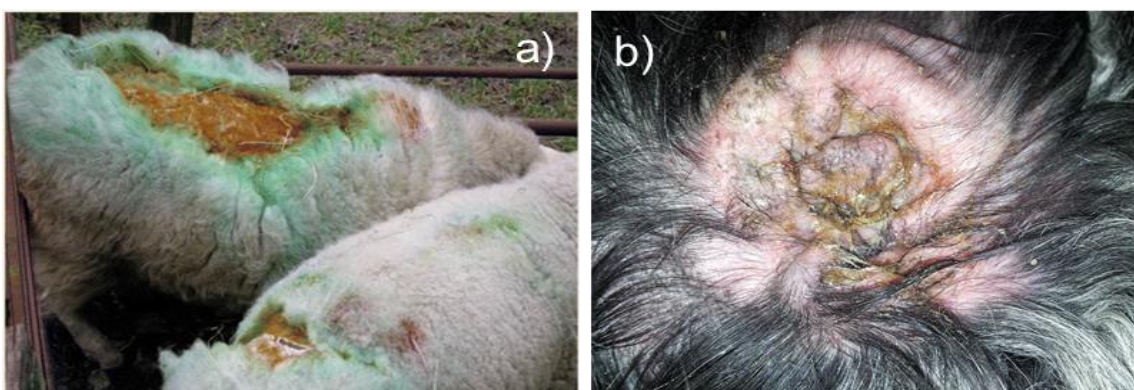
Zapaljenje spoljašnjeg uha je najčešće oboljenje uha pasa multifaktorijalne etiologije. Posebno su osetljivi psi koji imaju duge i spuštene uši, kod kojih se usled slabe ventilacije stvaraju pogodni uslovi za nastanak infekcije. Najvažnija Gram-negativna vrsta bakterije koja dovodi do infekcije spoljašnjeg uha je *P. aeruginosa* (De Martino *i sar.*, 2016). *Pseudomonas aeruginosa* nije deo saprofitne mikrobiote spoljašnjeg uha pasa i mačaka i kada je prisutan, uz sadejstvo promenjenih faktora sredine, može dovesti do ulceracija i ozbiljnih infekcija (Pye *i sar.*, 2013). Oboljenje protiče sa edemom ušne školjke, neprijatnim mirisom i eksudatom koji usled prisustva pigmenta piocijanina poprima zelenkastu boju. Dodatnu komplikaciju u terapiji ovog oboljenja predstavlja sve češća pojava multirezistentnih sojeva *P. aeruginosa* (Mekić *i sar.*, 2011).

Pseudomonas aeruginosa je povremeni pratilac bakterijskih oboljenja kože, a u slučaju dubokih piodermija, moguće ga je izolovati zajedno sa *E. coli* (Hillier *i sar.*, 2006).

Pseudomonas aeruginosa može biti uzročnik oboljenja delova oka kod pasa kao što su: blefaritis, konjunktivitis, keratitis, skleritis, horioretinitis, endoftalmitis i orbitalni celulitis (Ledbetter *i sar.*, 2009). Najteže oboljenje oka izazvano sojevima *P. aeruginosa* je ulcerozni keratitis koji se manifestuje brzim tokom i gubitkom vida koji može da bude trajan. Otkriveno je da postoje tri različita fenotipa *P. aeruginosa* koja na različite načine izazivaju keratitis kod pasa. Sojevi iz grupe I proizvode ekstracelularne faktore virulencije koji dovode do citolize i akutnog keratitisa, sojevi iz grupe II se razmnožavaju intracelularno u ćelijama rožnjače i izazivaju ulcerozni keratitis, dok sojevi iz grupe III dovode do blagog i prolaznog keratitisa (Ledbetter *i sar.*, 2009).

Tabela 2. Najčešća oboljenja životinja izazvana vrstom *P. aeruginosa* (preuzeto i prilagođeno iz referenci Markey *i sar.*, 2013 i Westman *i sar.*, 2010).

Vrsta životinja	Oboljenja
Goveda	Mastitis, metritis, enteritis, artritis, respiratorne infekcije, botriomikoza
Konji	Endometritis, metritis, ulcerozni keratitis, pneumonija, abscesi, pobačaji
Ovce	Mastitis, pneumonija, zapaljenje srednjeg uha, rinitis, eksudativni bakterijski dermatitis (<i>eng.</i> fleece rot)
Koze	Mastitis
Svinje	Respiratorne infekcije, zapaljenje spoljašnjeg uha, zapaljenje srednjeg uha, enteritis
Psi i mačke	Zapaljenje spoljašnjeg uha, cistitis, pneumonija, ulcerativni keratitis, infekcije urinarnog trakta, duboka piodermija
Činčile	Septikemija, pneumonija, konjunktivitis, enteritis, zapaljenje srednjeg i unutrašnjeg uha, abortusi
Kanadska kuna	Septikemija, hemoragična pneumonija
Laboratorijski glodari	Septikemija, enteritis
Živina	Septikemija, keratitis
Reptili (zoo vrtovi)	Nekrotični stomatitis



Slika 2. Infekcije izazvane vrstom *P. aeruginosa*: a) dermatitis kod ovaca (fotografija preuzeta iz izveštaja „Veterinary Laboratories Agency’s (VLA) disease surveillance report for England and Wales” (VLA, 2006), b) *Otitis externa* kod psa (fotografija dobijena ljubaznošću zaposlenih u ambulanti za kožne bolesti Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu).

2.2.2. *Pseudomonas aeruginosa* kao uzročnik infekcija kod ljudi

Oboljenja koja izaziva *P. aeruginosa* kod ljudi možemo podeliti na ona koja nastaju van bolnica (*eng. community-acquired*) i na nozokomijalna oboljenja koja nastaju kod hospitalizovanih pacijenata (*eng. hospital-acquired*) (Driscoll *i sar.*, 2007). Za nastanak infekcija čiji je uzročnik *P. aeruginosa* kod ljudi neophodni su predisponirajući faktori (Tabela 3).

Oboljenja izazvana vrstom *P. aeruginosa* koja nisu direktno povezana sa hospitalizacijom dele se na grupu oboljenja koja nastaju usled bakterijske kontaminacije korišćenjem zajedničkih prostorija, javnih bazena ili kupatila i na grupu oboljenja koja nastaju usled postojanja individualnih predisponirajućih faktora (npr. mutacija gena kod obolelih od cistične fibroze) (Kerr i Snelling, 2009).

Ulcerozni keratitis povezan sa upotrebom kontaktnih sočiva, oboljenje „zeleni nokat”, sindrom vrućeg stopala povezan sa rekreativnim korišćenjem sauna ili javnih bazena, septički artritis malih zglobova, zapaljenje spoljašnjeg uha („plivačko uho”) i pneumonija kod imunokompromitovanih pacijenata neka su od oboljenja koja mogu izazvati ozbiljne posledice, a povezana su sa korišćenjem javnih površina (Kerr i Snelling, 2009).

S druge strane mutacije određenih gena, kao što je slučaj kod oboljenja cistične fibroze, stvaraju preduslove za kolonizaciju tkiva bakterijom *P. aeruginosa* usled promene u fiziologiji i arhitekturi samog tkiva. Slična situacija je i kod pacijenata koji boluju od dijabetesa, kod kojih rane teško zarastaju, jer se po pravilu kontaminiraju vrstom *P. aeruginosa* (Driscoll *i sar.*, 2007; Kerr i Snelling, 2009).

Najvažnija oboljenja izazvana vrstom *P. aeruginosa* su ona koja nastaju kao sekundarna, tokom hospitalizacije pacijenta (Garnacho-Montero, 2012). Bolnička infekcija (intra-hospitalna ili nozokomijalna infekcija) je infekcija nastala kod pacijenata i osoblja u bolnici ili nekoj drugoj zdravstvenoj ustanovi (Garner *i sar.*, 1988).

Pseudomonas aeruginosa može biti uzročnik nozokomijalnih infekcija u svim bolnicama i na svim odeljenjima. Podaci govore da je 11% do 13,8% svih nozokomijalnih infekcija, kod kojih je dijagnostifikovan uzročnik, posledica infekcija izazvanih sojevima *P. aeruginosa*, a taj broj je još veći na odeljenjima intenzivne nege (12,2% do 22,6%) (Driscoll *i sar.*, 2007). Prema podacima Evropskog centra za kontrolu i prevenciju bolesti za 2015. godinu, najčešća nozokomijalna infekcija bila je

intrahospitalna pneumonija i to u 98% slučajeva kod intubiranih pacijenata ili pacijenata sa plasiranim urinarnim kateterom. Najčešći uzročnik bio je *P. aeruginosa* (ECDC, 2017).

Infekcije respiratornog trakta su među najčešćim i najvažnijim nozokomijalnim infekcijama kada je reč o učestalosti, morbiditetu i mortalitetu (Cavalcanti *i sar.*, 2005). *Pseudomonas aeruginosa* je čest uzročnik pneumonija nastalih kao posledica nepoštovanja osnovnih principa higijene i prakse (*eng.* hospital-associated pneumonia – HAP) i pneumonija nastalih kod intubiranih pacijenata na mehaničkoj ventilaciji (*eng.* ventilator-associated pneumonia – VAP) (Driscoll *i sar.*, 2007). *Pseudomonas aeruginosa* je najčešći krivac za visoki mortalitet (i do 50%) kod intubiranih pacijenata sa razvijenom intrahospitalnom pneumonijom (Berra *i sar.*, 2010). Respiratorne intrahospitalne pneumonije izazvane vrstom *P. aeruginosa* česte su i kod pacijenata sa hroničnom obstruktivnom bolesti pluća, kao i kod pacijenata sa malignim oboljenima (Streeter i Katouli, 2016).

Kod zdravih osoba, verovatnoća infekcije je veoma mala zahvaljujući odbrambenom mehanizmu koji onemogućava kolonizaciju respiratornog trakta sojevima *P. aeruginosa*, uprkos velikoj verovatnoći da će doći do kontakta sa ovom bakterijom. Međutim, u bolničkim uslovima, posebno kada je potrebna intubacija pacijenata, dolazi do narušavanja integriteta tkiva i slabljenja odbrambene funkcije, što predstavlja predisponirajuće faktore za nastanak pseudomonasnih infekcija (Berra *i sar.*, 2010).

Teške intrahospitalne pneumonije sa lošom prognozom javljaju se kod pacijenata sa cističnom fibrozom (CF). Mehanizam kojim *P. aeruginosa* kolonizuje respiratorni trakt pacijenta sa CF uslovljen je patogenezom ove nasledne bolesti. Bolest nastaje usled mutacije gena koji kodira sintezu CFTR proteina koji ima ulogu hloridnog kanala i koji je odgovoran za homeostazu epitelnog tkiva. Poremećaj funkcije ovih kanala dovodi do poremećaja u regulaciji transporta hloridnih jona kroz epitel što dovodi do hiperapsorbicije natrijuma i poremećaja mukocilijarnog transporta (Tolker-Nielsen, 2014).

Pseudomonas aeruginosa inicijalno kolonizuje paranazalne sinuse i potom se spušta u niže delove respiratornog trakta. Zanimljivo je da je kolonizacija respiratornog trakta u početku povremena i obuhvata veći broj različitih sojeva *P. aeruginosa*. Na

kraju, do hronične infekcije dovedu jedan ili nekoliko sojeva. Sposobnost da proizvodi biofilmove je jedan od glavnih razloga zašto *P. aeruginosa* uspeva da preživi u plućima pacijenata uprkos snažnom imunološkom odgovoru i intenzivnoj antibiotskoj terapiji (Tolker-Nielsen, 2014). Prisustvo mikroorganizma u plućima dovodi do pojačane migracije polimorfonuklearnih leukocita i produkcije antitela, što za posledicu ima oslobađanje velike količine enzima i faktora inflamacije. Pošto imunološki odgovor domaćina nije u stanju da ukloni pseudomonasni biofilm, dolazi do lize velike količine leukocita i na taj način se oslobađa DNK koja ima veliku molekulsku težinu i koja u lumenu disajnih puteva povećava viskoznost endobrohijalnog sekreta, što zajedno sa poremećajem mukocilijarnog transporta potpomaže daljem nastavku infekcije (Tolker-Nielsen, 2014).

Nozokomijalne infekcije urinarnog trakta izazvane bakterijom *P. aeruginosa* povezane su sa upotrebom urinarnih katetera, operacijama urinarnog trakta i prethodnom antibiotskom terapijom (Mittal *i sar.*, 2009). Prema podacima Evropskog centra za kontrolu i prevenciju bolesti (ECDC, 2017), *P. aeruginosa* je četvrti po redu uzročnik nozokomijalnih urinarnih infekcija na odeljenjima intenzivne nege. Aplikacija urinarnog katetera povlači za sobom fizičko oštećenje tkiva i narušavanje integriteta i protektivne funkcije mukoze uroepitela, a nemogućnost kompletnog pražnjenja mokraćne bešike stvara povoljne uslove za razmnožavanje bakterija (Mittal *i sar.*, 2010).

Infekcije rana, nastalih usled teških opekotina ili trauma, su često posledica kolonizacije oštećenog tkiva multirezistentnim sojevima *P. aeruginosa* i samim tim povezane su sa visokom stopom smrtnosti (Streeter i Katouli, 2016). Pored multirezistencije sojeva javlja se i problem formiranja biofilma. Bakterija obloži ranu biofilmom kroz koji je nemoguće delovati antibakterijskim agensima (Tolker-Nielsen, 2014). *Pseudomonas aeruginosa* je često uzročnik infekcija hroničnih rana koje uglavnom nastaju u vezi sa patofiziološkim poremećajima kao što su: ishemija, dijabetes ili hronično oboljenje vena (Tolker-Nielsen, 2014). Za razliku od inflamacije kod akutnih rana koja je samoograničavajući proces, inflamacija kod hroničnih rana vodi ka daljem oštećenju tkiva koje za rezultat ima kontinuiranu inflamaciju. U hroničnim ranama *P. aeruginosa* formira biofilm koji dodatno komplikuje zalečenje procesa. Dokazano je da su hronične rane kontaminirane sojevima *P. aeruginosa* veće i

pokazuju jači inflamatorni odgovor nego rane kontaminirane drugim vrstama mikroorganizama (Tolker-Nielsen, 2014). Kod hospitalizovanih pacijenata sa hroničnim ranama može doći do unakrsne kontaminacije i razmene sojeva bakterije *P. aeruginosa* između pacijenata, između pacijenata i medicinskog osoblja ili između pacijenata i okoline (McFee, 2009). Pseudomonasne infekcije operativnih rana su često dijagnostikovane kod pacijenata podvrgnutih amputaciji ili abdominalnoj hirurgiji (Breathnach, 2009). Kao nepovoljni ishod ovih infekcija može doći do sepse. Moguća komplikacija hirurških zahvata na oku je pojava pseudomonasnog keratitisa (Streeter i Katouli, 2016).

Najtežu komplikaciju nozokomijalnih pseudomonasnih infekcija predstavlja prelazak *P. aeruginosa* u krv što dovodi do bakterijemije, septikemije i septičkog šoka. Tok ovih patoloških stanja je sličan kao i kod drugih oboljenja izazvanih Gram-negativnim bakterijama (Majumdar i Padiglione, 2012).

Tabela 3. Najčešće infekcije izazvane vrstom *P. aeruginosa* kod ljudi i najvažniji faktori rizika za njihov nastanak (preuzeto i prilagođeno iz reference Gellatly i Hancock, 2013).

Infekcije	Glavni faktori rizika
Infekcije mekih tkiva	Opekotine , otvorene rane svih vrsta, operativne rane
Infekcije urinarnog trakta	Korišćenje urinarnog katetera
Bakterijemija	Imunosupresija
Dijabetesno stopalo	Dijabetes, opstrukcija mikrocirkulacije
Infekcije respiratornog trakta	Starost, hronična opstruktivna bolest pluća, cistična fibroza, pacijenti na mehaničkoj ventilaciji
Zapaljenje spoljašnjeg uha („plivačko uho”)	Oštećenje tkiva uha, prisustvo vode u uhu
Keratitis (infekcija rožnjače)	Prekomerno korišćenje kontaktnih sočiva, kontaminacija tečnosti u kojoj se čuvaju kontaktna sočiva
Zapaljenje srednjeg uha i folikulitis	Kontaminirana voda u džakuži kadama

2.3. Patogeneza pseudomonasne infekcije i faktori virulencije neophodni za njeno uspostavljanje

2.3.1. Patogeneza pseudomonasne infekcije

Patogeneza pseudomonasne infekcije je kompleksan i multifaktorijski proces koji može biti podjeljen u tri etape (Westman *i sar.*, 2010): a) kolonizacija i adhezija bakterija u tkivima i organima; b) umnožavanje bakterija i lokalna infekcija; c) sistemska infekcija.

Prva etapa u uspostavljanju infekcije je kolonizacija tkiva koju *P. aeruginosa* postiže uz pomoć flagele i pila, proteinskih struktura bakterijske ćelije neophodnih za kretanje bakterija i adheziju na odgovarajućem mestu. U inicijalnoj fazi uspostavljanja infekcije važnu ulogu igra i lipopolisaharid iz bakterijskog omotača koji je odgovoran za vezivanje bakterija za ćelije domaćina, ali i za zaštitu od imunološkog odgovora domaćina (Westman *i sar.*, 2010).

Dalji razvoj događaja prati umnožavanje bakterija na mestu uspostavljanja infekcije i produkcija senzornih signala koji, u momentu kada bakterijska populacija dostigne kritičan broj, postaju pozitivni regulatori ekspresije faktora virulencije neophodnih za savladavanje imunološkog sistema domaćina i oštećenje njegovih ćelija i tkiva. Najvažiji ekstracelularni faktori virulencije koji učestvuju u ovoj etapi razvoja pseudomonasne infekcije su: egzotoksin A, elastaze, proteinaze, ramnolipidi, piocijanin, hemolizini, kao i egzotoksini koje luči sekrecioni sistem tipa III. Svi oni su značajni za infekciju, jer narušavaju integritet ćelijske membrane, citotoksični su i inaktiviraju imunološke mehanizame domaćina (Kipnis *i sar.*, 2006).

Sistemska infekcija se može nadovezati na lokalnu kada bakterija uspe da savlada imunološki sistem domaćina. Za uspostavljanje sistemske infekcije važan je endotoksin (lipidna komponenta lipopolisaharida) koji stimuliše proizvodnju metabolita arahidonske kiseline (prostaglandina i leukotrijena) i produkciju citokina (TNF- α) što rezultira simptomima endotoksemije: groznicom, hipotenzijom, oligurijom, leukopenijom i diseminovanom intravaskularnom koagulacijom (Westman *i sar.*, 2010).

Opisani prikaz etapa u patogenezi infekcije *P. aeruginosa* odgovara akutnim pseudomonasnim infekcijama. Tokom razvoja hronične pseudomonasne infekcije

bakterija se prilagođava novonastalim uslovima i menja „životni stil” prelaskom sa planktonskog načina života na život u formu biofilma (Lee i Yoon, 2017).

2.3.2. Faktori virulencije *P. aeruginosa*

U osnovi mehanizama patogenosti *P. aeruginosa* nalazi se veliki broj faktora virulencije i sekundarnih metabolita. Ovi faktori mogu biti grupisani kao faktori virulencije povezani sa bakterijskom ćelijom (flagela, pili i LPS), faktori virulencije sekretovani van ćelije (egzotoksin A, proteinaze, elastaze, piocijanin, pioverdin, ramnolipidi) i sekrecioni sistemi tipa I, II i III. Razvoj akutne, odnosno hronične pseudomonasne infekcije usko je povezan sa postojanjem brojnih regulatornih sistema koji prikupljaju signale iz okoline i moduliraju ekspresiju gena virulencije (Moradali *i sar.*, 2017). Sposobnost formiranja biofilma je faktor virulencije koji objedinjuje strukture neophodne za pokretljivost bakterije, sposobnost sekrecije i razgranatu mrežu međućelijske komunikacije (Moradali *i sar.*, 2017).

2.3.2.1. Međubakterijska komunikacija (*quorum sensing*)

Sve do druge polovine XX veka bakterije su smatrane solitarnim organizmima, „gluvinim” na prisustvo drugih bakterija iste ili druge vrste u svom okruženju (Bassler i Losick, 2006). Ovu tvrdnju prvi je opovrgao Nilson (Nealson *i sar.*, 1970) koji je radeći sa bakterijama iz roda *Vibrio* (*Vibrio fischeri* i *Vibrio harveyi*) zaključio da postoji neki ekstracelularni faktor u supernatantu bakterijskih kultura koji utiče na sposobnost ovih vrsta da produkuju enzim luciferazu, koji je odgovoran za bioluminiscenciju. Taj ekstracelularni faktor je nazvan autoinducer (signalni molekul), a Eberhard je 1981. godine opisao njegovu hemijsku strukturu (Eberhard *i sar.*, 1981). Više od dve decenije od otkrića Nilsona, sposobnost bakterija da koordinišu ekspresiju svojih gena sa drugim bakterijama smatrana je izuzetkom koji se sreće kod nekoliko vrsta ali danas se zna da je međubakterijska komunikacija karakteristika gotovo svih do sada poznatih bakterijskih vrsta (Bassler i Losick, 2006).

Međubakterijska komunikacija se može definisati kao globalni regulatorni sistem koji koordiniše ekspresiju gena kao odgovor na promene gustine bakterijske populacije koristeći male signalne molekule (Bassler, 2002). Mnogi fiziološki procesi kod bakterija su regulisani međubakterijskom komunikacijom (bioluminiscencija,

pokretljivost, sporulacija, proizvodnja antibiotika, konjugacija, kao i procesi neophodni za interakciju patogena sa domaćinom) (Antunes *i sar.*, 2010; Miller i Bassler, 2001). U medicinskoj mikrobiologiji veoma je važan podatak da ovaj regulatorni sistem reguliše i produkciju faktora virulencije i formiranje biofilmova (Donlan i Costerton, 2002).

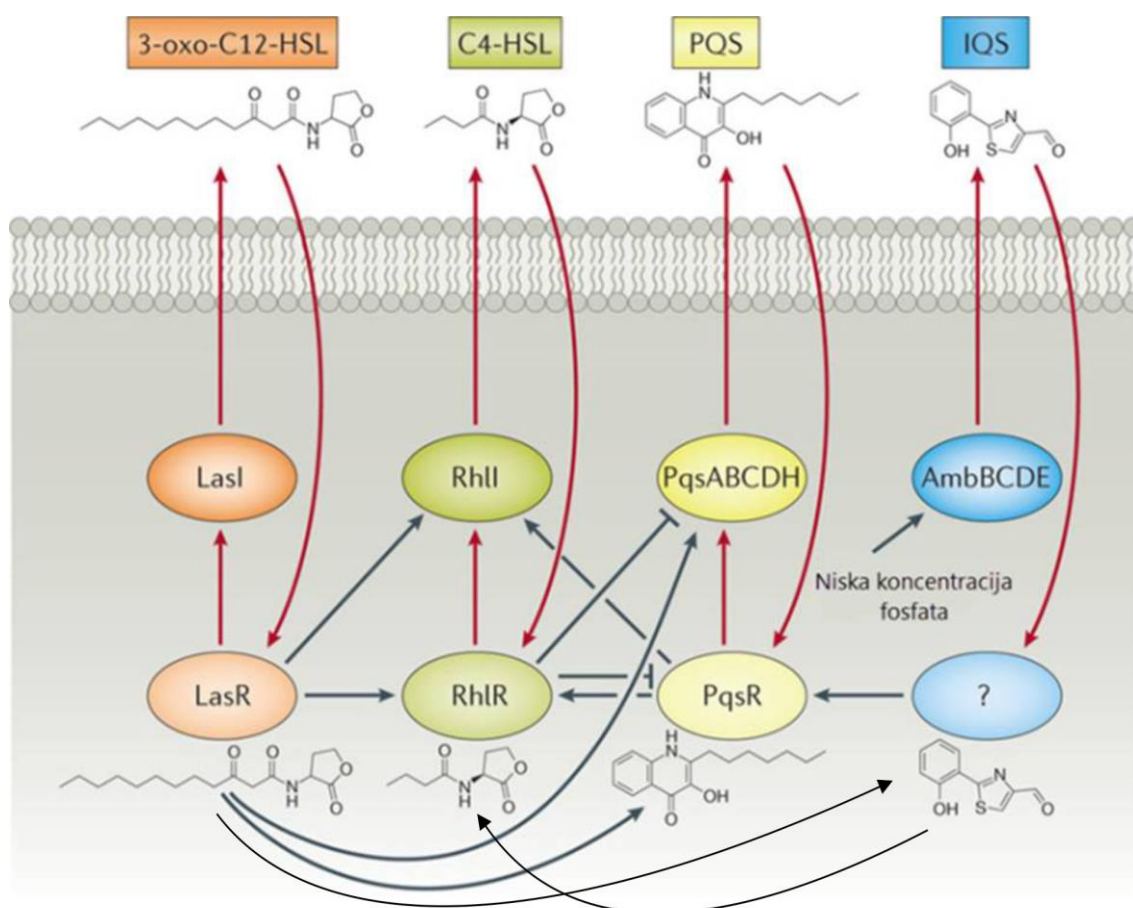
Uprkos razlikama u regulatornim komponentama i molekularnim mehanizmima, u osnovi svih sistema međubakterijske komunikacije leže tri principa:

1. Bakterijske ćelije u okviru zajednice proizvode signalne molekule (autoinducere, AI). Pri niskoj gustini populacije AI su prisutni u koncentracijama ispod praga detekcije. Kada populacija dostigne određenu gustinu kumulativna produkcija uzrokuje porast koncentracije AI, što omogućava njihovu detekciju i odgovor (Kaplan i Greenberg, 1985);
2. Receptori koji se nalaze u citoplazmi ili na spoljašnjoj membrani detektuju AI;
3. Detekcija AI od strane receptora za posledicu ima aktivaciju ekspresije gena neophodnih za kooperativno ponašanje, kao i gena neophodnih za proizvodnju AI čime se stvara pozitivna povratna sprega, koja omogućava koordinisanu aktivnost bakterijske populacije (Kaplan i Greenberg, 1985).

Gram-negativne bakterije koriste acil-homoserin laktone (AHL) kao signalne molekule za čiju sintezu je zadužen enzim AHL sintetaza kodiran od strane *luxI* gena (Bassler i Losick, 2006). Molekul AHL se sastoji iz homoserin laktorskog prstena i alifatičnog niza dužine 4 do 18 ugljenikovih atoma, vezanog amidnom vezom za homoserin laktoski prsten (Papenfort i Bassler, 2016). Jezgro molekula koji čini homoserin laktoski prsten je konstantno za sve vrste AHL, dok razlike između AHL molekula koje proizvode različite bakterije postoje u dužini acilnog lanca (Fuqua i Greenberg, 2002). Razlike između AHL molekula mogu biti povezane sa razlikama na trećem ugljenikov atom acilnog lanca koji može biti oksidovan, potpuno redukovan ili nositi hidroksilnu grupu (Fuqua i Greenberg, 2002). Supstrat za sintezu AHL molekula predstavlja S-adenozil metionin. Enzim AHL sintetaza premešta acil grupu sa proteina nosača acil grupe (eng. acyl carrier protein) na metionin u sklopu S-adenozil metionina. Laktonizacijom međuprodukta dobija se AHL molekul (Bassler, 2002). S-adenozil metionin i protein nosač acil grupe su česti međuproizvodi nekoliko važnih

metaboličkih procesa u ćelijama bakterija (Streips i Yasbin, 2002). Molekuli AHL sa kratkim acil lancima slobodno difunduju kroz ćelijsku membranu, dok molekuli AHL sa dužim acil lancima zahtevaju efluks pumpu za njihovo izbacivanje iz ćelije (Asad i Opal, 2008). Receptor za AHL molekule je LuxR protein koji se nalazi u citoplazmi bakterijske ćelije i funkcioniše po principu AHL-zavisnih transkripcionih aktivatora. Vezivanje acil-homoserin laktona za receptore uzrokuje njihovu, stabilizaciju, dimerizaciju i vezivanje za regulatorne elemente ciljnih gena (Papenfort i Bassler, 2016).

Pseudomonas aeruginosa poseduje najmanje četiri različita sistema međubakterijske komunikacije koji su međusobno povezani i integrisani u hijerarhijsku regulatornu mrežu (Slika 3). Svaki od sistema koristi hemijski različite signalne molekule.



Slika 3. Hijerarhijska mreža međubakterijske komunikacije *P. aeruginosa*. Preuzeto i modifikovano iz reference Papenfort i Bassler, 2016.

Geni kontrolisani na ovaj način kod vrste *P. aeruginosa* kodiraju faktore virulencije, sintezu sekundarnih metabolita, kao i formiranje biofilmova (Venturi, 2006). Mreža međubakterijske komunikacije kod *P. aeruginosa* može da odgovori i na sredinske signale stresa, čime se omogućava fleksibilnost u kontroli ekspresije gena značajnih za virulenciju (Lee i Zhang, 2015).

Prvi sistem međubakterijske komunikacije kod *P. aeruginosa* otkiven je početkom devedesetih godina XX veka. Zbog činjenice da ovaj sistem pozitivno reguliše ekspresiju gena koji kodiraju elastaze (*lasA* i *lasB* geni) nazvan je Las sistem (LasR/LasI) (Rumbaugh *i sar.*, 2000).

Las sistem čine LasR transkripcioni aktivator (*lasR* gen), LasI sintaza (*lasI* gen) i negativni transkripcioni regulator protein RsaL (*rsaL* gen). LasR transkripcioni aktivator aktivira transkripciju i *lasI* i *rsaL* gena. Aktivacijom *lasI* gena dolazi do povećane transkripcije LasI sintaze. LasI produkuje *N*-(3-oksododekanoil)-L-homoserin lakton (3-okso-C12-HSL) koji specifičnim vezivanjem za LasR receptor reguliše ekspresiju elastaze, LasA proteaze, alkalne proteaze i egzotoksina A (Antunes *i sar.*, 2010). Ekspresija gena koji kodira LasI sintazu je regulisana kompleksom LasR-tri-oks-C12-HSL, tako da lakton indukuje sopstvenu sintezu i uspostavlja mehanizam pozitivne povratne sprege. Aktivacijom *rsaL* gena dolazi do aktivacije sinteze RsaL proteina koji negativno reguliše ekspresiju *lasI* i *rsaL* gena čime omogućava homeostazu laktone na dva načina: inhibicijom sekrecije laktone i inhibicijom sopstvene ekspresije (Rampioni *i sar.*, 2007). Na ovaj način koncentracija laktone se održava na graničnom nivou kako bi u slučaju potrebe bakterije mogle brzo i efikasno da koordinišu ekspresiju važnih gena. Utvrđeno je da 3-okso-C12-HSL pored funkcije signalnog molekula suprimira sekreciju IL-12 i TNF- α u makrofagima stimulisanim lipopolisaharidom *P. aeruginosa* i inhibira proliferaciju T limfocita (Pritchard, 2006).

Drugi sistem međubakterijske komunikacije kod *P. aeruginosa* otkriven je nedugo posle Las sistema i nazvan je Rhl sistem (RhlR/RhlI). RhlI sintaza produkuje *N*-butiril-L-homoserin lakton (C4-HSL), koji vezivanjem za receptor RhlR indukuje ekspresiju ramnolipida, elastaze, LasA proteaze, piocijanina, hemolizina, cijanovodonika, i citotoksičnih lektina PA-1 i PA-2 (Lazazzera i Grossman, 1998; Lee i Zhang, 2015). Rhl sistem aktivira transkripciju rpoS sigma faktora koji se smatra glavnim regulatorom bakterijskog odgovora na stres (Schuster *i sar.*, 2004).

Treći sistem međubakterijske komunikacije kod *P. aeruginosa* označen je kao PQS (eng. *Pseudomonas aeruginosa* Quinolone Signal) (Pesci *i sar.*, 1999). PQS sintaza produkuje 2-heptil-3-hidroksi-4-hinolon čiji su derivati dugo godina proučavani kao antibakterijska jedinjenja, a tek kasnije su identifikovani kao signalni molekuli kod bakterija. Mutacija u PQS sistemu za posledicu ima poremećaj u formiranju biofilmova i sintezi faktora virulencije kao što su pirocijanin, elastaza, PA-IL lektin i ramnolipidi (Lee i Zhang, 2015; Rumbaugh *i sar.*, 2000). Funkcionalni PQS sistem međubakterijske komunikacije je neophodan za punu virulentnost sojeva *P. aeruginosa* na model sistemima biljaka, miševa i nematoda (Lee i Zhang, 2015). Pored svoje uloge u kontroli ekspresije faktora virulencije, PQS je i snažan imunomodulator koji inhibira proliferaciju T limfocita (Skindersoe *i sar.*, 2009). Otkriveno je i da PQS molekuli imaju značajnu ulogu u metabolizmu gvožđa (Nadal Jimenez *i sar.*, 2012).

Četvrti sistem međubakterijske komunikacije kod *P. aeruginosa* označen je kao IQS (eng. Integrated Quorum Sensing System) i ima ulogu u integrisanju sredinskih signala sa kompleksnom mrežom međubakterijske komunikacije (Lee *i sar.*, 2013). Signalni molekul ovog sistema je strukturno okarakterisan kao 2-(2-hidroksi)-tiazol-4-karbaldehid (Lee i Zhang, 2015).

Sva četiri sistema međubakterijske komunikacije kod *P. aeruginosa* su inkorporirana u složenu hijerarhijsku mrežu (Slika 3). Las sistem međubakterijske komunikacije koordiniše aktivost Rhl, PQS i IQS dok je Rhl sistem pod kontrolom Las i PQS sistema (Lee i Zhang, 2015). Rhl sistem negativno reguliše PQS sistem, što govori da odnos između autoinducera C4-HSL i 3-okso-C12-HSL igra odlučujuću ulogu u aktivnosti PQS sistema (Pesci *i sar.*, 1999). PQS sistem aktivira Las i IQS sisteme, a on aktivira Rhl sistem, sa druge strane IQS sistem aktivira Las sistem, a on sam reguliše aktivnost PQS i Rhl sistema (Lee i Yoon, 2017). U uslovima nedostatka fosfata, IQS sistem može delimično da preuzme ulogu Las sistema, čime se objašnjava visoku incidenca LasI mutanata među kliničkim izolatima *P. aeruginosa* (Smith *i sar.*, 2006). Odnose između sistema komunikacije dodatno komplikuju regulacioni sistemi (proteini) od kojih treba spomenuti Vfr i GacS-GacA transkripcione aktivatore koji pozitivno regulišu Las i Rhl sisteme međubakterijske komunikacije povećavajući produkciju acil-homoserin laktona (Venturi, 2006). Svaki od sistema međubakterijske komunikacije može biti aktiviran pomoću određenih faktora sredine (smanjena količina hranljivih

sastojaka, mikroaerofilni uslovi, nedostatak gvožđa), kao i faktorima koje proizvode ćelije domaćina (Lee i Yoon, 2017)

2.3.2.2. Flagela

Pseudomonas aeruginosa poseduje jednu polarnu flagelu koja, šematski gledano, ima izgled biča i sastoji se od proteina flagelina kodiranog genom *fliC* i kapa proteina kodiranog genom *fliD* (Westman i sar., 2010). Monomeri flagelina su klasifikovani kao flagelin tip A i flagelin tip B na osnovu molekularne težine i reaktivnosti sa specifičnim antitelima (Westman i sar., 2010).

Flagela ima ulogu u modulaciji imunskog odgovora vezujući se za glikolipidne receptore (asialo GM1) epitelnih ćelija, što stimuliše proizvodnju interleukina-8 (IL-8) koji je aktivator i hemotaksin za neutrofile i makrofage (Feldman i sar., 1998). Inicijalna kolonizacija oštećenog epitela pri uspostavljanju akutne pseudomonasne infekcije zavisi od postojanja flagele, dok je ekspresija gena koji kodiraju flagelin znatno smanjena kod sojeva izolovanih iz hroničnih žarišta (Gellatly i Hancock, 2013). U *in vivo* eksperimentima je potvrđeno da sojevi sa mutacijom na *fliC* genu imaju slabiju virulentnost i dovode samo do fokalnih lezija u plućima tokom razvoja pseudomonasne pneumonije (Westman i sar., 2010).

Flagela omogućava bakteriji specifičan način pokretljivosti nazvan plivanje (*eng.* swimming motility). Reč je o rotirajućim, spiralnim pokretima flagele pomoću koje se bakterija kreće u tečnim i vlažnim okruženjima (Gellatly i Hancock, 2013). Ovaj način kretanja *P. aeruginosa* je solitarno ponašanje bakterijskih ćelija i nije povezano sa sistemima međubakterijske komunikacije (Kearns, 2010).

2.3.2.3. Pili

Pili su filamentozne ćelijske strukture koje se nalaze na polovima ćelijske membrane i smatra se da su najvažniji adhezivni elementi *P. aeruginosa* (Gellatly i Hancock, 2013). Pili *P. aeruginosa* predstavljaju prototip pila tipa IV, izgrađene su od monomera pilina koga kodira gen *pilA*, a ceo proces je pod kontrolom regulatornog sistema PilS-PilR i sigma faktora RpoN (Gellatly i Hancock, 2013). Pokretanje pila šematski može biti predstavljeno kao hvatanje kukica koje se grče i opuštaju, a ovi pokreti zavise od ATPaza proteina PilB, PilT i PilU (Westman i sar., 2010).

Glikosfingolipid asialo GM1, jedan od receptora za koji se pili vezuju je sastavni deo membrane epitelnih ćelija i posebno je eksprimiran u oštećenom epitelu (De Bentzmann *i sar.*, 1996).

Za punu virulentnost sojeva *P. aeruginosa* važan je karakterističan način pokretljivosti nazvan grčenje (*eng.* twitching motility). Reč je o kretanju koje je povezano sa posedovanjem pili tipa IV. Ovaj način pokretljivosti bakterija favorizuje na vlažnim i polučvrstim površinama (Westman *i sar.*, 2010). Sojevi koji imaju pile, ali nemaju sposobnost izvođenja pokreta grčenja (usled delecije gena *pilT* ili *pilU*) imaju smanjenu virulentnost uprkos sposobnosti da kolonizuju epitel (Zolfaghar *i sar.*, 2003).

Pored uloge u kolonizaciji tkiva, pili su zaduženi i za kolonizaciju abiotičkih površina kao što je nerđajući čelik ili polistiren (Donlan, 2002). Smatra se da je grčenje *P. aeruginosa* značajno, ali ne i neophodno za adheziju i inicijalne faze formiranja biofilma, ali da od postojanja pili zavisi agregacija bakterijskih ćelija i formiranje mikrokolonija na kolonizovanim površinama, odnosno tkivima (O'Toole i Kolter, 1998).

Zajedno sa flagelom pili učestvuju u još jednom tipu pokretljivosti nazvanom „rojenje” (*eng.* swarming). Reč je o brzom i koordinisanom translokaciji bakterijske populacije na čvrstoj površini (Rasika, 2003). Rojenje predstavlja kompleksnu adaptaciju bakterije na uslove sredine i regulisano je međubakterijskom komunikacijom kroz kontrolu produkcije i sekrecije ramnolipida koji imaju funkciju biosurfaktanata (Köhler *i sar.*, 2000). Ramnolipidi smanjuju površinsku tenziju prilikom kretanja, omogućavajući kretanje bakterijskih ćelija preko čvrste površine (Kearns, 2010). Rojenje ima značajnu ulogu u svim fazama formiranja biofilma (Hall-Stoodley *i sar.*, 2004).

2.3.2.4. Lipopolisaharidi

Lipopolisaharidi (LPS) su kompleksani glikolipidi i glavna komponenta spoljašnje membrane Gram-negativnih bakterija. Imaju ulogu u zaštiti bakterije od imunološkog sistema domaćina, posredovanju u direktnom kontaktu između ćelije domaćina i bakterije, kao i između bakterije i antibiotika, kao i u inicijaciji inflamatornog odgovora (King *i sar.*, 2009). Kao i kod drugih Gram-negativnih bakterija, posle smrti bakterijske ćelije dolazi do oslobađanja lipopolisaharidne

komponente, koja ako završi u krvi dovodi do endotoksemije. Cirkulišući endotoksin se vezuje za CD14 receptore i Toll-like receptore 4 na makrofagima, što dovodi do produkcije i oslobađanja velikog broja medijatora inflamacije kao što su: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 i IL-10 (Westman *i sar.*, 2010).

Lipopolisaharid se sastoji od hidrofobne komponente - lipida A, oligosaharidnog jezgra koje sadrži visoko konzervisane rezidue šećera i dugog lanca polisaharida, odnosno O antigena. Lipid A se sastoji od diglukozamina koji je fosforilisan i supstituisan masnim kiselinama i kao takav predstavlja okosnicu lipida A (Gellatly i Hancock, 2013). Broj, pozicija i priroda supstituenata na lipidu A varira među izolatima, a može se menjati u zavisnosti od uslova sredine. Oligosaharidno jezgro kod *P. aeruginosa* se sreće u dve forme: sa ili bez polisaharidnog lanca. Oligosaharidna jezgra za koje je vezan polisaharidni lanac čine takozvani „glatki LPS”, dok jezgra za koja nije vezan polisaharidni lanac čine takozvani „hrapavi LPS”. Struktura oligosaharidnog jezgra je veoma konzervisana među izolatima *P. aeruginosa*, uključujući i kliničke izolate. Polisaharidni lanac vezan za oligosaharidno jezgro kod glatke forme LPS se javlja se u dve varijante: kao homopolimerni O polisaharid (A antigen) koji sadrži samo jednu vrstu šećera ili kao heteropolimerni O polisaharid (B antigen) koji sadrži ponovljene nizove nekoliko vrsta šećera. Antigen B izaziva mnogo jači imunološki odgovor od A antigena, što je najverovatnije i razlog zašto u hroničnim infekcijama produkcija B antigena opada u korist A antigena, a s ciljem da se umiri imunološki odgovor domaćina (King *i sar.*, 2009)

Balans između sinteze „glatkog” i „hrapavog” LPS je pod kontrolom dva gena, *migA* i *wapR*, s tim da je ekspresija *migA* gena pod kontrolom sistema međubakterijske komunikacije. Na osnovu razlika u kompoziciji B antigena napravljena je šema za antigenu serotipizaciju pomoću koje je moguće razlikovati sojeve *P. aeruginosa* (Lam *i sar.*, 2011).

2.3.2.5. Sekretioni sistemi tipa I i tipa II

Sekretioni sistem tipa I predstavlja skup tri membranska proteina koji omogućavaju transport različitih molekula, značajnih za fiziologiju bakterije, u ćeliju i iz ćelije (joni, proteini različitih veličina, alkalna proteinaza). Ovaj sistem, koji formira kanal duž spoljašnje i unutrašnje membrane bakterijske ćelije, čine ATP vezujući

protein (AprD), membranski fuzioni protein (AprE) i protein spoljašnje membrane (AprF) (Duong *i sar.*, 2001).

Sekrecioni sistem tipa II predstavlja transportni sistem putem kojeg se u spoljašnju sredinu sekretuju: proteinaze (LasA, LasB, proteinaza IV), lipaze, fosfolipaza C i egzotoksin A. Proces sekrecije putem ovog sistema se odvija na dva nivoa (Depluvez *i sar.*, 2016). Prvo se produkti proizvode kao prekursori, potom u periplazmatskom prostoru ovi prekursori dobijaju finalnu konformaciju i bivaju translocirani preko ćelijskih membrane pomoću Xcp sekretornog aparata (Ball *i sar.*, 2002). Čapon-Žirve (Chapon-Hervé) i saradnici su pokazali da Las i Rhl sistemi međubakterijske komunikacije regulišu ekspresiju *xcpP* i *xcpR* gena koji koordinišu sintezu komponenti sekrecionog sistema tipa II (Chapon-Hervé *i sar.*, 1997).

2.3.2.6. Fosfolipaza C

Fosfolipaza C (Plc) je enzim koji se sreće kod mnogih prokariota i ima širok dijapazon delovanja. *Pseudomonas aeruginosa* proizvodi dva tipa fosfolipaza C: hemolitičku (PlcH) i nehemolitičku (PlcN) i nekoliko homologa koji se iz prokariotske ćelije transportuju pomoću sekrecionog sistema tipa II (Barker *i sar.*, 2004)

Karakterističan je sličan dijapazon delovanja i hemolitičke i nehemolitičke fosfolipaze C, ali potrebno je naglastiti da PlcN ne može sama da izazove inflamatorni odgovor i da je značaj hemolitičke fosfolipaze PlcH daleko veći, kada je reč o povećanju nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta, leukotrijena, interleukina-8 i histamina (Berra *i sar.*, 2010). Hemolitička fosfolipaza C je odgovorna za direktnu lizu eritrocita ovce i čoveka (Gellatly i Hancock, 2013). Pored PlcH fosfolipaze C koja hidrolizuje fosfatidilholin i sfingomijelin, otkrivena je još jedna fosfolipaza C (PlcB) koja jedina ima sposobnost da hidrolizuje fosfatidiletanolamin (Westman *i sar.*, 2010).

Plućni surfaktant sadrži oko 70% fosfatidilholina i predstavlja idealno okruženje za delovanje fosfolipaze C čijom aktivnošću nastaju fosforilholini i diacilgliceroli koji mogu imati toksičan efekat na tkivo indukujući produkciju biološki reaktivnih jedinjenja, metabolita arahidonske kiseline (Westman *i sar.*, 2010).

2.3.2.7. *Proteinaze*

Vrsta *P. aeruginosa* proizvodi nekoliko važnih enzima sa proteinaznom aktivnošću: alkalna proteinaza (aeruginolizin), proteinaza IV, elastaza LasA i elastaza LasB (Gellatly i Hancock, 2013).

Alkalna proteinaza (aeruginolizin) je cink metaloproteinaza tipa 1 kodirana genom *aprA* (Hoge *i sar.*, 2010). Njena uloga je u degradaciji laminina, fibrina, fibrinogena, laktoferina, transferina, komponenti komplementa (C3, C1q), kao i proinflamatornih citokina INF- γ i TNF- α (Westman *i sar.*, 2010). Proteinaza IV poseduje serin proteinaznu aktivnost i ima aktivnu ulogu u degradaciji komponenti komplementa (C3, C1q), imunoglobulina (IgG), fibrinogena, plazminogena, i plazmina. Ekspresiju proteinaze IV pozitivno regulišu alternativni sigma faktori PvdS i lecitin LecB (Hoge *i sar.*, 2010). *Pseudomonas aeruginosa* proizvodi dva tipa elastaza, LasA i LasB, čija je sekrecija regulisana Las i Rhl sistemima međubakterijske komunikacije i odvija se putem sekretornog sistema tipa II (Westman *i sar.*, 2010). Neki autori elastazu A (LasA) nazivaju stafilolizin, dok se termin elastaza odnosi samo na elastazu B (LasB) (Gellatly i Hancock, 2013). Elastaza LasA poseduje samo deo elastazne aktivnosti koju poseduje elastaza LasB, što dovodi do zaključka da je uloga LasA da povećava proteolitičku aktivnost LasB (Gellatly i Hancock, 2013). Pored elastazne aktivnosti LasA vrlo efikasno lizira ćelije *Staphylococcus aureus*, što predstavlja mehanizam kojim se *P. aeruginosa* bori sa kompetitorima (Hoge *i sar.*, 2010). Elastaza LasB poseduju i proteolitičku i elastaznu aktivnost, degradira elastin, kolagen, fibrin, interaguje sa komponentama imunološkog sistema, inaktivirajući imunoglobuline (IgA, IgG), citokine (TNF- α , μ -interferon) i komponente komplementa (C1q i C3) (Hoge *i sar.*, 2010).

2.3.2.8. *Egzotoksin A*

Egzotoksin A je važan faktor virulencije koji u suštini predstavlja NAD⁺-difamid-ADP-riboziltransferazu (Gellatly i Hancock, 2013). Posle sekrecije enzim se vezuje za alfa 2 makroglobulinske receptore na membrani eukariotske ćelije, a po ulasku u citoplazmu deluje preko inhibicije elongacionog faktora 2, što posledično dovodi do inhibicije sinteze proteina i apoptoze ćelije domaćina (Michalska i Wolf,

2015). Aktivnost egzotoksina A vodi ka imunosupresiji, jer inhibicija sinteze proteina deluje negativno na proliferaciju progenitora makrofaga i neutrofila, a samim tim i na oslobađanje citokina (Westman *i sar.*, 2010). Sekretija ovog toksina je pod kontrolom Las sistema međubakterijske komunikacije. Sojevi mutanti za gen koji kodira sintezu egzotoksina A imaju i do 20 puta manju virulentnost, što govori o važnosti ovog faktora virulencije u patogenezi pseudomonasne infekcije (Gellatly i Hancock, 2013). Pilar i Hobden su u *in vivo* eksperimentu na laboratorijskim miševima utvrdili da je egzotoksin A najvažniji faktor virulencije u nastanku ulceroznog keratitisa (Pillar i Hobden, 2002). Za ekspresiju gena koji kodira sintezu egzotoksina A veoma je važna produkcija siderofore pioverdin koja ima primarnu ulogu u metabolizmu gvožđa kod *P. aeruginosa*. Smatra se da u prisustvu jona gvožđa pioverdin aktivira signalni put kojim se reguliše ekspresija gena za egzotoksin A (Michalska i Wolf, 2015).

2.3.2.9. Sekretioni sistem tipa III

Sekretioni sistem tipa III predstavlja proteinski kompleks koji funkcioniše po principu „molekularnog šprica” kojim bakterija injektira efektorne proteine (citotoksine) direktno u citoplazmu eukariotske ćelije (Westman *i sar.*, 2010). Sastoji se od pet komponenti: kompleksa nalik igli koji prolazi kroz membranu i ćelijski zid, translokacionog aparata, regulatornih proteina, efektornih proteina i šaperona. Za biogenezu i regulaciju ovog sistema zaduženo je 36 gena, organizovanih u pet operona koji su zajedno grupisani u genomu *P. aeruginosa* (Hauser, 2009).

Kontrola ovog sistema odvija se kako na nivou ekspresije gena koji kodiraju komponente sistema (preko transkripcionog aktivatora ExsA), tako i na nivou kontrole sekrecije efektornih proteina (Hauser, 2009). Sekretioni sistem tipa III igra važnu ulogu u toku akutne pseudomonasne infekcije, dok njegova ekspresija opada kako infekcija postaje hronična (Gellatly i Hancock, 2013; Hauser, 2009). Kod pacijenata sa cističnom fibrozom, kod kojih je česta prevelika produkcija alginata i mukoidni fenotip *P. aeruginosa* usled mutacije u genu *mucA*, zapaženo je da dolazi do negativne regulacije ekspresije gena koji koordinišu sintezu sekretionog sistema tipa III (Wu *i sar.*, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* produkuje četiri efektorna proteina sekretionog sistema tipa III, za čiju aktivaciju je neophodan kofaktor iz eukariotske ćelije: egzoenzim S, egzoenzim T, egzoenzim U i egzoenzim Y (Hauser, 2009). Važno je istaći da ne

poseduju svi sojevi *P. aeruginosa* kompletan set gena koji kodira sva četiri efektorna proteina. U zavisnosti od toga koje efektorne proteine sekretuje zavisi i način i ishod infekcije (npr. egzoenzim S dovodi do ćelijske apoptoze, dok egzoenzim U indukuje ćelijsku lizu) (Galle *i sar.*, 2012).

Egzoenzim S je citotoksin koji ima dve nezavisne katalitičke funkcije, N terminalnu GTPazu i C terminalnu ADP-riboziltransferaznu aktivnost, i dovodi do poremećaja u organizaciji aktinskih filamenata ćelije, inhibira sintezu DNK, onemogućava vezikularni transport u ćeliji i endocitozu (Hauser, 2009). Delujući preko inaktivacije pravilne funkcije Ras i Rho proteina u citoskeletu fagocita i T limfocita, egzotoksin S dovodi i do modulacije imunološkog odgovora domaćina (Gellatly i Hancock, 2013). Egzoenzim T, slično egzoenzimu S, remeti pravilnu organizaciju aktinskih filamenata u ćeliji i dovodi do egzocitolize i fagocitolize (Westman *i sar.*, 2010). Delujući na jedinice ćelijskog citoskeleta, egzotoksin T onemogućava kontrolu zarastanja rana i regeneraciju tkiva, što uslovljava nastavak infekcije i prelazak u hroničan tok (Hauser, 2009). Egzoenzim U je efektorni protein koji poseduje fosfolipaznu aktivnost, dovodi do lize fagocita, nekroze epitelnih ćelija i jedan je od glavnih razloga za pojavu bakterijemije kod pacijenata sa nozokomijalnom pseudomonasnom infekcijom pluća (Berra *i sar.*, 2010; Westman *i sar.*, 2010). Egzoenzim S i egzoenzim U su dva citotoksična proteina koja se nikada ne eksprimiraju zajedno, a upravo eksprimiranje jednog ili drugog utiče na virulentnost soja. Sojevi koji eksprimiraju egzoenzim U su 100 puta virulentniji u odnosu na sojeve koji eksprimiraju egzoenzim S (Gellatly i Hancock, 2013). Egzoenzim Y je do sada najmanje proučen i na osnovu *in vitro* i *in vivo* ispitivanja zaključeno je da je reč o enzimu sa funkcijom adenilat ciklaze koja modulira nivo cAMP u ćelijama. Značaj ovog toksina ostaje nejasan, mada neka istraživanja ukazuju na poremećaj funkcije ćelijskog citoskeleta i povećanu permeabilnost endotela (Hauser, 2009).

2.3.2.10. Piocijanin

Piocijanin (5-metil-1-hidroksifenazin) je plavozeleni pigment iz grupe fenazina čija je produkcija pod kontrolom sistema međubakterijske komunikacije (Hall *i sar.*, 2016). *Pseudomonas aeruginosa* produkuje nekoliko fenazina, heterocikličnih molekula sa redoks potencijalom, ali u patogenezi pseudomonasne infekcije najveći značaj ima

piocijanin (Parsons *i sar.*, 2007). Produkcija piocijanina specifična je za *P. aeruginosa* i jedan je od glavnih mehanizama kojim ova bakterija izaziva citotoksičnost kod evolutivno različitih organizama (ljudi, biljaka, nematoda, gljiva, insekata) (Lau *i sar.*, 2004a).

Najvažniji mehanizam dejstva piocijanina je inhibicija ćelijskog disanja. Za razliku od antioksidativnog delovanja pigmenata drugih bakterija, kao što su stafiloksantin ili melanin, piocijanin paradoksalno favorizuje oksidativne procese u ćelijama (Liu i Nizet, 2009). Kao dipolarni (cviter) jon sa hidrofobnim i hidrofilnim regionom, piocijanin može veoma lako da prolazi kroz ćelijsku membranu domaćina. Po prolasku kroz membranu piocijanin se redukuje primajući elektrone, najčešće od NADPH, koje potom transportuje do kiseonika i na taj način generiše proizvodnju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 , indukujući oksidativni stres (Lau *i sar.*, 2004a). Efekti piocijanina posredstvom oslobođenih reaktivnih kiseoničnih vrsta su: inhibicija ćelijske respiracije, oksidacija glutationa, inaktivacija katalaza, inhibicija inhibitora α -1 proteaze, poremećaj homeostaze kalcijuma, smanjenje nivoa intracelularnog cAMP, smanjenje aktivnosti mukocilijarnog aparata, indukovanje proinflamatornog efekta (stimulacijom epitelnih ćelija da proizvode IL-8), inhibicija ćelijskog rasta, inhibicija oslobađanja prostaciklina, apoptoza neutrofila (Lau *i sar.*, 2004a; Liu i Nizet, 2009; Winstanley i Fothergill, 2009).

Piocijanin ima i ulogu siderofore, jer helira jone gvožđa koje prethodno oslobodi iz transferina (Cox, 1986). Ovaj pigment daje karakterističnu plavozelenu boju kolonijama *P. aeruginosa* (Gellatly i Hancock, 2013). Sojevi *P. aeruginosa* koji usled genetske mutacije proizvode piocijanin u neznatnim količinama izazivaju infekcije slabijeg intenziteta (Gellatly i Hancock, 2013). U ispitivanju koje je su sprovedi Baron i Rov pokazano je da piocijanin poseduje i antimikrobnu aktivnost (Baron i Rowe, 1981).

2.3.2.11. Ramnolipidi

Pseudomonas aeruginosa sekretuje termostabilne glikolipide koji se nazivaju ramnolipidi i koji imaju ulogu biosurfaktanta i poseduju hemolitičku aktivnost (Westman *i sar.*, 2010). U grupu ramnolipida spadaju 3-(3-hidroksialkanoiloksi) alkanoična kiselina (HAA), mono-ramnolipidi i di-ramnolipidi (Soberón-Chávez *i sar.*, 2005). Sinteza ramnolipida se odvija u tri reakcije koje katalizuju enzimi ramnozil-

transferaze (RhlA, RhlB i RhlC) kodirani genima *rhlAB* (u jednom operonu) i *rhlC* (deo drugog operona), a aktivnost ovih gena je pod kontrolom Rhl sistema međućelijske komunikacije (Soberón-Chávez *i sar.*, 2005). Nedostatak fosfata i prisustvo nitrata indukuju sintezu ramnolipida, dok prisustvo amonijaka i visok nivo gvožđa inhibiraju sintezu ramnolipida (Pamp i Tolker-Nielsen, 2007).

Tokom infekcije u respiratornom traktu, ramnolipidi solubilizuju fosfolipide plućnog surfaktanta, čime ih čine prijemčivijim za delovanje drugih enzima kao što je fosfolipaza C (Westman *i sar.*, 2010). Ramnolipidi takođe narušavaju mukocilijarni transport kojim se respiratorni trakt oslobađa viška mucina i štetnih materija (Van Delden i Iglewski, 1998). Ramnolipidi omogućavaju rojevito kretanje *P. aeruginosa* (Köhler *i sar.*, 2000) i imaju veliki značaj u formiranju biofilma (Davey *i sar.*, 2003). Jedna od važnih funkcija ramnolipida, kao faktora virulencije je i ta da izazivaju nekrozu polimorfonuklearnih leukocita (Tolker-Nielsen, 2014).

2.3.2.12 Siderofore

Siderofore (hromatofora vezana za peptid) su faktori virulencije koje proizvodi bakterijska ćelija u cilju sakupljanja jona metala koji su neophodni za bakterijski metabolizam (Baron i Rowe, 1981). Tokom patogeneze pseudomonasne infekcije postoji velika potreba za gvožđem (Fe^{3+}), zbog čega bakterijska ćelija sekretuje dve siderofore, pioverdin i piohelin, koje imaju ulogu u prikupljanju gvožđa iz tkiva domaćina (Schalk i Guillon, 2013). Postoji preko 60 hemijski različitih vrsta pioverdin siderofora koje su karakteristične za određene sojeve *P. aeruginosa* i koje se razlikuju prema dužini peptidnog lanca vezanog za hromatoforu (Schalk i Guillon, 2013). Pored sakupljanja jona gvožđa, pioverdin ima i ulogu u ekspresiji određenih gena virulencije. Vezujući se za FpvA membranski protein, pioverdin preko PvdS sigma faktora indukuje sintezu gvožđe-zavisnih metaloproteinaza, egzotoksina A i proteina povezanih sa biosintezom pioverdina (Nguyen *i sar.*, 2014). Smatra se da su Fur protein (Ferric uptake regulator; glavni regulatorni protein zadužen za metabolizam gvožđa) i PQS sistem međubakterijske komunikacije preko pioverdina odgovorni za održavanje homeostaze gvožđa u bakterijskoj ćeliji (Nguyen *i sar.*, 2014). Signalni molekul 2-heptil-3-hidroksi-4-hinolon vezuje gvožđe preko svoje hidroksilne grupe i transportuje ga do ćelijske membrane odakle ga preuzima pioverdin (Nadal Jimenez *i sar.*, 2012). Za

razliku od pioverdina, piohelin vezuje gvožđe sa manjim afinitetom. Utvrđeno je da je pioverdin neophodan faktor za formiranje biofilmova u uslovima niske koncentracije gvožđa u bakterijskom okruženju (Yang *i sar.*, 2009). Pioverdin daje karakterističnu žutozelenu fluorescentnu boju bakterijskim kolonijama (Schalk i Guillon, 2013).

2.3.2.13. Cijanovodonik (HCN)

Cijanovodonik je sekundarni metabolit *P. aeruginosa* i veoma potentan inhibitor citohrom c oksidaze i drugih metaloproteinaza. Zbog afiniteta ka ovoj specifičnoj grupi enzima cijanovodonik dovodi do supresije aerobne respiracije i letalnog ishoda kod inficiranih ćelija domaćina (Blumer i Haas, 2000). *Pseudomonas aeruginosa* proizvodi HCN u procesu oksidativne dekarboksilacije glicina pomoću flavoenzima vezanog za ćelijsku membranu i kodiranog *hcnABC* genima (Blumer i Haas, 2000). Maksimum proizvodnje HCN nastaje krajem eksponencijalne i početkom stacionarne faze rasta pod mikroaerofilnim uslovima, a ceo proces je pod kontrolom Las i Rhl sistema međubakterijske komunikacije i anaerobnog regulatornog proteina Anr (Gallagher i Manoil, 2001). Bakterije se štite od cijanovodonika korišćenjem alternativnih puteva na respiratornom lancu, koji uključuju oksidaze koje nisu osetljive na HCN, kao i aktivnošću enzima koji neutrališu HCN (Cipollone *i sar.*, 2008). Prema istraživanju Galangera i Manole cijanovodonik predstavlja najvažniji faktor virulencije koji kod *in vivo* model sistema *Caenorhabditis elegans* dovodi do paralize praćene uginućem poznatim pod nazivom „crvena smrt”. (Gallagher i Manoil, 2001). Značajna koncentracija HCN je pronađena i kod pacijenata sa cističnom fibrozom, što je povezano sa smanjenom količinom kiseonika u plućima obolelih od ove nasledne bolesti (Sanderson *i sar.*, 2008).

2.3.2.14. Lektini

Lektini su klasa proteina koji specifično vezuju ugljene hidrate (Tielker *i sar.*, 2005). *Pseudomonas aeruginosa* proizvodi dve vrste lektina, LecA i LecB, čija je sinteza pod kontrolom Rhl sistema međubakterijske komunikacije i alternativnog sigma faktora RpoS (Winzer *i sar.*, 2000). Oba lektina imaju ulogu u adheziji, u uspostavljanju kontakta između bakterijskih ćelija, kao i u formiranju biofilma (Chemani *i sar.*, 2009). Velika količina lektina nalazi se u citoplazmi, ali je određena količina vezana za

spoljašnju membranu ćelije *P. aeruginosa*, gde lektini imaju ulogu adhezivnih molekula (Chemani *i sar.*, 2009). U sklopu receptora na endotelnim i epitelnim ćelijama nalaze se ugljenohidratne komponente koje LecA i LecB prepoznaju, i na taj način se bakterijska ćelija vezuje za ćeliju domaćina. LecA pokazuje veliki afinitet prema D-galaktozi, dok LecB pokazuje visoki afinitet za L-fukozu i nešto manji afinitet za D-manozu (Chemani *i sar.*, 2009). Lektin LecA prepoznaje galaktozu u oligosaharidnoj komponenti LPS drugih bakterija i vezuje ih formirajući agregate sačinjene od više ćelija (Kulshin *i sar.*, 1991). Smatra se da je ovo jedan od načina na koji LecA učestvuje u strukturi biofilma (Diggle *i sar.*, 2006).

LecA izaziva i citotoksični efekat na epitelnim ćelijama respiratornog trakta, čime doprinosi oštećenju respiratornog epitela tokom pseudomonasne infekcije (Moradali *i sar.*, 2017). U *in vivo* eksperimentu na laboratorijskim pacovima utvrđeno je da LecA povećava permeabilnost intestinalnog epitela pojačavajući apsorpciju citotoksičnih egzoprodukata kao što je egzotoksin A (Moradali *i sar.*, 2017).

U *in vitro* ispitivanjima LecA i LecB smanjuju frekvencu pokreta cilija respiratornog epitela, čime inhibiraju važan odbrambeni mehanizam (Chemani *i sar.*, 2009). LecB učestvuje u razvoju hronične respiratorne infekcije kod pacijenata obolelih od CF, jer je kod epitelih ćelija ovih pacijenata zapažen povećan broj receptora koji sadrže fukozu (Tielker *i sar.*, 2005).

2.3.2.15. Biofilmovi *P. aeruginosa*

Bakterije u prirodi žive u obliku slobodnoživećih, pojedinačnih, planktonskih ćelija ili u formi zajednica pričvršćenih za neku podlogu, koje se nazivaju biofilmovi (Donlan, 2002).

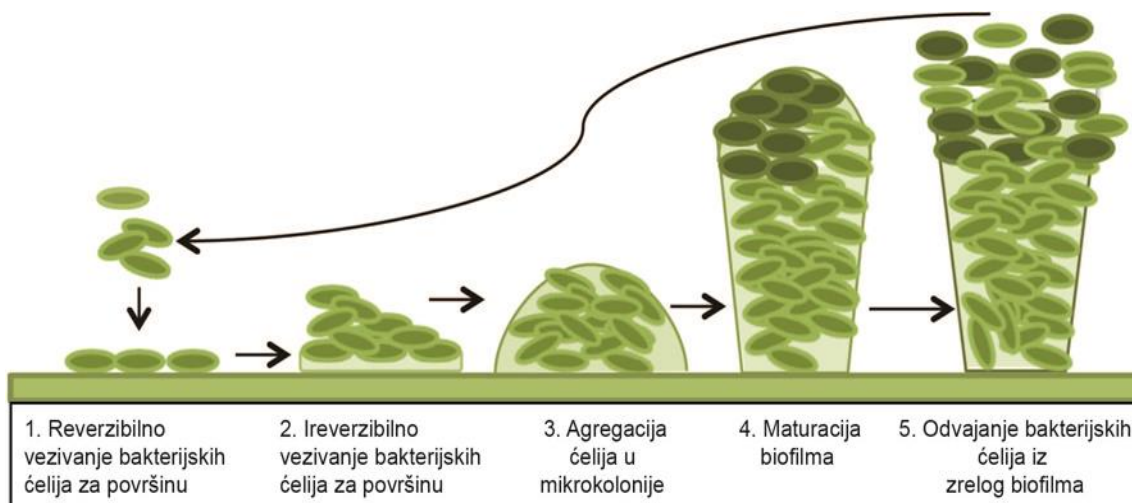
Biofilm predstavlja strukturnu zajednicu mikroorganizama pričvršćenih za živu ili neživu površinu i uronjenih u ekstracelularni matriks (Hall-Stoodley *i sar.*, 2004). Ekstracelularni matriks je proizvod aktivnosti samih bakterijskih ćelija i sastavljen je od polisaharida, proteina i DNK poreklom od samih mikroorganizama (Donlan, 2001). Biofilm predstavlja evolutivnu prednost bakterija i smatra se da se prvi put pojavio pre više od 3 milijarde godina (Tolker-Nielsen, 2014). Termin biofilm je upotrebljen prvi put za tanak, sluzav sloj bakterija na filteru za prečišćavanje vode (Mack, 1975).

Zahvaljujući konfokalnoj mikroskopiji danas se zna da biofilmovi nisu jednostavne skupine bakterija u tankom sloju, već da je reč o složenoj trodimenzionoj zajednici.

Preživljavanje u formi biofilma pruža bakterijama mnoge prednosti kao što su: zaštita od delovanja antibakterijskih agenasa, zaštita od fagocitoze, zaštita od isušivanja i nagle promene pH i/ili osmotskog pritiska i zaštita od toksičnog dejstva pojedinih metala (Hall-Stoodley *i sar.*, 2004). U biofilmu bakterije razmenjuju hranljive materije, metaboličke produkte i genetički materijal (Donlan, 2002). Među saprofitnim i patogenim vrstama bakterija retki su biofilmovi sastavljeni samo od jedne vrste a znatno češći mešoviti biofilmovi sastavljeni od dve, pa i više vrsta bakterija (Percival *i sar.*, 2011).

Sposobnost formiranja biofilma predstavlja jednu od najvažnijih virulentnih karakteristika *P. aeruginosa*. Prelazeći iz planktonske forme u formu biofilma *P. aeruginosa* gubi pokretljivost i inhibira virulentne faktore važne za izazivanje akutne infekcije, a dobija zaštitu od fagocitoze, oksidativnog stresa i delovanja antibiotika (Moradali *i sar.*, 2017). Značaj biofilmova *P. aeruginosa* za medicinu i veterinu ogleda se prvenstveno u sposobnosti ove bakterije da izazove hroničnu infekciju (Tolker-Nielsen, 2014; Westman *i sar.*, 2010). Međutim, podjednako je važna i činjenica da ova bakterija može da formira biofilm na svim neživim površinama u domaćinstvu, na farmama i u bolnicama, i da na taj način bude stalno prisutna u okruženju ljudi i životinja (Lee i Yoon, 2017).

Faze u razvoju biofilma. Razviće biofilma kod *P. aeruginosa* prati programirani put formiranja (Costerton, 1999), koji podrazumeva nekoliko faza: pričvršćivanje za površinu i umnožavanje, agregaciju ćelija u mikrokolonije i diferencijaciju u strukturne zajednice (Slika 4) (Hall-Stoodley *i sar.*, 2004). Za *P. aeruginosa* je karakteristično da ima sposobnost da formira biofilm i na kontaktnoj površini vazduha i tečnosti u vidu strukture koja se naziva pelikula (Olejnickova *i sar.*, 2014).



Slika 4. Šematski prikaz faza u formiranju biofilma. Bakterijske ćelije su prikazane šematski i u fazi maturacije biofilma neke su obojene različito kako bi se naglasila razlika u populaciji bakterija pri vrhu pečurkaste strukture od populacije bakterijskih ćelija koje čine stablo pečurkaste strukture.

Biofilmovi se mogu formirati na različitim organskim i neorganskim površinama kao što su različita tkiva životinja i ljudi, medicinska pomagala, cevi i posude za vodu, zidovi prostorija i podovi. Vezivanje bakterija za površinu predmeta ili tkiva predstavlja prvi korak u formiranju biofilma (Parsek i Greenberg, 2005). Ova faza je uslovljena fizičkim svojstvima površine, dostupnošću hranljivih materija, parametrima sredine (kao što su dostupnost vode, pH i temperatura) i genetski je regulisana (Prakash *i sar.*, 2003). Vezivanje bakterija za površinu može biti reverzibilno i ireverzibilno (Percival *i sar.*, 2011). Reverzibilno vezivanje bakterija za površinu je posredovano nespecifičnim interakcijama kao što su hidrofobne i Van der Valsove sile, dok je za ireverzibilno vezivanje potrebna sekrecija adhezina od strane bakterije i početak sekrecije ekstracelularnog matriksa (Lee i Yoon, 2017). U fazi vezivanja bakterija za površinu, aktivnu ulogu imaju pili tipa IV, flagela, cup fimbrije, Psl polisaharid, eDNK i bakterijska pokretljivost (Rybtke *i sar.*, 2011).

Posle inicijalnog kontakta bakterije sa podlogom, bakterija može da se odlepi od podloge, da ostane na mestu vezivanja ili da se pokretima flagele i pila tipa IV kreće duž podloge (Tolker-Nielsen, 2014). Glavni regulator tranzicije iz reverzibilne faze vezivanja u ireverzibilnu je SadB protein (Caiazza i O'Toole, 2004). Na brzinu kojom se ovaj proces odvija utiču, pored karakteristika površine za koju se bakterije vezuju i

fizičke karakteristike površine ćelije, postojanje flagela, pili ili fimbrija, kao i brzina kojom se deponuje ekstracelularni matriks (Percival *i sar.*, 2011).

Po uspostavljanju ireverzibilnih veza bakterija sa određenom površinom počinje formiranje mikrokolonija, bakterije počinju da se dele i da međusobno komuniciraju, a najvažniji događaj tokom faze sazrevanja biofilma je intenzivna proizvodnja ekstracelularnog matriksa (Hall-Stoodley *i sar.*, 2004). Ekstracelularni matriks održava arhitekturu biofilma i predstavlja vezivnu strukturu sastavljenu iz vode, polisaharida, proteina i eDNK (Donlan i Costerton, 2002). Uporedno sa proizvodnjom ekstracelularnog matriksa, dolazi do formiranja kanala koji povezuju delove biofilma i služe za dostavljanje vode i hranljivih materija u sve delove biofilma, kao i za uklanjanje produkata metabolizma bakterija (Fux *i sar.*, 2005). Tokom procesa sazrevanja biofilma bakterije unutar njega postaju sve više tolerantniji na stres i na dejstvo antibiotika (Lee i Yoon, 2017). Debljina biofilma varira od uslova u kojima se biofilm razvija, ali generalno, pri debljinama od 10 μm do 25 μm , uslovi postaju anaerobni za bakterije i to je prva indikacija da je reč o zreлом biofilmu (Percival *i sar.*, 2011). U laboratorijskim uslovima utvrđeno je da biofilm koji proizvodi *P. aeruginosa* gajen u medijumu uz dodatak glukoze ima pečurkastu strukturu (Tolker-Nielsen, 2014). Tokom faze rasta i sazrevanja ovakvih biofilmova zapažena je diferencijacija ćelija na nepokretne i pokretne. Tako je utvrđeno da nepokretna populacija ćelija inicira stvaranje mikrokolonija i stabla pečurkaste strukture, dok je za fomiranje strukture na vrhu stabla poznate kao „kapa struktura” neophodna subpopulacija bakterija koja poseduje flagele i pile tipa IV (Tolker-Nielsen, 2014).

Poslednja faza u razvoju biofilma je faza odvajanja bakterijskih ćelija iz zrelog biofilma ili faza disperzije biofilma. Ova faza se može podeliti na 3 podfaze (Kaplan, 2010): a) oslobađanje ćelija iz biofilma, b) translokacija slobodnih ćelija na nova mesta kolonizacije i c) vezivanje slobodnih ćelija za nove površine.

Do odvajanja ćelija iz pseudomonasnog biofilma može doći putem erozije, odlublivanja i rasejavanjem (Lee i Yoon, 2017). Rasejavanje je uvek aktivni proces, koji regulišu bakterije, dok erozija i odlublivanje mogu biti i aktivni i pasivni procesi, tj. mogu ih inicirati bakterije ili pak biti rezultat delovanja neke spoljašnje sile (Kim i Lee, 2016). Erozija predstavlja kontinuirano odvajanje pojedinačnih ćelija ili manjih agregata ćelija iz biofilma, dok odlublivanje predstavlja iznenadno otkidanje većih

delova biofilma, koje obično nastaje kao posledica nedostatka kiseonika ili hranljivih materija, najčešće u kasnijim fazama sazrevanja biofilma (Kim i Lee, 2016).

Rasejavanje je aktivan proces odvajanja velikog broja pojedinačnih ćelija ili manjih agregata iz unutrašnjosti biofilma kroz formirane centralne šupljine (Kim i Lee, 2016). Tokom sazrevanja biofilma dolazi do diferencijacije bakterijskih ćelija na pokretne i nepokretne, što incira razdvajanje delova biofilma na osnovu veće zastupljenosti jedne ili druge subpopulacije. To razdvajanje uz rast biofilma dovodi do formiranja šupljina unutar biofilma, kroz koje oslobođene ćelije aktivno plivajući izlaze iz biofilma. Glavni okidač za rasejavanje ćelija kroz centralne šupljine je dijametar mikrokolonija (80 μm), a smatra se i da starost mikrokolonija (3 dana do 12 dana) ima udela u tom procesu (Kim i Lee, 2016). Rasejavanje ćelija iz biofilma može biti indukovano i uslovima sredine, kao što su količina nutrijenata, nivo kiseonika, prisustvo azot oksida (NO), promena pH vrednosti i prisustvo metalnih helatora (Lee i Yoon, 2017). U oslobađanju ćelija iz biofilma veliku ulogu imaju i produkti bakterijske ćelije kao što su ramnolipidi i *cis*-2 dekanoična kiselina (Pamp i Tolker-Nielsen, 2007).

Oslobađanje bakterija iz biofilmova formiranih u organizmu ljudi i životinja ima veliki značaj za medicinu i veterinu, jer na ovaj način dolazi do egzacerbacije hronične bolesti i potencijalno teških akutnih stanja kao što je sepsa. Takođe, rasipanje ćelija iz biofilma je razlog za pojavu rekurentnih infekcija, čak i posle hirurškog uklanjanja afektiranog tkiva ili kontaminiranog implanta (Tolker-Nielsen, 2014).

Struktura matriksa biofilma Ekstracelularni matriks (ECM) biofilma može činiti i do 90% suve mase biofilma (Moradali *i sar.*, 2017). Ova supstanca formira okruženje za intenzivnu interakciju između ćelija i predstavlja rezervoar metabolita, nutrijenata i energije za ubrzani rast biofilma (Moradali *i sar.*, 2017). Matriks biofilma je sastavljen iz polisaharida, proteina, lipida i eDNK. Polisaharidnu komponentu pseudomonasnog biofilma čine tri različite vrste polisaharida: alginat, Psl polisaharid i Pel polisaharid (Gellatly and Hancock, 2013).

Polisaharid Psl se sastoji od ponovljenih jedinica pentasaharida - D-manoze, D-glukoze i L-ramnoze, a njegovu sintezu i transport kodira 11 gena smeštenih na *psl* lokusu (Mann i Wozniak, 2012). Ovaj polisaharid je važna komponenta ECM koja omogućava inicijalno formiranje biofilma pojačavajući vezivanje ćelija za površinu,

migraciju ćelija i međućelijsku interakciju (Colvin *i sar.*, 2012; Mann i Wozniak, 2012). Polisaharid Psl interaguje sa eDNK formirajući mrežu koja kod zrelih biofilmova služi kao strukturna podrška (Lee i Yoon, 2017). U ranoj fazi formiranja biofilma ovaj polisaharid štiti mladi biofilm od antibiofilm agenasa i antibiotika (Moradali *i sar.*, 2017).

Pel polisaharid je druga važna polisaharidna komponenta matriksa koja učestvuje u inicijalnoj fazi formiranja biofilma. Sinteza i transport ovog polisaharida su koordinisani aktivnošću sedam gena smeštenih u okviru *pel* lokusa (Mann i Wozniak, 2012). Struktura Pel polisaharida nije još uvek razjašnjena. Ovaj polisaharid je važan za formiranje pelikula, odnosno biofilma na površini vazduh-tečnost (A-L biofilmovi) (Lee i Yoon, 2017). Polisaharid Pel pruža zaštitu bakterijama u okviru biofilma od aminoglikozidnih antibiotika (Lee i Yoon, 2017). U slučaju da je produkcija Psl polisaharida smanjena, Pel polisaharid preuzima i njegovu ulogu (Mann i Wozniak, 2012). Ovaj polisaharid povezan sa eDNK gradi strukturnu mrežu u biofilmu i lociran je u stablu trodimenzionalne strukture pečurke (Moradali *i sar.*, 2017). Odnos količine Psl i Pel u strukturi biofilma je karakterističan za svaki soj *P. aeruginosa* (Colvin *i sar.*, 2012; Moradali *i sar.*, 2017).

Alginat je treći važan sastojak polisaharidne komponente ECM i u biohemijskom smislu predstavlja linearni kopolimer sastavljen od D-manuronske kiseline i L-guluronske kiseline povezane $\beta(1-4)$ glikozidnim vezama (Mann i Wozniak, 2012). Sojevi koji proizvode veliku količinu alginata su najčešće izolovani iz sputuma pacijenata oboljelih od cistične fibroze, ali se sreću i kod pacijenata sa hroničnom upalom mokraćne bešike (Tolker-Nielsen, 2014). Mehanizam kojim dolazi do hiperprodukcije alginata najčešće je povezan sa mutacijom gena *mucA* koji je negativni regulator produkcije alginata (Moradali *i sar.*, 2017). Uprkos velikom značaju alginata u strukturi zrelih biofilmova ovaj egzopolisaharid nije neophodan za inicijalno formiranje biofilma, kao što je to slučaj sa Psl i Pel egzopolisaharidima (Gellatly i Hancock, 2013). Sojevi *P. aeruginosa* koji proizvode alginat imaju karakterističan sluzav izgled kolonija i nazivaju se mukoidni sojevi (Moradali *i sar.*, 2017). Sa stanovišta održivosti biofilma, alginat je važan, jer zadržava vodu i hranjive sastojke u biofilmu, smanjuje količinu reaktivnih kiseoničnih vrsta, pruža zaštitu od antibiotika i tokom infekcije formira

viskozni gel oko bakterijske ćelije i interferira sa imunološkim odgovorom domaćina (Lee i Yoon, 2017).

Ekstracelularna DNK (eDNK) je još jedan sastojak ECM neophodan za inicijalnu fazu formiranja biofilma (Whitchurch *i sar.*, 2002). Količina eDNK se značajno povećava tokom faze formiranja mikrokolonija i eDNK je neophodna za formiranje strukture „kape” na stablu zrelog biofilma (Barken *i sar.*, 2008). Pored strukturne uloge koju ima, eDNK je važna i za održavanje katjenskog gradijenta, koordinaciju pokreta grčenja, zaštitu od antibiotika, a predstavlja i izvor hrane za bakterije tokom nutritivnog stresa (Moradali *i sar.*, 2017). Ekstracelularna DNK je i glavni proinflamatorni faktor u biofilmu *P. aeruginosa* (Lee i Yoon, 2017). U strukturi zrelog biofilma, eDNK je lokalizovana sa spoljašnje strane stabla pečurkaste strukture, gde pomaže u održavanju spoja između stabla i strukture „kape” (Rybtke *i sar.*, 2011). Smatra se da je eDNK poreklom od liziranih ćelija (Das *i sar.*, 2015) ili je oslobođena iz živih ćelija preko membranskih vezikula (Whitchurch *i sar.*, 2002). Piocijanin, ekstracelularni faktor virulencije, dovodi do oslobađanje reaktivnih kiseoničnih vrsta koje dovode do citolize ćelija domaćina i bakterijskih ćelija i oslobađanja DNK. Piocijanin se potom vezuje za dezoksiribofo-fosfatnu okosnicu DNK molekula i interkalira se između azotnih baza (Das *i sar.*, 2015). Vezivanje piocijanina za eDNK povećava viskoznost matriksa, što utiče na fizičko-hemijske interakcije matriksa biofilma sa okolinom i inicira agregaciju bakterijskih ćelija. Ovo objašnjava činjenicu da pacijenti sa CF imaju veoma viskozni sputum u kome se koncentracija eDNK kreće od 3-14 mg/ml, a koncentracija piocijanina se kreće i do 27 µg/ml (Kanthakumar *i sar.*, 1993). Struktura piocijanin-eDNK je važna i zato što omogućava slanje elektrona do mesta na kojima se nalaze akseptori (kiseonik, nitrat), čija je difuzija kroz biofilm ograničena, čime potpomaže ćelijsko disanje (Das *i sar.*, 2015). Utvrđeno je i da je PQS sistem međubakterijske komunikacije neophodan za oslobađanje DNK iz ćelija koje su lokalizovane u stablu trodimenzione strukture biofilma, čime se omogućava formiranje strukture „kape” na vrhu stabla (Yang *i sar.*, 2009).

Proteinsku komponentu matriksa biofilma čine adhezini: CdrA protein, cup fimbrije, lektini LecA i LecB. Protein CdrA čija sinteza u biofilmu je pod kontrolom cikličnog diguanilata (c-di-GMP) vezuje se za Psl polisaharid dovodeći do agregacije ćelija u tečnoj kulturi, odnosno do obrazovanja biofilma na čvrstoj podlozi (Borlee *i*

sar., 2010). Kod sojeva sa mutacijom na genu *cdrA* dolazi do obrazovanja biofilмова sa malom količiom biomase i do smanjene stabilnosti strukture biofilma (Borlee *i sar.*, 2010). Lektini LecA i LecB su kao adhezini važni za održavanje strukture i stabilnost biofilma (Diggle *i sar.*, 2006; Tielker *i sar.*, 2005). Lektin LecA može da stvara agregate bakterijskih ćelija tako što prepoznaje i veže galaktozu u oligosaharidnoj komponenti LPS kompleksa drugih bakterija (Diggle *i sar.*, 2006). Pored pili tipa IV koje su važne za formiranje biofilma, bakterija poseduje još jedan tip fimbrijalnih nastavaka koji omogućavaju formiranje biofilma, čak i kod mutanata deficitnih za pile tipa IV (Vallet *i sar.*, 2001). Cup fimbrije su adhezivni nastavci koje bakterija koristi tokom inicijalne faze formiranja biofilma, u interakcijama između samih bakterija i tokom formiranja mikrokolonija. Smatra se da je uloga cup fimbrija kod sojeva koji imaju funkcionalne pile sinergistička i da fimbrije služe za vezivanje bakterija za ravne površine, kao i za tranziciju bakterija iz jedne sredine u drugu (Kulasekara *i sar.*, 2005). Laboratorijski soj *P. aeruginosa* PAO1 poseduje tri genska klastera (*cupA*, *cupB* i *cupC*) koji sadrže gene neophodne za biogenezu cup fimbrija, ali je samo gen iz klastera *cupA* odgovoran za adheziju bakterija putem fimbrija za površinu (Vallet *i sar.*, 2001). Ekspresija gena iz bilo kog od tri klastera dovodi do značajnog povećanja proizvodnje pelikule, dok odsustvo ekspresije bilo kog gena iz klastera *cupA-C*, kao i gena za sintezu pili tipa IV dovodi do kompletnog gubitka pelikule ili pojave klastera mikrokolonija (Kulasekara *i sar.*, 2005).

Flagele i pili tipa IV nisu u klasičnom smislu reči komponente biofilma, ali su važne za inicijalno vezivanje bakterija za površinu i imaju ulogu u sazrevanju biofilma, omogućavajući migraciju ćelija u okviru nezrelog biofilma i stvaranje trodimenzione pečurkaste strukture (Lee i Yoon, 2017). Tokom procesa sazrevanja biofilma, mikrokolonije se formiraju umnožavanjem nepokretnih ćelija, što u kasnijoj fazi dovodi do formiranja stabla pečurkaste strukture biofilma (Klausen *i sar.*, 2003a). Za formiranje „kapa” formacije na vrhu pečurkaste strukture neophodni su pili tipa IV, flagela i pokretljivost plivanjem, rojenjem i/ili grčenjem. O’Toole i Kolter (1998) su dokazali da su pili tipa IV neophodni za karakterističan tip pokretljivosti, grčenje, kao i za formiranje mikrokolonija, a da su flagele neophodne za vezivanje bakterija za abiotičku površinu. Ipak, čak i u slučaju nepostojanja pila tipa IV bakterije su formirale sloj na površini, ali bez razvoja mikrokolonija (O’Toole i Kolter, 1998). Barken i

saradnici smatraju da rojevito kretanje predstavlja tip pokretljivosti od kojeg zavisi formiranje strukture „kape” (Barken *i sar.*, 2008).

Matriks biofilma sadrži i određenu količinu površinski aktivnih molekula – ramnolipida, čija je sinteza pod kontrolom Rhl sistema međubakterijske komunikacije. Uloge ovih površinski aktivnih molekula u biofilmu su brojne i obuhvataju formiranje mikrokolonija (Pamp i Tolker-Nielsen, 2007), reorganizaciju strukture biofilma i formiranje strukture „kape” (Davey *i sar.*, 2003), održavanje otvorenih kanala između delova biofilma kroz koje prolaze hranljive materije (Davey *i sar.*, 2003) i oslobađanje ćelija iz biofilma tj. rasipanje ćelija (Boles *i sar.*, 2005). Mutacija u genu *rhlA* dovodi do stvaranja ravnih biofilmova sa nediferenciranim ćelijama, usled nemogućnosti *P. aeruginosa* da formira mikrokolonije (Pamp i Tolker-Nielsen, 2007). Stvarajući uslove za rojevito kretanje, ramnolipidi učestvuju u formiranju strukture „kape” na pečurkastom modelu biofilma u *in vitro* uslovim (Pamp i Tolker-Nielsen, 2007). Iako se sinteza ramnolipida prvenstveno odigrava u ćelijama mikrokolonija tokom ranih faza formiranja biofilma, i ćelije stabla pečurkaste strukture zrelog biofilma proizvode ramnolipide (Boles *i sar.*, 2005).

Regulacija formiranja biofilma Prelazak bakterija sa planktonskog načina života na formu biofilma zahteva dinamičnu regulatornu mrežu koja na transkripcionom, postranskripcionom i postranslacionom nivou omogućava koordinisanu ekspresiju velikog broja gena (Moradali *i sar.*, 2017). Regulacija formiranja biofilma je usko povezana sa molekularnim mehanizmima koji kontrolišu produkciju ekstracelularnog matriksa i ekspresiju adhezina koji omogućavaju vezivanje bakterijske ćelije na mestu formiranja biofilma (Tolker-Nielsen, 2014).

Započinjanje formiranja biofilma kod *P. aeruginosa* u mnogome zavisi od postojanja različitih signalnih sistema preko kojih bakterija detektuje spoljašnje signale (Lee i Yoon, 2017). Ovi sistemi rade po principu kaskadne fosforilacije kojom se indukuju konformacijske promene u regulatornim proteinima, što za rezultat ima promenu u ekspresiji gena. Među više od 60 signalnih sistema koje poseduje *P. aeruginosa* za formiranje biofilma, važno je istaći GAC sistem (global activator of antibiotic and cyanide synthesis) koji omogućava prelazak akutne u hroničnu infekciju i formiranje biofilma (Nadal Jimenez *i sar.*, 2012). Ovaj sistem čine transmembranska

regulatorna kinaza GacS, koja prima informacije iz okruženja i regulatorni protein GacA koji posle fosforilacije indukuje transkripciju malih regulatornih RNK (RsmZ i RsmY). Posle vezivanja malih regulatornih RNK za RsmA protein, koji kada je slobodan inhibira ekspresiju gena značajnih za formiranje biofilma, dolazi do povećanja nivoa sekundarnog signalnog molekula - cikličnog diguanozin-5'-monofosfata (c-di-GMP). Ishod ove reakcije je aktivacija ekspresije gena zaduženih za formiranje komponenti biofilma i represija gena čija je funkcija važna tokom akutne infekcije kao što su geni koji koordinišu ekspresiju određenih faktora virulencije i pokretljivosti (Nadal Jimenez *i sar.*, 2012). Dve druge kinaze, LadS i RetS regulišu ekspresiju gena preko GacA kinaze. LadS kinaza deluje na isti način kao i GacA, tj. pozitivno utiče na ekspresiju *pel* operona (sinteza Pel polisaharida), što dovodi do produkcije ekstracelularnog matriksa i represije gena zaduženih za sintezu sekrecionog sistema tipa III (Nadal Jimenez *i sar.*, 2012). S druge strane, RetS kinaza kontroliše GacA kinazu na suprotan način od RetS, čime promovise akutnu infekciju i sintezu sekrecionog sistema tipa III. GAC signalni sistem putem RsmA negativno kontroliše sintezu homoserin laktona čime utiče na Las i Rhl sisteme međubakterijske komunikacije (Nadal Jimenez *i sar.*, 2012). Pored toga, tri senzorna sistema, BfiSR, BfmSR i MifSR su povezana sa sazrevanjem biofilma i održavanjem strukture zrelog biofilma (Petrova i Sauer, 2009).

Sekundarni signalni molekul c-di-GMP se smatra glavnim regulatornim faktorom formiranja biofilma kod velikog broja bakterija, uključujući i *P. aeruginosa*. Visok nivo c-di-GMP stimuliše formiranje biofilma, dok njegov nizak nivo stimuliše planktonski način života kod bakterija (Fazli *i sar.*, 2014). Signalni sistem koji uključuje c-di-GMP je kompleksan, ali kao glavne komponente treba izdvojiti GGDEF proteine koji imaju diguanilat ciklaznu aktivnost, kao i EAL/HD-GYP proteine sa fosfodiesteraznom aktivnošću (Rybtke *i sar.*, 2011). Aktivnošću ovih enzima modulira se nivo c-di-GMP u bakterijskoj ćeliji u skladu sa signalima iz okoline, a preko receptora na membrani (Moradali *i sar.*, 2017). Ciklični di-GMP pozitivno reguliše ekspresiju komponenti ekstracelularnog matriksa kao što su: Pel, Psl, alginat, cup fimbrije i CdrA (Tolker-Nielsen, 2014). Ovaj molekul je važan i u ranoj fazi formiranja biofilma, jer pozitivno reguliše ekspresiju proteina SadB koji predstavlja glavni regulator adhezije bakterijske ćelije na čvrstu površinu (Merritt *i sar.*, 2007). Dokazano je i da Las sistem međubakterijske komunikacije negativno kontroliše nivo cikličnog di-

GMP (Ueda i Wood, 2009). Nivo kiseonika, određeni nutrijenti, kao i azot oksid regulišu disperziju biofilma putem promene nivoa c-di-GMP (Lee i Yoon, 2017).

Međubakterijska komunikacija ima značajnu ulogu u formiranju biofilma. Veliki broj oprečnih rezultata u istraživanjima uloge pojedinih sistema u kontroli formiranja biofilma je posledica činjenice da uslovi sredine diktiraju aktivaciju pojedinih sistema međubakterijske komunikacije. Rhl sistem međubakterijske komunikacije je aktivan tokom cele faze razvoja biofilma, jer pozitivno reguliše proizvodnju ramnolipida koji su neophodni u svim fazama rasta i sazrevanja biofilma (Al-Tahhan *i sar.*, 2000; Davey *i sar.*, 2003). Međubakterijska komunikacija, preciznije PQS sistem putem citolize određene subpopulacije ćelija omogućava oslobađanje eDNK koja je neophodna za održavanje pravilne strukture biofilma (Barken *i sar.*, 2008). *Pseudomonas aeruginosa* koristi međubakterijsku komunikaciju za ekspresiju gena koji kodiraju lektine (LecA i LecB) koji su važni u procesu formiranja biofilma (Diggle *i sar.*, 2006). Ekspresija *pel* gena je pod kontrolom Las sistema (Sakuragi i Kolter, 2007). Važnost međubakterijske komunikacije u formiranju i sazrevanju biofilma najbolje potvrđuje osetljivost biofilmova koje formiraju QS mutanti na antimikrobne agense i fagocitozu (Wagner i Iglewski, 2008)

U regulaciji formiranja biofilma dostupnost gvožđa ima veliki značaj. Singh i saradnici (2002) su pokazali da laktoferin na sluznicama vezuje dostupno gvožđe i na taj način onemogućava bakterijama da ga koriste. Za formiranje biofilma potrebna je veća količina gvožđa nego za rast bakterija (Singh *i sar.*, 2002). Smanjen nivo gvožđa dovodi do zaustavljanja formiranja biofilma i stimulacije pokreta grčenja, jer smanjen nivo gvožđa aktivira Las i Rhl signalne puteve međubakterijske komunikacije koji pozitivno regulišu ekspresiju gena za pokrete grčenja (Patriquin *i sar.*, 2008). Izvor ugljenika takođe igra ulogu u formiranju biofilma. Biofilmovi koji su rasli u medijumu sa glukozom imaju pečurkastu strukturu, dok su oni koji su rasli u citratnom medijumu ravni i nediferencirani (Klausen *i sar.*, 2003b).

2.4. Tretmani infekcija izazvanih vrstom *P. aeruginosa*

Potpuna eliminacija bakterije *P. aeruginosa* iz okruženja u kome žive ljudi i životinje nije moguća, jer sojevi *P. aeruginosa* mogu kolonizovati sve površine i

perzistirati u formi biofilma sa povremenim otpuštanjem planktonskih ćelija koje kolonizuju nove ekološke niše. U tom smislu rezervoari ove bakterije mogu biti životinje, ljudi, medicinsko osoblje, medicinski instrumenti, sve površine, pa čak i sredstva za dezinfekciju.

Uzimajući u obzir ozbiljnost infekcija izazvanih vrstom *P. aeruginosa* kao i sve češću pojavu multirezistentnih sojeva ove vrste, pronalazak novih načina terapije i preventive je imperativ. Za sada, preventiva u smislu održavanja higijene i pojačanog monitoringa, kao i savesna, pravilna i ciljana upotreba antibiotika ostaju jedine opcije za sprečavanje širenja infekcija izazvanih rezistentnim sojevima ove vrste.

Razumevanje kompleksnosti sistema bakterijske komunikacije i poznavanje puteva kontrole ekspresije gena za najvažnije faktore virulencije otvara nove mogućnosti za dizajniranje antibakterijskih lekova koji bi u budućnosti bili alternativa antibioticima u borbi protiv infekcija izazvanih vrstom *P. aeruginosa*. Izučavanje načina nastanka i arhitekture biofilma, kao najvažnije adaptivne karakteristike, daje priliku za pronalazak efikasnijih načina borbe protiv upornih, hroničnih infekcija izazvanih ovom vrstom. Razvoj adekvatnih vakcina, koje bi bile aplikovane najosetljivijim grupama, dodatno bi pomogle u smanjenju broja infekcija, a u slučaju pacijenata sa cističnom fibrozom dodatno bi produžile i popravile kvalitet života.

2.4.1. Urođeni i stečeni mehanizmi rezistencije na antibiotike kod vrste *P. aeruginosa*

Rezistencija *P. aeruginosa* na antibiotike je globalni problem u veterinarskoj i humanoj medicini (Aloush *i sar.*, 2006; Mišić, 2013). Mehanizmi koji leže u osnovi rezistencije *P. aeruginosa* na veliki broj antibakterijskih agenasa mogu biti podeljeni na urođene i stečene (Moradali *i sar.*, 2017).

Mehanizam urođene rezistencije *P. aeruginosa* na određene antibiotike zasniva se na: smanjenoj permeabilnosti spoljašnje membrane bakterijske ćelije, postojanju različitih efluks pumpi i produkciji enzima β -laktamaza (Moradali *i sar.*, 2017). *Pseudomonas aeruginosa* je intrinzično rezistentan na ampicilin, amoksicilin sa klavulanskom kiselinom, amoksicilin sa sulbaktamom, cefalosporine I i II generacije, cefotaksim, ceftriakson, ertrapienem, hloramfenikol, tetraciklin, tigeciklin, kanamicin, neomicin i trimetoprim-sulfametoksazol (EUCAST, 2016). Moduliranje propustljivosti

spoljašnje membrane ogleda se u pojačanoj ekspresiji gena koji kodiraju specifične porine čime se povećava selektivna propustljivost membrane i smanjuje mogućnost difuznog ulaska antibiotika u citoplazmu, kao što su karbapenemi ili cefalosporini (Moradali *i sar.*, 2017). Efluks pumpe su membranske strukture koje aktivno izbacuju antibiotike iz citoplazme bakterijske ćelije (Moradali *i sar.*, 2017). Smatra se da efluks pumpe (MexEF-OprN i MexGHI-OpmD) imaju značaja i u uspostavljanju hronične infekcije tako što moduliraju PQS sistem međubakterijske komunikacije smanjivanjem koncentracije hinolona u citoplazmi, što dovodi do smanjene ekspresije određenih faktora virulencije (Lamarche i Déziel, 2011). Rezistenciju na dezinficijense kao što su kvaternarne amonijumove soli, *P. aeruginosa* ostvaruje putem efluks pumpi (De Abreu *i sar.*, 2014). *Pseudomonas aeruginosa* razvija rezistenciju na antibiotike sa β -laktamskim prstenom putem ekspresije gena *ampC* koji kodira sintezu inducibilnog enzima β -laktamaze čiji je supstrat β -laktamski prsten (Moradali *i sar.*, 2017).

Stečena rezistencija može biti posledica mutacije bakterijskih gena ili horizontalnog transfera gena za rezistenciju putem mobilnih genetičkih elemenata kao što su plazmidi, transpozoni i integriromi (Moradali *i sar.*, 2017). Za razliku od urođene rezistencije, stečena rezistencija je specifična za onu vrstu ili grupu antibiotika koja je dovela do selektivnog evolutivnog pritiska na bakterijsku populaciju iz koje se su izdvojile rezistentne ćelije (Moradali *i sar.*, 2017). Usled mutacija na genima određenih regulatornih proteina može doći do velike produkcije enzima β -laktamaza, što dovodi do pojave rezistencije na još veći broj antibiotika kao što su cefalosporini IV generacije ili monobaktami (Gellatly i Hancock, 2013). Mutacija u genu koji kodira sintezu proteina OprD porina dovodi do rezistencije na karbapeneme (Moradali *i sar.*, 2017).

2.4.2. Otpornost *P. aeruginosa* u biofilmu na antibakterijske agense

Otpornost bakterija u biofilmovima na antibakterijske agense i komponente imunološkog sistema domaćina predstavlja veliki klinički problem (Bjarnsholt *i sar.*, 2013; Koo *i sar.*, 2017; Tolker-Nielsen, 2014). Da bi se opisala otpornost bakterija u okviru biofilma na antibakterijske agense koristi se termin „tolerancija” da bi se naglasila razlika u odnosu na termina „rezistencija” kojim se opisuje nasledna antibakterijska otpornost planktonskih ćelija, tj. rezistencija u užem smislu (Tolker-Nielsen, 2014). Tolerancija na antibiotike je i do 1000 puta veća kod ćelija u biofilmu u

odnosu na planktonske ćelije (Mah *i sar.*, 2003). Tolerancija biofilmova na antibakterijske agense je često udružena sa rezistencijom bakterija na antibakterijske agense (nezavisno od formiranja biofilma), čime se dodatno komplikuje problem uklanjanja biofilmova (Bjarnsholt *i sar.*, 2013). Proizvodnja ramnolipida, faktora virulencije koji ubijaju fagocite se smatra osnovom tolerancije biofilmova na ćelije imunološkog sistema (Tolker-Nielsen, 2014).

Iako pojedini antibiotici mogu smanjiti broj bakterija u biofilmu, oni ne mogu uništiti sve bakterije, što ostavlja mogućnost da se infekcija dalje nastavi. Zbog toga se, kada je to moguće, pribegava radikalnim metodama borbe protiv infekcija praćenih biofilmovima, kao što su hirurško uklanjanje zahvaćenog tkiva ili kontaminiranog implanta uz obaveznu dugu antibakterijsku terapiju (Tolker-Nielsen, 2014).

Mehanizmi u osnovi tolerancije biofilma na antibakterijske agense prema Tolker-Nielsenu (2014) su podeljeni na:

- a) Mehanizme tolerancije povezane sa nemogućnošću penetracije antibakterijskih agenasa u biofilm (fizička tolerancija)
- b) Mehanizme tolerancije povezane sa različitom fiziološkom aktivnošću ćelija u biofilmu (fiziološka/metabolička tolerancija)
- c) Mehanizme tolerancije povezane sa prisustvom perzistera i drugih fenotipskih varijacija
- d) Mehanizme tolerancije povezane sa ekspresijom specifičnih gena kod bakterija u okviru biofilma (adaptivna tolerancija)
- e) Rezistencija bakterija na antibakterijske agense (rezistencija u užem smislu)

a) Mehanizmi tolerancije povezani sa nemogućnošću penetracije antibakterijskih agenasa u biofilm (fizička tolerancija)

Da bi antibakterijska supstanca stigla do ćelije u okviru biofilma potrebno je da prođe kroz gustu mrežu ekstracelularnog matriksa koji sadrži polisaharide, proteine i eDNK. Komponente matriksa mogu da interaguju sa antibakterijskim jedinjenjem i da onemoguće ili uspore njegovo dalje kretanje ka ćeliji. Ekstracelularna DNK i alginat imaju ulogu antibiotskog štita, jer vezuju aminoglikozidne antibiotike i na taj način ometaju njihovu aktivnost (Tolker-Nielsen, 2014). Matriks biofilma ne može da zaštiti

ćelije biofilma u uslovima kontinuiranog izlaganja visokim koncentracijama antibiotika, već može samo da kratkotrajno uspori njihovu aktivnost (Bjarnsholt *i sar.*, 2013). Ekstracelularni matriks pruža zaštitu bakterijskim ćelijama i od aktivnosti ćelija imunološkog sistema domaćina (Tolker-Nielsen, 2014).

b) Mehanizmi tolerancije povezani sa različitom fiziološkom aktivnošću ćelija u biofilmu (fiziološka/metabolička tolerancija)

Metabolička aktivnost bakterija je povezana sa dostupnošću hranljivih materija i kiseonika unutar biofilma. Mnogi antibiotici zasnivaju mehanizam svog delovanja na inhibiciji fundamentalnih metaboličkih i fizioloških procesa koji su neophodni za rast bakterije. Sa uvećanjem biomase, unutar biofilma dolazi do promena u uslovima sredine tako što koncentracija kiseonika i hranljivih materija opada od površine prema dubini biofilma, menja se pH vrednost i povećava koncentracija produkata metabolizma, što vodi ka smanjenju metabolizma bakterijskih ćelija u središnjim delovima biofilma (Høiby *i sar.*, 2010). Određene vrste antibiotika, kao što su aminoglikozidi, ispoljavaju slabije dejstvo u anaerobnim uslovima, pa je njihova aktivnost na ćelije u središtu biofilma veoma mala (Walters *i sar.*, 2003). Kolistin je antibiotik koji deluje na ćelije u centralnom delu biofilma (metabolički manje aktivne) dok ciprofoksacin deluje na ćelije na površini biofilma (metabolički aktivne) što ostavlja mogućnost za kombinovanu antibiotiksu terapiju (Høiby *i sar.*, 2010).

c) Mehanizmi tolerancije povezani sa prisustvom perzistera i drugih fenotipskih varijacija

U populaciji bakterija, koje rastu u formi planktonskih ćelija ili biofilma, izdvaja se subpopulacija ćelija koje se nazivaju perzisteri (Tolker-Nielsen, 2014). Za ove bakterijske ćelije je karakteristično da imaju izmenjeni metabolizam, da se slabo dele ili se uopšte ne dele i da su rezistentne na veliki broj antibiotika, uključujući i antibiotike koji su aktivni na ćelijama sa smanjenim metabolizmom (Lewis, 2010). Smatra se da su ove ćelije postale dormantne posle diferencijacije od normalnih, metabolički aktivnih ćelija (Tolker-Nielsen, 2014). Postojanje perzistera je verovatno i jedan od razloga zašto je eliminacija biofilma izuzetno komplikovan posao, jer čak i posle simultanog delovanja više različitih antibakterijskih agenasa ove ćelije mogu da prežive i da ponovo

razviju infekciju (Bjarnsholt *i sar.*, 2013). Jedan od načina borbe protiv ovih ćelija je ciljanje esencijalnih proteina neophodnih za održavanje bakterija u dormantnom stanju (Lewis, 2010). Pored perzistentnih ćelija, u biofilmu se mogu sresti i druge fenotipske varijante ćelija koje su otpornije na antibakterijske agense. Kod pacijenata sa CF izolovan je Small-Colony Variant fenotip (SCV fenotip) koji se odlikuje hiperprodukcijom biofilma (Tolker-Nielsen, 2014).

d) Mehanizmi tolerancije povezani sa ekspresijom specifičnih gena kod bakterija u okviru biofilma (adaptivna tolerancija)

U osnovi adaptivne tolerancije je indukcija rezistentnih mehanizama kojima se postiže privremena otpornost bakterijskih ćelija na antibakterijske supstance koje su inicirale indukciju (Tolker-Nielsen, 2014). Adaptivna rezistencija se dešava u određenoj subpopulaciji bakterija u okviru biofilma, ne zahteva genetičke promene, a posle odsustva antibakterijskog agensa koji je doveo do njene aktivacije dolazi do gubitka ovog vida rezistencije (Bjarnsholt *i sar.*, 2013). Ovaj vid tolerancije može biti specifičan (sinteza β -laktamaza u prisustvu β -laktama, alteracija lipopolisaharida u prisustvu kolistina ili ekspresija *ndvB* gena u prisustvu tobramicina) ili nespecifičan (ekspresija efluks pumpi kao odgovor na prisustvo antibiotika ili na oksidativni i nutritivni stres) (Bjarnsholt *i sar.*, 2013; Lee i Yoon, 2017). Međubakterijska komunikacija je povezana sa tolerancijom biofilmova *P. aeruginosa* na tobramicin i vodonik peroksid (Tolker-Nielsen, 2014).

e) Rezistencija bakterija na antibakterijske agense (rezistencija u užem smislu)

Problem sa rezistentnim bakterijama u okviru biofilma može nastati kada multirezistentni soj formira biofilm ili kada usled mutacija dođe do rezistencije kod bakterija koje su već formirale biofilm (Bjarnsholt *i sar.*, 2013). Visoka učestalost mutacija i povećan horizontalni transfer genetičkih elemenata u biofilmovima *P. aeruginosa* doprinose multirezistenciji na niz antibakterijskih agenasa, uključujući i antibiotike kao što su β -laktami, aminoglikozidi i fluorohinoloni (Højby *i sar.*, 2010). Posebno je interesantan podatak da rezistencija na antibiotike koincidira sa

rezistencijom na neke dezinficijense (hlorheksidina, triklosana i amonijumovih kvaternarnih sol) čime problem uklanjanja biofilmova postaje još veći (Bjarnsholt *i sar.*, 2013; Silver *i sar.*, 2006).

2.4.3. Strategija borbe protiv biofilmova

Biofilmovi predstavljaju jednu od nezaobilaznih meta u terapiji hroničnih infekcija. Identifikacija strukturno novih antibakterijskih agenasa i razvoj novih terapijskih strategija koje bi omogućile efikasno lečenje infekcija praćenih biofilmovima i dalje predstavljaju izazov.

Predloženo je nekoliko strategija u borbi protiv biofilmova (Bjarnsholt *i sar.*, 2013):

- a) blokiranje površinskih struktura, čime se sprečava adhezija bakterija na površine (prevencija formiranja biofilma),
- b) slabljenje biofilmova korišćenjem enzima koji bi vršili degradaciju struktura ekstracelularnog matriksa biofilma ili primenom inhibitora međubakterijske komunikacije (slabljenje biofilma)
- c) degradacija već formiranih biofilmova mehanički ili enzimskim putem i primenom inhibitora međubakterijske komunikacije.

a) Prevencija formiranja biofilma

Prevencija formiranja biofilma predstavlja najoptimalniji način borbe protiv infekcija praćenih biofilmovima. Treba imati u vidu da, iako su planktonske ćelije osetljivije na antibakterijske agense i na aktivnosti imunološkog sistema domaćina, do prve terapije ili aktivnosti imunološkog sistema dolazi tek po formiranju biofilma. Razlog ovome je što se na mestu inicijalne kolonizacije tkiva razvija veoma slaba inflamacija, tako da organizam prepoznaje „ozbiljnost” infekcije tek onda kada je biofilm formiran i kada ne može da ga odstraniti (Bjarnsholt *i sar.*, 2013). Kao način prevencije formiranja biofilma, instrumenti i implanti se mogu obložiti antibakterijskim sredstvima da bi se sprečilo da postanu mesta kolonizacije bakterijama (npr. kateteri se oblažu hlorheksidin-srebro sulfadiazinom) (Bjarnsholt *i sar.*, 2013; Koo *i sar.*, 2017).

Razvoj vakcina na osnovu antigena, kao što su flagelin, pilin ili komponente lipopolisaharida, je još jedan od načina preventivne borbe protiv formiranja biofilma (Bjarnsholt *i sar.*, 2013; Rybtke *i sar.*, 2011).

b) Slabljenje biofilma

Strategija slabljenja biofilma podrazumeva borbu protiv biofilma putem: inaktivacije faktora virulencije bakterijskih ćelija u okviru biofilma, inaktivacije sistema međubakterijske komunikacije, narušavanje homeostaze metabolizma gvožđa, kao i modulacije aktivnosti sRNK (Bjarnsholt *i sar.*, 2013). Elegantniji pristup inhibiciji faktora virulencije je primena inhibitora sistema međubakterijske komunikacije. Pošto ovi sistemi koordinišu ekspresiju velikog broja faktora virulencije, uključujući i važan proces sazrevanja biofilma, inhibitori sistema međubakterijske komunikacije omogućavaju borbu protiv biofilmova multirezistentnih sojeva uz minimalni rizik da će doći do pojave rezistencije na QS inhibitore (Bjarnsholt *i sar.*, 2013; Rybtke *i sar.*, 2011; Tolker-Nielsen, 2014). Inhibitori ovih sistema mogu biti poreklom iz biljaka, bakterija, gljiva ili mogu biti hemijski sintetisani. Metabolizam gvožđa je još jedno moguće mesto delovanja antibiofilm agenasa. Kombinacija antibiotika sa helatorima gvožđa (antibiotik-siderofora konjugat) dovodi do inhibicije sazrevanja biofilma usled narušavanja homeostaze gvožđa (Rybtke *i sar.*, 2011). Slabljenje biofilma je moguće i inhibitornim delovanjem na signalne puteve koji koordinišu razvoj biofilma a najčešće mete su c-di-GMP i male RNK (Small RNA, sRNA) (Tolker-Nielsen, 2014).

c) Degradacija formiranog biofilma

Strategija degradacije biofilma podrazumeva uklanjanje formiranog biofilma mehaničkim putem, njegovu enzimsku razgradnju ili moduliranje signalnih puteva međubakterijske komunikacije (Bjarnsholt *i sar.*, 2013). Potpuno uklanjanje biofilma moguće je samo na određenim površinama. U slučaju da je biofilm formiran na tkivu ili implantu, hirurška intervencija uključuje uklanjanje obolelog tkiva, odnosno kontaminiranog implanta (Tolker-Nielsen, 2014). Enzimska degradacija biofilma

podrazumeva primenu enzima čiji su supstrati ključne komponente matriksa biofilma, kao što je DNAza koja degraduje važnu strukturnu komponentu ekstracelularnog matriksa - eDNK (Rybtke *i sar.*, 2011). U razvojnem ciklusu biofilma oslobađanje ćelija je normalna faza koja se nastavlja na proces maturacije i u tesnoj je vezi sa međubakterijskom komunikacijom. Delovanjem na signalne puteve međubakterijske komunikacije moguće je ubrzati prelazak bakterijskih ćelija iz biofilma u planktonsku formu u kojoj su ćelije osetljivije na delovanje antibakterijskih agenasa (Bjarnsholt *i sar.*, 2013). Glavni regulator prelaska bakterijskih ćelija iz planktonske forme u formu biofilma je c-di-GMP. Sintezom malih molekula koji bi inhibirali sintezu ovog molekula ili pak stimulisali njegovu razgradnju onemogućilo bi se formiranje biofilma i/ili ubrzao prelazak ćelija iz forme biofilma u formu planktonskih ćelija (Bjarnsholt *i sar.*, 2013; Koo *i sar.*, 2017).

2.4.4. Joni metala u borbi protiv *P. aeruginosa*

Veliki broj biohemijskih procesa u eukariotskim i prokariotskim ćelijama ne može se zamisliti bez prisustva jona metala. Određeni metali su neophodni za održavanje strukture ćelijske membrane i DNK a skoro polovinu poznatih enzima čine metaloproteini (Lemire *i sar.*, 2013; Waldron i Robinson, 2009). Prema značaju za metabolizam ćelije metale možemo podeliti na esencijalne, kao što su Fe, Cu, Ni, Zn, i za njih se zna tačna biološka funkcija, i neesencijalne, kao što je Ag, čija biološka funkcija nije poznata (Farrer i Sandler, 2011). Mnogi metali su toksični za sve vrste ćelija u visokim dozama, s tom razlogom što su doze citotoksičnosti za esencijalne metale značajno veće od onih za neesencijalne metale. Interesovanje za primenu metala kao antibakterijskih sredstava pojačano je usled saznanja da neki metali mogu da degradiraju biofilmove, da imaju sinergistično dejstvo sa drugim antibakterijskim sredstvima, da mogu da selektivno inhibiraju određene metaboličke puteve u ćeliji kao i da mogu da ubiju multirezistentne bakterije (Lemire *i sar.*, 2013). Dobro je poznato da su prokariotski i eukariotski transportni sistemi metala i metaloproteini evolutivno divergirali pa je verovatno da neki metali mogu da naprave razliku između vrste ćelija na koju deluju na osnovu ciljnog mesta (Lemire *i sar.*, 2013).

Metali izazivaju citotoksični efekat na ćelijama putem različitih mehanizama kao što su: ometanje funkcije enzima, proizvodnja ROS-eva, ometanje funkcionisanja

ćelijske membrane, ometanje unosa nutritijenata u bakterijsku ćeliju kao i putem genotoksičnosti (Lemire *i sar.*, 2013).

U dizajniranju bilo kog antibakterijskog leka važna je selektivna toksičnost odnosno delovanje tog leka na ciljane bakterijske ćelije. Toksičnost metala, inkorporiranih u antibakterijske preparate, na ćelije sisara može biti smanjena promenom načina aplikacije tog preparata ili njihovom primenom površinski, vezanih za neki materijal ili neki medicinski uređaj (Lemire *i sar.*, 2013). Jedan od novih načina upotrebe metala u borbi protiv patogenih bakterija je metoda nazvana „trojanski konj“. Na ovaj način se gvožđe, kao esencijalni element za metabolizam bakterije, zamenjuje nekim toksičnim metalom (Kaneko *i sar.*, 2007; Lemire *i sar.*, 2013). Primenom ove strategije metali se aplikuju vezani za siderofore kao što su dezferioksamin (DFO), enterohelin i/ili protoporfirin IX (Lemire *i sar.*, 2013). Novija istraživanja pokazuju da vodeni rastvor $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ pokazuje izuzetno jaku antibiofilm i antibakterijsku aktivnost ka multirezistentnim kliničkim sojevima *P. aeruginosa* (Kaneko *i sar.*, 2007). Jedan od potencijalnih načina eksploatacije antibakterijskog delovanja metala je i njihova kombinacija sa antibioticima. U istraživanju u kom je Ga-DFO istovremeno aplikovan sa gentamicinom, utvrđeno je da galijum poseduje antibiofilm aktivnost, čak i na zrelim biofilmovima (Banin *i sar.*, 2008). Korišćenje metala u vidu nanočestica jedan je od aktuelnih načina upotrebe metala u antibakterijske svrhe (Lemire *i sar.*, 2013).

2.4.5. Strategija tretmana pseudomonasnih infekcija kompleksima srebra

Usled visoke antibakterijske aktivnosti, a niske toksičnosti za eukariotske ćelije, srebro(I) jedinjenja pokazuju poželjnije terapijske karakteristike od ostalih vrsta metala koji imaju antibakterijsku aktivnost (Lemire *i sar.*, 2013).

Antibakterijska aktivnost srebra dobro je poznata već vekovima. Posuđe pravljeno od srebra i bakra, korišćeno je za dezinfekciju vode i čuvanje hrane još u doba Persije, starog Egipta, Grčke i Rima (Lemire *i sar.*, 2013). Doseljenici na severnoamerički kontinent su ostavljali srebrne novčiće u posuđe sa vodom, vinom, mlekom i sirćetom kako bi sačuvali svežinu i ispravnost namirnica, a sličnu strategiju koristili su japanski vojnici tokom Drugog svetskog rata kako bi sprečili širenje dizenterije (Lemire *i sar.*, 2013). Poslednje tri decenije interesovanje za jedinjenja srebra kao antibakterijske agense poraslo je prvenstveno zbog sve veće rezistencije

patogenih bakterija na antibiotike (Klasen, 2000a, b). Srebrom su danas impregnirani kateteri i ortopedska pomagala, a sve je veće interesovanje za razvoj novih topikalnih preparata koji bi sadržali srebro u cilju prevencije i lečenja kontaminiranih rana kod ljudi i životinja (Bjarnsholt *i sar.*, 2007).

Antibakterijska aktivnost srebra privlači sve veću pažnju istraživača i farmaceutske industrije i zbog novootkrivenog fenomena produžene baktericidne aktivnosti nazvanog „zombi” efekat, gde ubijene bakterije predstavljaju rezervoar jona srebra koji imaju mogućnost da ponovo deluju na žive bakterije (Wakshlak *i sar.*, 2015).

Poznato je nekoliko mehanizama na osnovu kojih joni srebra demonstriraju antibakterijsku aktivnost (Farrer i Sandler, 2011): joni srebra interaguju sa tiol grupom L-cisteina u proteinima inaktivirajući njihovu funkciju, joni srebra se vezuju za nukleinske kiseline, joni srebra dovode do oslobađanja kalijuma i joni srebra generišu superoksidge unutar ćelije.

Metalno srebro je inertno i ne reaguje sa prokariotskim ili eukariotskim ćelijama. Međutim, otpušteni joni srebra reaguju sa enzimima i proteinima bakterijske ćelije dovodeći do strukturnih promena u ćelijskom zidu i na ćelijskoj membrani, što rezultira dezintegracijom ćelije (Bjarnsholt *i sar.*, 2007). Dokazano je i da joni srebra interkaliraju u DNK i RNK molekule i na taj način ometaju fundamentalne fiziološke procese u bakterijskoj ćeliji (Lansdown, 2002). Smatralo se da je važan segment antibakterijske aktivnosti jona srebra njihova interakcija sa respiratornim lancem i formiranje ROS-ova, naročito superoksidnih radikala (Park *i sar.*, 2009). Utvrđeno je da joni srebra zadržavaju antibakterijsku aktivnost i u anaerobnim uslovima, što navodi na zaključak da srebro deluje na bakterijske ćelije istovremeno angažujući više različitih mehanizama (Park *i sar.*, 2009; Randall *i sar.*, 2013). Značajno je i da srebro(I) jedinjenja pokazuju inhibitornu aktivnost prema biofilmovima *P. aeruginosa* (Bjarnsholt *i sar.*, 2007). Još jedna važna osobina srebra je da može da ispolji svoj antibakterijski potencijal bez obzira na funkcionalnost QS sistema (Bjarnsholt *i sar.*, 2007).

Dostupnost jona srebra predstavlja bitnu stavku u dizajniranju antibakterijskih jedinjenja koja u sebi sadrže ovaj metal. Poželjno je da antibakterijska jedinjenja pokazuju efekat produžene aktivnosti, kako bi se sprečila ponovna kolonizacija i umnožavanje bakterija. Tako jedinjenja srebra i bakra u izuzetno malim količinama

postepeno otpuštaju katjone koji ispoljavaju toksičnost na bakterije (Wakshlak *i sar.*, 2015). Jedan od načina da se fino podesi aktivnost srebro(I) katjona je da se primene u formi kompleksa. Smatra se da u slučaju srebro(I) kompleksa, prilikom finog podešavanja aktivnosti, važnu ulogu imaju vrsta donorskog atoma i jednostavnost izmene liganda (Nomiya *i sar.*, 2004). Stoga, pogodnu klasu liganada za sintezu antibakterijskih srebro(I) kompleksa čine aromatični heterociklični ligandi koji sadrže azot (Kalinowska-Lis *i sar.*, 2016).

Veliko interesovanje za komplekse srebra u prevenciji i terapiji bakterijskih infekcija pokrenulo je pitanje pojave rezistencije bakterija na ova jedinjenja (Gupta i Silver, 1998). Rezistencija na srebro je moguća putem mutacije gena ili horizontalnim transferom ali to se retko dešava (Percival *i sar.*, 2005). Prilog ovoj tvrdnji je i činjenica da su bakterije u kontaktu sa subinhibitornim koncentracijama srebra već četiri milijarde godina i da pojava rezistencije širih razmera nije zabeležena (Percival *i sar.*, 2005). Rezistencija na srebro kod Gram-negativnih bakterija može se preneti horizontalnim transferom preko plazmida koji sadrži 14 kb veliki operon koji kodira Sil proteinski kompleks (Silver *i sar.*, 2006). Na ovaj način rezistencija se ostvaruje kombinovanim mehanizmom, sekvestracijom jona Ag^+ u periplazmi i efluksom Ag^+ jona iz citoplazme bakterijske ćelije (Randall *i sar.*, 2013; Silver *i sar.*, 2006).

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Istraživanja koja se bave izučavanjem korelacije faktora virulencije *P. aeruginosa* i njegovog patogenog potencijala su malobrojna i uglavnom fokusirana na jednu vrstu uzoraka, najčešće poreklom od čoveka.

Ovo ispitivanje predstavlja uporednu analizu izolata *P. aeruginosa* dobijenih iz različitih vrsta uzoraka poreklom od životinja i ljudi s ciljem da se utvrdi povezanost faktora virulencije i patogenosti na ćelijskom i molekularnom nivou. Istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije imala su tri specifična cilja:

1. Uporedna analiza odabranih faktora virulencije izolata *P. aeruginosa* izolovanih iz različitih vrsta uzoraka poreklom od životinja i ljudi sa referentnim sojem *P. aeruginosa* PAO1 i testiranje njihovog virulentnog i infektivnog potencijala *in vitro* na ćelijama iz ćelijske linije A549 i *in vivo* na modelu nematode *Caenorhabditis elegans*, odnosno modelu embriona zebrica (*Danio rerio*).
2. Uporedna analiza ekspresije gena virulencije odgovornih za sintezu polisaharidnih komponenti ekstracelularnog matriksa, komponenata signalnih puteva međubakterijske komunikacije (Las, Rhl i PQS), kao i gena odgovornih za sintezu fosfolipaze C i sintezu ramnolipida kod izabranih izolata *P. aeruginosa* i soja *P. aeruginosa* PAO1 gajenih u planktonskom obliku i u biofilmu.
3. Testiranje osetljivosti izabranih izolata *P. aeruginosa* i soja *P. aeruginosa* PAO1 u planktonskoj formi i njihovih biofilmova na komplekse srebra(I) sa ftalazinom.

Shodno ciljevima postavljeni su sledeći zadaci:

1. Prikupiti dovoljan broj ($n > 100$) izolata *P. aeruginosa* poreklom od obolelih životinja i ljudi;
2. Napraviti odabir izolata *P. aeruginosa* na osnovu sposobnosti da formiraju biofilm u mikrotitracionoj ploči sa 96 bunarčića ravnog dna za dalje analize;

3. Usporedno analizirati sposobnost odabranih izolata da formiraju biofilm u mikrotitracionoj ploči, da formiraju biofilm na granici vazduh-tečnost, da proizvode piocijanin, da se kreću (plivanje, grčenje i rojenje), da ostvare hemolitičku aktivnost, kao i citotoksični potencijal na ćelijama iz ćelijske linije A549;
4. Na osnovu rezultata dobijenih analizom citotoksičnog potencijala izolata, odabrati izolate za ispitivanje njihovog infektivnog potencijala na nematodama *C. elegans* i embrionima zebrića (*D. rerio*);
5. Usporedno analizirati ekspresiju odabranih gena kod izabranih izolata i soja *P. aeruginosa* PAO1 u planktonskoj formi i biofilmu;
6. Statistički obraditi rezultate dobijene mikrobiološkim i molekularno-genetičkim metodama;
7. Testirati osetljivost planktonskih ćelija kao i biofilmova odabranih izolata *P. aeruginosa* na nosintetisane komplekse srebra(I) sa ftalazinom i ispitati uticaj kompleksa srebra(I) sa ftalazinom na pokretljivost i proizvodnju piocijanina kod ovih izolata.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Poreklo ispitivanih izolata *Pseudomonas aeruginosa* i njihova karakterizacija

4.1.1. Poreklo ispitivanih izolata *P. aeruginosa*

Izolati *P. aeruginosa* korišćeni u eksperimentima u okviru ove disertacije dobijeni su sa Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, od veterinarske laboratorije „VetLab” iz Beograda i od Regionalne bolnice Valjevo. U periodu 2015-2016. Sakupljeno je 202 izolata *P. aeruginosa*. Od 202 izolata, 121 je bio poreklom iz uzoraka od životinja (pas n=109, mačka n=5, goveče n=5, hrčak n=1, zmija n=1), a 81 od ljudi (Tabela 4).

Tabela 4. Poreklo izolata i vrste uzoraka iz kojih su izolovani

Vrsta uzorka	Poreklo izolata	
	Životinje (A)	Ljudi (H)
Bris uha	55	12
Urinokultura	8	30
Bris rane	4	8
Bris kože	24	4
Vaginalni bris	11	4
Bris oka	6	1
Bris usta	5	1
Bris nosa	4	0
Sputum	0	21
Uzorak mleka	4	0
Ukupno	121	81

Za izolate poreklom iz bolničkih uzoraka dobijena je dozvola etičke komisije Regionalne bolnice Valjevo (broj dozvole 01/8570). Za izradu ove disertacije nisu korišćeni podaci o pacijentima iz čijih uzoraka je *P. aeruginosa* izolovan. Svi izolati su po identifikaciji dobijali laboratorijske oznake koje su sadržale slovo H, ako je reč o izolatu izolovanom iz uzoraka poreklom od ljudi, odnosno slovo A, ako je reč o izolatu izolovanom iz uzoraka poreklom od životinja. Kao referentni soj u svim ispitivanjima

korišćen je *P. aeruginosa* PAO1 (NCTC10332) koji je nabavljen iz Nacionalne kolekcije bakterijskih sojeva (NCTC, *eng.* National Collection of Type Cultures, Culture Collection of Public Health, Ujedinjeno Kraljevstvo).

4.1.2. Identifikacija bakterijskih izolata

Izolati su iz pomenutih ustanova preuzimani uz potvrdu da je reč o *P. aeruginosa*, ali je po prijemu u laboratoriju još jednom rađena identifikacija standardnim mikrobiološkim metodama (mikroskopski, kulturno i ispitivanjem fiziološko-biohemijskih osobina izolata). Svi izolati su dobijeni na komercijalnim podlogama za izolaciju bakterija i po prijemu u laboratoriji su zasejavani na selektivnu podlogu za izolaciju i identifikaciju *P. aeruginosa* (Pseudomonas Isolation Agar Base, HiMedia, Indija). Na izraslim kolonijama su urađeni oksidaza i katalaza testovi i pravljen je mikroskopski preparat koji je bojen po Gramu.

Oksidaza test je izvođen nanošenjem bakterijske kolonije na traku sa impregniranim reagensom (Torlak, Srbija). Prisustvo oksidaze (pozitivna reakcija) je dovelo do promene boje trake iz bele u crnu. Ispitivanje proizvodnje katalaze je izvođeno nakapavanjem vodenog rastvora H₂O₂ (3%, v/v) na bakterijske kolonije izrasle na čvrstim hranljivim podlogama. Kod pozitivne reakcije dolazilo je do pojave mehurića gasa na površini kolonije. Bojenje po Gramu izvođeno je po standardnoj proceduri (Bartholomew i Mittwer, 1952). Za izolate koji su bili katalaza i oksidaza pozitivni dodatno je urađena i identifikacija primenom BBL Crystal Enteric/Nonfermenter sistema (BBL Crystal enteric/nonfermenter ID kit, Becton, Dickinson and Company, SAD). Takođe, kao finalna potvrda identifikacije odabranih izolata urađena je i identifikacija putem analize parcijalne sekvence gena za 16S rRNK (odjeljak 4.6.4.).

4.1.3. Čuvanje izolata *P. aeruginosa* u laboratoriji

Svi izolati *P. aeruginosa* su čuvani u krioprotektivnoj podlozi (tripton soja bujon sa 20% (v/v) glicerola (Merck, Nemačka)) u zamrzivaču na -70 °C (ESCO, Lexicon ULT Freezer, Singapur). Za potrebe eksperimenata izolati su oživljavani i gajeni na

Luria Bertani agaru (LA) na 37 °C tokom 24 sata. Sastav svih mikrobioloških podloga dat je u odeljku 4.2.1.

4.2. Karakterizacija virulencije izolata *P. aeruginosa*

4.2.1. Mikrobiološke podloge

Za pripremu hranljivih podloga korišćeni su tripton soja bujon (Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo), ekstrakt kvasca i agar (Torlak, Srbija), glukoza (Becton, Dickinson and Company, Ujedinjeno Kraljevstvo) i kazaminokiseline (Sigma-Aldrich, SAD). Korišćene su mineralne soli: NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄ sve nabavljene od Sigma-Aldrich, Nemačka.

TSB (*eng.* Tryptic Soy Broth): 30 g/l. Sterilizacija autoklaviranjem 15 minuta na 121 °C.

LB (Luria Bertani bujon): NaCl 10 g/l, ekstrakt kvasca 5 g/l, tripton 10 g/l. Sterilizacija autoklaviranjem 15 minuta na 121 °C.

LA (Luria Bertani agar): NaCl 10 g/l, ekstrakt kvasca 5 g/l, tripton g/l, agar 15 g/l. Sterilizacija autoklaviranjem 15 minuta na 121 °C.

M8: 5 g/l Na₂HPO₄, 3 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l NaCl, 0,2% glukoze, 0,5% kazaminokiselina i 1 mM MgSO₄. Sterilizacija pojedinačnih komponenti autoklaviranjem 15 minuta na 121 °C, odnosno filtriranjem kroz filter promera 0,22 µm.

Agar: 0,3-1,5 %

PBS pufer (*eng.* Phosphate Buffered Saline - PBS): 8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,78 g/l Na₂HPO₄ × 2 H₂O; 0,27 g/l KH₂PO₄; pH 7,4). Sterilizacija putem filtracije.

Pseudomonas isolation agar base (HiMedia, India): 45,03 g/l sa 20 ml glicerola. Sterilizacija autoklaviranjem 15 minuta na 121 °C.

Za potrebe eksperimenata *P. aeruginosa* izolati su gajeni u 5 ml TSB tokom 18 sati na temperaturi od 37 °C, uz mešanje od 180 obrtaja /minuti u orbitalnoj mešalici, osim ako nije drugačije naznačeno.

4.2.2. Sposobnost izolata *P. aeruginosa* da formiraju biofilm u mikrotitracionim pločama (ukupan biofilm)

Sposobnost izolata *P. aeruginosa* da formiraju biofilm ispitivana je kvantitativnim testom u polistirenskim mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića ravnog dna (Sarstedt, Severna Karolina, SAD) po opisanoj metodi (Merritt *i sar.*, 2005). Princip ove metode je da bakterije na površini bunarčića mikrotitracionih ploča obrazuju biofilm koji se indirektno dokazuje bojenjem vodenim rastvorom kristal violeta. Rezultati se očitavaju spektrofotometrijskim merenjem.

Za potrebe ovog eksperimenta bakterijski izolati su gajeni na način opisan u odeljku 4.2.1. Od pune bakterijske kulture pravljene su suspenzije do optičke gustine (*eng.* Optical Density, OD) OD_{600} 0,2 što odgovara broju od $1,5-2 \times 10^8$ CFU/ml (Colony-Forming Units, CFU). Iz pripremljenih suspenzija zasejavano je po 100 μ l ispitivane kulture u bunarčiće na mikrotitracionoj ploči. Svaki izolat je zasejavan u šest bunarčića. Posle inkubacije na 37 °C u trajanju od 24 sata, medijum sa slobodnoživećim (planktonskim) ćelijama je uklanjan plastičnom Pasterovom pipetom, a bunarčići na mikrotitracionoj ploči su ispirani dva puta sterilnim PBS puferom. Posle ispiranja, ploča je ostavljena da se osuši strujanjem vazduha na sobnoj temperaturi (15 minuta), a potom je u svaki bunarčić dodavano po 100 μ l 99% hladnog metanola (v/v) radi fiksiranja biofilma. Vizuelizacija biofilma je izvođena njegovim bojenjem pomoću 125 μ l kristal violeta (0,1 %, v/v, Serva, Nemačka) u trajanju od 20 minuta. Posle ispiranja i sušenja mikrotitracionih ploča, boja sa površina bunarčića je rastvarana u 150 μ l sirćetne kiseline (33%, v/v, Serva, Nemačka). Apsorbanca je merena uz primenu filtera talasne dužine 550 nm na aparatu Tecan Infinite 200 Pro multiplate reader (Tecan Group Ltd., Švajcarska). Kao negativna kontrola, korišćeni su bunarčići koji su sadržali samo sterilni TSB i koji su tretirani na isti način kao i bunarčići koji su sadržali bakterijske kulture. Rezultati su predstavljani kao procenat formiranog biofilma u odnosu na biofilm koji formira referentni soj *P. aeruginosa* PAO1. Testiranje sposobnosti formiranja biofilma svakog izolata ponovljeno je u tri nezavisna eksperimenta.

4.2.3. Sposobnost izolata *P. aeruginosa* da formiraju biofilm na granici vazduh-tečnost (A-L biofilm)

Pseudomonas aeruginosa ne samo da formira biofilm na plastičnoj površini koja je u dodiru sa bakterijskom kulturom, već i na dodirnoj površini vazduh-tečnost. Ispitivanje sposobnosti bakterijskih sojeva da formiraju biofilm na ovoj površini izvedeno je u plastičnim epruvetama (Spektar d.o.o., Srbija) prema opisanom protokolu (Olejnickova i sar., 2014).

Suspenzija ispitivanog soja gustine $1,5-2 \times 10^8$ CFU/ml u količini od 200 μ l je dodavana u 1,8 ml sveže TSB podloge u plastičnim epruvetama i inkubirana 24 sata na 37 °C, uz mešanje od 90 obrtaja/minuti u orbitalnoj mešalici. Po završenoj inkubaciji, podloga sa planktonskim ćelijama je uklanjana plastičnim Pasterovim pipetama, a epruvete su ispirane tri puta sterilnim PBS puferom. Nakon sušenja strujanjem vazduha na sobnoj temperaturi tokom 15 minuta biofilmovi su bojeni korišćenjem 2 ml kristal violeta (0,1%, v/v). Radi kvantifikacije biofilma na dodirnoj površini vazduh-tečnost bilo je potrebno odstraniti deo biofilma formiranog na dnu epruvete, što je urađeno dodavanjem 1,5 ml sirćetne kiseline (33%, v/v). Posle rastvaranja boje, sadržaj je pažljivo uklanjano iz plastičnih epruveta, tako da je na zidu ostala samo kristal violet boja vezana za biofilm formiran u nivou dodirne površine vazduha i tečnosti. Potom je u epruvete dodavano po 2 ml sirćetne kiseline i mešano 30 sekundi na vorteks aparatu, čime je rastvoren kristal violet sa zidova epruvete. Merenje je vršeno u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića ravnog dna (Kartell, Italija), tako što je iz svake plastične epruvete uzimano po 150 μ l sirćetne kiseline u kojoj je rastvorena kristal violet. ApSORBANCA je merena uz primenu filtera talasne dužine 550 nm na aparatu Tecan Infinite 200 Pro multiplate reader. Kao kontrola, korišćene su plastične epruvete sa odgovarajućom količinom sterilne TSB, koje su tretirane na isti način kao i epruvete koje su sadržale bakterijske kulture. Rezultati su predstavljani kao procenat biofilma koji formira izolat na granici vazduh-tečnost u odnosu na formirani biofilm kod referentnog soja *P. aeruginosa* PAO1. Testiranje sposobnosti formiranja biofilma svakog izolata ponovljeno je u tri nezavisna eksperimenta.

4.2.4. Ispitivanje različitih vrsta pokretljivosti izolata *P. aeruginosa*

4.2.4.1. Plivanje

Kretanje bakterija kroz hranljivu podlogu koja sadrži mali procenat agara (0,3%, w/v) se u literaturi naziva plivanje (*eng. swimming*). Ispitivanje sposobnosti plivanja izolata *P. aeruginosa* urađeno je prema opisanom protokolu (Ha *i sar.*, 2014).

Za potrebe eksperimenta izolati su gajeni su na način opisan u odeljku 4.2.1., a potom je od pune bujonske kulture pravljen suspenzija gustine $1,5-2 \times 10^8$ CFU/ml. Korišćenjem sterilne čačkalice bakterije su inokulisane u sterilnu M8 podlogu sa 0,3% (w/v) agara. Inokulacija čačalicom je vršena tako da vrh čačkalice, koji je prvo uronjen u bakterijsku suspenziju, probije agar, ali ne dodirne dno Petrijeve šolje. Inokulisane podloge su potom inkubirane na 37 °C tokom 20 sati. Rezultati su predstavljani kao površina migracije bakterijske kolonije kroz M8 podlogu prema formuli $r^2\pi$ i izraženi u cm^2 , gde r predstavlja poluprečnik kružnice koju opisuju bakterije prilikom kretanja kroz agar. Ako je kolonija rasla u više pravaca, merena je dužina svakog kraka i izračunavana je srednja vrednost. Eksperiment je ponovljen tri puta.

4.2.4.2. Rojenje

Bakterijski izolati na hranljivim podlogama sa 0,6% agara pokazuju specifičan vid kretanja koji se u literaturi naziva rojenje (*eng. swarming*). Ispitivanje sposobnosti rojenja *P. aeruginosa* izolata izvedeno je prema opisanom protokolu (Ha *i sar.*, 2014).

Ispitivanje sposobnosti rojenja sojeva *P. aeruginosa* izvedeno je inkubacijom bakterija na M8 hranljivoj podlozi sa 0,6% (w/v) agara. Na sredinu M8 podloge, prethodno razlivene u standardne Petrijeve šolje, nanošeno je po 2,5 μl bakterijske suspenzije ispitivanog soja gustine $1,5-2 \times 10^8$ CFU/ml. Posle inokulacije, podloge su inkubirane tokom 20 sati na temperaturi od 37 °C. Rezultati su predstavljani kao površina migracije bakterijskih kolonija na M8 podlozi prema formuli $r^2\pi$ i izraženi u cm^2 , gde r predstavlja poluprečnik kružnice koju opisuju bakterije prilikom kretanja po agaru. Ako je kolonija rasla u više pravaca, merena je dužina svakog kraka i izračunavana je srednja vrednost. Eksperiment je ponovljen tri puta.

4.2.4.3. Grčenje

Ispitivanje pokreta grčenja (*eng.* twitching) kod *P. aeruginosa* zasniva se na merenju prečnika kretanja bakterijske kolonije na dnu plastične Petrijeve šolje. Ispitivanje sposobnosti grčenja izolata *P. aeruginosa* izvedeno je prema opisanom protokolu (Turnbull i Whitchurch, 2014).

Suspenzija ispitivanog soja gustine $1,5-2 \times 10^8$ CFU/ml je pomoću sterilne čačkalice inokulisana u Luria Bertani čvrstu podlogu sa 1% agara. Inokulacija je izvedena tako da vrh čačkalice, koji je prethodno uronjen u suspenziju bakterija, prođe kroz agar i dodirne dno plastične Petrijeve šolje. Inokulisane podloge su potom inkubirane tokom 72 sata na temperaturi od 25 °C. Posle inkubacije, agar je uklanjan metalnom špatulom, a Petrijeva šolja je ostavljena da se osuši (15 minuta na sobnoj temperaturi). Potom je dno Petrijeve šolje preliveno kristal violetom (2%, v/v) u trajanju od 10 minuta, posle čega je Petrijeva šolja ispirana destilovanom vodom sve do pojave bistre vode pri ispiranju. Nakon sušenja, na dnu Petrijeve šolje je uočavan trag kretanja bakterijske kolonije. Rezultati su predstavljani kao površina migracije bakterijskih kolonija na plastičnoj površini ispod agara a prema formuli: $r^2\pi$ i izraženi u cm^2 , gde je r poluprečnik kružnice koju opisuju bakterije prilikom kretanja. Ako je kolonija rasla u više pravaca, merena je dužina svakog kraka i izračunavana je srednja vrednost. Eksperiment je ponavljan tri puta.

4.2.5. Ispitivanje hemolitičke aktivnosti izolata *P. aeruginosa*

Ispitivanje hemolitičke aktivnosti bakterijskih izolata izvedeno je u eksperimentu sa ispranim eritrocitima ovce prema proceduri koju su opisali Olejnickova i saradnici (2014), pri čemu je merena količina oslobođenog hemoglobina iz razorenih eritrocita.

Za potrebe eksperimenta eritrociti iz pune krvi ovce (Torlak, Srbija) su dobijeni na sledeći način: 5 ml pune krvi je centrifugirano 10 minuta na $600 \times g$ obrtaja na temperaturi od 4 °C, (Centrifuge 5810, Eppendorf, Nemačka), posle čega je plastičnom pipetom odstranjena plazma, a talog eritrocita je resuspendovan u 5 ml sterilnog PBS pufera. Postupak je ponovljen tri puta, a isprani eritrociti su resuspendovani u 10 ml PBS pufera (1% suspenzije eritrocita).

Eksperiment je izvođen u plastičnim tubicama zapremine 1,5 ml (Eppendorf, Nemačka). U 1 ml bakterijske suspenzije ispitivanog izolata gustine $1,5-2 \times 10^8$ CFU/ml dodato je 50 μ l 1% suspenzije ispranih eritrocita ovce. Eksperiment je praćen tokom 3 sata na temperaturi od 37 °C. Posle isteka perioda inkubacije, nehemolizirani eritrociti su sakupljeni centrifugiranjem (20 minuta, $10\,000 \times g$, 20 °C, Eppendorf 5145 D centrifuga). Količina oslobođenog hemoglobina je određivana merenjem apsorbance na svetlosnoj dužini od 545 nm na spektrofotometru (Ultraspec 3300 pro, Amersham Biosciences, Ujedinjeno Kraljevstvo). U eksperimentu su kao kontrole korišćeni eritrociti inkubirani samo u sterilnoj podlozi (kontrola spontane hemolize), kao i eritrociti uništeni delovanjem 0,1% deterdženta tritona X-100 (Sigma-Aldrich, Nemačka) (kontrola totalne hemolize). Rezultati su predstavljeni kao procenat hemolize koju izazivaju testirani izolati u odnosu na totalnu hemolizu, a prema formuli:

$$\text{hemoliza (\%)} = \frac{\text{vrednost za određeni izolat} - \text{spontana hemoliza}}{\text{totalna hemoliza} - \text{spontana hemoliza}} \times 100$$

Eksperiment je ponovljen tri puta.

4.2.6. Ispitivanje proizvodnje piocijanina izolata *P. aeruginosa*

Sposobnost *P. aeruginosa* izolata da proizvode piocijanin određivana je merenjem optičke gustine supernatanta bakterijskih kultura gajenih tokom 18 sati (O'Loughlin *i sar.*, 2013). Za potrebe eksperimenta kulture bakterijskih izolata gajene su na način opisan u odeljku 4.2.1.

Suspenzija ispitivanog soja gustine $1,5-2 \times 10^8$ CFU/ml u količini od 1 ml je centrifugiran (20 minuta, $10,000 \times g$, 20 °C; Eppendorf 5145 D centrifuge). Optička gustina supernatanta je merena u spektrofotometru (Ultraspec 3300 pro) uz upotrebu filtera od 695 nm talasne dužine. Eksperiment je ponovljen tri puta. Rezultati su dobijeni primenom sledeće formule:

$$\text{piocijanin} = \frac{\text{OD}_{695} (\text{supernatant})}{\text{OD}_{600} (\text{puna kultura})}$$

Rezultati su predstavljeni kao odnos proizvedenog piocijanina za svaki izolat u odnosu na piocijanin koji proizvodi referentni soja *P. aeruginosa* PAO1 i izraženi u procentima.

4.3. Ispitivanje citotoksičnosti i infektivnosti izolata *P. aeruginosa*

4.3.1. Ispitivanje citotoksičnosti izolata *P. aeruginosa* na ćelijama iz ćelijske linije A549

Za ispitivanje citotoksičnog potencijala bakterijskih izolata u uslovima *in vitro* korišćene su ćelije karcinoma pluća čoveka iz ćelijske linije A549 (*eng.* American Type Culture Collection ATCC; Manasas, Virdžinija, SAD). Test se zasnivao na primeni boje propidijum jodida (PI, Sigma-Aldrich, Nemačka) koja se vezuje za DNK oštećenih ćelija i emituje fluorescentni signal (ekscitacija/emisija 493/636 nm). Boja PI ne prolazi kroz nenarušene ćelijske membrane, pa se kvantifikacija signala koji potiče od vezivanja ove boje za DNK oštećene ćelije uzima kao mera citotoksičnosti. Eksperiment je izveden prema opisanoj metodi (O'Loughlin *i sar.*, 2013).

Ćelije iz ćelijske linije A549 su čuvane u krioprotektivnoj podlozi u tečnom azotu. Nekoliko dana pre početka eksperimenta ćelije su oživljavane u komercijalnoj RPMI - 1640 podlozi (u daljem tekstu samo RPMI, Sigma-Aldrich, Nemačka) uz dodatak 100 µg/ml streptomocina (Sigma-Aldrich, Nemačka), 100 U/ml penicilina (Sigma-Aldrich, Nemačka) i 10% (v/v) goveđeg fetalnog seruma (Fetal Bovine Serum, FBS, Sigma-Aldrich, Nemačka). Ćelije su gajene u plastičnim posudama za gajenje ćelijskih kultura zapremine 75 ml (Sarstedt, Nemačka) do formiranja ćelijskog sloja koji pokriva celu površinu dna plastične posude, u inkubatoru sa 5% CO₂ i na temperaturi od 37 °C u proseku 2-3 dana. Formirani ćelijski sloj je ispiran sterilnim PBS puferom koje prethodno zagrejan na temperaturu od 37 °C stepeni, a potom su ćelije odvajane od podloge tretmanom sa 1% tripsin - EDTA rastvorom (Sigma-Aldrich, Nemačka) inkubacijom na 37 °C, 2-3 minuta. Resuspendovane ćelije u EDTA rastvoru su potom mešane sa novom sterilnom RPMI podlogom i zasejavane u nove plastične posude. Za eksperiment su uvek korišćene ćelije iz drugog ili trećeg presejavanja.

Za potrebe eksperimenta, ćelije su posle tretmana sa tripsin – EDTA rastvorom i dodavanja nove sterilne RPMI podloge, prebacivane u plastične epruvete i centrifugirane (1250 obrtaja/minuti, 10 minuta na sobnoj temperaturi, Heraeus Centrifuges, Thermo Scientific, SAD). Podloga je potom sterilnom plastičnom Pasterovom pipetom odstranjivana, a ćelijski talog je resuspendovan u 20 ml sterilne RPMI podloge i pažljivo mešan, uz pomoć plastičnih pipeta,. Ćelije su potom brojane u hemocitometru (Hausser Scientific, SAD). Po potrebi suspenzija ćelija je razblaživana tako da u 100 µl RPMI podloge bude oko 100,000 ćelija. Eksperiment je izvođen u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića ravnog dna. Za svaki bakterijski izolat koji je ispitivan korišćeno je šest bunarčića na mikrotitracionoj ploči ispunjenih RPMI podlogom (šest istovetnih ponavljanja). Mikrotitracione ploče sa zasejanim ćelijama su inkubirane 20 sati pod standardnim uslovima (37 °C, 5% CO₂). Eksperiment je ponavljan dva puta.

Bakterijski izolati su za ovaj eksperiment gajeni u uslovima opisanim u odeljku 4.2.1. Umnožene bakterijske ćelije su potom ispirane sterilnim PBS puferom i resuspendovane u modifikovanoj RPMI podlozi koja je sadržala 0,5% (v/v) FBS i 10 µg/ml PI i nije sadržala antibiotike. Suspenzija bakterijskih ćelija odgovarala je optičkoj gustini OD₆₀₀ 0,02 (1,5-2×10⁷ CFU/ml).

Umnožene ćelije iz ćelijske linije A549 su ispirane tri puta sterilnim i zagrejanim PBS puferom, a potom prelivane suspenzijom bakterija u RPMI podlozi. Fluorescenca PI je merena na svaka 2 sata (ekscitacija/emisija - 535nm/617nm) u periodu od 20 sati, u aparatu Tecan Infinite M200 Pro multiplate reader. Kao kontrole korišćene su bakterijske ćelije u RPMI podlozi, kao i ćelije iz ćelijske linije A549 u RPMI podlozi. Dobijeni rezultati su prikazani kao odnos citotoksičnosti izazvane ispitivanim izolatima u odnosu na citotoksičnost izazvanu deterdžentom (0,1% Triton-X100), čija je vrednost uzeta kao 100% citotoksičnost.

4.3.2. Ispitivanje infektivnosti izolata *P. aeruginosa* u model sistemu *Caenorhabditis elegans* AU 39 (*glp-4*; *sek -1*)

Caenorhabditis elegans soj AU 39 (*glp-4*; *sek-1*) dobijen je iz Centra za genetiku *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans* Genetics Center, Univerzitet u Minesoti, Minesota, SAD). U odnosu na divlji soj, ovaj soj je sterilan na temperaturi izvođenja eksperimenta

i pojačano osetljiv na nekoliko bakterijskih vrsta uključujući i *P. aeruginosa*. Suština ovog testa je bila u praćenju preživljavanja nematoda u periodu od sedam dana u prisustvu različitih izolata *P. aeruginosa*. Kao referentni soj korišćen je *P. aeruginosa* PAO1 za koji u literaturi postoji podatak da je umereno patogen za *C. elegans* (Lee *i sar.*, 2006).

Podloge korišćene u ovom eksperimentu su: NGM (Nematode Growth Medium) 2,5 g/l peptona, 3 g/l NaCl, 17 g/l agara i 970 ml destilovane vode je autoklavirano 15 minuta na 121 °C, posle čega je u rastvor dodavano 5 mg/ml holesterola (Sigma-Aldrich, nemačka) rastvorenog u 99% etanolu (Sigma-Aldrich, Nemačka), 1 ml 1 M CaCl₂, 1 ml 1 M MgSO₄ i 25 ml 1 M KPI pufera (108,3 g KH₂PO₄; 35,6 g K₂HPO₄; pH 6)); M9 rastvor (3 g/l KH₂PO₄, 6 g/l Na₂HPO₄, 5 g/l NaCl, a posle autoklaviranja na 121 °C 15 minuta dodavan je 1 ml/l 1 M MgSO₄); M9 obogaćena podloga (95% M9 bujona, 5% TSB bujona, 10 µl/ml holesterola (Sigma-Aldrich, Nemačka) rastvorenog u 99% etanolu (Sigma Aldrich, Nemačka).

Propagacija crva u laboratorijskim uslovima rađena je prema protokolu (Stiernagle, 2006). Crvi su gajeni na podlogama za rast crva, NGM. Podloga je potom razlivena u Petrijeve šolje i na očvrslu podlogu dodavano je po 500 µl bujonske kulture *Escherichia coli* soj OP50 kojom se nematode hrane u laboratorijskim uslovima. Podloge su zatim inkubirane 24 sata na temperaturi od 37 °C, a po isteku inkubacije su na njih prenošeni crvi. *Escherichia coli* OP50 je dobijena ljubaznošću prof. dr Aleksandre Trifunović, Cluster of Excellence for Aging Research, Keln, Nemačka.

Priprema crva i bakterijskih kultura za potrebe eksperimenta je izvođena prema protokolu (Scoffone *i sar.*, 2016) uz određene modifikacije. Crvi su inkubirani na NGM podlozi na temperaturi od 15 °C u trajanju od nekoliko dana, do dobijanja dovoljne količine jaja. Potom su populacije crva sinhronizovane (kako bi u eksperimentu svi crvi bili u stadijumu larve L4). Crvi su pomoću rastvora M9 spirani sa NGM podloge i u suspenziju crva zapremine 3,5 ml dodavano je po 500 µl 5 M NaOH i 1 ml 14% NaClO. Crvi su potom mešani u trajanju od 10 sekundi 4-5 puta sa razmakom između svakog mešanja u trajanju od 2 minuta. Posle propadanja odraslih stadijuma u rastvoru su ostajala samo jaja koja su peletirana centrifugiranjem (1 minuta, 2000 obrtaja/minuti, 15 °C). Nakon uklanjanja supernatanta, jaja su resuspendovana u svežem M9 rastvoru i ispirana nekoliko puta. Na kraju su jaja resuspendovana tako da u 10 µl M9 rastvora

bude 150-200 jaja. Tako pripremljena jaja inokulisana su na svežu NGM podlogu i inkubirana na temperaturi od 25 °C u trajanju od 48 sati, tj. do prelaska crva u larveni stadijum L4, čime je postignuta sinhronizacija populacije.

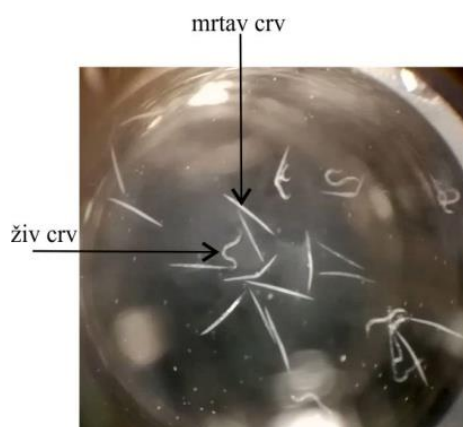
Eksperiment je izveden u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića ravnog dna (Kartell, Italija), pri čemu je svaki izolat zasejan u po 4 bunarčića u kojima su se već nalazili crvi. Bakterije su za potrebe eksperimenta gajene u TSB podlozi pod već opisanim uslovima u odeljku 4.2.1. Bakterijske ćelije iz bujonske kulture su ispirane dva puta M9 obogaćenom podlogom. Posle peletiranja bakterijske ćelije su resuspendovane u svežoj OGM podlozi tako da je optička gustina OD₆₀₀ iznosila 2, što je odgovaralo broju bakterija od $1,5-2 \times 10^9$ CFU/ml.

Sinhronizovana populacija crva je rasla do stadijuma L4 da bi potom bila spirana M9 obogaćenom tečnom podlogom sa NGM podloge. U plastičnoj epruveti su prikupljeni crvi sa nekoliko NGM podloga (u proseku 3 do 4) i ostavljani da se sakupe na dnu epruvete (10-20 minuta). Potom je tečnost iznad crva uklanjana plastičnom Pasterovom pipetom, a crvi resuspendovani u svežoj M9 obogaćenoj podlozi. Ovaj proces je ponavljan dva do tri puta, tj. do momenta kada je M9 obogaćena podloga u kojoj su crvi resuspendovani postajala bistra. Zatim se pristupalo pravljenju suspenzije crva tako da u 25 µl suspenzije bude 25-35 crva. Suspenzija je pravljena metodom razblaživanja peletiranih crva u ovoj tečnoj podlozi i praćenja njihovog broja pod mikroskopom. Peletirani crvi su prvo resuspendovani u 5 ml obogaćene M9 tečne podloge a potom je pod mikroskopom određivan njihov broj u 25 µl ove tečne podloge, u slučaju da je broj crva bio manji ili veći od ženjenog opsega od 25 – 35, crvi su ponovo peletirani a potom resuspendovani u manjoj ili većoj zapremini ove tečne podloge.

U mikrotitracione ploče prvo je dodavano 50 µl sveže, sterilne M9 obogaćene podloge podloge, a potom 25 µl pripremljene suspenzije crva, kao i 25 µl suspenzije ispitivanog *P. aeruginosa* izolata. Kao kontrole korišćeni su crvi u M9 obogaćenoj tečnoj podlozi bez ispitivanih izolata. Preživljavanje crva praćeno je u periodu od sedam dana pomoću stereomikroskopa (SMZ143-N2GG, Motic, Nemačka). Crvi koji su imali izgled rigidnog štapa i nisu se pokretali čak ni posle dodirivanja metalnom žičicom smatrani su mrtvim (Slika 5). Rezultati su predstavljani kao procenat preživelih crva u odnosu na ukupan broj crva primenom formule:

$$\text{živi crvi (\%)} = \frac{\text{broj živih crva u ispitivanom bazenčiću} - \text{kontrolna grupa}}{\text{ukupan broj crva u bazenčiću} - \text{kontrolna grupa}} \times 100$$

Preživljavanje crva je predstavljeno Kaplan-Majerovom krivom preživljavanja. Eksperiment je ponovljen tri puta.



Slika 5. Mrtvi i živi crvi fotografisani fotoaparatom na stereomikroskopu.

4.3.3. Ispitivanje infektivnosti izolata *P. aeruginosa* u model sistema embriona zebriće (*Danio rerio*)

Divlji soj zebriće (*Danio rerio*) je dobijen ljubaznošću dr Ane Cvejić (Wellcome Trust Sanger Institute, Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo). Zebriće su gajene u uzgajalištu za zebriće pod kontrolisanim uslovima (temperatura vode 28°C, svetlosni režim 14 sati dan : 10 sati mrak) i hranjene su suvom hranom (TetraMin™ flakes; Tetra Melle, Nemačka) dva puta dnevno, odnosno svežim *Artemia nauplii* jednom dnevno. Nakon parenja adultnih ženki i mužjaka (odnos 2:3), dobijeni embrioni su sakupljeni i isprani od detritusa, a potom gajeni u Petrijevoj šolji sa vodom za embrione (0,2 g/l of Instant Ocean® Salt u destilovanoj vodi) na temperaturi od 28,5 °C. U stadijumu razvoja od 24 sata embrionima je pincetom uklonjen horion i potom su vraćeni u inkubator do trenutka mikroinjektiranja.

Bakterijski izolati za potrebe eksperimenta su pripremani prema opisanom protokolu (Brannon *i sar.*, 2009). Svaki od ispitivanih izolata je gajen u 5 ml TSB podloge na način opisan u odeljku 4.2.1. Narasle bakterijske kulture su razređene u svežoj TSB podlozi u odnosu 1:100. Ovako razređene kulture su vraćene na inkubaciju

do rasta koji odgovara optičkoj gustini OD₆₀₀ od 0,7 do 0,8 što odgovara ukupnom broju bakterija od $7-8 \times 10^8$ CFU/ml. Za pripremu inokuluma za mikroinjektiranje, 2 ml bakterijske kulture u log fazi rasta je centrifugirano ($1500 \times g$, 5 minuta, Eppendorf Centrifuge 5415D), a potom je pelet ispiran dva puta sterilnim PBS puferom. Isprane bakterijske ćelije su potom resuspendovane u odgovarajućoj količini PBS pufera tako da suspenzija odgovara broju ćelija od 3×10^8 CFU/ml.

Embrioni zebrica u razvojnem stadijumu 30-32 sata nakon oplodnje su anestetizirani u rastvoru trikaina (200 µg/ml, Sigma-Aldrich, SAD), a potom je 2 nl (600 – 650 bakterijskih ćelija) prethodno pripremljenog bakterijskog inokuluma ili sterilnog PBS-a injektirano u duktus žumancetne kese (Clatworthy *i sar.*, 2009). Injektiranje je izvedeno pomoću pneumatske pikopumpe (PV820, World Precious Instruments, SAD). Za ispitivanje infektivnosti svakog odabranog izolata korišćeno je 25 – 30 embriona. Kao negativna kontrola korišćen je sterilan PBS pufer. Takođe, neinjektirani embrioni su korišćeni kao kontrola preživljavanja. Injektirani embrioni su potom gajeni u mikrotitracionim pločama sa 24 bunarčića (u svaki bunarčić mikrotitracione ploče je stavljeno do 10 embriona u 1 ml vode za embrione) na temperaturi od 28,5 °C. Preživljavanje inficiranih embriona je praćeno naredna četiri dana (do starosti embriona od 120 sati) pomoću stereomikroskopa (SMZ143-N2GG, Motic), a mrtvi embrioni su uklanjani svaki dan. Tokom četiri dana praćena je pojava različitih morfo-fizioloških parametara (Tabela 5). Kao moribundni embrioni označavani su teratogeni embrioni koji su imali spor i jedva primetan ritam rada srca. Za dodatnu proveru broja bakterijskih ćelija u injektiranom inokulumu, tri kapljice koje sadrže po 10 µl PBS pufera su injektirane sa po 2 nl pripremljene kulture, razblažene 10 puta i zasejane na prethodno pripremljenu LA podlogu i inkubirane na 37 °C tokom 24 sata. Eksperiment je ponovljen tri puta.

U cilju praćenja širenja bakterijske infekcije kroz telo embriona *in vivo*, izolati bakterija su obeležavani fluorescentnom bojom inkubiranjem u 10 µM rastvora boje CellTracker™ Red CMTPX Dye (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, SAD). Bakterijske kulture u logaritamskoj fazi rasta (OD₆₀₀ 0,7 – 0,8) su centrifugirane ($1500 \times g$, 5 minuta, Eppendorf Centrifuge 5415D), a potom su peletirane bakterijske ćelije resuspendovane u 4 ml 10 µM rastvora boje CellTracker™ Red CMTPX Dye u RPMI podlozi (bez seruma) i mešane 30 minuta na 37 °C i 180 obrtaja/minuti. Nakon

toga pripremljena suspenzija je centrifugirana, bakterijske ćelije su ispirane u PBS puferu, a optička gustina (OD₆₀₀) od 0,7-0,8 je podešena tako da odgovara broju od 3×10⁸ CFU/ml (600-650 bakterija/2 nl). Preživljavanje inficiranih embriona predstavljeno je Kaplan-Majerovom krivom preživljavanja. Celokupan eksperimentalni rad na modelu zebrića urađen je u skladu sa Evropskom direktivom (EU2010/63) i prema Pravilniku za rad sa oglednim životinjama Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.

Tabela 5. Lista letalnih i teratogenih efekata koji su praćeni na embrionima *D. rerio* tokom 120 spf (spf – sati posle fertilizacije).

Kategorija	Razvojni proces	Vreme (hpf)			
		24	48	72	96-120
Letalni efekat	Koagulacija jajeta (embriona) ^a	●	●	●	●
	Odsustvo formiranja somita	●	●	●	●
	Rep nije odvojen	●	●	●	●
	Odsustvo kontrakcija srca		●	●	●
Teratogeni efekat	Malformacija glave	●	●	●	●
	Malformacija očiju ^b	●	●	●	●
	Malformacija sakula/otolita ^c	●	●	●	●
	Malformacija notohorde	●	●	●	●
	Malformacija repa ^d	●	●	●	●
	Skolioza	●	●	●	●
	Promena frekvence rada srca		●	●	●
	Promena u cirkulaciji krvi		●	●	●
	Edem perikardijalne duplje	●	●	●	●
	Edem žumancetne kese	●	●	●	●
	Deformacija žumancetne kese	●	●	●	●
	Oblik i veličina jetre				●
	Promene u veličini/dužini tela ^e	●	●	●	●

^a Zastoj u razvoju embriona (organogenezi)

^b Malformacije oka su detektovane kao promene u veličini i obliku oka

^c Odsustvo otolita ili prisustvo više od dva otolita u sakulusu. Redukcija ili uvećanje otolita i sakulusa.

^d Malformacije repa su detektovane kao promene u obliku i položaju repa u odnosu na kontrolne embrione.

^e Poremećaji rasta embriona su detektovani kao zastoj u razvoju embriona i povećanju njegove veličine (praćeno pre izleganja embriona, 24 spf i 48 spf), odnosno dužine tela (praćeno odmah po izleganju i 72 spf) korišćenjem svetlosnog mikroskopa (CKX41; Olympus, Japan).

4.4. Analiza biofilmova fluorescentnom mikroskopijom

Metoda fluorescentne mikroskopije je korišćena za posmatranje preživljavanja ćelija iz ćelijske linije A549 u prisustvu odabranih izolata *P. aeruginosa*, kao i za vizuelizaciju efekata kompleksa srebra BG1 i BG2 na formiranje biofilmova, kao i na degradaciju već formiranog biofilma.

4.4.1. Posmatranje biofilmova izolata *P. aeruginosa* formiranih na sloju ćelija A549

Bakterijski biofilmovi formirani na sloju ćelija A549 su posmatrani fluorescentnim mikroskopom posle bojenja trima različitim bojama: SYTO® 9 bojom (TermoFisher Scientific, SAD), DAPI bojom (4',6-diamidin-2-fenilindol, TermoFisher Scientific, SAD) i propidijum jodidom (PI, Sigma-Aldrich, Nemačka). Sve tri boje se vezuju za DNK, s tim da PI ne prolazi kroz nenarušenu ćelijsku membranu, pa se koristi kao indikator vijabilnosti i bakterijskih ćelija i ćelija linije A549 na preparatu.

Ćelije su gajene prema već opisanom protokolu u odeljku 4.3.1. U mikrotitracione ploče sa 24 bunarčića ravnog dna (Sarstedt, Nemačka) su postavljana UV-sterilisana pokrovna mikroskopska stakla koja su potom prelivena sa 1 ml suspenzije A549 ćelija u RPMI podlozi (od 200,000 ćelija/ml). Inkubacija je trajala 24 sata, na temperaturi od 37 °C pri koncentraciji CO₂ od 5%.

Ispitivani izolati *P.aeruginosa* su gajeni na način opisan u odeljku 4.2.1. Umnoženi ispitivani izolati su isprani sterilnim PBS puferom i resuspendovani u RPMI podlozi bez antibiotika i sa 0,5% (v/v) fetalnog goveđeg seruma. Resuspendovane bakterijske ćelije u RPMI podlozi su razređene do gustine koja je imala vrednost OD₆₀₀ 0,002, što odgovara ukupnom broju ćelija od 1,5-2×10⁶.

Podloga iz mikrotitracionih ploča u kojima su gajene ćelije A549 je uklanjana plastičnom Pasterovom pipetom, a bunarčići su ispirani zagrejanim sterilnim PBS puferom. Potom je u svaki bunarčić dodavana bakterijska suspenzija. Eksperiment je postavljan uvek u dve mikrotitracione ploče paralelno, sa identičnim brojem bakterijskih i A549 ćelija, a inkubacija je trajala 8 sati (mikrotitraciona ploča 1) i 16 sati (mikrotitraciona ploča 2). Po završenoj inkubaciji sledila je priprema preparata za mikroskopiranje koja se sastojala u bojenju A549 ćelija i bakterijskih ćelija na pokrovnom staklu sa tri boje. Prvo je sadržaj bunarčića mikrotitracionih ploča

odstranjen, potom je bunarčić ispiran sa PBS puferom, a nakon toga je svako mikroskopsko pokrovno staklo prelivano sa 300 μ l PBS pufera koji je sadržao svaku od tri boje, SYTO® 9, DAPI i PI, u finalnoj koncentraciji od 2,5 μ M. Bojenje A594 ćelija i biofilma je trajalo 30 minuta, u mraku, na sobnoj temperaturi. Boja je posle isteka tog vremena uklanjana ispiranjem sterilnim PBS puferom, a pokrovno mikroskopsko staklo je prebacivano na staklenu pločicu za mikroskopiranje i posmatrano na Olympus BX51 fluorescentnom mikroskopu (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan), pod uveličanjem od 20,000 i 40,000 puta, uz korišćenje odgovarajućih filtera za detekciju DAPI, PI i SYTO® 9 boja. Maksimum ekscitacije, tj. emisije za SYTO® 9 je 480 nm, odnosno 500 nm, za PI 490 nm, odnosno 635 nm, a za DAPI 358 nm, odnosno 461 nm. Analiza dobijenih slika rađena je u programu Cytovision 3.1 (Applied Imaging Corporation, Kalifornija, SAD).

4.4.2. Posmatranje biofilmova izolata *P. aeruginosa* formiranih u prisustvu kompleksa srebra(I) sa ftalazinom

Za potrebe vizuelizacije efekata kompleksa srebra(I) na formiranje biofilma izolata *P. aeruginosa*, odnosno na degradaciju već formiranih biofilmova, odabrani izolati su kultivisani na plastičnim mikroskopskim pokrovnim pločicama. U eksperimentu su korišćene već opisane boje PI i SYTO® 9.

Izolati *P. aeruginosa* su gajeni pod opisanim uslovima u odeljku 4.2.1. Potom su bakterijske kulture razblaživane do gustine $4,5-5 \times 10^7$ CFU/ml (OD_{600} 0,05) i u bunarčiće mikrotitracionih ploča sa 24 mesta postavljene su plastične pokrovne mikroskopske pločice koje su prethodno tretirane 70% alkoholom i izlagane UV svetlu u trajanju od 30 min. Sterilnost pokrovnih ljušpica kontrolisana je inkubacijom ljušpica u sterilnom LB medijumu tokom 24 sata. U svaki bunarčić dodavano po 3 ml pripremljene suspenzije ispitujućeg izolata i srebro(I) kompleks u koncentraciji koja je odgovarala njegovoj vrednosti od $0,5 \times \text{MIK}$ (minimalna inhibitorna koncentracija) za izolat koji se testira. Posle 24 sata inkubacije bunarčići su ispirani dva puta sa PBS puferom i na svaku pločicu dodavano je po 350 μ l rastvora PI i SYTO® 9 boje. Po isteku 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, višak tečnosti je uklanjana, a pločice su stavljane na mikroskopska stakla. Preparat je posmatran pod fluorescentnim mikroskopom na već opisan način.

Za potrebe ispitivanja efekta kompleksa srebra(I) na već formirani biofilm, biofilmovi su gajeni na gore opisan način tokom 24 sata, potom su bunarčići ispirani dva puta PBS puferom i u svež medijum su dodavani kompleksi srebra(I) u koncentraciji koja je odgovarala vrednosti $2 \times \text{MIK}$ za dati kompleks i za određeni izolat. Biofilmovi su potom inkubirani još 24 sata, posle čega se pristupalo pravljenju preparata za mikroskopiranje na identičan način kao u slučaju ispitivanja efekta kompleksa na formiranja biofilma.

4.5. Kvantifikacija proizvodnje quorum sensing autoinducera (senzornih molekula)

Kod *P. aeruginosa* proizvodnja biofilma regulisana je složenim sistemom međubakterijske komunikacije, stoga je praćena razlika u aktivnostima tri najznačajnija sistema međubakterijske komunikacije kod tri odabrana izolata koja pokazuju različitu sposobnost formiranja biofilмова. Dobijene vrednosti su poređene sa *P. aeruginosa* PAO1. Proizvodnja autoinducera za tri sistema QS međubakterijske komunikacije (Rhl, Las i PQS) u supernatantima odabranih izolata je kvantifikovana uz pomoć tri biosenzorska soja: *P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-*rhlA* ($\Delta rhlA$ Prh1A::lux) (Duan i Surette, 2007); *P. aeruginosa* PA14-R3 ($\Delta lasI$ PrsA::lux) (Massai i sar., 2011) i *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta pqsA$ (CTX lux::pqsA) (Fletcher i sar., 2007). Svaki od biosenzorskih sojeva je mutant za proizvodnju odgovarajućeg autoinducera čiji se nivo određuje, ali mogu da detektuju egzogeno dodati signalni molekul emitujući luminiscencu. Svi biosenzorski sojevi su dobijeni ljubaznošću dr Livie Leoni (Università Degli Studi Roma Tre, Rim, Italija).

4.5.1. Ispitivanje produkcije acil homoserin laktona (AHL)

Kvantifikacija proizvedenih autoinducera urađena je po prethodno opisanoj metodi (Pekmezovic i sar., 2016). Bakterijske kulture ispitivanih izolata gajene su pod uslovima opisanim u odeljku 4.2.1., s tim da je tečna podloga korišćena u ovim eksperimentima bila Luria Bertani bujon (LB). Umnožene bakterijske kulture su razblaživane u odnosu 1:100 u svežem LB bujonu i inkubirane na 37 °C tokom 6 sati. Po isteku inkubacije, po 1 ml kulture svakog ispitivanog izolata je centrifugiran 15

minuta na 13 000 obrtaja/minuti (Eppendorf Centrifuge 5415 D). Supernatant koji sadrži AHL je potom filtriran korišćenjem 0,22 µm filtera (Sarstedt, Nemačka) i čuvan 6 sati na -20°C.

Količina proizvedenog autoinducera Rhl sistema, C4-HSL, je merena u eksperimentima sa biosenzorskim sojem *P. aeruginosa* PAOJP2/pKD-rhlA (Δ rhlA PrhIA::lux), dok je količina autoinducera Las sistema, 3-oxo-C12-HSL merena korišćenjem biosenzorskog soja *P. aeruginosa* PA14-R3 (Δ lasI PrsA::lux). Biosenzorske kulture su gajene 18 sati u 5 ml LB podloge na orbitalnoj mešalici pri 180 obrtaja/minuti, na temperaturi od 37 °C. Umnožene bakterijske kulture su razblaživane u svežem LB bujonu do optičke gustine OD₆₀₀ 0,045 (što odgovara broju bakterija od 4,5-5×10⁷ CFU/ml).

Dvadeset mikrolitara supernatanta sa AHL dodavano je u 180 µl razređene kulture biosenzorskih sojeva *P. aeruginosa* PA14-R3 (Δ lasI PrsA::lux) i *P. aeruginosa* PAOJP2/ pKD-rhlA (Δ rhlA PrhIA::lux) (Duan i Surette, 2007). Kao negativna kontrola korišćene su razređene kulture biosenzorskih sojeva u koje je dodavano po 20 µl svežeg LB bujona.

Eksperiment je izvođen u zatamnjanim mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića ravnog, prozirnog dna (Microtiter plate black chimney well, Greiner, Austrija) da bi se izbeglo preklapanje signala između susednih bunarčića. Mikrotitracione ploče su inkubirane 4 sata na 37°C na orbitalnoj mešalici na 70 obrtaja/minuti. Kao kontrola sterilnosti korišćeni su bunarčići sa sterilnim LB bujonom. Nakon 4 sata, optička gustina (OD₆₀₀) i bioluminiscencija su simultano merene aparatom Tecan Infinite 200 pro multiplate reader. Dobijene vrednosti bioluminiscencije su normalizovane u odnosu na optičku gustinu prema formuli:

$$X_{\text{detekcija}} = \frac{\text{luminiscencija}}{OD_{600}}$$

Rezultati su predstavljeni kao arbitrarne jedinice u odnosu na vrednosti X_{detekcije} dobijene za referentni soj *P. aeruginosa* PAO1 i predstavljeni u vidu histograma. Eksperiment je rađen u triplikatu za svaki izolat i ponovljen dva puta.

4.5.2. Ispitivanje produkcije 2-heptil-3-hidroksi-4-hinolona

Za ispitivanje produkcije 2-heptil-3-hidroksi-4-hinolona (autoinducer PQS sistema) bakterijski izolati su gajeni u LB bujonu pod uslovima opisanim u odeljku 4.2.1. Umnožene bakterijske kulture su potom razblaživane u odnosu 1:100 u 10 ml LB bujona i inkubirane 24 sata (37 °C, 180 obrtaja/minuti). Nakon 24 sata, autoinduceri su izolovani iz kultura u stacionarnoj fazi rasta po prethodno opisanom postupku (Rampioni *i sar.*, 2010). Kulture izolata su prebacivane u plastične epruvete zapremine 50 ml, (Sarstedt, Nemačka) i dodavana im je jednaka zapremina etil acetata (Sigma-Aldrich, Nemačka) zakišljenog 0,1% sirćetnom kiselinom (Sigma-Aldrich, Nemačka). Suspenzija je snažno promešana i centrifugirana 15 minuta na 5000 obrtaja/minuti (Eppendorf 5804 R centrifuga). Izdvojena, organska faza je zatim prebacivana u staklene balone i rastvarač je uklonjen uparavanjem na vakumskom uparivaču (Buchi rotavapor R-200, Buchi, Švajcarska). Suva masa je zatim resuspendovana u 50 µl čistog metanola (Sigma-Aldrich, Nemačka) i rastvoreni ekstrakt je čuvan na 4 °C za dalje merenje PQS.

Za kvantifikaciju proizvedenog PQS autoinducera korišćen je biosenzorski soj *P. aeruginosa* PAO1 Δ pqsA (CTX *lux::pqsA*). Umnožena kultura biosenzorskog soja je razblaživana u odnosu 1:1000 u LB bujonu. Eksperiment je rađen u zatamnjanim mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića i prozirnim dnom (Microtiter plate black chimney well, Greiner, Austrija). Razblažena kultura biosenzorskoj soja PAO1 Δ pqsA (CTX *lux::pqsA*) u zapremini od 180 µl je gajena u prisustvu 5 µl ekstrakta (izolovanog PQS autoinducera). Kao negativna kontrola korišćena je razblažena kultura biosenzorskog soja u koju je dodato 5 µl metanola. Mikrotitracione ploče sa bakterijskom kulturom su inkubirane tokom 4 sata na 37 °C na orbitalnoj mešalici pri 70 obrtaja/minuti. Optička gustina i luminiscencija su merene na način opisan u odeljku 4.5.1.1.

4.6. Analiza proizvodnje egzopolisaharida – Congo red agar test

Congo red agar test je korišćen za analizu glavnih strukturnih komponenti matriksa biofilma: alginata, pel i psl egzopolisaharida. Ovaj test je izvođen na agaru uz dodatak indikatorskih boja Congo red i Coomassie brilliant blue. Na osnovu apsorpcije

indikatorskih boja od strane strukturnih komponenti matriksa biofilma, na Congo red agaru formiraju se fenotipski različite kolonije. Test je rađen, prema opisanom protokolu (Friedman i Kolter, 2004a).

Sastav Congo red agar podloga je bio sledeći: 1% tripton, 1% agar, Congo Red indikatorska boja 40 µg/ml (MP Biomedicals, LCC, Francuska) i Coomassie blue indikatorska boja 20 µg/ml (Sigma, Sigma-Aldrich, Ujedinjeno Kraljevstvo). Za pripremanje podloge bilo je potrebno odvojeno sterilisati rastvor triptona i agara, odnosno rastvor indikatorskih boja u autoklavu na 121 °C tokom 15 minuta. Posle hlađenja do 55 °C, u rastvor triptona i agara je dodavan rastvor indikatorskih boja.

Pripremljena Congo red agar podloga je razlivena u Petrijeve šolje (zapremina podloge oko 25 ml) i ostavljena na sobnoj temperaturi da se potpuno ohladi (24 sata).

Na svakoj Petrijevoj šolji je nacrtana šema po kojoj je nanošeno po 3 µl suspenzije ispitujućih izolata gustine $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (OD_{600} 0,2) koje su prethodno gajene prema već opisanim uslovima u odeljku 4.2.1. Inkubacija na temperaturi od 20 °C je trajala četiri dana. Fotografije izraslih kolonija su snimane digitalnim fotoaparatom (Canon, Japan).

4.7. Molekularno-biološke metode

4.7.1. Izolacija ukupne DNK

Ukupna DNK je izolovana iz bakterijskih ćelija gajenih u bujanskoj kulturi korišćenjem komercijalnog paketa za izolaciju ukupne DNK, KAPA Express Extract Kit (Kapa Biosystems, SAD). Za potrebe izolacije DNK, bakterije su gajene na način opisan u odeljku 4.2.1.

4.7.2. Umnožavanje gena za 16S rRNK

Lančana reakcija polimeraze (*eng.* Polymerase Chain Reaction, PCR) je korišćena za umnožavanje gena za 16S rRNK iz uzoraka totalne DNK. Ova reakcija se zasniva na tri procesa koji se sukcesivno ponavljaju: 1) denaturacija dvolančane DNK matrice *in vitro*, 2) hibridizacija oligonukleotida sa matricom na osnovu komplementarnosti baza i 3) sinteza komplementarnog lanca DNK, odnosno ekstenzija

oligonukleotida, tj. prajmera aktivnošću DNK polimeraze (White, 1997). Za umnožavanje željenih delova DNK u reakciji lančane polimeraze, korišćen je aparat 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD). Svaka PCR reakcija je sadržala, prema uputstvu proizvođača, potrebne komponente iz KAPA Taq PCR paketa (Kapa Biosystems, Inc., Masačusets, SAD), kao i univerzalne bakterijske prajmere 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') i 1492r (5'-CGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (Invitrogen, Kalifornija, SAD) potrebne za umnožavanje dela gena za 16S rRNK (Lane, 1991). Za umnožavanje gena za 16S rRNK korišćen je sledeći program: jedan ciklus inicijalne denaturacije (5 minuta, 95 °C); 35 ciklusa denaturacije (20 sekundi, 98 °C), hibridizacije/vezivanja prajmera (15 sekundi, 60 °C) i elongacije (1 minuta, 72 °C) i jedan ciklus finalne elongacije (5 minuta, 72 °C). Za prečišćavanje dobijenih 16S rDNK fragmenata (~1500 bp) korišćen je QIAquick PCR Purification paket (QIAGEN GmbH, Nemačka) prema uputstvu proizvođača.

4.7.3. Agarozna gel elektroforeza

Za analizu rezultata izolacije totalne DNK i reakcije lančane polimeraze korišćena je horizontalna elektroforeza na agaroznim gelovima (1%, w/v) pripremljenim u TBE puferu (TRIS, Borna kiselina, EDTA; 10,9 g/l. TRIS, 5,56 g/l (Serva, Nemačka), borne kiseline (Merck, Nemačka) i 0,93 g/l EDTA (Sigma-Aldrich, Nemačka)). Za vizuelizaciju pod ultraljubičastom svetlošću, etidijum bromid koncentracije 10 mg/ml je dodavan u gel u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml. Elektroforetsko razdvajanje vršeno je pri konstantnom naponu električnog polja od 8 V po dužnom centimetru gela. Razdvajanje uzoraka praćeno je kretanjem fronta indikatorske boje, a detekcija uzoraka na gelu vršena je osvetljavanjem gela ultraljubičastom svetlošću talasne dužine 260 nm (BioDoc Analyze, Biometra, Nemačka).

Veličina DNK fragmenata (PCR produkta) je određivana poređenjem njihove elektroforetske pokretljivosti sa pokretljivošću standarda poznate molekulske mase. Kao marker molekulskih veličina korišćeni su O'GeneRuler™ 100 bp DNK marker (100 – 3000 bp; Fermentas UAB, Litvanija).

4.7.4. Sekvenciranje DNK

PCR proizvodi su sekvencirani na aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD), uz upotrebu komercijalnog paketa za sekvenciranje BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD).

Reakciona smeša za sekvenciranje (8 μ l) sadržala je: 3 μ l Ready Reaction Mix, 3,2 pmol 1492r prajmera i PCR proizvod kao DNK matricu (1-2 ng na svakih 100 bp dužine PCR produkta). Prvi korak sekvenciranja rađen je na PCR aparatu (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, Kalifornija, SAD) korišćenjem sledećeg programa: jedan ciklus inicijalne denaturacije (1 minuta, 96 °C) i 25 ciklusa denaturacije (10 sekundi, 96 °C), vezivanja prajmera (5 sekundi, 55 °C) i elongacije (4 minute, 60 °C).

Nevezani obeleženi nukleotidi su uklonjeni dodavanjem 40 μ l rastvora A (1,2 ml 3 M CH₃COONa, pH 5,2; 25 ml 96% (v/v) etanola i 5,8 ml destilovane vode) i centrifugiranjem (10 minuta, 10,000 \times g, Eppendorf Centrifuge 5415 D). Nakon odlivanja supernatanta, talog je ispiran 70% (v/v) etanolom (200 μ l) i centrifugiran (10 minuta, 10,000 \times g, Eppendorf Centrifuge 5415 D) dva puta. Talog je potom osušen, rastvoren u 25 μ l formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems, Kalifornija, SAD) i nanešen na aparat 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SAD).

4.7.5. Obrada DNK sekvenci i filogenetska analiza

Analiza kvaliteta dobijenih sekvenci rađena je u programu SqMan pro software (DNASTAR Inc, Vajoming, SAD). Korišćenjem programa BLAST pretraživane su po sličnosti baze podataka dostupne na NCBI internet stranici (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) u cilju pronalaženje homolognih sekvenci. Poravnavanje sekvenci izolata sa sekvencama tipskih sojeva preuzetih iz GenBank baze podataka rađeno je u CLUSTALW2 programu (Thompson *i sar.*, 1994) koji je dostupna na <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. Na osnovu dobijenog poravnanja sekvenci konstruisano je filogenetsko stablo korišćenjem „neighbor-joining” (NJ) algoritma uz primenu Jukes-Cantor korekcije u programu MEGA7 (Kumar *i sar.*, 2016). Za ukorenjavanje filogenetskog stabla korišćena je sekvenca gena za 16S rRNK izolata *Bacillus subtilis* B-1 (AB213262.1).

4.7.6. Izolacija ukupne RNK

Za potrebe izolacije ukupne RNK iz slobodnoživećih (planktonskih) bakterija, odnosno bakterija u okviru biofilma korišćen je komercijalni paket GeneJet RNA purification kit (Thermo Scientific, Litvanija).

Izolacija ukupne RNK iz slobodnoživećih (planktonskih bakterija): Bakterije su gajene tokom 18 sati u 5 ml TSB podloge, na 37 °C uz mešanje od 180 obrtaja/minuti na orbitalnoj mešalici, a potom je 100 µl bakterijske kulture zasejavano u 5 ml sveže LBB podloge i gajeno pod istim uslovima do ulaska bakterijske kulture u srednju logaritamsku fazu rasta, što odgovara OD₆₀₀ od 0,5 do 0,7 (prosečno 4 sata rasta). Za izolaciju RNK uziman je 1 ml ovakve bakterijske kulture i centrifugiran (10 minuta, 10,000×g, 4 °C; Eppendorf 5145 D centrifuge). Supernatant je uklanjan plastičnom Pasterovom pipetom, a oborene bakterijske ćelije su resuspendovane u 100 µl TE pufera (Tris-EDTA; 10 mM Tris (Serva, Nemačka) i 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), pH 8,0).

Izolacija ukupne RNK iz bakterija u okviru biofilma: Bakterije su gajene u mikrotitracionim pločama sa 6 bunarčića u kojima je na dno postavljena plastična, mikroskopska, pokrovna pločica. Puna bakterijska kultura je razređena u svežoj TSB podlozi, tako da je optička gustina (OD₆₀₀) suspenzije bila 0,05 što odgovara ukupnom broju bakterija od oko 5×10⁷ CFU/ml. U bunarčiće na mikrotitracionoj ploči dodato je po 3 ml pripremljene suspenzije ispitujućih izolata, tako da prekrije mikroskopsku pokrovnu pločicu. Za svaki ispitivani izolat zasejavana su po dva bunarčića na mikrotitracionoj ploči. Kao negativna kontrola korišćen je bunarčić u kome su se nalazili samo sterilna mikroskopska pokrovna pločica i sterilna LBB podloga. Mikrotitracione ploče su potom inkubirane tokom 24 sata na polici (stacionarno), na 37 °C. Posle 24 sata inkubiranja, pokrovne mikroskopske pločice na kojima je formiran biofilm su pažljivo pincetom vađene iz bunarčića mikrotitracione ploče i ispirane tri puta uranjanjem u sterilni PBS pufer, kako bi se odstranile sve slobodne bakterijske ćelije. Biofilm, formiran na površini mikroskopske pokrovne pločice je potom skidan grebanjem korišćenjem vrha sterilnog nastavka za pipete i sterilisane metalne špatulice. Dobijena masa je potom centrifugirana (10 minuta, 10,000 × g, 4°C; Eppendorf 5145 D centrifuge), a izdvojena tečnost je uklonjena plastičnom Pasterovom pipetom. Talog

sastavljen od oborenih ćelija i ekstracelularnog matriksa biofilma je resuspendovan u 100 μ l TE pufera.

Dalji koraci su za obe vrste uzoraka bili identični i rađeni su prema protokolu paketa za izolaciju RNK, GeneJet RNA purification kit (Thermo Scientific). Dobijena RNK je eluirana destilovanom vodom u zapremini od 100 μ l i analizirana horizontalnom elektroforezom na agaroznom gelu (1%, w/v) (opisano u odeljku 4.5.3).

Posle izolacije i provere na agaroznom gelu zaostala DNK u RNK smeši je uklanjana korišćenjem paketa za prečišćavanje RNK, Rapidout DNA removal kit (ThermoFisher Scientific), prema uputstvo proizvođača. Kvalitet RNK je posle prečišćavanja proveravan horizontalnom elektroforezom na agaroznom gelu (1%, w/v), a koncentracija je merena na aparatu NanoVue (GE Healthcare, Ujedinjeno Kraljevstvo).

4.7.7. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) na osnovu izolovane RNK

Hemikalije korišćene za sintezu cDNK nabavljene su od proizvođača Thermo Scientific. Sinteza cDNK rađena je u dva koraka, tj. dve odvojene reakcije. Prva reakcija, ukupne zapremine od 12,5 μ l, sadržala je 0,7 μ g RNK matrice, 1 μ l nasumičnog prajmera i odgovarajuću količinu dejonizovane vode. Ova reakcija se odvijala na temperaturi od 65 °C tokom 5 minuta, posle čega su uzorci prebačeni na led i držani na 4 °C 5 minuta. Druga reakcija se odvijala u ukupnoj zapremini od 20 μ l. Sadržaju prve reakcije je dodavano je 4 μ l reakcioni pufer, 0,5 μ l ribobloka (40 U/ μ l), 2 μ l dNTP mešavina (10 mM) i 1 μ l enzima reverzna transkriptaza (200 U/ μ l). Ova reakcija se odvijala prvo na temperaturi od 25 °C tokom 10 minuta, potom na 45 °C tokom 60 minuta i na kraju na 70 °C tokom 10 minuta. Uspešnost sinteze cDNK je proveravana umnožavanjem cDNK u PCR reakciji sa specifičnim prajmerima za *rplU* gen (Tabela 6), korišćenjem paketa za umnožavanje DNK FastGene Taq DNA kit (Nippon Genetics). Analiza dobijenog produkta dužine 206 bp je vršena horizontalnom elektroforezom na agaroznom gelu na način opisan u odeljku 4.7.3.

4.7.8. Umnožavanje cDNK metodom Real Time PCR

Uzorci cDNK dobijeni na način koji je opisan u odeljku 4.7.7. su rastvarani u dejonizovanoj vodi u odnosu 1:64, kada je reč o uzorcima poreklom iz slobodnoživećih bakterija, odnosno u odnosu 1:10 u dejonizovanoj vodi, kada je reč o uzorcima poreklom iz bakterija u biofilmovima. Za umnožavanje cDNK metodom Real Time PCR korišćene su hemikalije proizvođača Thermo Scientific. Reakcije su pripremane prema uputstvu proizvođača, uz promenu zapremeni. Zapremina jedne reakcije je iznosila 10 µl i sadržala je: 1 µl cDNK, 0,5 µl reverznog prajmera, 0,5 µl forvard prajmera, 5 µl maxima Syber green/rox qPCR master mixa(2X) i 3µl dejonizovane vode. Reakcije su izvođene u aparatu 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD) prema sledećim parametrima: 2 minute na 50 °C, 10 minuta na 95 °C, 40 ciklusa na 95 °C 15 sekundi i 60 °C 1 minuta. Svaka reakcija je rađena u triplikatu, a u eksperiment su kao negativne kontrole bile uključene reakcije koje nisu sadržale cDNK matricu.

Prajmeri korišćeni za umnožavanje ispitivanih gena (Tabela 6) konstruisani su u programu Primer3plus (www.bioinformatics.nl/primer3plus) na osnovu sekvenci za ispitivane gene *P. aeruginosa* deponovanih u bazi podataka. Kao referentni gen (gen koji se eksprimira na isti način u svim izolatima) korišćena je gen *rplU* koji kodira ribozomalni protein L21.

Dužina produkata dobijenih umnožavanjem korišćenih prajmera se kretala od 151 do 220 bp (*plcH* – 151 bp; *lasR* – 160 bp; *lasI* – 164 bp; *rhlR* – 176 bp; *rhlI* – 195 bp; *rhlA* – 155 bp; *rplU* – 206 bp; *mucA* – 220 bp; *pelA* – 162 bp; *pslA* – 206 bp; *pqsA* – 154 bp; *pqsR* – 143 bp).

Prvo je testirana efikasnost Real Time PCR reakcija u kojima su korišćeni navedeni prajmeri, konstruisanjem standardne krive. Standardna kriva je dobijena na osnovu rezultata Real time PCR reakcija u kojima je kao matrica korišćena serijski razblaživana cDNK referentnog soja *P. aeruginosa* PAO1 gajenog u formi planktonskih ćelija, odnosno biofilma. Utvrđeno je da pod korišćenim uslovima nema nespecifičnog umnožavanja.

Rezultati su analizirani u programu 7500 System Software (Applied Biosystem) i predstavljeni kao $2^{-\Delta Ct}$, gde je ΔCt razlika između Ct vrednosti ispitivanog i referentnog gena. Kako bi analiza rezultata bila moguća, bilo je potrebno definisati

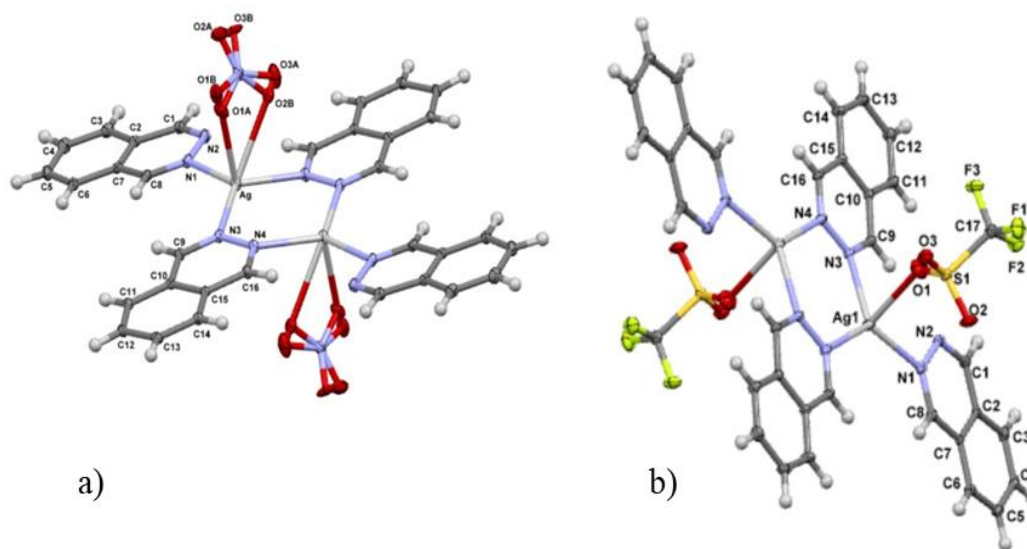
nekoliko veličina: „baseline” – veličina koja obuhvata inicijalni ciklus PCR u kojem postoji vrlo mala promena u jačini fluorescentnog signala; „threshold” – predstavlja liniju koja prolazi kroz eksponencijalni deo krive amplifikacije; „Ct” (threshold cycle) – veličina koja predstavlja broj ciklusa u kome fluorescenca prolazi kroz „threshold”.

Tabela 6. Spisak prajmera korišćenih za analizu 12 gena kod izolata *P. aeruginosa*.

Gen	GenBank oznaka	Oznaka prajmera	5'-3' sekvenca prajmera
<i>plcH</i>	AAG04233.1	PlcH-F	CTATCAACGCAACGGCAAC
		PlcH-R	CAGCCACACTTCACTGATCG
<i>lasR</i>	AAG04819.1	LasR-F	TGGATGCTCAAGGACTACGC
		LasR-R	CCGAGCAGTTGCAGATAACC
<i>lasI</i>	AAG04821.1	LasI-F	GCACATCTGGGAACTCAGC
		LasI-R	TCATCTTCTCCACGCCTACG
<i>rhlR</i>	AAG06865.1	RhlR-F	CTCCTCGGAAATGGTGGTC
		RhlR-R	GCTCGAAGCTGGAGATGTTC
<i>rhlI</i>	AAG06864.1	RhlI-F	CTACCTGTGCAGCGAAACC
		RhlI-R	CCGTTGCGAACGAAATAGC
<i>rhlA</i>	AAG06867.1	RhlA-F	GAAAGCCAGCAACCATCAG
		RhlA-R	AGCTGCCGTTGATGAAATG
<i>rplU</i>	AAG07956.1	rplU-F	CGAATTCCTCAAGGTCGAGA
		rplU-R	GCTTCATGTGGTGCTTACGA
<i>pelA</i>	AAG06452.1	PelA-F	TCGATACCTTCGCCCTGAC
		PelA-R	TGTAATCGCTCATCCACAGC
<i>pslA</i>	AAG05619.1	PslA-F	CGGTCAGCGAATACAGCTC
		PslA-R	TTCCTTGGTCAGGAGTACGG
<i>pqsA</i>	AAG04385.1	PqsA - F	CAATACACCTCGGGTTCCAC
		PqsA - R	TGCCATAGCCGAAGAACATC
<i>pqsR</i>	AAG04392.1	PqsR - F	CTGATCTGCCGTAATTGG
		PqsR - R	ATCGACGAGGAACTGAAGA
<i>mucA</i>	AAG04152.1	MucA-F	AACTCTGTCCGCTGTGATGG
		MucA-R	GTCCCTTCTCCGCTTTCG

4.8. Ispitivanje osetljivosti izolata *P. aeruginosa* na komplekse srebra(I)

Ispitivan je efekat dva nova kompleksa srebra(I) sa ftalazinom (Slika 6) sintetisana na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Kragujevcu (Glisic *i sar.*, 2016).



Slika 6. Hemijske strukture kompleksa srebra(I) sa ftalazinom a) BG1; b) BG2.

4.8.1. Određivanje vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) kompleksa srebra

Koncentrovani rastvori (50 mg/ml) kompleksa srebra su pripremljeni u dimetil sulfoksidu (DMSO) neposredno pre postavljanja eksperimenta čuvani na 4 °C. Antibakterijska aktivnost ispitivanih kompleksa srebra (odnosno određivanje vrednosti MIK) je ispitivana standardnom mikrodilucionom metodom u Luria Bertani bujonu po protokolu Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (*eng.* Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (Cockerill *i sar.*, 2012). Eksperiment je rađen u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića ravnog dna (Kartell, Italija). Korišćena su dvostruka serijska razblaženja u LB bujonu (500-3.6 µg/ml) za svako od ispitivanih jedinjenja. Bakterijske kulture ispitivanih izolata *P. aeruginosa* gajene pod već opisanim uslovima (odeljak 4.2.1) u LB bujonu i razređene su tako da se u svakom

bunarčiću finalno nalazi 10^5 CFU/ml. Kao pozitivna kontrola služile su bakterije inkubirane u LB podlozi sa DMSO rastvaračem ($\text{DMSO} \leq 1\%$). Kao kontrola precipitacije ispitivanih jedinjenja korišćena je LB bujon sa odgovarajućim koncentracijama kompleksa srebra(I), dok je kao negativna kontrola korišćen LB bujon sa dodatkom DMSO rastvarača u odgovarajućim koncentracijama. Kao kontrola sterilnosti korišćena je sam LB bujon. Test je izveden u duplikatu za oba jedinjenja. Apsorbanca je merena u aparatu Tecan Infinite 200 Pro multiplate reader na talasnoj dužini od 600 nm neposredno nakon inokulacije ($t=0$ sat) i 20 sati nakon inkubacije ($t=20$ sati). Minimalna inhibitorna koncentracija je definisana kao najniža koncentracija antibakterijskog agensa koja inhibira vidljivi rast nakon 20 sati.

4.8.2. Određivanje citotoksičnosti kompleksa srebra(I)

Citotoksičnost oba jedinjenja je ispitivana MTT testom koji se zasniva na sposobnosti metabolički aktivnih ćelija da redukuju žuti tetrazolium MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolium bromid) u ljubičasti formazan, koji dalje može biti razblažen i kvantifikovan spektrofotometrijskim metodama. Određivanje citotoksičnosti jedinjenja MTT testom je urađeno prema protokolu (Calloni *i sar.*, 2016; Savic *i sar.*, 2016a) Ćelijska linija fibroblasta pluća (MRC5) (*eng.* American Type Culture Collection ATCC; Manasas, Virdžinija, SAD) je propagirana u RPMI podlozi sa dodatkom 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomocina, 100 U/ml penicilina i 10% FBS, na 37 °C i u prisustvu 5% CO_2 (metoda propagacije ćelija ove ćelijske linije je identična propagaciji ćelija iz ćelijske linije A549, što je detaljno opisano u odeljku 4.3.1).

Test je rađen u mikrotitracionim pločama sa ravnim dnom i 96 bunarčića (Kartell, Italija). Ćelije (10^5 po bunarčiću) su tretirane u podlozi koja sadrži komplekse srebra(I) u opadajućim koncentracijama (50 $\mu\text{g/ml}$ do 1,5 $\mu\text{g/ml}$) i DMSO u kontrolnim bunarčićima (netretirane ćelije). Nakon 48 sati inkubiranja, u svaki bunarčić je dodat rastvor MTT (Sigma Aldrich, Nemačka) u RPMI podlozi, u finalnoj koncentraciji od 0,5 mg/ml. Dobijena smeša je potom inkubirana 30 minuta na 37 °C u prisustvu 5% CO_2 . Podloga je pažljivo uklonjena i zatim je dodat DMSO (50 μl , 100% DMSO) u cilju rastvaranja kristala formazana. Apsorbanca, koja odgovara nivou mitohondrijski zavisne redukcije MTT-a do formazana, je merena na talasnoj dužini od 540 nm na aparatu Tecan Infinite 200 pro multiplate reader. Dobijeni rezultati su izraženi kao

procenat vijabilnih ćelija ($X_{\text{preživelih}}$), pri čemu je preživljavanje netretiranih ćelija inkubiranih samo sa DMSO (X_{DMSO}) u odgovarajućim koncentracijama uzeto kao 100%, prema formuli:

$$X_{\text{preživelih}}(\%) = \frac{X_{\text{DMSO}} - X_{\text{tretiranih}}}{100}$$

Vrednosti su predstavljene kao IC_{50} vrednosti koje označavaju koncentraciju kompleksa srebra koja za 50% inhibiraju vijabilnost ćelija fibroblasta.

4.8.3. Ispitivanje efekta kompleksa srebra(I) na formiranje biofilмова

Izolati korišćeni u ovom eksperimentu gajeni su na način opisan u odeljku 4.2.1. Za ispitivanje efekta kompleksa srebra(I) na sposobnost izolata da formiraju biofilmove korišćene su mikrotitracione ploče sa 96 bunarčića ravnog dna (Kartell, Italija) prema metodi opisanoj u odeljku 4.2.2. U bunarčiće na mikrotitracionoj ploči dodata je suspenzija ispitujućeg izolata gustine od $1,5-2 \times 10^8$ CFU/ml i kompleksi srebra(I) u koncentracijama koje su odgovarale vrednostima $0,8 \times \text{MIK}$, $0,4 \times \text{MIK}$ i $0,2 \times \text{MIK}$ za svako ispitivano jedinjenje i za svaki ispitivani izolat. Posle inkubacije od 24 sata, biofilmovi su analizirani kvantitativnom metodom bojenja kristal violetom koja je opisana u odeljku 4.2.2. Kao kontrole korišćeni su bakterijske kulture inkubirane bez kompleksa srebra(I), kao i sam bujon. Rezultati su predstavljeni kao procenat formiranog biofilma pri inkubaciji sa testiranim kompleksom srebra(I) u odnosu na formirani biofilm kod izolata inkubiranih bez kompleksa srebra(I). Vrednosti za koje je $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnim.

4.8.4. Ispitivanje efekta kompleksa srebra na već formirani biofilm

Efekat kompleksa srebra(I) na već formirani biofilm praćen je u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarčića ravnog dna. Bakterijske kulture ispitivanih izolata su gajene u bunarčićima mikrotitracionih ploča na način opisan u odeljku 4.2.2. Posle inkubacije od 24 sata na temperaturi od 37°C , podloga sa slobodnoživećim bakterijama iz svakog bunarčića na mikrotitracionoj ploči je uklanjana plastičnom Pasterovom pipetom, tako da su u bunarčićima ostajale samo bakterije u formi biofilma koji je formiran na njihovim zidovima. Svaki bunarčić na mikrotitracionoj ploči je

inspiran sterilnim PBS puferom, a potom je u svaki dodavana sveža podloga u zapremini od 100 μ l koja je sadržala komplekse srebra(I) u finalnoj zapremini u dvostruko vrednosti MIK za svako jedinjenje i za svaki izolat. Posle 24 sata inkubacije na temperaturi od 37°C, preostali biofilm je kvantifikovan bojenjem kristal violet bojom na način opisan u odeljku 4.2.2. Kao pozitivne kontrole korišćeni su biofilmovi koji nisu inkubirani sa kompleksima srebra(I). Rezultati su predstavljani kao procenat biofilma koji je inhibiran u odnosu na procenat biofilma koji svaki izolat formira pri inkubaciji bez kompleksa srebra(I). Vrednosti za koje je $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnim.

4.8.5. Ispitivanje efekta kompleksa srebra na pokretljivost izolata *P. aeruginosa*

Uticaj kompleksa srebra(I) na tri tipa pokretljivosti opisana kod bakterija - plivanje, rojenje i grčenje, praćeno je u Petrijevim šoljama na način karakterističan za svaki tip pokretljivosti, kao što je opisano u odeljku 4.2.4. U podloge za evaluaciju pokretljivosti izolata dodavani su kompleksi srebra(I) u finalnim koncentracijama koje su odgovarale vrednostima 0,5 \times MIK za svako jedinjenje za svaki izolat. Kao pozitivne kontrole korišćene su Petrijeve šolje sa podlogama koje nisu sadržale komplekse srebra(I) i na kojima su se izolati nesmetano kretali. Rezultati su predstavljeni kao procenat smanjene površine pokretljivosti u odnosu na izolate koji su se kretali po podlogama bez kompleksa srebra(I).

4.8.6. Ispitivanje efekta kompleksa srebra na proizvodnju piocijanina

Za potrebe ovog eksperimenta, sveže bakterijske kulture su gajene u 5 ml LB bujona tokom 18 sati na orbitalnoj mešalici pri 180 obrtaja/minuti, na temperaturi od 37 °C. U 5 ml svežeg LB bujona dodavano je 5 μ l bakterijske kulture u prisustvu kompleksa srebra(I) u finalnoj koncentraciji od vrednosti 0,1 \times MIK za svaki izolat. Dalji tok eksperimenta je prethodno detaljno opisan u odeljku 4.2.6. Efekat kompleksa srebra(I) na proizvodnju piocijanina izražen je kao odnos optičke gustine (OD_{695}) supernatanta i optičke gustine (OD_{600}) pune kulture u odnosu na isti odnos kod kontrolne, netretirane bakterijske kulture, primenom formule:

$$\text{piocijanin} = \frac{\frac{\text{OD695 (supernatant tretman)}}{\text{OD600 (puna kultura tretman)}}}{\frac{\text{OD695 (supernatant kontrole)}}{\text{OD600 (puna kultura kontrole)}}}$$

4.9. Statistička analiza

U statističkoj analizi dobijenih rezultata primenjena je deskriptivna i inferentna statistika, kao i prediktivna analitika.

U sklopu deskriptivne statistike korišćeni su statistički parametri kao što su aritmetička sredina, standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrednost.

Za ispitivanje statistički značajnih razlika između tretiranih i netretiranih uzoraka u eksperimentima analize antibakterijske aktivnosti kompleksa srebra(I) korišćen je Studentov t-test, a značajnost je utvrđivana na nivou od $p < 0,05$. Studentov t-test je korišćen i za ispitivanje razlika u količini proizvedenih autoinducera kod ispitivanih izolata u odnosu na referentni soj *P. aeruginosa* PAO1, a značajnost je utvrđivana na nivou od $p < 0,05$

Za pravilan odabir testova u sklopu inferentne statistike neophodno je bilo proveriti da li ispitivani podaci imaju normalan raspored. U tu svrhu je korišćen Šapiro-Vilkv test (Shapiro i Wilk, 1965) implementiran u programskom jeziku R u okviru baznog paketa (Team, 2014). U okviru inferentne statistike određen je korelacioni odnos i stepen korelacije između odabranih faktora virulencije, kao i hijerarhijsko grupisanje izolata na osnovu vrednosti za faktore virulencije i citotoksičnost. Za analizu korelacija između izolata i faktora virulencije i citotoksičnosti korišćena je metoda robustne rang korelacije (*eng.* Robust rank correlation) (Li *i sar.*, 2012) implementirane programskom jeziku R u okviru baznog paketa. Korelacioni koeficijenti su određeni pomoću „Gauss strict fuzzy ordering” metode implementirane u programskom jeziku R u okviru baznog paketa. Ispitivane karakteristike virulencije izolata su smatrane korelisanim ukoliko je koeficijent korelacije bio $\gamma \geq 0,3$. Statistička značajnost vrednosti γ je računata permutacionim testiranjem (10,000 permutacije) u sklopu algoritma robusne rang korelacije. Kao statistički značajne korelacije uzimane su korelacije gde je $p < 0,05$ (Bodenhofner i Klawonn, 2008).

Hijerarhijsko grupisanje izolata je izvedeno u programskom jeziku R u okviru baznog paketa, dok je grafičko predstavljanje hijerarhijskog grupisanja urađeno u programskom paketu „Dendextend” (Galili, 2015). Kod grupisanja izolata kao mera sličnosti je služila euklidska udaljenost izračunata na osnovu vrednosti dobijene u ispitivanjima sedam faktora virulencije i citotoksičnosti.

Za ispitivanje statističke značajnosti razlika između grupa izolata (izolati od životinja/izolati od ljudi i izolati iz uzoraka briseva/izolati iz tečnih uzoraka) korišćen je neparametrijski test, Wilcoxon Rank-Sum test implementiran u programskom jeziku R u okviru baznog paketa (Kieser *i sar.*, 2013). Međutim, Wilcoxon Rank-Sum test ne sadrži probabilistički podatak o veličini efekta (*eng.* effect size), tj. relativnoj tendenciji razlikovanja podataka u formi verovatnoće. Kako bi rezultati bili predstavljeni jednostavnije i razumljivije, korišćen je neparametrijski relativni efekat, odnosno vrednost „*k*” (*eng.* relative effect/probabilistic index) koristeći „Relative effect” test iz „nrmv” R paketa (Burchett *i sar.*, 2017). Ovaj test je komplementaran Wilcoxon Rank-Sum testu.

Prediktivna analitika koristi brojne statističke pristupe za kompleksnu analizu podataka sa ciljem pronalaženja obrazaca u podacima na osnovu kojih se mogu formirati predikcioni modeli. Nelinearna regresiona analiza je odabrana za generisanje modela mašinskog učenja baziranog na sedam nelinearnih predikcionih varijabli tj. sedam testiranih faktora virulencije izolata da bi se odredio citotoksični potencijal izolata. Citotoksičnost je u ovom slučaju posmatrana kao zavisna varijabla. Predikcioni model je kreiran korišćenjem neparametrijskog algoritma mašinskog učenja XGBoost (Extreme Gradient Boosting algoritam) implementiranog u programskom jeziku R u okviru baznog paketa (Chen i Guestrin, 2016).

Metod mašinskog učenja XGBoost je, osim u regresiji, korišćen i u klasifikaciji, tj. za kreiranje modela koji se može koristiti za pretpostavljanje pripadnosti definisanim klasama. Kao klase definisane su sledeće grupe - izolati od životinja, odnosno izolati od ljudi i izolati iz brisa, odnosno izolati iz tečnosti. Wilcoxon Rank-Sum test i relative effect test, metode inferentne statistike, ne uzimaju u obzir međusobne odnose varijabli pri ispitivanju razlika između grupa na osnovu samo jedne zajedničke varijable, čime su inherentno bivariacione. Nelinearne metode mašinskog učenja za razdvajanje dve ili više jedinstvenih grupa unutar podataka (klasifikacija) se koriste za formiranje

prediktivnih modela baziranih na kompleksnoj, nelinearnoj interakciji svih varijabli. Efikasnost pronalaženja klasifikacione funkcije zavisi kako od metoda mašinskog učenja, tako i od karakteristika podataka. Ova efikasnost se može računati preko merenja prediktivnih performansi datog modela.

Efikasnost kreiranih modela u predikciji na korišćenim podacima testirana je primenom unakrsne validacije na osnovu šema razdvajanja podatka na podatke za treniranje i za testiranje. Kod n -unakrsne validacije podaci se dele u n jednakih grupa. Za formiranje modela koriste se $n-1$ grupa podataka, a testiranje se vrši na preostalom skupu kod koga se instance podataka, u ovom slučaju izolati, ne nalaze u grupi za treniranje. Postupak se ponavlja n puta da bi se osigurao realističan prikaz performansi modela. U ovoj analizi upotrebljena je standardno korišćena desetostruka unakrsna validacija (UV-10). Poseban slučaj n -unakrsne validacije je *leave-one-out* unakrsna validacija (LOOUV), gde se testiranje vrši na jednom primeru (u ovom slučaju izolat), a ostatak podataka se koristi za modelovanje. Proces se ponavlja n puta, gde je n ukupan broj primera, pri čemu svaki put drugi primer služi za testiranje.

U procesu provere efikasnosti klasifikatora koristeći metodu unakrsne validacije upotrebljene su sledeće mere performansi modela: *area under receiver operator curve* (AUROC), *area under precision operator curve* (AUPRC) i balansirana tačnost (BT). Mera AUROC je dvodimenzionalni prikaz koji na X osi predstavlja lažno pozitivnu stopu (1-specifičnost) i na Y osi predstavlja stvarnu pozitivnu stopu (senzitivnost). Vrednost 1 za AUROC bi predstavljao idealan model, tj. najveće razdvajanje između ispitivanih grupa. Veličina AUROC može biti nepouzdana mera performansi modela koji je generisan pomoću podataka gde postoje razlike u broju primera u jednoj od klasa. Zbog nesrazmernosti u broju podataka između ispitivanih grupa upotrebljene su još dve mere, AUPRC i BT koje su osetljive na neujednačenost podataka u dve različite grupe (npr. različit broj izolata u grupi izolata poreklom od ljudi (21) u odnosu na izolate poreklom od životinja (19)). Mera AUPRC je, slično AUROC, dvodimenzionalni grafički prikaz, gde je na X osi prikazana stvarno pozitivna stopa, a na Y osi preciznost. Kao i kod AUROC, veća vrednost AUPRC i BT ukazuje na efikasniji model.

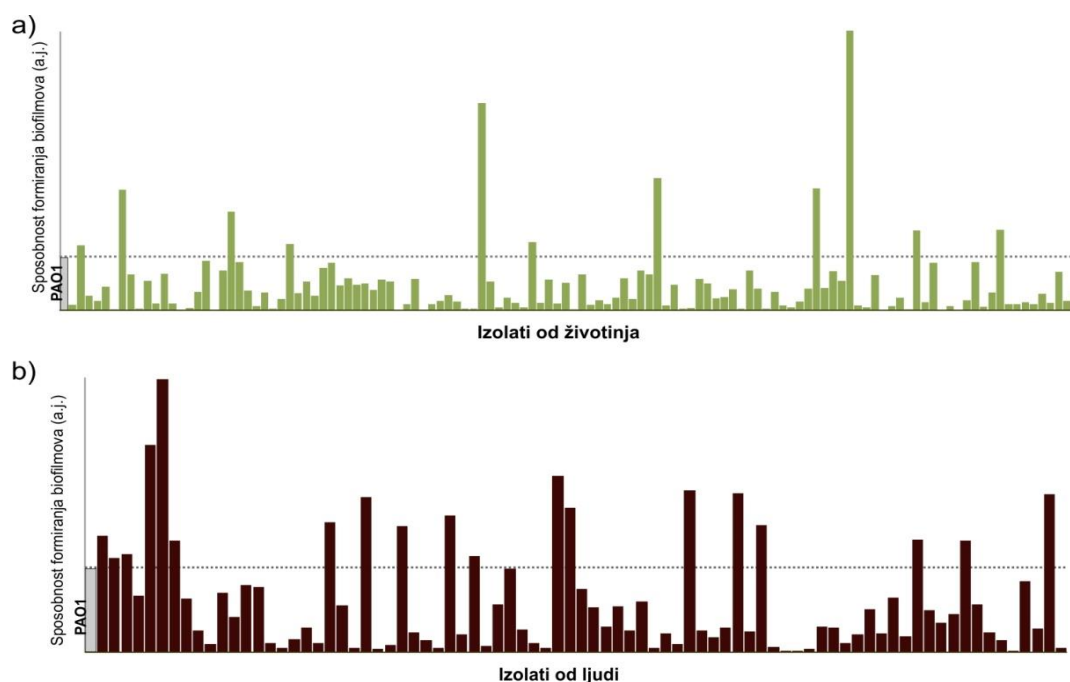
Kod validacije regresora upotrebljena je često korišćena mera – koren srednje kvadratne greške (KSKG, *eng.* root-mean-square error - RMSE). Koren srednje

kvadratne greške predstavlja kvadratni koren razlike između posmatranih vrednosti zavisne varijable i prognoziranih vrednosti predikcionim algoritmom. Ova vrednost se izražava u jedinicama zavisne promenjive, što je važno za jednostavnije tumačenje rezultata.

5. REZULTATI

5.1. Odabir izolata *P. aeruginosa* na osnovu sposobnosti da formiraju ukupan biofilm

Za potrebe ovog istraživanja, sakupljena su ukupno 202 izolata *P. aeruginosa* (121 izolat poreklom od životinja i 81 izolat poreklom od ljudi). Od 121 izolata poreklom od životinja, 109 izolata je bilo od pasa, pet izolata je bilo od mačaka, pet izolata je poticalo iz uzoraka uzetih od goveda, jedan od zmija, a jedan od hrčka. Sposobnost formiranja biofilma koji uključuje biofilm koji *P. aeruginosa* formira na zidovima i na dnu bunarčića mikrotitracione ploče sa 96 bunarčića (u daljem tekstu ukupan biofilm) je testirana kod svih sakupljenih izolata *P. aeruginosa* (Slika 7).



Slika 7. Sposobnost izolata poreklom od a) životinja i b) ljudi da formiraju ukupan biofilm u bunarčićima mikrotitracionih ploča. Vrednosti su predstavljene u odnosu na vrednost *P. aeruginosa* PAO1 i izražene su u arbitrarnim jedinicama (a.j.).

Od 202 analizirana izolata, osam izolata poreklom od životinja i tri izolata poreklom od ljudi (ukupno 11, odnosno 5%) nije formiralo biofilmove. Trideset izolata *P. aeruginosa* koji su formirali veću količinu ukupnog biofilma u poređenju sa

referentnim sojem *P. aeruginosa* PAO1 su označeni kao dobri proizvođači (Slika 1). Od ovih 30 dobrih proizvođača biofilmova, 11 izolata je vodilo poreklom od životinja (9% svih izolata od životinja), odnosno 19 od ljudi (23% svih izolata od ljudi). Najveći broj dobrih proizvođača biofilmova među izolatima poreklom od životinja (10) izolovani su iz uzoraka briseva uha, kože, vagine, rane i usta, dok je najveći broj dobrih proizvođača biofilmova među izolatima poreklom od ljudi (19) izolovano iz uzoraka urinokulture i sputuma. Brisevi uha pasa su bili izvor pet dobrih proizvođača biofilma (izolati BU10A, BU22A, BU35A, BU69A i BU31A), koji su proizvodili do pet puta više biofilma od *P. aeruginosa* PAO1. S druge strane, sedam od 19 dobrih proizvođača biofilmova poreklom od ljudi koji su poticali iz uzoraka sputuma (S2H, S19H, S20H, S22H, S25H, S26H i S27H) je proizvodilo do tri puta više biofilma od *P. aeruginosa* PAO1.

Na osnovu sposobnosti da formiraju ukupan biofilm 40 izolata je odabrano za dalju analizu tokom koje su ispitivani drugi faktori virulencije (Tabela 7). Među 40 odabranih izolata, 30 izolata (izolati poreklom od životinja n=11, izolati poreklom od ljudi n=19) je imalo veću sposobnost proizvodnje biofilmova u poređenju sa *P. aeruginosa* PAO1, dok je 10 odabranih izolata (izolati poreklom od životinja n=8, izolati poreklom od ljudi n=2) slabije proizvodilo biofilmove u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1. Prema vrsti uzorka, od 40 izolata, 25 izolata je poticalo iz uzoraka uzetih brisevima (izolati poreklom od životinja n=18, izolati poreklom od ljudi n=7), dok je 15 izolata izolovano iz tečnih uzoraka (izolati poreklom od životinja n=1, izolati poreklom od ljudi n=14).

Tabela 7. Izolati *P. aeruginosa* izabrani za dalju analizu odabranih faktora virulencije.

Oznaka izolata	Poreklo izolata	Vrsta uzorka	% proizvedenog ukupnog biofilma u odnosu na PAO1
BU10A ^a	pas	Bris uha	151 ± 10,2
BU22A	pas	Bris uha	150 ± 11,94
BU31A	pas	Bris uha	526 ± 20,45
BU35A	pas	Bris uha	229 ± 7,19
BU69A	pas	Bris uha	249 ± 13,01
BU16A	pas	Bris uha	1 ± 0,25
BU9A	pas	Bris uha	11 ± 2,07
BO3A	pas	Bris oka	13 ± 1,59
Bust3A	zmija	Bris usta	226 ± 2,80
Bust6A	pas	Bris usta	2 ± 0,35
BR4A	pas	Bris rane	128 ± 8,57
BR2A	pas	Bris rane	14 ± 3,86
BK6A	pas	Bris kože	390 ± 15,62
BK16A	pas	Bris kože	1 ± 0,03
BV6A	pas	Bris vagine	125 ± 10,19
BV20A	pas	Bris vagine	185 ± 10,84
BN2A	goveče	Bris nosa	1 ± 0,2
M3A	goveče	Mleko	122 ± 5,82
BV13A	pas	Bris vagine	3 ± 0,35
BU53H	čovak	Bris uha	188 ± 6,85
BU60H	čovak	Bris uha	133 ± 8,37
BO6H	čovak	Bris oka	151 ± 12,05
S2H	čovak	Sputum	155 ± 9,83
S19H	čovak	Sputum	133 ± 3,83
S20H	čovak	Sputum	326 ± 17,18
S22H	čovak	Sputum	247 ± 11,81
S25H	čovak	Sputum	117 ± 14,66
S6H	čovak	Sputum	4 ± 0,97
S26H	čovak	Sputum	112 ± 4,53
S27H	čovak	Sputum	139 ± 10,13
U24H	čovak	Urinokultura	152 ± 7,79
U8H	čovak	Urinokultura	134 ± 7,71
U26H	čovak	Urinokultura	190 ± 5,7
U30H	čovak	Urinokultura	193 ± 6,7
U18H	čovak	Urinokultura	3 ± 0,81
U41H	čovak	Urinokultura	172 ± 4,51
BR5H	čovak	Bris rane	211 ± 14,44
BK25H	čovak	Bris kože	163 ± 10,53
BV23H	čovak	Bris vagine	185 ± 10,24
BR13H	čovak	Bris rane	115 ± 9,61

^aSlovo A u oznaci izolata ukazuje da izolat vodi poreklo iz uzorka uzetog od životinja, dok slovo H ukazuje da je izolat poreklom od ljudi. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna ponavljanja ± standardna devijacija (SD).

5.2. Karakterizacija virulencije odabranih izolata *P. aeruginosa*

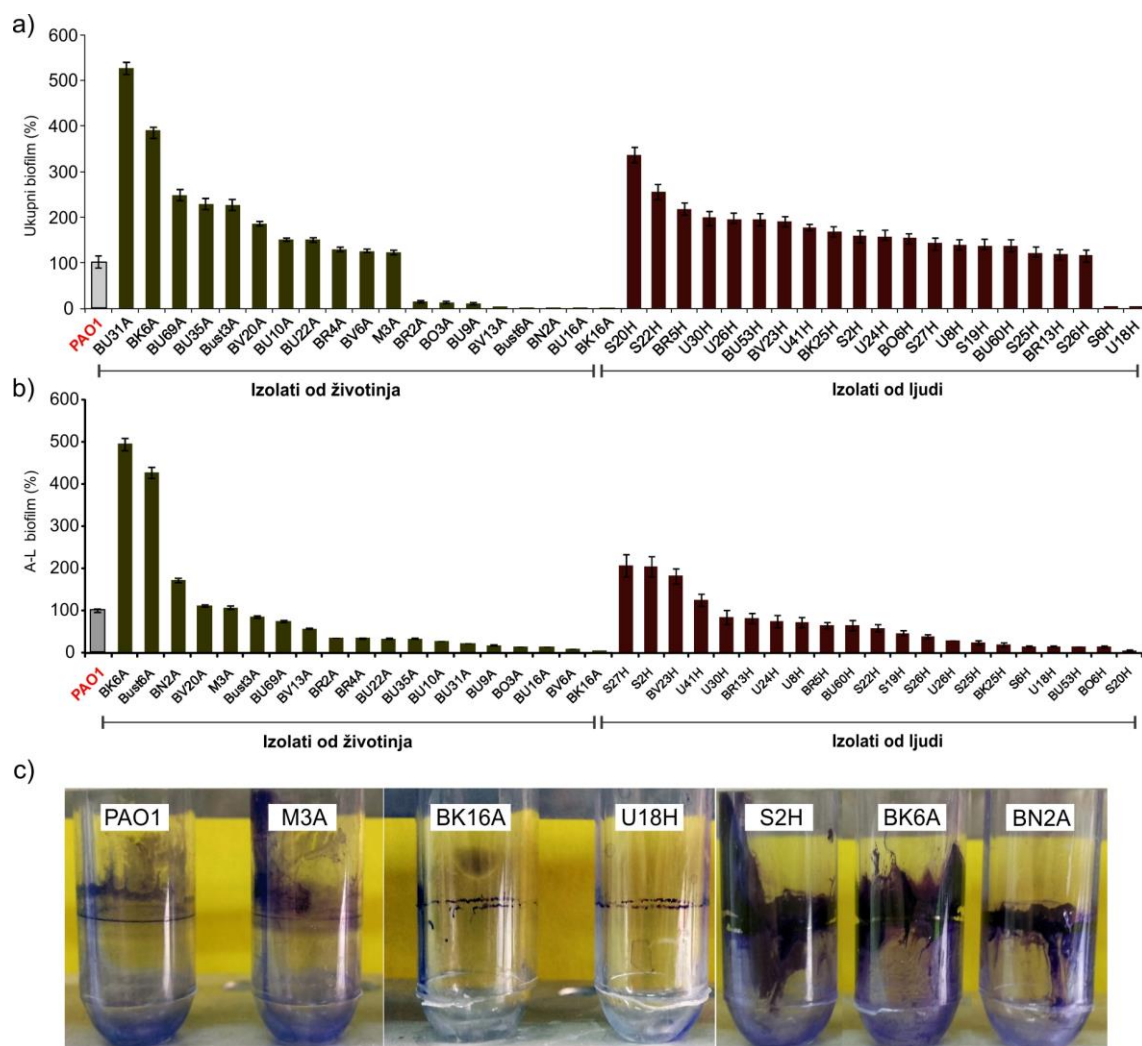
Za 40 izabranih izolata *P. aeruginosa* ispitano je šest faktora virulencije: sposobnost da formiraju biofilmove (ukupan biofilm i A-L biofilm), sposobnost produkcije piocijanina, pokretljivost (plivanje, rojenje i grčenje) i hemolitička aktivnost.

5.2.1. Rezultati ispitivanja sposobnosti odabranih izolata *P. aeruginosa* da formiraju biofilmove

Sposobnost odabranih izolata da proizvode biofilm je ispitana u mikrotitracionim pločama (ukupan biofilm) i plastičnim epruvetama (biofilm na površini tečnost-vazduh, A-L biofilm) i upoređena je sa vrednostima dobijenim za *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 8).

Rezultati analize su pokazali da je 12 izolata (30%) proizvelo biofilm u količinama dva puta većim od *P. aeruginosa* PAO1, dok je sedam izolata (17%) proizvelo biofilm u količini 20 puta manjoj od *P. aeruginosa* PAO1. U proseku su izolati proizveli sličnu količinu biofilma bez obzira na njihovo poreklo. Najbolji proizvođači biofilmove su bila dva izolata poreklom od životinja, BK6A i BU31A, koja su proizvela biofilm u količinama četiri, odnosno pet puta većim od *P. aeruginosa* PAO1.

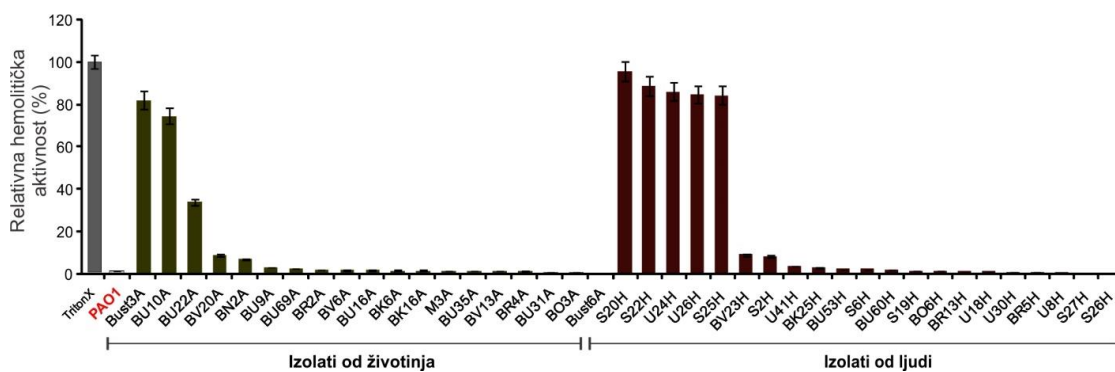
Izolati poreklom od životinja i oni poreklom od ljudi proizveli su, u proseku, sličnu količinu A-L biofilma (Slika 8). Deset izolata (pet poreklom od ljudi i pet poreklom od životinja) je proizvelo A-L biofilmove u količinama većim nego *P. aeruginosa* PAO1. Među njima, šest izolata (tri izolata poreklom od životinja, a tri poreklom od ljudi) je proizvelo A-L biofilmove u duplo većoj količini u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1. Dobri proizvođači A-L biofilmove među izolatima poreklom od životinja bili su izolati izolovani iz uzoraka brisa (osim izolata M3A koji je izolovan iz mleka), dok su dobri proizvođači A-L biofilmove među izolatima poreklom od ljudi bili izolovani iz tečnih uzoraka, tj. sputuma i urinokultura. Izolati koji su produkovali najveću količinu biofilma na kontaktu vazduha i tečnosti vodili su poreklo od životinja, Bust6A (izolovan iz brisa usta psa) i BK6A (izolovan iz brisa kože psa).



Slika 8. Formiranje biofilmova kod odabranih izolata *P. aeruginosa*: a) formiranje ukupnih biofilmova; b) formiranje A-L biofilmova; c) fotografije A-L biofilmova posle bojenja kristal violet bojom. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna ponavljanja \pm SD.

5.2.2. Rezultati ispitivanja hemolitičke aktivnosti odabranih izolata *P. aeruginosa*

Za ispitivanje hemolitičke aktivnosti odabranih izolata *P. aeruginosa* u *in vitro* uslovima korišćeni su eritrociti ovce.

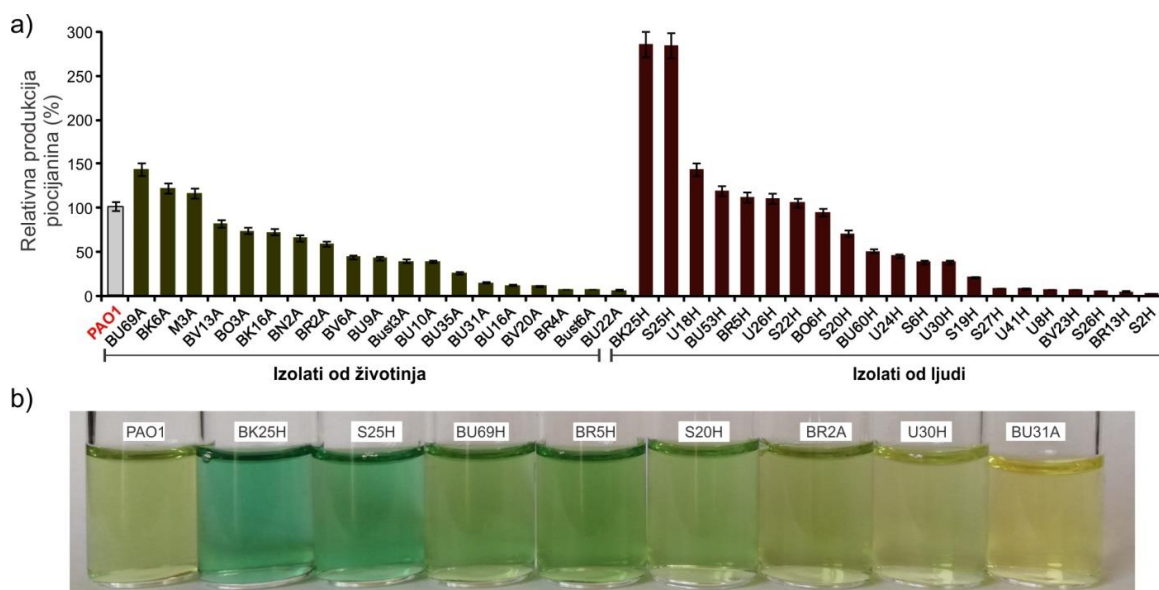


Slika 9. Hemolitička sposobnost odabranih izolata *P. aeruginosa* predstavljena u odnosu na totalnu hemolizu koja je izazvana deterdžentom (TritonX). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna ponavljanja \pm SD.

Od 40 ispitivanih izolata *P. aeruginosa*, osam izolata nije imalo hemolitičku aktivnost, odnosno zabeležena hemolitička aktivnost je bila manja od 1% u poređenju sa totalnom hemolizom izazvanom dejstvom deterdženta Triton X-100 (Slika 9). Najveći broj izolata (19) je pokazao hemolitičku aktivnost između 1% i 3%, pet izolata između 3% i 10%, a vrednosti između 30% i 95% je pokazalo osam izolata. Vrednost hemolitičke aktivnosti *P. aeruginosa* PAO1 iznosila je 1,66% u odnosu na hemolizu sa Triton X-100. U proseku, izraženiju hemolitičku aktivnost su imali izolati poreklom od ljudi u odnosu na izolate poreklom od životinja. Najveću hemolitičku aktivnost 35%-95% imalo je pet izolata, S20H, S22H, S25H, U24H i U26H, poreklom od ljudi, odnosno tri izolata, Bust3A, BU10A i BU22A, poreklom od životinja.

5.2.3 Rezultati ispitivanja proizvodnje piocijanina kod odabranih izolata *P. aeruginosa*

Za potrebe ispitivanja sposobnosti izolata da produkuju piocijanin korišćeni su supernatanti bakterijskih kultura gajenih u TSB bujonu (Slika 10).



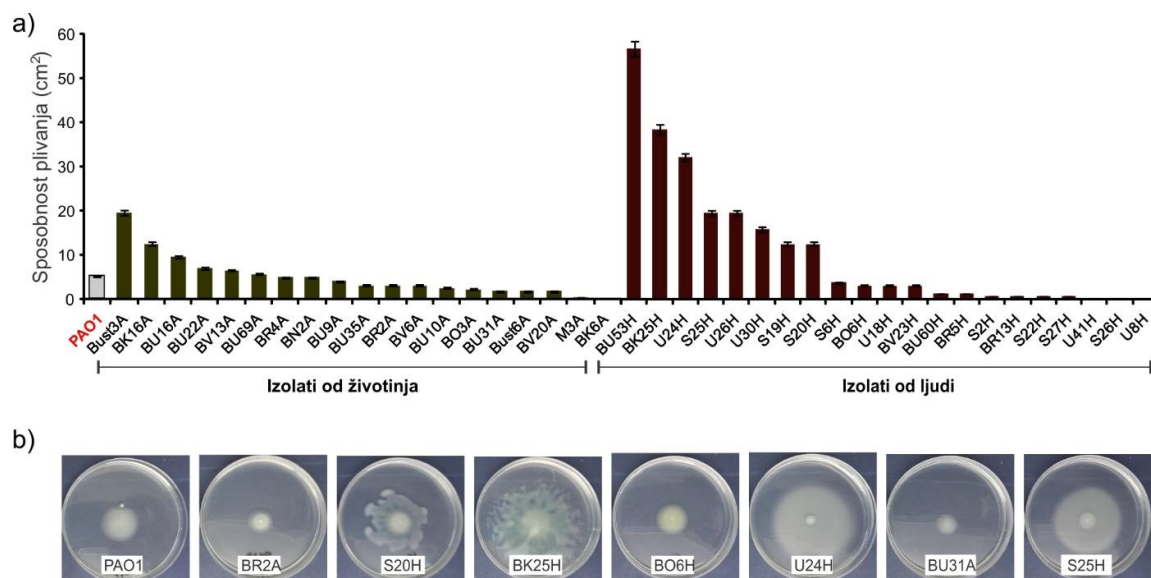
Slika 10. Sposobnost proizvodnje piocijanina: a) Proizvodnja piocijanina odabranih izolata *P. aeruginosa* izražena u procentima u odnosu na referentni soj *P. aeruginosa* PAO1; b) fotografije supernatanata odabranih izolata *P. aeruginosa* (veći intenzitet plavozelene boje ukazuje na veću proizvodnju piocijanina). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna ponavljanja \pm SD.

Najveći broj izolata, njih 30 (75%) je proizvelo piocijanin u količinama manjim od *P. aeruginosa* PAO1, pri čemu je deset izolata proizvelo piocijanin u količinama manjim od 10% u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 10). Deset izolata (25%) je proizvelo piocijanin u količinama većim od količine koju je proizveo *P. aeruginosa* PAO1, s tim da je pet izolata bilo izolovano iz uzoraka briseva, odnosno pet izolata izolovano iz uzoraka tečnosti. Dva izolata, BK25H i S25H, su se pokazala kao najveći proizvođači piocijanina proizvodeći 2,5, odnosno 2,8 puta više pigmenta od *P. aeruginosa* PAO1. U proseku, sposobnost proizvodnje piocijanina bila je veća među izolatima poreklom od ljudi u poređenju sa izolatima poreklom od životinja.

5.2.4. Rezultati ispitivanja pokretljivosti odabranih izolata *P. aeruginosa*

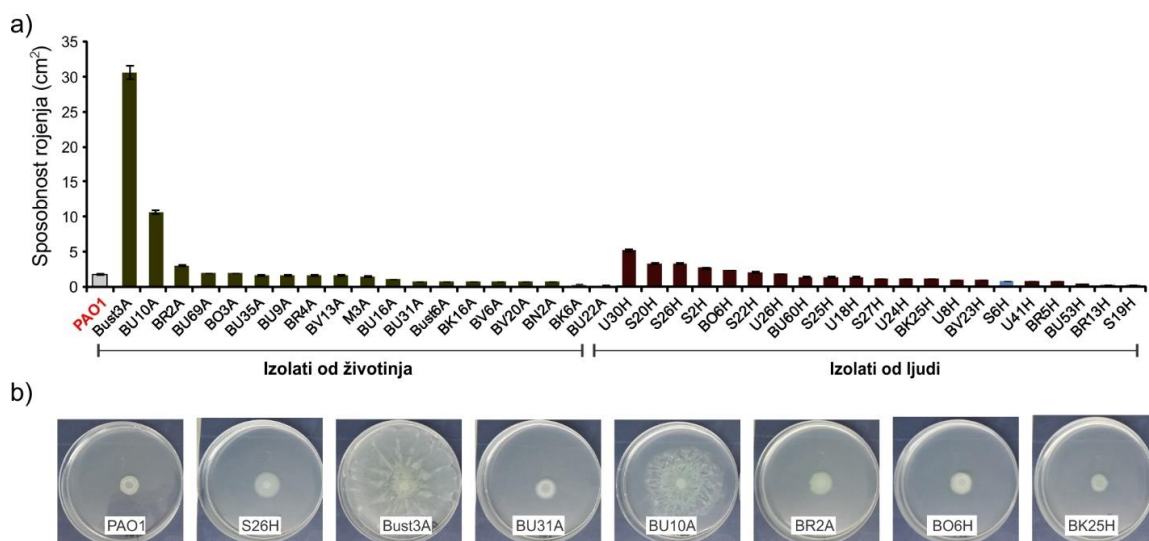
Kretanje izolata plivanjem praćeno je zasejavanjem odabranih izolata na polučvrsti agar (0,3% agara) i merenjem površine kretanja bakterijskih kolonija (Slika 11). Među ispitivanim izolatima, osam izolata (20%) je pokazalo veoma malu zonu pokretljivosti (manje od 1 cm²), dok su 22 izolata (55%) pokazala pokretljivost sa površinama zona između 1 i 10 cm². Među deset izolata (25%) sa zonama pokretljivosti većim od 10 cm² najveću zonu pokretljivosti, 56 cm², je pokazao izolat BU53H,

izolovan iz brisa uha čoveka. U poređenju sa *P. aeruginosa* PAO1 (zona pokretljivosti 4,91 cm²) (Slika 11), 12 izolata je pokazalo znatno veću pokretljivost od kojih su četiri (10%) vodila poreklo od životinja, a osam (20%) od ljudi. U proseku, izolati poreklom od ljudi su se bolje kretali plivanjem u poređenju sa izolatima poreklom od životinja.



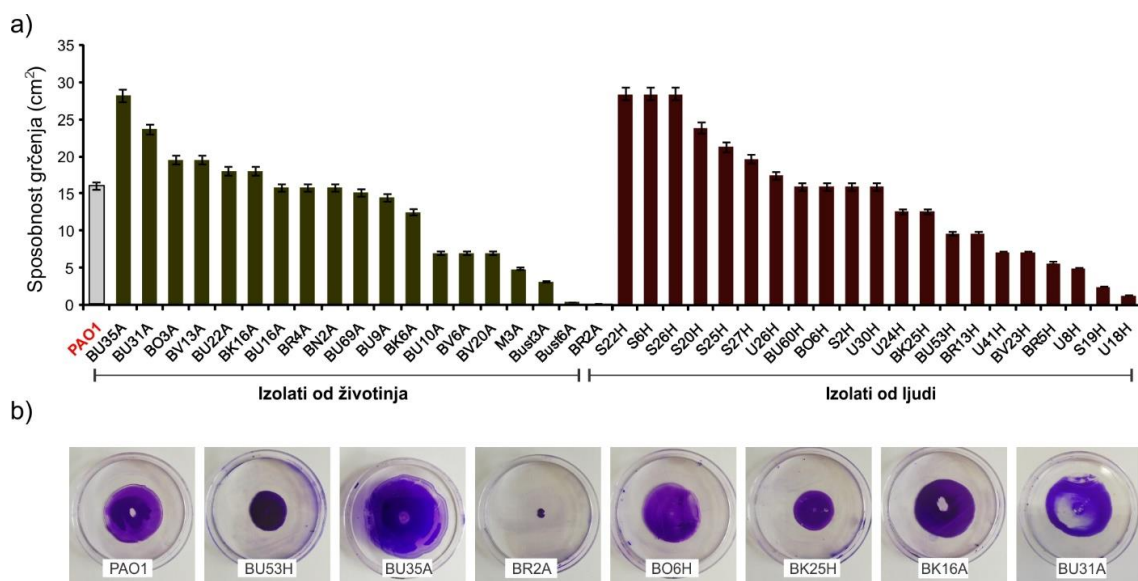
Slika 11. Sposobnost odabranih izolata *P. aeruginosa* da se kreću plivanjem: a) grafički prikaz površina koje su izolati prešli na polučvrstom agaru; b) fotografije Petrijevih šolja sa najkarakterističnijim izolatima. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna ponavljanja \pm SD.

Sposobnost rojenja je praćena zasejavanjem izolata na polučvrsti agar (0,6% agara) i merenjem površine kretanja bakterijske kolonije (Slika 12). Od 40 testiranih izolata, 16 izolata (40%) je imalo zonu pokretljivosti manju od 1 cm². Najveći broj izolata (22, tj. 55%) je imao zone pokretljivosti između 1 cm² i 5 cm², dok su samo dva izolata (BU10A i Bust3A) imala zone pokretljivosti preko 10 cm² (Slika 12). U poređenju sa *P. aeruginosa* PAO1, 12 izolata je pokazalo veću zonu pokretljivosti. Izolat Bust3A je imao čak 30 puta veću zonu pokretljivosti od *P. aeruginosa* PAO1. Sposobnost kretanja rojenjem je u proseku bila veća među izolatima poreklom od životinja u poređenju sa izolatima poreklom od ljudi.



Slika 12. Sposobnost odabranih izolata *P. aeruginosa* da se kreću rojenjem: a) grafički prikaz površina koje su izolati prešli rojenjem na polučvrstom agaru; b) fotografije Petrijevih šolja sa najkarakterističnijim izolatima. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna ponavljanja \pm standardna devijacija.

Sposobnost kretanja izolata grčenjem praćena je na čvrstim podlogama i površina kretanja je izmerena posle bojena kristal violetom (slika 13). Od 40 ispitanih izolata, kod 15 (37,5%) izolata zona pokretljivosti je bila manja od 10 cm^2 . Najveći broj izolata (25 izolata, tj. 62,5%) je imao zonu pokretljivosti grčenjem iznad 14 cm^2 . Najveće zone pokretljivosti detektovane su kod izolata BU35A, S22H, S6H i S26H i iznosile su 28 cm^2 . U proseku, veću sposobnost kretanja grčenjem imali su izolati poreklom od ljudi, u odnosu na izolate poreklom od životinja. Soj *P. aeruginosa* PAO1 imao je zonu pokretljivosti od $15,9 \text{ cm}^2$. Šest izolata je imalo zone pokretljivosti znatno veće od *P. aeruginosa* PAO1, od kojih su dva izolata vodila poreklo od životinja, a četiri od ljudi.



Slika 13. Sposobnost odabranih izolata *P. aeruginosa* da se kreću grčenjem: a) grafički prikaz površina koje su izolati prešli grčenjem; b) fotografije Petrijevih šolja sa najkarakterističnijim izolatima. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna ponavljanja \pm SD.

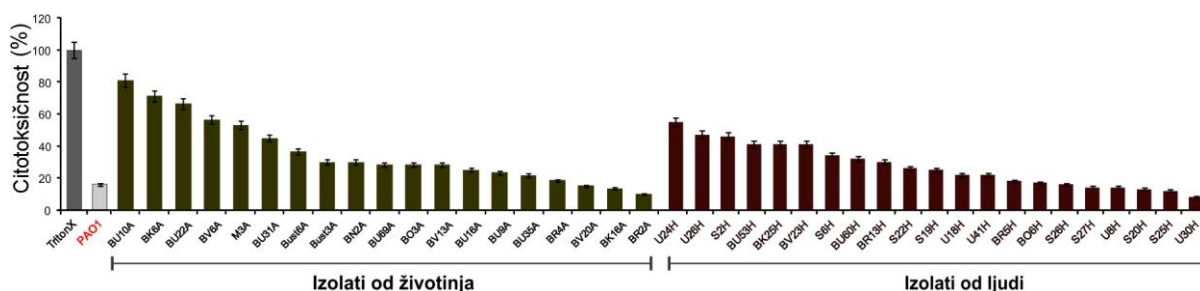
5.3. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti i infektivnosti odabranih izolata *P. aeruginosa*

Citotoksičnost izolata *P. aeruginosa* je određivana testiranjem njihove sposobnosti da izazivaju citotoksični efekat na ćelijama iz ćelijske linije A549, a zatim su rezultati dobijeni u ovom eksperimentu upoređeni sa rezultatima testiranja infektivnosti, dobijenim u eksperimentima *in vivo* sa model sistemima *Caenorhabditis elegans* i *Danio rerio*.

5.3.1. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti odabranih izolata *P. aeruginosa* na ćelijama iz ćelijske linije A549

Citotoksična aktivnost ispitanih izolata praćena je tokom 24 sata, merenjem fluorescencije boje PI koja se vezuje za DNK eukariotskih ćelija sa narušenim integritetom membrane. Za određivanje citotoksičnog potencijala izolata korišćene su vrednosti fluorescencije PI izmerene u desetom satu infekcije, kako bi se isključila mogućnost da detektovani fluorescentni signal potiče od vezivanja PI za ekstracelularnu DNK prisutnu u biofilmovima koji se mogu formirati na zidovima bunarčića ili na površini sloja ćelija A549. Citotoksično delovanje izolata na ćelije A549 prikazana je

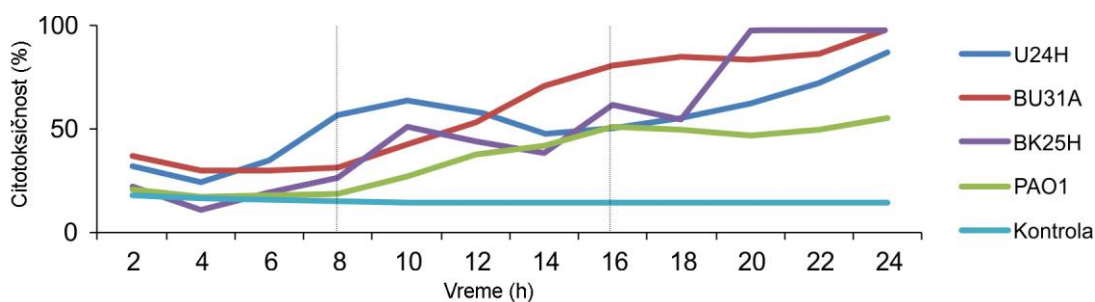
kao procenat umrlih ćelija u prisustvu ispitivanog izolata u odnosu na smrt ćelija A549 izazvanu deterdžentom Triton X-100, čija je vrednost uzeta kao 100% citotoksičnog efekta (Slika 14). Da bi se dodatno isključila mogućnost da signal PI potiče od vezivanja boje za ekstracelularnu DNK u biofilmovima, izolati su paralelno zasejavani na isti način kao u eksperimentalnoj infekciji, ali u odsustvu A549 ćelija i pri tome je potvrđeno odsustvo fluorescentnog PI signala.



Slika 14. Citotoksična aktivnost odabranih izolata *P. aeruginosa* 10 sati nakon infekcije predstavljena kao procenat citotoksičnosti u prisustvu izolata u odnosu na totalnu citotoksičnost izazvanu deterdžentom (TritonX). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz dva nezavisna ponavljanja \pm SD.

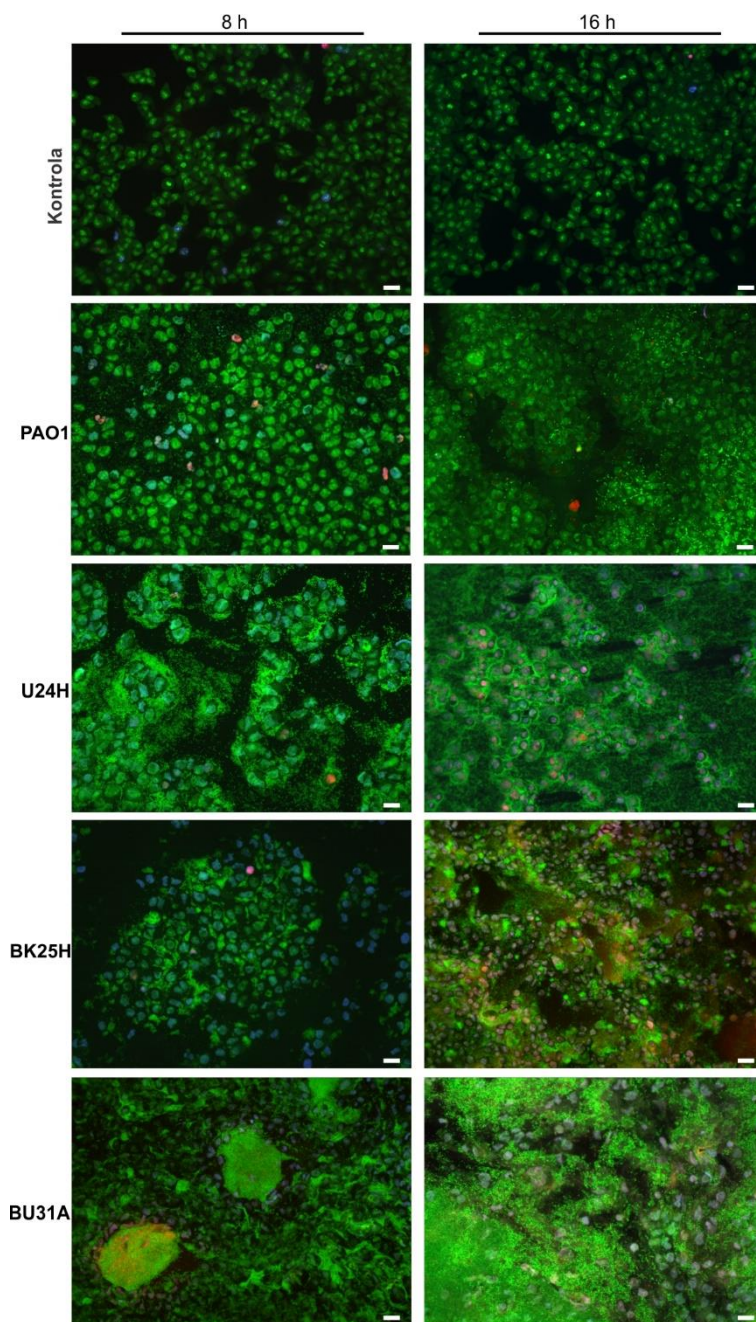
Sposobnost izazivanja citotoksičnog efekta kod 60% izolata iz obe grupe je bila veća od citotoksičnog potencijala *P. aeruginosa* PAO1. Među izolatima koji pokazuju dva ili više puta veću citotoksičnost na ćelijama A549 od *P. aeruginosa* PAO1, 35% njih su poreklom od životinja, odnosno 65% od ljudi. Svi izolati poreklom od životinja koji su pokazali visoku citotoksičnost na ćelijama A549 su vodili poreklo iz uzoraka briseva (osim izolata M3A izolovanog iz uzorka mleka), dok su visoko citotoksični izolati poreklom od ljudi izolovani iz briseva i uzoraka urina i sputuma. Najveći citotoksični potencijal među izolatima iz životinja (49% umrlih ćelija) na ćelijama A549 je pokazao izolat BU10A koji je izolovan iz brisa uha psa, dok je najcitotoksičniji humani izolat (55% umrlih ćelija) bio uzorak U24H izolovan iz urina čoveka. Najmanji citotoksični potencijal na ćelijama A549 od 6%, odnosno 8% su imali uzorak BR2A, izolovan iz uzorka od životinje, odnosno uzorak U30H poreklom od čoveka.

Progresija citotoksičnosti tokom 24 sata za četiri reprezentativna izolata (dva sa najvećim citotoksičnim potencijalom, U24H i BU10A, jedan sa umerenim citotoksičnim potencijalom, BK25H i *P. aeruginosa* PAO1) prikazana je na slici 15.



Slika 15. Citotoksična aktivnosti tri karakteristična izolata i soja PAO1 tokom 24 sata. Kao kontrola praćena je spontana smrt neinficiranih ćelija.

Citotoksična aktivnost pomenutih izolata praćena je i na fluorescentnom mikroskopu 8 sati i 16 sati po infekciji (Slika 16). Izolat BU31A, najveći proizvođač ukupnog biofilma, formirao je biofilm preko sloja A549 ćelija već posle 8 sati od početka infekcije. Slično ovom izolatu, i izolat U24H je već posle 8 sati formirao značajnu količinu biofilma na površini A549 ćelija. Posle 16 sati izolat BU31A je formirao toliku količinu biofilma da je prekrpio celu površinu pločica na kojima su rasle A549 ćelije, dok je biofilm koji je formirao izolat U24H bio razbacan po površini A549 ćelija i bio je manje konfluentan. Na osnovu bojenja preparata PI može se zaključiti da su oba izolata izazvala citotoksični efekat u sličnom procentu. Izolat BK25H, koji je okarakterisan kao najbolji proizvođač pocijanina, 8 sati po infekciji je formirao sličnu količinu biofilma kao i *P. aeruginosa* PAO1, međutim 16 sati po infekciji, količina biofilma ovog izolata i broj liziranih ćelija je bio veći u odnosu na infekciju sa *P. aeruginosa* PAO1.



Slika 16. Fluorescentna mikrografija biofilмова izolata U24H, BK25H, BU31A i soja PAO1 formiranih na sloju ćelija iz ćelijske linije A549. Posle inkubacije od 8 sati, odnosno 16 sati jedra ćelija A549 su obojena bojama DAPI (plavo) i SYTO 9 (zeleno), žive bakterijske ćelije su obojene bojom SYTO 9 (zeleno), mrtve bakterijske ćelije i mrtve ćelije A549 su obojene upotrebom PI (crveno). Ekstracelularna DNK u formiranom biofilmu istovremeno je obojena bojama SYTO 9 i PI (narandžasto). Kontrolu čine ćelije A549 gajene bez prisustva bakterija. Razmernik predstavlja 10 μm .

5.3.2. Rezultati ispitivanja infektivnosti odabranih izolata *P. aeruginosa* na *in vivo* model sistemima

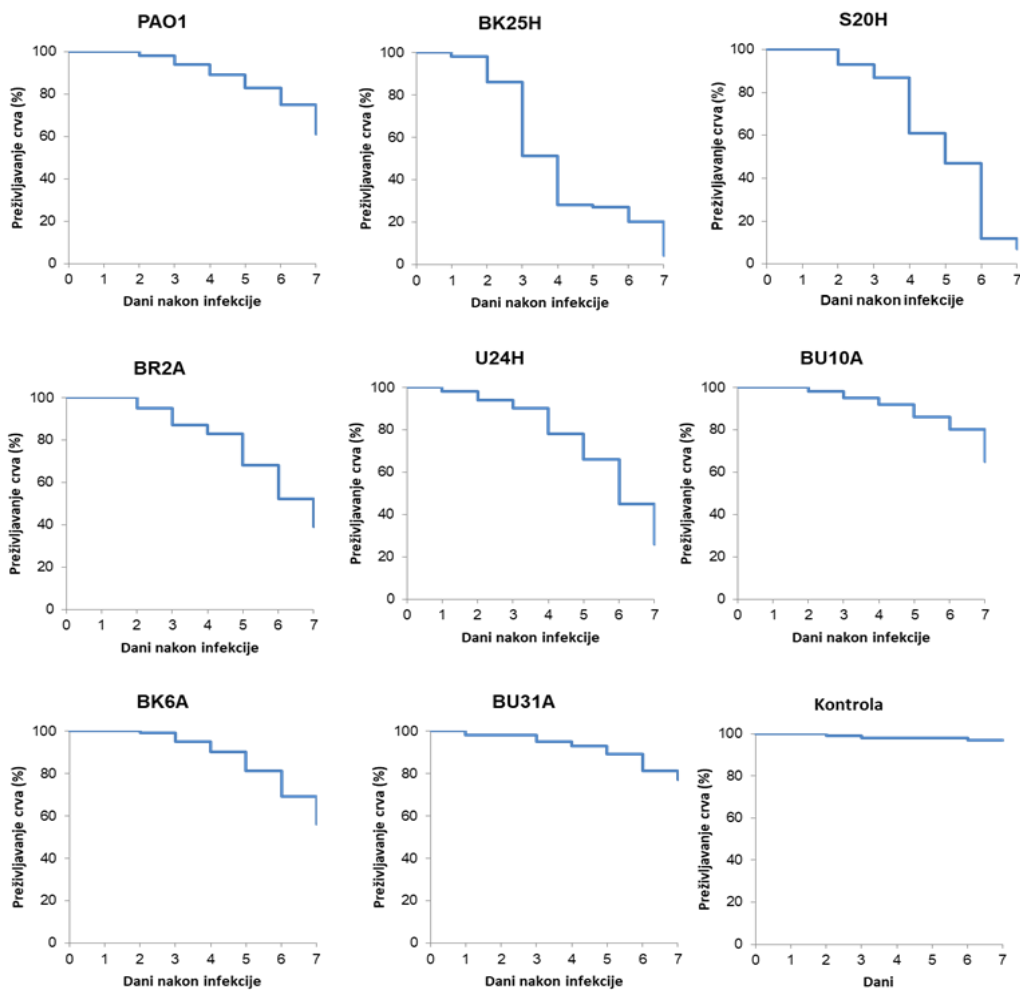
Infektivnost pojedinih izolata *P. aeruginosa* praćena je *in vivo* u model sistemima *Caenorhabditis elegans* i *Danio rerio*. Izolati za ispitivanja *in vivo* su izabrani na osnovu rezultata dobijenih u eksperimentima ispitivanja karakteristika virulencije i citotoksićnosti i predstavljani su u tabeli 8.

Tabela 8. Izolati izabrani za ispitivanja *in vivo*.

Izolat	Citotoksićnost (%)	Osnovne karakteristike izolata
U24H	55	Najcitotoksićniji meću izolatima poreklom od ljudi, dobar proizvođać biofilma
BU10A	49	Najcitotoksićniji meću izolatima poreklom od životinja, dobar proizvođać biofilma
BK2H	41	Najveći proizvođać piocijanina, dobar proizvođać biofilma i prelazi najveće površine pokretima plivanja
BK6A	43	Najveći proizvođać A-L biofilma i dobar proizvođać ukupnog biofilma
BU31A	27	Najveći proizvođać ukupnog biofilma, prelazi najveće površine pokretima grćenja
S20H	13	Izolat sa najvećom hemolitićkom aktivnošću, dobar proizvođać biofilma
BR2A	6	Najmanje citotoksićan, najmanja sposobnost proizvodnje biofilma
PAO1	16	Referentni soj

5.3.2.1. Rezultati ispitivanja infektivnosti odabranih izolata *P. aeruginosa* na model sistemu *C. elegans glp-4; sek-1*

Ispitivanje sposobnosti odabranih izolata da ubiju nematodu *C. elegans glp-4; sek-1* izvedeno je na crvima u larvenom stadijumu L4. Larve *C. elegans* su inkubirane sa izolatima *P. aeruginosa* i njihovo preživljavanje je praćeno tokom sedam dana brojanjem mrtvih i živih crva (Slika 17).



Slika 17. Kaplan-Majerove krive preživljavanja *C. elegans* u prisustvu 8 ispitanih izolata *P. aeruginosa* tokom sedam dana.

Neznatna uginuća nematoda počela su drugog dana po infekciji, da bi trećeg dana došlo do jasnih razlika u broju uginulih crva inkubiranih sa različitim izolatima. Na osnovu ukupnog broja uginulih crva sedmog dana eksperimenta (od 23% do 96%) izolati su prema infektivnosti poređani na sledeći način:

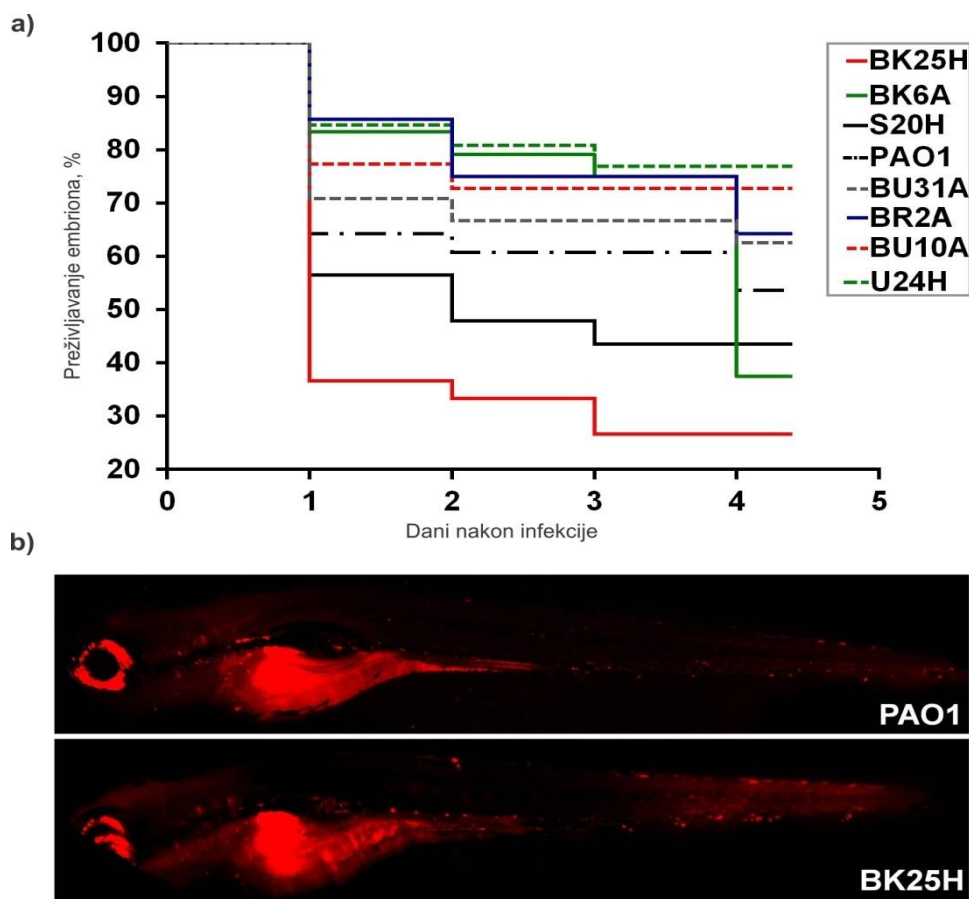
BK25H≈S20H>U24H>BR2A>BK6A>PAO1≈BU10A>BU31A

Smrtnost nematoda, četvrtog dana od početka inkubacije sa izolatima *P. aeruginosa* se kretala od 5% do 72%. Kod izolata BK25H značajnija uginuća su zabeležena već drugog dana (15%), trećeg dana zabeleženo je 49% uginulih nematoda da bi sedmog dana detektovano 96% uginulih nematoda. Za izolat S20H je karakteristično da je do značajnog broja uginjavanja crva došlo četvrtog dana posle infekcije (40%), a da je šestog dana svega 12% crva bilo živo. Izolat BU31A bio je

najmanje infektivan u eksperimentu sa *C. elegans*, izazvavši smrt kod svega 23% crva nakon sedam dana od početka eksperimenta.

5.3.2.2. Rezultati ispitivanjaa infektivnosti odabranih izolata *P. aeruginosa* na model sistemu embriona zebrice (*Danio rerio*)

Za potrebe ovog eksperimenta korišćeni su embrioni ribica stari od 30 do 32 sata kod kojih je injektiranjem ćelija odabranih izolata izazvana sistemska infekcija. Injektiranje je izvedeno direktno u krvni sud žumancetne kese embriona uz pomoć mikroinjektora. Preživljavanje embriona je praćeno tokom četiri dana (Slika 18).

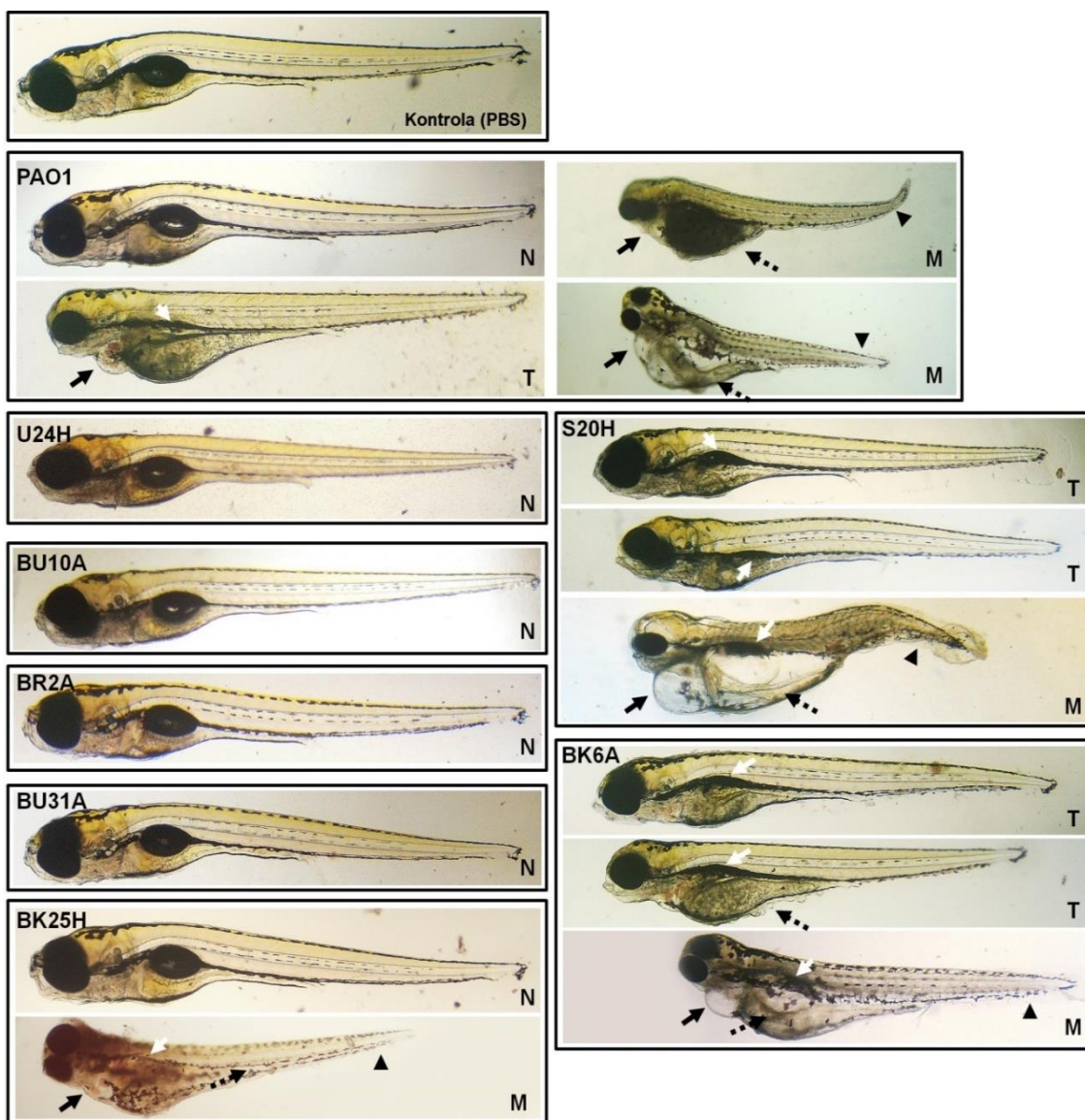


Slika 18. Infektivni potencijal odabranih izolata *P. aeruginosa* na modelu *D. rerio*: a) Kaplan-Majerova kriva preživljavanja embriona zebrice u prisustvu odabranih izolata *P. aeruginosa* tokom pet dana; b) Reprezentativne mikrografije emriona zebrice injektiranih ćelijama *P. aeruginosa* obeleženih crvenom fluorescentnom bojom (Cell tracker).

Na osnovu broja uginulih embriona četvrtog dana od početka infekcije testirani izolati su prema infektivnosti rangirani na sledeći način:

BK25H>BK6A>S20H>PAO1>BU31A≈BR2A>BU10A≈U24H.

Smrtnost embriona u prisustvu izabranih izolata je bila između 23% i 73%. Svi izolati, osim BK6A, su ubijali embrione uglavnom prvog dana posle infekcije, kada embrioni još nisu bili potpuno imunokompetentni. Smrtnost embriona inficiranih sa izolatom BK25H, koji je proizvodio veliku količinu piocijanina, je već prvog dana bila 55%. U slučaju izolata BK6A došlo je do drastičnog uginuća embriona četvrtog dana posle infekcije, a bakterijske ćelije su uočene u svim delovima tela zebrice sa akumulacijom u kaudalnom regionu. Uočeno je da su u kaudalnom regionu inficiranih embriona izolati S20H, BK6A, kao i *P. aeruginosa* PAO1 izazvali prekid cirkulacije i nekrozu tkiva do četvrtog dana posle infekcije, kao i progresivne edeme perikardijalne duplje i celog tela. Takođe, kod ovih embriona nije došlo do razvoja ribljeg mehura. Sa druge strane, moribundni embrioni inficirani drugim izolatima su uglavnom manifestovali oštećenja u regionu žumancetne kese (Slika 19). Zapaženo je da su embrioni inficirani izolatom BK6A trećeg dana posle infekcije postali paralizovani.

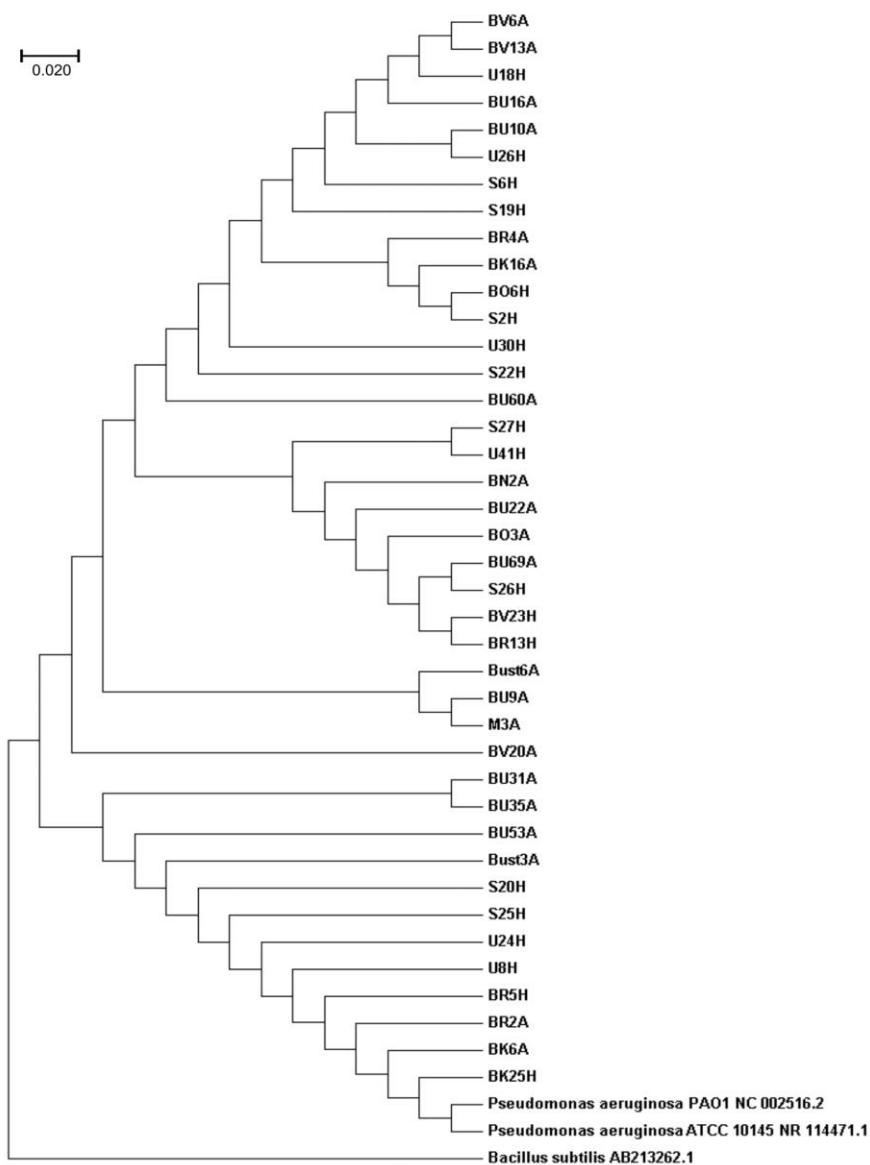


Slika 19. Fotografije embriona zebrica posle infekcije (N – normalna zebrica, T – teratogena zebrica, M – moribundna zebrica); strelice označavaju mesta promene posle infekcije.

5.4. Rezultati ispitivanja filogenetske srodnosti i grupisanja odabranih izolata *P. aeruginosa* na osnovu parcijalne sekvence gena za 16S rRNK

Za potrebe ispitivanja filogenetske srodnosti odabranih izolata korišćene su parcijalne sekvence gena za 16S rRNK. Veličina dobijenih sekvenci je bila oko 600 bp. Kao sekvence iz baze podataka sa kojima su upoređeni ispitivani izolati korišćene su 16S rRNK sekvence *P. aeruginosa* PAO1 NC_002516.2 i *P. aeruginosa* 10145 NR_114471.1. Sekvence ispitanih izolata su bile od 97% do 100% identične sa

sekvencama korišćenim za poređenje. Konstruisano filogenetsko stablo pokazuje da su ispitani izolati slični i da su, nezavisno od vrste uzoraka iz kojih su izolovani, distribuirani kroz celo stablo (Slika 20). Na filogenetskom stablu nije uočeno klasterovanje koje bi ukazalo na filogenetske razlike između grupa izolata.



Slika 20. Filogenetsko stablo napravljeno na osnovu parcijalnih sekvenci gena za 16S rRNK za 40 ispitanih izolata. Filogenetsko stablo je ukorenjeno korišćenjem sekvence za 16S rRNK izolata *Bacillus subtilis* (AB213262.1). Razmernik predstavlja udaljenost zamena baza na određenoj poziciji.

5.5. Statističke analize: korelacija, klasterovanje i prediktivnost

Rezultati dobijeni ispitivanjem odabranih faktora virulencije i citotoksičnosti 40 izabranih izolata i referentnog soja uključeni su u statističku analizu sa ciljem da se utvrdi korelacioni odnos i stepen korelacije pojedinačnih faktora virulencije i citotoksičnosti testiranih na ćelijama iz ćelijske linije A549. Na istim podacima primenjeno je i mašinsko učenje radi generisanja predikcionog modela. U procesu modelovanja citotoksični potencijal je posmatran kao zavisna varijabla, čija se vrednost predviđala. Ostale karakteristike virulencije izolata *P. aeruginosa* posmatrane su kao nezavisne varijable i korišćene su za formiranje modela mašinskog učenja. Izolati su grupisani metodom hijerarhijskog grupisanja na osnovu podataka za svih osam ispitanih karakteristika - sedam karakteristika virulencije i citotoksičnost.

Ispitivanje razlika između izolata *P. aeruginosa* poreklom od životinja i izolata porekom od ljudi, kao i izolata poreklom iz uzoraka briseva i izolata porekom iz uzoraka tečnosti, na osnovu nekih od odabranih faktora virulencije rađeno je statističkim metodama opisanim u odeljku 4.9.

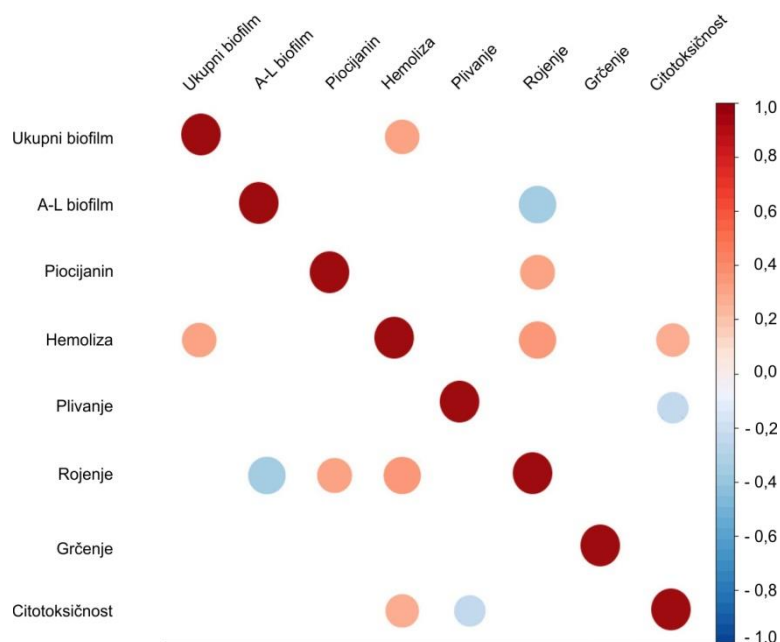
5.5.1. Analiza korelacije

Rezultati Šapiro-Vilkovog testa su pokazali da podaci ni u jednoj grupi testiranih faktora virulencije kao ni i podaci o citotoksičnosti nemaju normalnu distribuciju. Shodno tome, korišćene su neparametarske statističke metode za ispitivanje korelacija.

Robusna rang korelacija je efikasan metod za identifikaciju nelinearnih odnosa između podataka koji nemaju normalnu distribuciju. Ovom statističkom metodom analiziran je stepen i predznak korelacije, tj. da li su korelacije pozitivne ili negativne između svake od osam ispitanih karakteristika.

Iako pod ispitivanim uslovima stepen korelacije nije bio veliki, bio je statistički značajan (Slika 21). Najveća pozitivna korelacija je zabeležena između hemolitičke aktivnosti i sposobnosti rojenja kod ispitanih izolata, dok je najveća negativna korelacija zabeležena između sposobnosti izolata da formiraju A-L biofilm i sposobnosti rojenja. Umerene pozitivne korelacije su zapažene između hemolitičke aktivnosti i sposobnosti izolata da formiraju ukupan biofilm, kao i između sposobnosti izolata da produkuju piocijanin i sposobnosti rojenja. Citotoksičnost ispitanih izolata je bila pozitivno

korelisana sa hemolitičkom aktivnošću i umereno negativno korelisana sa sposobnošću izolata da se kreću plivanjem.



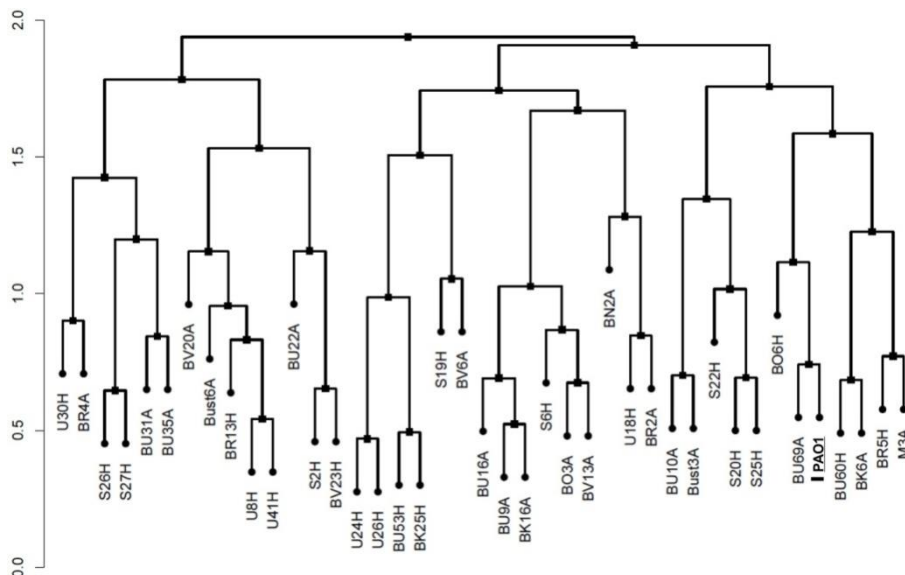
Slika 21. Korelacioni odnosi između ispitanih karakteristika (sedam faktora virulencije i citotoksičnosti). Prikazane su statistički značajne korelacije ($p < 0.05$) kod kojih je $\gamma \geq 0.3$. Boja i veličina krugova označavaju nivo i jačinu korelacije. Na temperaturnoj skali na Y osi prikazane su vrednosti koeficijenta korelacije γ . Nijanse crvene ukazuju na pozitivnu korelaciju, a nijanse plave ukazuju na negativnu korelaciju.

5.5.2. Rezultati ispitivanja klasterovanja odabranih izolata *P. aeruginosa*

Posle utvrđivanja korelacija između ispitivanih karakteristika virulencije odabranih sojeva i *P. aeruginosa* PAO1, izolati su grupisani metodom hijerarhijske klasterizacije. Izolati su grupisani na osnovu euklidske udaljenosti normalizovane vrednostima sedam ispitivanih faktora virulencije i citotoksičnosti.

Dobijeni rezultati, predstavljeni u okviru razgranatog stabla pokazuju da nema jasnog klasterovanja među izolatima (Slika 22). Zapažaju se tri glavne grane, ali su izolati poreklom od ljudi i životinja ravnomerno distribuirani kroz sve grane hijerarhijskog stabla. Takođe, izolati sa najvećim citotoksičnim potencijalom su raspoređeni u okviru svake grane hijerarhijskog stabla. Na istoj grani sa referentnim sojem je izolat BU69A (izolovan iz brisa uha psa) koji je pokazao citotoksični potencijal sličan soju PAO1 kao i slične vrednosti za većinu ispitivanih faktora

virulencije, osim u slučaju piocijanina kog je produkovao u većoj količini u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1.



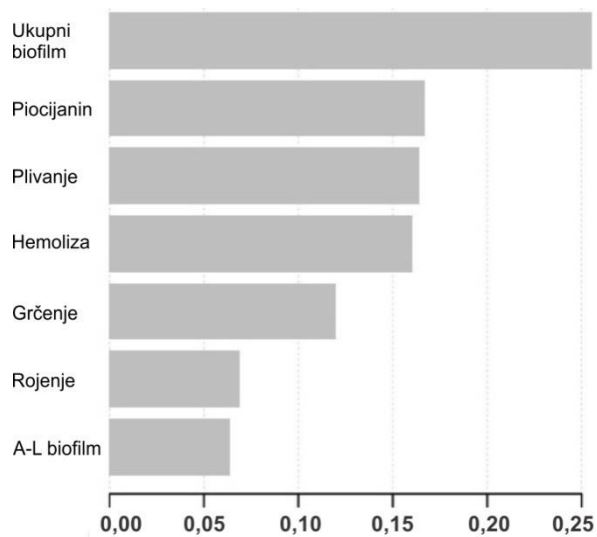
Slika 22. Hijerarhijsko klasterovanje odabranih izolata i *P. aeruginosa* PAO1 na osnovu ispitnih karakteristika (sedam faktora virulencije i citotoksičnosti). Na Y osi su prikazane vrednosti euklidske udaljenosti normalizovane vrednostima sedam ispitivanih faktora virulencije i citotoksičnosti.

5.5.3. Predikcija citotoksičnosti izolata *P. aeruginosa* na osnovu ispitivanih faktora virulencije

U konstrukciji predikcionog modela korišćenjem algoritma mašinskog učenja, koji bi na osnovu ispitanih faktora virulencije izolata omogućio procenu njegove citotoksičnosti, citotoksičnost je posmatrana kao zavisna varijabla. Korišćenjem LOOUV metode sposobnost dobijenog predikcionog modela da predvidi citotoksični potencijal izolata *P. aeruginosa* na osnovu sedam ispitanih virulentnih karakteristika je bila: $KSKG = 7,64906 \pm 2,726$.

Na osnovu podataka dobijenih primenom konstruisanog predikcionog modela, može se reći da je najvažnija karakteristika za predikciju citotoksičnosti izolata *P. aeruginosa* njihova sposobnost da formiraju ukupan biofilm (Slika 23). Sledeća značajna karakteristika je sposobnost proizvodnje piocijanina praćena sposobnošću plivanja, hemolitičkom aktivnošću, sposobnošću grčenja i rojenja, dok je sposobnost

formiranja biofilma na granici vazduh-tečnost, prema ovom modelu, najmanje važna za predikciju citotoksičnosti.



Slika 23. Relativna važnost različitih faktora virulencije za predviđanje citotoksičnog potencijala ispitanih izolata zasnovanog na XGBoost regresionom modelu. Na X osi je prikazan relativan uticaj pojedinačne virulentne karakteristike na povećanje performansi prediktivnog modela.

5.5.4. Rezultati ispitivanja statističke razlike između grupa izolata

U svrhu testiranja statistički značajnih razlika između grupa izolata primenjen je Wilcoxon Rank-Sum test. Podaci su grupisani prema poreklu (izolati poreklom od životinja i izolati poreklom od ljudi) i vrsti uzoraka (izolati poreklom iz uzorka brisevaa i izolati poreklom iz uzoraka tečnosti) i testirani su za svaku ispitanu karakteristiku virulencije u parovima. Između testiranih grupa izolata pronađene razlike nisu bile statistički značajne ($p < 0.05$). Kako Wilcoxon Rank-Sum test ne sadrži probabilistički podatak o veličini efekta, tj. relativnoj tendenciji razlikovanja podatka u formi verovatnoće, vrednosti na osnovu kojih je moguće doneti zaključak o razdvojenosti određenih kategorija izolata su izražene u vrednosti k . Vrednosti k su dobijene korišćenjem neparametrijskog Relative effect testa kompatibilnog sa Wilcoxon Rank-Sum testom.

Najveću statističku razliku (koju predstavlja k vrednost) između izolata poreklom od ljudi i životinja pokazali su podaci za citotoksičnost (Tabela 9). Ovaj

podatak govori da u 62,9% slučajeva nasumično odabran izolat poreklom od ljudi ima veći citotoksični potencijal u odnosu na izolat poreklom od životinja. Razlike su zabeležene i na osnovu sposobnosti izolata da formiraju ukupne biofilmove i A-L biofilmove, kao i na osnovu sposobnosti izolata da se kreću grčenjem. Najmanje razdvajanje između izolata poreklom od životinja i ljudi je zabeleženo na osnovu podataka za proizvodnju piocijanina, hemolitičku aktivnost, kretanje rojenjem i kretanje plivanjem.

Tabela 9. Prikaz vrednosti (*k*) dobijenih u Relative effect testu poređenjem faktora virulencije i citotoksičnosti izolata iz različitih grupa

Grupa ^a	Ukupan biofilm	A-L biofilm	Piocijanin	Hemolitička aktivnost	Plivanje	Rojenje	Grčenje	Citotoksičnost
A	0,39097 ^b	0,42983	0,49624	0,49874	0,51002	0,50878	0,45739	0,37093
H	0,60903	0,57017	0,50376	0,50126	0,48998	0,49122	0,54261	0,62907
S	0,46667	0,39467	0,52800	0,46667	0,40267	0,56133	0,41067	0,47210
F	0,53333	0,60533	0,47200	0,53333	0,59733	0,43867	0,58933	0,52810

^a A=izolati od životinja; H=izolati od ljudi; S=izolati iz briseva, F=izolati iz tečnih uzoraka

^b Vrednost *k* predstavlja verovatnoću da će nasumično uzet izolat iz bilo koje grupe imati veću vrednost za određenu karakteristiku virulencije od nasumično uzetog izolata iz neke druge grupe

Sa druge strane, najveće razdvajanje između izolata iz uzoraka briseva i uzoraka tečnosti je uočeno u količini proizvedenog A-L biofilma. Dobijene *k* vrednosti su pokazale da su veće šanse da će izolat koji proizvodi veću količinu A-L biofilma biti izolovan iz uzoraka tečnosti (60,5%) nego iz uzoraka briseva (39,46%). Razlike na osnovu citotoksičnog potencijala, sposobnosti izolata da proizvode ukupan biofilm, produkuju piocijanin, kreću se plivanjem, rojenjem i/ili grčenjem su bile male.

Takođe, razlika između grupa izolata analizirana je i korišćen je neparametarski algoritam mašinskog učenja XGBoost, sa ciljem da se ispita mogućnost razdvajanja navedenih grupa izolata (klasifikacija) na osnovu svih karakteristika virulencije, uključujući i citotoksičnost, konstruisanjem prediktivnog modela. Za proveru efikasnosti klasifikatora korišćena je UV-10.

Rezultati dobijeni na osnovu UV-10 za razlikovanje između grupa izolata poreklom od ljudi i onih poreklom od životinja bili su: AUROC=0,062, AUPRC=0.588 i BT=59,56%. Idealna situacija, odnosno najbolje razdvajanje je ono u kom je vrednost AUPRC jednaka 1, a vrednost BT jednaka 100%, dok vrednosti od 0,5 za AUPRC i

50% za BT pokazuju nasumičnost podataka u grupi. Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da je razlika između izolata poreklom od životinja i onih poreklom od ljudi, na osnovu prethodno opisanog pristupa, veoma mala. Korišćeni algoritam bolje razdvaja grupu izolata poreklom iz uzoraka briseva i grupu izolata poreklom iz tečnih uzoraka. Vrednosti za UV-10 test u ovom slučaju su bili: AUROC=0,767, AUPRC=0,771 i BT=66%.

5.6. Rezultati analize ekspresije gena virulencije

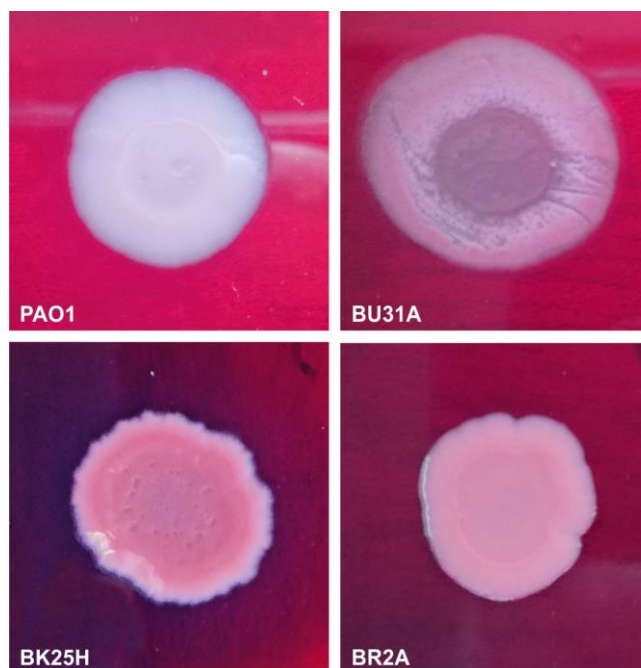
Da bi se razumela genetička osnova različite sposobnosti izolata da formiraju biofilm, detaljno je analizirana ekspresija 11 gena čiji su proizvodi uključeni u proces formiranja biofilma, međubakterijsku komunikaciju, hemolitičku aktivnost, kao i proizvodnju ramnolipida. Za ovu analizu odabrana su tri izolata *P. aeruginosa* na osnovu razlika u sposobnostima da formiraju ukupne biofilme u odnosu na soj PAO1 (Tabela 10).

Tabela 10. Lista izolata odabranih za analizu ekspresije gena.

Izolat	Proizvodnja ukupnog biofilma u odnosu na soj PAO1
BU31A	Proizvodi pet puta veću količinu biofilma
BK25H	Proizvodi dva puta veću količinu biofilma
BR2A.	Proizvodi pet puta manju količinu biofilma

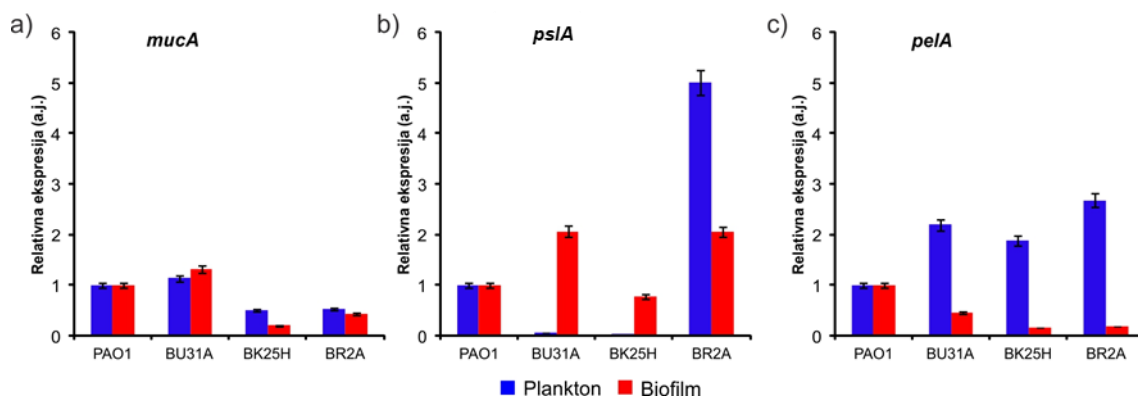
5.6.1. Rezultati analize ekspresije gena uključenih u sintezu ekstracelularnog matriksa biofilмова kod odabranih izolata

Razlike u sastavu egzopolisaharida među izolatima *P. aeruginosa* mogu se uočiti gajenjem na podlogama koje sadrže Congo red i Coomassie blue boje. Poređenjem kolonija tri izabrana izolata i *P. aeruginosa* PAO1 gajenih na ovim podlogama uočene su razlike u boji, izgledu površine i izgledu ivica kolonija, što je ukazivalo na potencijalno različit sastav proizvedenih egzopolisaharida (Slika 24).



Slika 24. Fotografije kolonija odabranih izolata *P. aeruginosa* gajenih 96 sati u prisustvu Congo red i Coomassie blue bojâ.

Za detaljnije ispitivanje odnosâ i količinâ različitih komponenti ekstracelularnog matriksa kod odabranih izolata kvantifikovana je ekspresija gena uključenih u proizvodnju svake egzopolisaharidne komponente matriksa. Praćena je ekspresija *mucA*, *psl* i *pelA* gena kod izolata gajenih u planktonskoj formi u toku eksponencijalne faze rasta ćelija, kao i u formi biofilma (Slika 25). Kako je u kontrolnim eksperimentima utvrđeno da ekspresija ispitivanih gena kod svakog izolata pod istim uslovima može da varira od 20% do 40% od gajenja do gajenja, kao minimalna vrednost razlike u ekspresiji analiziranih gena, koja je uzeta za značajnu, bila je dvostruka razlika u ekspresiji. Rezultati genske ekspresije za svaki izolat upoređivani su sa ekspresijom odgovarajućeg gena kod *P. aeruginosa* PAO1 i vrednosti su izražavane u formi relativne ekspresije.



Slika 25. Relativna ekspresija gena uključenih u proizvodnju glavnih komponenti ekstracelularnog matriksa (*mucA*, *pslA* i *pelA*) u različitim fazama rasta bakterija. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta \pm standardna devijacija.

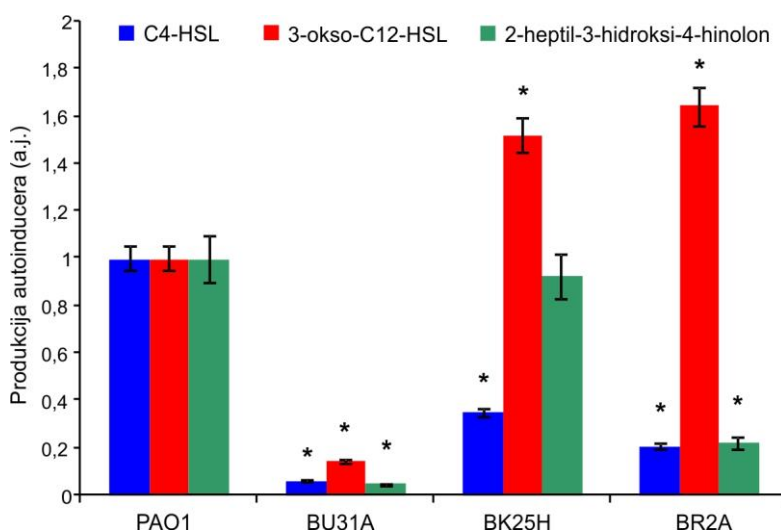
Ekspresija *mucA* gena kod izolata BU31A koji se pokazao kao najbolji proizvođač biofilmova nije se značajno razlikovala od ekspresije kod *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 25). Kod izolata BK25H i BR2A ekspresija *mucA* gena bila je značajno manja i u planktonskoj i u biofilm formi, pri čemu je najveća razlika u vidu petostruko manje ekspresije uočena kod biofilmova izolata BK25H.

Ekspresija *pslA* gena značajno je varirala među izolatima, kao i među različitim formama rasta istog izolata (Slika 25). Najviši nivo ekspresije *pslA* gena uočen je kod planktonskih ćelija izolata BR2A (produkuje najmanju količinu ukupnog biofilma), dok je u planktonskim formama druga dva izolata uočena značajno niža ekspresija ovog gena u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1, kao i u odnosu na izolat BR2A. U biofilmovima izolata BU31A i BR2A ekspresija *pslA* gena bila je dvostruko veća od ekspresije kod *P. aeruginosa* PAO1 i izolata BK25H.

Nivo ekspresije *pelA* gena u planktonskoj formi sva tri izolata bio je sličan među izolatima i dvostruko veći od nivoa ekspresije kod *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 25). S druge strane, nivoi ekspresije ovog gena u biofilmovima sva tri izolata bili su niži u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1, pri čemu je dva do tri puta veća ekspresija uočena kod BU31A u odnosu na druga dva izolata.

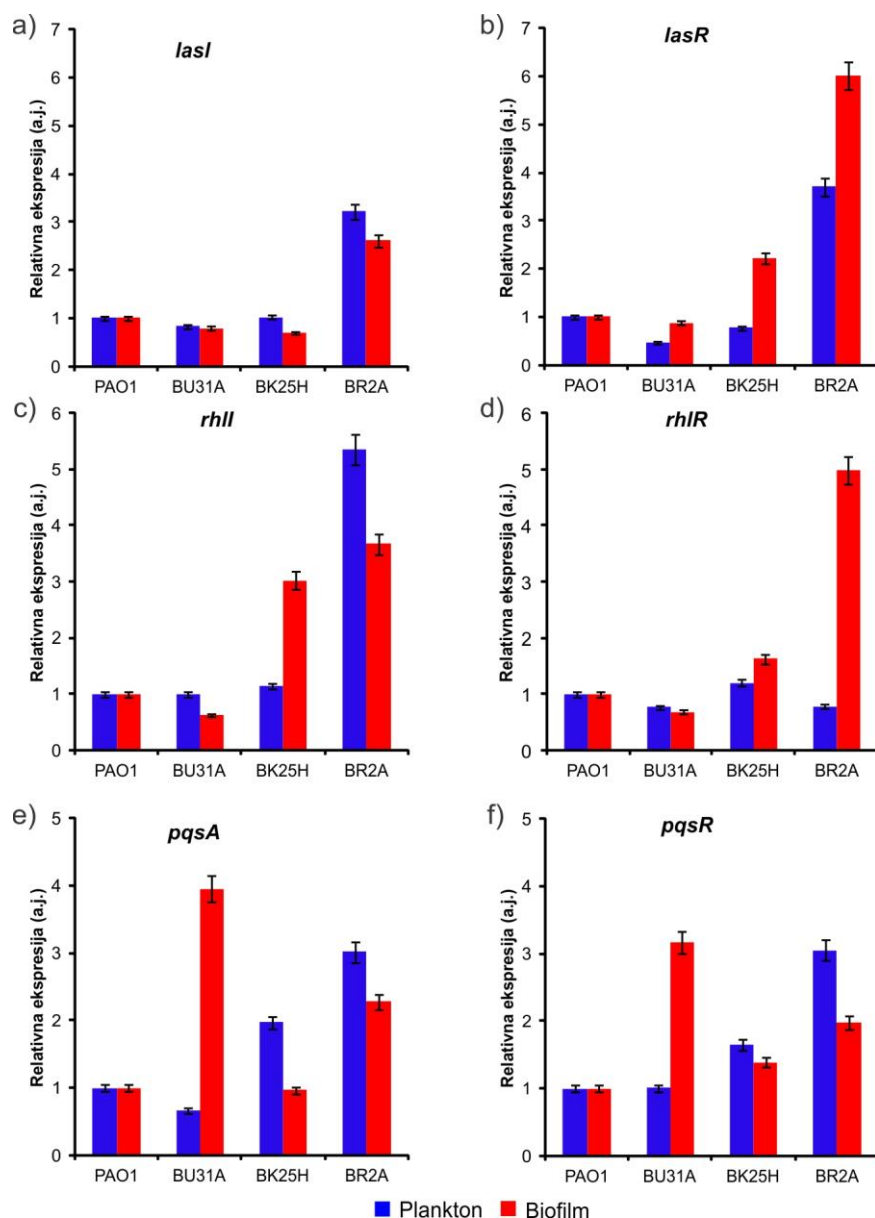
5.6.2. Rezultati analize aktivnosti Las, Rhl i PQS puteva međubakterijske komunikacije *P. aeruginosa*

Proizvodnja autoinducera (signalnih molekula) kod sva tri izolata razlikovala se međusobno, kao i u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 26). Kod izolata BU31A nivo sva tri autoinducera u supernatantu bio je 10 do 15 puta niži nego kod *P. aeruginosa* PAO1. Količina C4-HSL bila je značajno manja kod sva tri izolata u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1, dok je količina 3-okso-C12-HSL bila oko 1,6 puta veća u supernatantima izolata BK25H i BR2A u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1 i 16 puta veća u odnosu na izolat BU31A. Količina autoinducera PQS sistema kod izolata BU31A i BR2A bila je 10, odnosno pet puta manja u poređenju sa *P. aeruginosa* PAO1, odnosno izolatom BK25H kod kojih je izmerena slična količina ovog autoinducera.



Slika 26. Kvantifikacija autoinducera u supernatantima izolata *P. aeruginosa* izražena u arbitrarnim jedinicama u odnosu na vrednosti za *P. aeruginosa* PAO1. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna ponavljanja \pm SD. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između soja PAO1 i tri ispitivana izolata su predstavljene zvezdicom.

Odabrani izolati su dalje upoređivani na osnovu ekspresije gena uključenih u sintezu ove tri vrste autoinducera, kao i njihovih receptora (Slika 27).



Slika 27. Analiza ekspresije gena povezanih sa međubakterijskom komunikacijom izabranih izolata i *P. aeruginosa* PAO1 gajenih u formi planktonskih ćelija i u formi biofilma. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta \pm SD.

Ekspresija *lasI* gena značajno se razlikovala samo kod izolata BR2A i bila je oko tri puta veća u odnosu na ostale izolate i *P. aeruginosa* PAO1, kako u planktonskoj formi, tako i u biofilmu (Slika 27). Takođe, gen *lasR* je bio 4 do 7 puta više ekspimiran u planktonskoj, odnosno biofilm formi izolata BR2A u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 27). Ekspresija *lasR* kod BU31A u planktonskoj formi bila je dva puta manja u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1, dok se u biofilmu nije razlikovala. Dvostruko veća

ekspresija ovog gena kod izolata BK25H u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1 uočena je samo u formi biofilma, dok se u planktonskoj formi nije razlikovala.

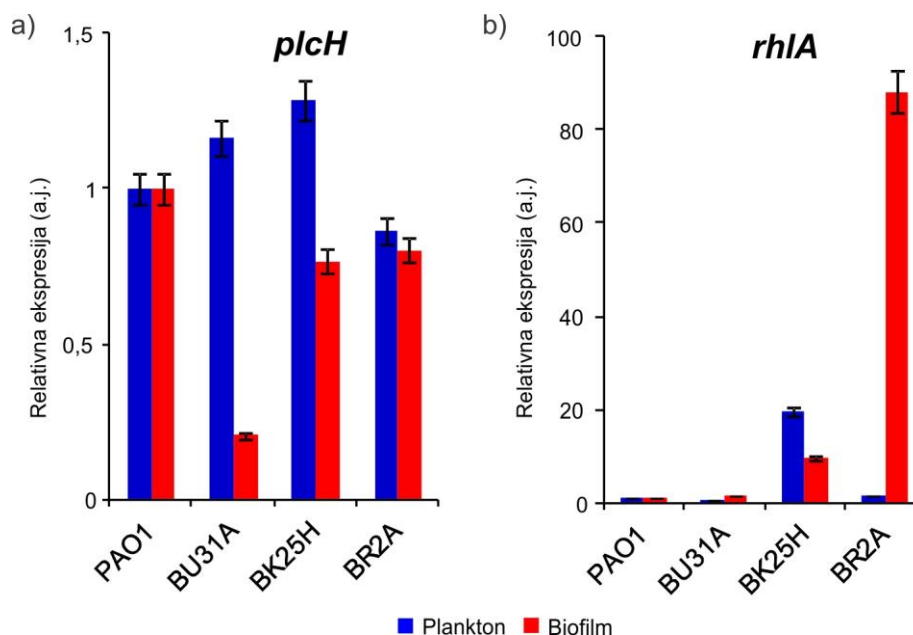
Sličan trend razlika u ekspresiji uočen je i kod gena *rhlI* i *rhlR* koji kodiraju sintetazu za C4-HSL, odnosno njihov receptor (Slika 27). Značajno veća razlika u ekspresiji *rhlI* u planktonskoj formi detektovana je samo kod izolata BR2A, dok je kod biofilmova povećana ekspresija ovog gena pored BR2A uočena i kod izolata BK25H. Nivo ekspresije gena *rhlR* značajno se razlikovao samo u biofilmu izolata BR2A i bio je pet puta viši u odnosu na nivo ekspresije ovog gena u planktonskoj formi, odnosno u biofilmovima ostalih izolata i *P. aeruginosa* PAO1.

Razlike u ekspresiji *pqsA* odnosno *pqsR* gena među izolatima imale su sličan trend i to BU31A<BK25H<BR2A u planktonskoj formi i BK25H <BR2A<BU31A u biofilmovima (Slika 27). U odnosu na *P. aeruginosa* PAO1 zabeležen je četiri odnosno dva i po puta veći nivo ekspresije gena *pqsA* kod izolata BU31A i BR2A gajenih u formi biofilma, dok je dva, odnosno tri puta veći nivo ekspresije ovog gena zabeležen kod planktonskih formi izolata BK25H i BR2A. Najveća ekspresija *pqsR* gena u planktonskoj formi je uočena kod izolata BR2A i bila je tri puta veća u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1. Najviši nivo ekspresije ovog gena u biofilmovima zabeležen je kod izolata BU31A i bio je tri puta viši u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1.

Iz ovih rezultata uočava se da je u biofilmovima izolata BU31A, najboljeg proizvođač biofilma, najaktivniji PQS signalni put međubakterijske komunikacije, dok je izolat BR2A, koji je najlošiji proizvođač biofilmova, pokazao veliku aktivnost sva tri signalna puta, kako u biofilmu, tako i u planktonskoj formi.

5.6.3. Rezultati analize ekspresije gena uključenih u sintezu hemolitičke fosfolipaze C i ramnolipida

Prilikom analize ekspresije gena *plcH* koji kodira hemolitičku fosfolipazu C nisu uočene značajne razlike među planktonskim formama ispitivanih izolata i *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 28). Značajno manja ekspresija ovog gena uočena je samo u biofilmu izolata BU31A u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1.



Slika 28. Relativna ekspresija *plcH* i *rhlA* gena analizirana kod izolata gajenih u formi planktonskih ćelija i u formi biofilma. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost reprezentativnog eksperimenta \pm SD.

Ekspresija gena *rhlA* odgovornog za sintezu ramnozitransferaze značajno se razlikovala među izolatima kako u planktonskoj formi, tako i u biofilmovima (Slika 28). Najveća ekspresija ovog gena zapažena je kod izolata BR2A gajenog u formi biofilma i bila je gotovo 90 puta veća u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1. Značajno velika ekspresija ovog gena uočena je i u biofilmu izolata BK25H. Kod izolata gajenih u formi planktonskih ćelija značajno veća ekspresija u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1 zabeležena je samo kod BK25H izolata.

5.7. Rezultati ispitivanja osetljivosti odabranih izolata *P. aeruginosa* na komplekse srebra(I) sa ftalazinom

Za ispitivanje osetljivosti izolata *P. aeruginosa* na komplekse srebra(I) korišćena su dva kompleksa srebra(I) sa ftalazinom (označena kao BG1 i BG2). Antibakterijski potencijal oba kompleksa testiran je na 15 izolata *P. aeruginosa* i na referentnom soju *P. aeruginosa* PAO1. Četrnaest izolata je izabrano na osnovu sposobnosti da proizvode veće količine biofilma u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1, dok je izolat BR2A odabran kao kontrola, zbog male količine biofilma koju proizvodi.

5.7.1. Rezultati testiranja antibakterijske aktivnosti i citotoksičnosti kompleksa srebra(I) sa ftalazinom

Kompleksi srebra(I) sa ftalazinom (BG1 i BG2) su pokazali značajan antipseudomonasni potencijal na bakterijama gajenim u planktonskoj formi. U slučaju kompleksa BG1 vrednosti MIK su se kretale u opsegu od 1,56 µg/ml do 12,5 µg/ml, dok su u slučaju kompleksa BG2 vrednosti MIK bile između 3,12 µg/ml i 25 µg/ml (Tabela 11). Koncentracija kompleksa BG1 koja je smanjila vijabilnost ćelija fibroblasta za 50% (IC₅₀) je bila 18 ±1,03 µg/ml, dok je za kompleks BG2 ta vrednost iznosila 8,9±0,77 µg/ml.

Kompleks BG1 je imao vrednosti MIK manje od 8 µg/ml za najveći broj izolata (14) osim za izolat BU22A, gde je ta vrednost bila 12 µg/ml. Ove vrednosti su bile od jedan i po do 11 puta puta manje od IC₅₀ vrednosti za ovaj kompleks.

Tabela 11. Vrednosti MIK kompleksa srebra(I) sa ftalazinom (BG1 i BG2) za odabrane izolate *P. aeruginosa* i *P. aeruginosa* PAO1.

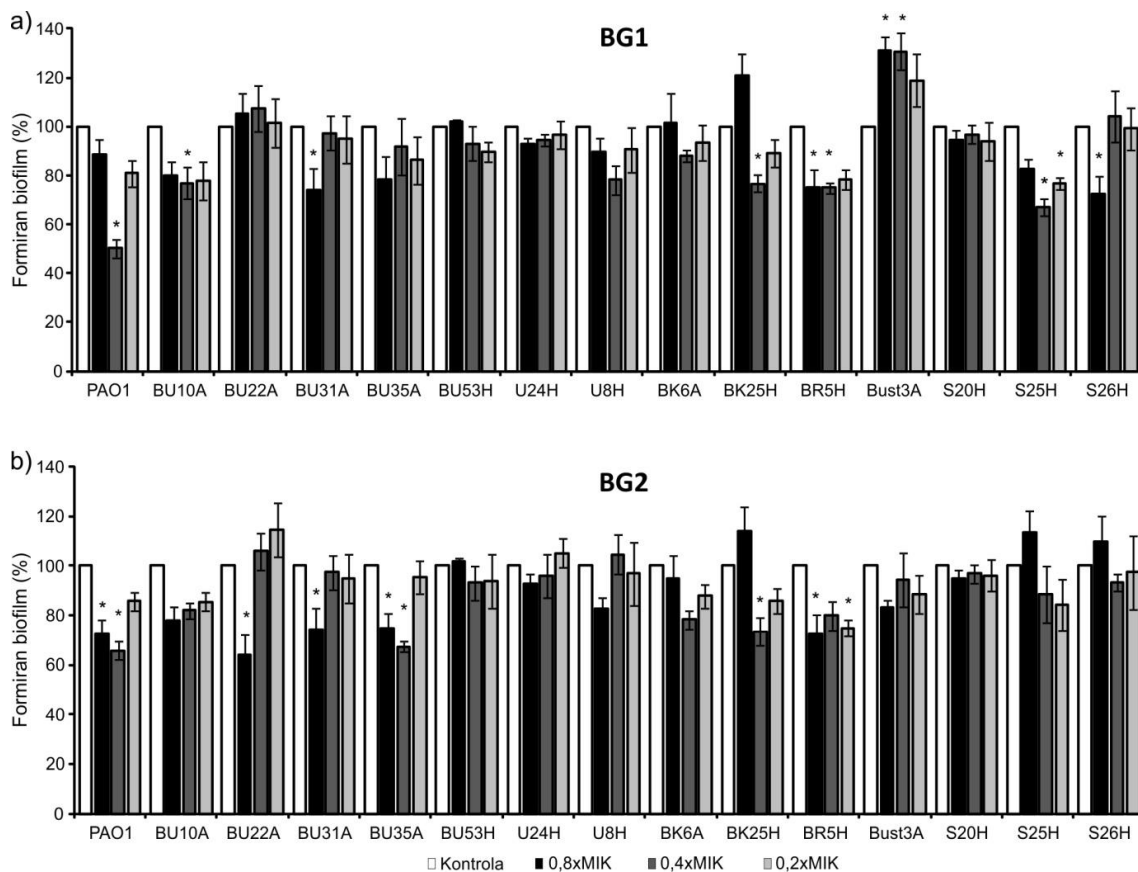
Izolat	MIK ($\mu\text{g/ml}$)	
	BG1	BG2
PAO1	3,9	7,8
BU10A	2,5	3,9
BU22A	12,5	25
BU31A	7,8	7,8
BU35H	3,12	6,25
BU53H	3,12	6,25
U24H	3,9	3,9
U8H	6,25	6,5
BK6A	7,8	7,8
BK25H	7,2	7,2
BR5H	3,1	3,12
Bust3A	1,56	3,12
S20H	3,9	3,9
S25H	3,1	25
S26H	6,25	12,5
BR2A	3	3,9

Kompleks BG2 je imao vrednosti MIK ispod 8 $\mu\text{g/ml}$ za najveći broj izolata osim za izolat S26H gde je vrednost MIK bila 12,5 $\mu\text{g/ml}$ i izolate S25H i BU22A, koji su bili najmanje osetljivi i gde je utvrđena vrednost MIK od 25 $\mu\text{g/ml}$. Osim u slučaju vrednosti MIK koje je kompleks BG2 imao za ova tri izolata, sve druge vrednosti MIK su bile u nivou ili manje od vrednosti IC_{50} za ovaj kompleks.

5.7.2. Rezultati efekat kompleksa srebra(I) sa ftalazinom na biofilmove odabranih izolata *P. aeruginosa*

Efekat kompleksa srebra(I) sa ftalazinom na biofilmove odabranih izolata *P. aeruginosa* ispitan je u eksperimentima inhibicije formiranja biofilma i degradacije već formiranog biofilma.

Potencijal kompleksa BG1 i BG2 da inhibiraju formiranje biofilma ispitan je u koncentracijama manjim od vrednosti MIK za svaki ispitan izolat (Slika 29).



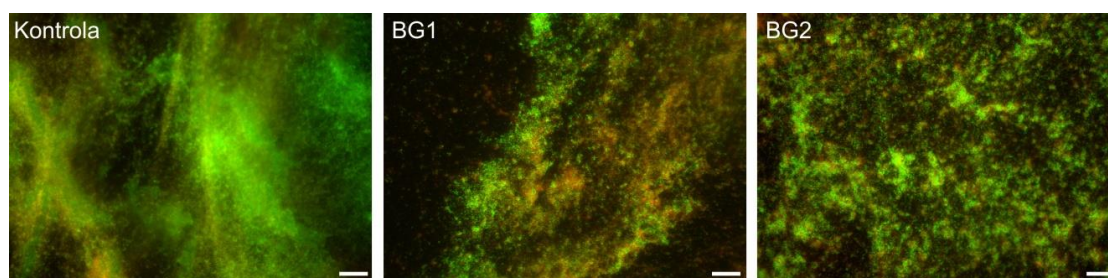
Slika 29. Efekat kompleksa srebra(I) sa ftalazinom (BG1 i BG2) na formiranje biofilmova. a) Uticaj kompleksa BG1 na formiranje biofilmova i b) uticaj kompleksa BG2 na formiranje biofilmova. Vrednosti su predstavljene kao procenat formiranog biofilma izraženog u odnosu na netretiranu kontrolu (0,1% DMSO). Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između tretmana kompleksom srebra(I) i odgovarajuće netretirane kontrole su označene zvezdicom. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna ponavljanja \pm SD.

U koncentraciji koja odgovara vrednosti 0,8xMIK kompleksa BG1, kod većine izolata je uočeno smanjenje formiranja ukupnog biofilma od 5% do 20%. Statistički značajno smanjenje količine formiranog biofilma je uočeno samo kod izolata BU31A, BR5H i S26H i iznosilo je oko 30%. Nasuprot tome, kod pet izolata, BU22A, BU53H, BK6A, BK25H i Bust3A zabeležena je stimulacija proizvodnje biofilma u odnosu na netretirane kontrole. Povećanje količine biofilma kod ovih pet izolata kretalo se od 5% do 30%, pri čemu je statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) zabeleženo samo kod izolata Bust3A. Pri tretmanu kompleksom BG1 u koncentraciji koja odgovara vrednostima 0,2xMIK, primećeno je smanjenje količine biofilma kod 11 izolata i *P. aeruginosa* PAO1 od 5% do 50%. Statistički značajno smanjenja biofilma koje se

kretalo između 25% i 50% uočeno je kod *P. aeruginosa* PAO1 i izolata BU10A, BK25H, BR5H i S25H.

Pri koncentraciji $0,8 \times \text{MIK}$, kompleks BG2 je smanjio formiranje biofilma kod 10 izolata i *P. aeruginosa* PAO1u opsegu od 5% do 40% (Slika 29). Statistički značajno smanjenje biofilma ($p < 0,05$) je zabeleženo kod *P. aeruginosa* PAO1 i izolata BU22A, BU31A i BR5H. Kod četiri izolata, BU53H, BK25H, S25H i S26H, primećena je stimulacija formiranja biofilma od oko 10%, što nije bilo statistički značajno. U koncentraciji koja odgovara vrednosti $0,4 \times \text{MIK}$, kompleks BG2 je inhibirao formiranje biofilma od 5% do 35% kod 12 izolata i *P. aeruginosa* PAO1. Statistički značajno smanjenje formiranja biofilma uočeno je kod *P. aeruginosa* PAO1 i izolata BU35A i BK25, i iznosilo je preko 25%. Pri koncentraciji koja odgovara vrednostima $0,2 \times \text{MIK}$ formiranje biofilmova je bilo značajno smanjeno samo kod izolata BR5H, gde je smanjenje količine biofilma iznosilo 25%.

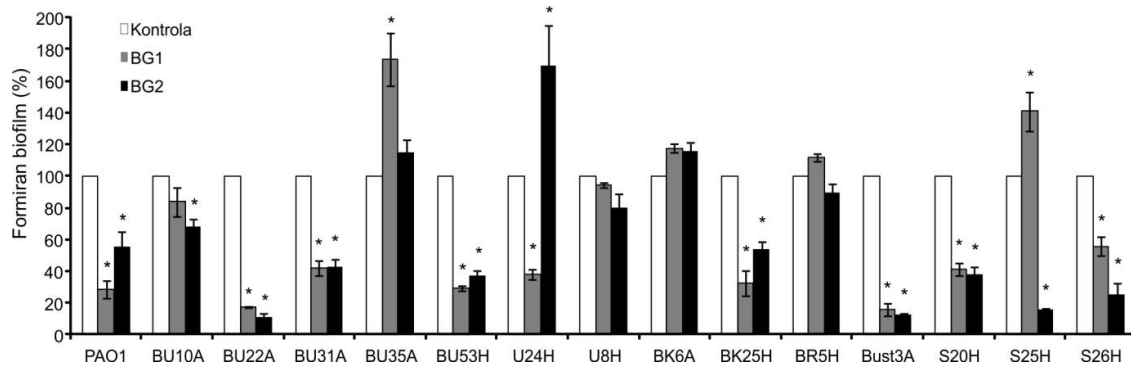
Efekat kompleksa srebra(I) na formiranje biofilmova kod izolata BK25H je praćen pod fluorescentnim mikroskopom nakon 24 sata tretmana, u koncentracijama koje odgovaraju vrednostima $0,4 \times \text{MIK}$ za svaki kompleks (Slika 30). Izolat BK25H je izabran zbog svog virulentnog dejstva na embrione zebrića i nematodu *C. elegans*, kao i zbog sposobnosti ovog izolata da proizvodi dva puta veću količinu biofilma u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1. Posle bojenja SYTO 9 i PI bojama uočeno je smanjenje količine biofilma u odnosu na kontrolu, kao i povećan broj mrtvih ćelija usled baktericidnog dejstva kompleksa srebra(I).



Slika 30. Inhibicija formiranja biofilma izolata BK25H gajenog u prisustvu kompleksa srebra(I) sa ftalazinom (BG1 i BG2) u koncentracijama koje odgovaraju njihovim vrednostima $0,4 \times \text{MIK}$. Posle 24 sata inkubacije, žive ćelije su obojene bojom SYTO 9 (zeleno), a mrtve ćelije su obojene bojom PI (crveno). Ekstracelularna DNK u formiranom biofilmu istovremeno je obojena i SYTO 9 i PI (narandžasto) bojom. Razmernik predstavlja 10 μm .

Za primenu u medicini je značajnija sposobnost antibakterijskog agensa da degradira već formirane biofilmove. Stoga su dalje testirane sposobnosti kompleksa

srebra(I) da degradiraju već formirani biofilm kod 14 odabranih izolata i *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 31). Izolat BR2A nije korišćen u ovom eksperimentu, zbog činjenice da proizvodi veoma malu količinu biofilma.



Slika 31. Sposobnost kompleksa srebra(I) sa ftalazinom (BG1 i BG2) da degradiraju već formirane biofilme. Vrednosti su predstavljene kao procenat preostalog biofilma izraženog u odnosu na kontrolu nakon 24 sata tretmana koncentracijama koje odgovaraju vrednostima $2 \times \text{MIK}$. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između tretmana kompleksom srebra(I) i odgovarajuće netretirane kontrole su označene zvezdicom. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost dobijenu iz tri nezavisna ponavljanja \pm SD.

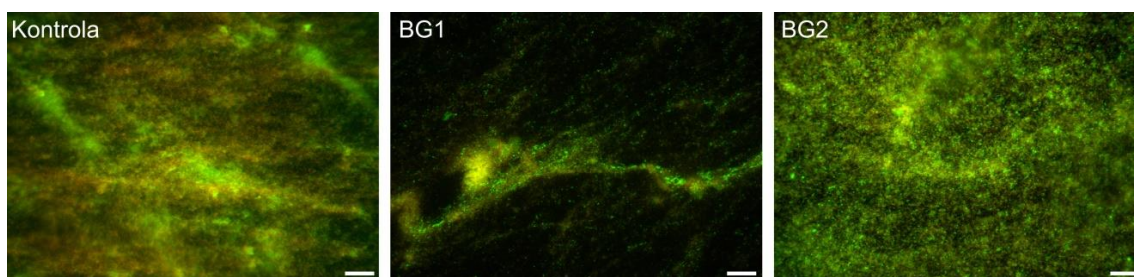
Kompleks BG1 je bio efikasan u degradaciji formiranih biofilмова deset izolata, kao i *P. aeruginosa* PAO1. Procenat degradacije biofilмова se kretao od 5% do 90%, u zavisnosti od izolata, pri čemu je statistički značajno smanjenje količine biofilma ($p < 0,05$) zabeleženo kod osam izolata i *P. aeruginosa* PAO1. Najveći efekat na prethodno formirani biofilm je zapažen kod izolata BU22A i Bust3A. Količina biofilma posle tretmana kompleksima srebra(I) kod ova dva izolata je bila smanjena za oko 85%. Procenat degradiranog biofilma je bio jednak za *P. aeruginosa* PAO1 i izolat BK25H i iznosio je 70%. Kod četiri ispitana izolata (BK6A, BR5H, S25H i BU35A) primećena je stimulacija proizvodnje biofilma u opsegu od 10% do 65%, pri čemu je statistički značajna stimulacija proizvodnje biofilma ($p < 0,05$) zabeležena kod izolata BU35A i S25H.

Pri tretmanu kompleksom BG2 degradacija prethodno formiranih biofilмова je zapažena kod 11 izolata, kao i kod *P. aeruginosa* PAO1. Smanjenje količine biofilma kretalo se u opsegu od 10% do 90%, pri čemu je statistički značajno smanjenje količine biofilma zabeleženo kod deset izolata i *P. aeruginosa* PAO1. Najveću osetljivost biofilмова na BG2 pokazali su izolati BU22A, S25H i Bust3A, kod kojih je procenat degradacije formiranog biofilma iznosio 85%. Smanjenje količine biofilma kod *P.*

aeruginosa PAO1 bilo je oko 50%. Kod izolata BU35A, BK6A i U24H zabeležena je stimulacija proizvodnje biofilma u opsegu od 10% do 60%, pri čemu je statistički značajna stimulacija proizvodnje biofilma od 60% zabeležena samo kod izolata U24H.

Efikasnost oba kompleksa srebra(I) da degradiraju biofilmove koje formira BU31A izolat, najveći proizvođač ukupnog biofilma, je bila slična i kretala se oko 50%.

Efekat kompleksa srebra(I) na prethodno formiranim biofilmovima izolata BK25H je praćen pod fluorescentnim mikroskopom posle inkubacije od 24 sata u prisustvu koncentracija kompleksa srebra koje odgovaraju vrednostima 2×MIK (Slika 32). Posle bojenja SYTO 9 i PI bojama uočava se smanjenje količine i promena strukture biofilma u odnosu na netretiranu kontrolu (I).



Slika 32. Degradacija prethodno formiranih biofilmova izolata BK25H gajenog u prisustvu kompleksa srebra(I) sa ftalazinom (BG1 i BG2) u koncentracijama koje odgovaraju vrednostima 2×MIK. Posle 24 sata inkubacije, žive ćelije su obojene SYTO 9 bojom (zeleno), mrtve ćelije su obojene PI bojom (crveno). Ekstracelularna DNK u formiranom biofilmu je obojena i SYTO 9 i PI bojama (narandžasto). Razmernik predstavlja 10 µm.

5.7.3. Rezultati efekata kompleksa srebra(I) sa ftalazinom na pokretljivost izolata *P. aeruginosa*

Za ispitivanje uticaja kompleksa srebra(I) BG1 i BG2 na tri tipa pokretljivosti *P. aeruginosa*, bakterije su zasejavane na podloge koje su sadržavale komplekse u koncentracijama 0,5×MIK. Efekti kompleksa srebra na pokretljivost ispitani su kod izolata BK25H, kao i kod *P. aeruginosa* PAO1 (Tabela 12)

Tabela 12. Efekat kompleksa srebra(I) sa ftalazinom (BG1 i BG2) u koncentracijama $0,5 \times \text{MIK}$ na pokretljivost izolata BK25H i *P. aeruginosa* PAO1.

Kompleks srebra	Plivanje (%)*		Rojenje (%)		Grčenje (%)	
	PAO1	BK25H	PAO1	BK25H	PAO1	BK25H
BG1	64,0	100	64,9	100	79,6	81,0
BG2	0	100	100	100	65,7	74,6

* pokretljivost bakterija izražena je u odnosu na netretiranu kontrolu čija je površina kretanja uzeta kao 100%

Najveće promene u zonama pokretljivosti uočene su kod *P. aeruginosa* PAO1 u prisustvu kompleksa BG1. Veličina zone pokretljivosti *P. aeruginosa* PAO1 na mekom agaru (plivanje) smanjena je za 36%. U istom procentu smanjena je zona pokretljivosti i na polučvrstom agaru (rojenje), dok je ispitivanjem pokreta grčenja utvrđeno da je zona smanjena za 20%. Kompleks BG2 je imao nešto veći uticaj na smanjenje zone grčenja *P. aeruginosa* PAO1, dok na rojenje nije imao uticaja. Na podlogama za ispitivanje plivanja nije uočen rast bakterija pod ovim uslovima.

Kod izolata BK25H kompleksi BG1 i BG2 jedino su pokazali uticaj na pokrete grčenja, pri čemu su zone bile smanjene i iznosile su 19%, odnosno 25%.

5.7.4. Rezultati efekat kompleksa srebra(I) sa ftalazinom na proizvodnju piocijanina kod izolata *P. aeruginosa*

Uticaj kompleksa srebra(I) na proizvodnju piocijanina ispitan je na izolatu BK25H i na *P. aeruginosa* PAO1. Izolat BK25H i *P. aeruginosa* PAO1 su gajeni u prisustvu kompleksa BG1 i BG2 u koncentraciji $0,1 \times \text{MIK}$ tokom 24 sata pri čemu nije uočen efekat na proizvodnju piocijanina u odnosu na netretiranu kontrolu (Tabela 13).

Tabela 13. Ispitivanje uticaja kompleksa srebra(I) sa ftalazinom (BG1 i BG2) na proizvodnju piocijanina u koncentracijama $0,1 \times \text{MIK}$.

	OD ₆₉₅ /OD ₆₀₀	
	BK25H	PAO1
kontrola	1,269 ± 0,0157	0,783 ± 0,01325
Izolat+BG1	1,239 ± 0,018	0,796 ± 0,0162
Izolat+BG2	1,214 ± 0,0095	0,765 ± 0,0125

6. DISKUSIJA

6.1. Karakterizacija ispitivanih faktora virulencije kod izolata *P.aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je peti najčešće izolovan patogen širom sveta, odnosno treći najčešće izolovan uzročnik urinarnih infekcija i sedmi najznačajniji patogen povezan sa septičkim stanjima (Lister *i sar.*, 2009). Najviše podataka o *P. aeruginosa* kao patogenoj vrsti je dobijeno u ispitivanjima infekcija koje ovaj patogen izaziva kod ljudi. Istraživanja koja se bave izučavanjem korelacije karakteristika virulencije sojeva *P. aeruginosa* i patogenog potencijala ove bakterije su malobrojna i uglavnom fokusirana na jednu vrstu uzoraka izolovanih iz jednog domaćina, najčešće čoveka (Fonseca *i sar.*, 2007; Jeukens *i sar.*, 2014; Le Berre *i sar.*, 2011; Olejnickova *i sar.*, 2014). Ovakve studije na uzorcima dobijenim iz inficiranih životinja su manje opsežne (Haenni *i sar.*, 2015; Kidd *i sar.*, 2011; Lin *i sar.*, 2012; Poonsuk i Chuanchuen, 2012; Qi *i sar.*, 2014; Scaccabarozzi *i sar.*, 2015).

Infekcije izazvane vrstom *P. aeruginosa* predstavljaju veliki terapijski izazov kako za lekare, tako i za veterinare. Ova vrsta izaziva perzistentne infekcije a širenje različitih sojeva *P. aeruginosa* u populaciji ljudi i životinja je često preko supklinički inficiranih jedinki. Značajan problem u terapiji infekcija izazvanih ovom vrstom predstavlja urođena i stečena rezistencija na antibiotike što za posledicu ima mali broj efektivnih terapijskih opcija (Gellatly i Hancock, 2013). Učestalost izolacije *P. aeruginosa* kod malih životinja najbolje je dokumentovana kod pasa (Hillier *i sar.*, 2006; Petersen *i sar.*, 2002). Na osnovu podataka dobijenih od Veterinarske dijagnostičke laboratorije, Univerziteta u Mičigenu (Michigan State University's Animal Health Diagnostic Laboratory) *P. aeruginosa* je izolovan u 7,5% svih briseva kože ispitanih u ovoj laboratoriji, odnosno u 28% briseva uha u periodu od 1992. do 1997. godine (Petersen *i sar.*, 2002) što govori u prilog tome da je *P. aeruginosa* važan uzročnik infekcija kože pasa (Hillier *i sar.*, 2006).

Pokazano je da sojevi *P. aeruginosa* izolovani iz obolelih životinja i ljudi, a gajeni u *in vitro* uslovima manifestuju različite fenotipske varijetete, ali do sada nije dovoljno ispitano da li i ukoliko meri pojedinačni faktori virulencije izolovanih sojeva

utiču na ishod lečenja ovih infekcija (Crousilles *i sar.*, 2015; Lee *i sar.*, 2006). Kao što je opisano u odeljku 2.3.2. vrsta *P. aeruginosa* poseduje veliki broj različitih faktora virulencije, a svaki od njih ima širok dijapazon manifestovanja što je dobro dokumentovano kod kliničkih sojeva *P. aeruginosa* (Olejnickova *i sar.*, 2014). Razlika u ekspresiji pojedinih faktora virulencije, npr. pojačana ekspresija sekrecionog sistema tipa III, u značajnoj meri utiče na ishod infekcije (Ledizet *i sar.*, 2012). Međutim, kompleksan odnos između pojedinih faktora virulencije kod *P. aeruginosa*, kao i značaj takvog odnosa na domaćina nije potpuno jasan.

Formiranja biofilma među bakterijama značajnim za veterinarsku medicinu je od velike važnosti. *P. aeruginosa* je poznat po tome što produkuje ekstracelularni matriks kada god su uslovi za kolonizaciju nekog tkiva/površine povoljni čime se započinje formiranje biofilma (Gellatly i Hancock, 2013). Prelazak *P. aeruginosa* iz planktonskog u biofilm formu je osnovni preduslov za nastanak perzistentnih infekcija izazvanih ovom vrstom. Hronične infekcije su obično povezane sa biofilmom i povećanom tolerancijom biofilma na antibiotike, dok je akutna infekcija povezana sa planktonskim načinom života *P. aeruginosa* (Gellatly i Hancock, 2013). U okviru ove disertacije testirana je sposobnost 202 izolata da formiraju biofilm u mikrotitracionim pločama. Od testiranih izolata, 93% izolata (113/121) poreklom od životinja i 96% izolata (78/81) poreklom od ljudi je imalo sposobnost da proizvodi biofilm u mikrotitracionim pločama. Visoka incidenca kliničkih izolata sa sposobnošću formiranja biofilma je opisana kod izolata *P. aeruginosa* poreklom od ljudi. U radu Olejnickove i saradnika (2014) prijavljeno je da 80% do 88% izolata *P. aeruginosa* izolovanih od ljudi sa infekcijama izazvanim dugotrajnim korišćenjem katetera ima sposobnost formiranja biofilma u *in vitro* uslovima. Među izolatima ispitivanim u okviru ove disertacije 9% izolata (11/121) poreklom od životinja, odnosno 23% izolata (19/81) poreklom od ljudi ima bolju sposobnost formiranja biofilma u poređenju sa najbolje okarakterisanim kliničkim sojem *P. aeruginosa* PAO1. Soj *P. aeruginosa* PAO1, koji je korišćen kao referentni soj u ovoj disertaciji formira biofilm u mikrotitracionim pločama i umereno je patogen prema različitim *in vivo* model sistemima (Lee *i sar.*, 2006). Pye i saradnici su ukazali na značaj formiranja biofilma vrste *P. aeruginosa* tokom hroničnih otitisa pasa u slabljenju odgovora infekcije na tretman (Pye *i sar.*, 2013). U njihovom istraživanju najveći broj prikupljenih izolata poreklom od životinja bio je iz uzoraka pasa sa otitisom

(83), pri čemu je sposobnost formiranja biofilma zabeležena kod 40% tih izolata (83/33). U ispitivanju sprovedenom u okviru ove disertacije *P. aeruginosa* je izolovan iz 55 uzoraka brisa uha pasa sa otitisom i pri tome je 52 (95%) izolata imalo sposobnost formiranja biofilma u mikrotitar pločama.

Naglašavajući važnost sposobnosti formiranja biofilma za infekcije izazvane sojevima *P. aeruginosa*, u okviru ove disertacije je za dalja istraživanja odabrano 30 izolata sa boljom sposobnošću formiranja biofilma u odnosu na PAO1, kao i 10 izolata sa lošijom sposobnošću formiranja biofilma u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1. Odabrani izolati su korišćeni za testiranje ispitivanih faktora virulencije i određivanje postojanja i stepena korelacija između pojedinih faktora virulencije. Uz formiranje biofilma, proizvodnja piocijanina je još jedan faktor virulencije koji je od velikog značaja za patogeni potencijal *P. aeruginosa*, jer izaziva oksidativni stres u ćelijama i remeti transport elektrona u respiratornom lancu (Lau *i sar.*, 2004a). S druge strane, hemolitička aktivnost *P. aeruginosa* dovodi do oštećenja tkiva tokom infekcije i smatra se da bi nivo produkcije hemolizina u *in vitro* uslovima mogao da posluži za procenu pijelonefritičkog potencijala *P. aeruginosa* (Mittal *i sar.*, 2010). Različiti načini kretanja bakterija (plivanje, rojenje i grčenje) su čvrsto povezani sa patogenezom pseudomonasne infekcije, jer omogućavaju bakteriji da kolonizuje različita okruženja, a bakterijski nastavci (flagela i pili tipa IV) su važne antigene determinante koje dovode do inflamatorne reakcije u organizmu (Arora *i sar.*, 2005). Stoga, odabrani faktori virulencije u ovoj disertaciji uključili su: formiranje biofilma (ukupan biofilm i biofilm na granici vazduh-tečnost), produkciju piocijanina, hemolitički potencijal i manifestaciju tri tipa pokretljivosti (plivanje, rojenje i grčenje). U ovom istraživanju dokazana je pozitivna korelacija između sposobnosti izolata da formiraju biofilm i njihove hemolitičke aktivnosti, što je pokazano i u radu Scaccabarozzi i saradnika (2015). U istoj studiji hemolitička aktivnost je korelirala pozitivno sa plivanjem, dok rezultati dobijeni u okviru ove disertacije govore o pozitivnoj korelaciji između hemolitičke aktivnosti i rojenja. S druge strane, fenotipska karakterizacija izolata *P. aeruginosa* poreklom od pacijenata sa infekcijama povezanim sa dugotrajnim korišćenjem katetera govori o negativnoj korelaciji između hemolitičke aktivnosti i sposobnosti izolata da formiraju biofilm (Olejnickova *i sar.*, 2014). Takođe, negativna korelacija je prijavljena između proizvodnje piocijanina i sposobnosti izolata da

formiraju biofilm (Olejnickova *i sar.*, 2014), kao i između proizvodnje piocijanina i sposobnosti plivanja (Scaccabarozzi *i sar.*, 2015). U rezultatima u okviru ove disertacije produkcija piocijanina je pozitivno korelirala sa sposobnošću rojenja. Pored navedenih podataka u literaturi postoje i brojni kontradiktorni podaci o korelaciji između faktora virulencije kod *P. aeruginosa*, koji govore o pozitivnoj korelaciji sposobnosti formiranja biofilma sa sposobnošću izolata za grčanjem među izolatima poreklom od mastitisa kod ovaca (Wright *i sar.*, 2015), kao i negativne korelacije između sposobnosti formiranja biofilma i proizvodnje piocijanina (Fernandez-Pinar *i sar.*, 2011).

Rezultati dobijeni za ispitivane faktore virulencije odabranih izolata poređeni su sa njihovim citotoksičnim potencijalom. Citotoksični potencijal odabranih izolata *P. aeruginosa* ispitivan je na ćelijama iz ćelijske linije A549 koje potiču od epitelnih ćelija pluća izolovanih iz adenokarcinoma čoveka (Giard *i sar.*, 1973). Ove ćelije su čest model sistem za ispitivanje citotoksičnog potencijala *P. aeruginosa* (Hawdon *i sar.*, 2010; Larrosa *i sar.*, 2012; O'Loughlin *i sar.*, 2013) zbog činjenice da je ova bakterija čest uzročnik infekcija respiratornog trakta ljudi i životinja, a ove ćelije gajene u jednom sloju ili 3D modelu pluća zadržavaju morfološke i biohemijske karakteristike pneumocita intaktnog plućnog tkiva (XChi *i sar.*, 1991). Značajan citotoksični potencijal pokazalo je 34% odabranih izolata (14/40). Na osnovu kvantitativnih podataka, hemolitička aktivnost i sposobnost plivanja su pokazale najveću povezanost sa citotoksičnim potencijalom izolata *P. aeruginosa*, dok je neparametrijska statistička analiza utvrdila pozitivnu korelaciju između citotoksičnosti i hemolitičke aktivnosti, kao i negativnu korelaciju između citotoksičnosti i sposobnosti plivanja. U proseku, nije bilo značajnih razlika između citotoksičnog potencijala među izolatima poreklom od ljudi i onih poreklom od životinja. Stoga, podaci dobijeni u ovom istraživanju predstavljaju prvi uporedni prikaz citotoksičnog potencijala *P. aeruginosa* porekom od ljudi i životinja i ukazuju na sličnost ovog parametra između dve grupe izolata. Međutim, primenom osetljivije statističke analize (odjeljak 5.5.4.) citotoksičnost se izdvojila kao parametar po kome su se, sa relativno malim razlikama u vrednostima k , izolati poreklom od ljudi razdvojili u odnosu na izolate poreklom od životinja (Tabela 9). Slično ovim rezultatima, nije bilo razlike ni u virulenciji između izolata izolovanih iz okoline i kliničkih sojeva *P. aeruginosa* testiranih u *in vivo* model sistemima *Drosophila melanogaster* i *Lactuca sativa* (Vives-Florez i Garnica, 2006). U *in vivo*

model sistemu *Galleria mellonella* utvrđeno je da izolati poreklom iz vode i iz bolničkog okruženja u jednoj bolnici za hidroterapiju i klinički izolati *P. aeruginosa* poreklom iz uzoraka pacijenata sa respiratornim infekcijama imaju sličan infektivni potencijal (Pereira *i sar.*, 2014). Utvrđeno je i da sojevi *P. aeruginosa* izolovani iz uzoraka od koza sa mastitisima u Italiji pokazuju sličan patogeni potencijal, kao i sredinski izolati *P. aeruginosa* (Scaccabarozzi *i sar.*, 2015).

Grupisanje izolata nije primećeno na osnovu ispitivanih faktora virulencije, kao ni na osnovu parcijalne sekvence gena za 16S rRNK. Smatra se da populacija *P. aeruginosa* nije klonalna i da je veoma različita, sa velikim brojem klonalnih grupa, kao i sa veoma slabom ili nepostojećom vezom između klonalnih grupa, ekološke niše i specifične bolesti (Haenni *i sar.*, 2015). Kao i u rezultatima prikazanim u okviru ove disertacije, rezultati drugih studija govore o visokoj fenotipskoj i genotipskoj razlici među izolatima *P. aeruginosa* (Scaccabarozzi *i sar.*, 2015; Wright *i sar.*, 2015). U radu koji su objavili Scaccabarozzi i saradnici (2015) 33 ispitana izolata *P. aeruginosa* (7 poreklom od obolelog vimena koza i 26 poreklom iz okoline) su se grupisala u 5 glavnih fenotipskih klastera, što je bilo drugačije u odnosu na rezultate iz istraživanja u okviru ove disertacije.

Nekoliko *in vivo* model sistema je razvijeno kako bi se pratila patogenezu pseudomonasne infekcije, pri čemu je utvrđeno da su geni faktora virulencije koji se eksprimiraju tokom infekcije model sistema isti oni geni koji se eksprimiraju i tokom infekcije čoveka i životinja. Mutanti *P. aeruginosa* sa smanjenim virulentnim potencijalom pokazuju smanjenu infektivnost prema *Aradopsis* i *C. elegans*, kao i prema model sistemu infekcije rane kod laboratorijskih miševa (Gallagher i Manoil, 2001; Rahme *i sar.*, 1995). Određeni geni neophodni za virulentnost sojeva *P. aeruginosa* u model sistemu mušice *Drosophila melanogaster* su geni čija ekspresija posreduje u oštećenju ćelija sisara (D'Argenio *i sar.*, 2001). U genetičkom i fiziološkom smislu *C. elegans* je poznat i predvidljiv višćelijski organizam čiji urođeni imunološki odgovor, mada pojednostavljen, u prisustvu patogena u mnogome oponaša urođeni imunološki odgovor sisara (Utari i Quax, 2013). U ovom ispitivanju, za potrebe ispitivanja virulentnosti izolata *P. aeruginosa* na *C. elegans* izabrano je sedam izolata na osnovu citotoksičnog potencijala na ćelijama iz ćelijske linije A549 (Tabela 8), kao i *P. aeruginosa* PAO1. Za *P. aeruginosa* PAO1 se zna da ima umereno virulentno

delovanje na model sistem *C. elegans* (Lee *i sar.*, 2006), što je potvrđeno i u eksperimentu izvedenom u okviru ove disertacije. Brojna istraživanja pokazuju da ekspresija gena kojima su kodirani faktori virulencije pomoću kojih *P. aeruginosa* ubija *C. elegans* zavisi od uslova eksperimenta, odnosno od vrste podloge, osmolariteta i prisustva hranljivih sastojaka (Kirienko *i sar.*, 2014). Glavni mehanizam kojim *P. aeruginosa* ubija *C. elegans* u tečnom minimalnom medijumu se zasniva na letalnoj hipoksiji koja je indukovana aktivnošću siderofora koje bakterija proizvodi, posebno pioverdina (Kirienko *i sar.*, 2014; Kirienko *i sar.*, 2013; Utari i Quax, 2013). Najveći letalni potencijal ka *C. elegans* imali su izolati BK25H i S20H koji su proizvodili velike količine piocijanina u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1. Kirienko i saradnici (2013) tvrde da tokom izvođenja eksperimenta u tečnom minimalnom medijumu, piocijanin nije neophodan faktor virulencije za ubijanje *C. elegans*. S druge strane, Lee i saradnici (2006) su pokazali da je patogenost soja *P. aeruginosa* PA14 multifaktorijalna, da zahteva kumulativnu (i verovatno koordinisanu) akciju više faktora virulencije. Ispitivanje virulentnosti izolata *P. aeruginosa* na *C. elegans* u okviru ove disertacije pokazuje da piocijanin (fenazini) ima značajnu ulogu u ubijanju nematoda. Za potrebe ispitivanja potencijala virulencije izolata *P. aeruginosa* korišćen je još jedan model sistem, embrioni zebra ribica stari 32 sata. Zbog svoje veličine, velikog broja položenih jaja, transparentnog tela koje omogućava praćenje progressa infekcije u realnom vremenu, kao i sličnosti urođenog i stečenog imunskog odgovora sa onim kod ljudi, zebra ribice su postale veoma koristan model sistem za ispitivanje patogeneze *P. aeruginosa* (Clatworthy *i sar.*, 2009). Analiza infektivnog potencijala odabranih izolata *P. aeruginosa* na model sistemu embriona zebra ribica je potvrdila da određeni izolati mogu na različite načine da ubijaju embrion zebra ribice. Najveću sposobnost ubijanja embriona imala su dva izolata koja su proizvodila veliku količinu piocijanina (BK25H i BK6A). Ranije je pokazao da piocijanin igra važnu ulogu u akutnoj infekciji embriona zebra ribica inficiranih sojevima *P. aeruginosa* PA14, dok sposobnost formiranja biofilma i produkcija elastaza i alginata nije bila od značaja za ovu infekciju (Chand *i sar.*, 2011). Zanimljivo je da je BK6A, kao izolat koji je proizvodio veliku količinu biofilma dovodio do paralize embriona trećeg dana posle infekcije, što ukazuje na postojanje nekog toksičnog produkta (ili produkata) koji za ciljna tkiva ima nervni ili mišićni sistem, ili pak oba sistema. Sličan fenomen opisan je od strane Liamasa i

saradnika prilikom infekcije nematoda *C. elegans* sa *P. aeruginosa* PAO1 (Llamas *i sar.*, 2009). Svi rezultati ukazuju da infekcija u *in vivo* uslovima nije korelirala sa citotoksičnošću dobijenom u *in vitro* sistemu, što još jednom naglašava značaj *in vivo* model sistema za ovu vrstu istraživanja.

Primena metoda mašinskog učenja u mikrobiologiji poslednjih godina postaje važno polje istraživanja. Većina ispitivanja koja su uključivala konstruisanje prediktivnih modela imala je za cilj pronalazak prediktivnog modela pomoću koga je moguće pouzdano utvrditi profil antibiotske rezistencije ispitivanih izolata na osnovu neke ispitivane osobine (Her i Wu, 2018; Pesesky *i sar.*, 2016). Analizom rezultata dobijenih u okviru ove disertacije, ispitana je mogućnost primene modela mašinskog učenja za pravljenje prediktivnog modela na osnovu koga bi se mogla odrediti citotoksičnost izolata na osnovu nekog od ispitivnih faktora virulencije. Konstruisani prediktivni model je naglasio značaj sposobnosti proizvodnje biofilma, kao i hemolitičke aktivnosti, zatim proizvodnje piocijanina i sposobnosti plivanja kao potencijalno značajne prediktore citotoksičnog potencijala *P. aeruginosa*. Kako bi se dobio pouzdaniji prediktivni model, potrebno je studiju proširiti na veći broj kliničkih i sredinskih izolata različitog porekla. Rezultati takve studije bi mogli potvrditi značaj određenih karakteristika virulencije ili kombinacije karakteristika virulencije kao pouzdanih markera ili kao novih ciljnih mesta za razvoj novih antibakterijski tretmana.

Iako kompleksni odnosi između faktora virulencije nisu do kraja razjašnjeni, smatra se da je virulentnost *P. aeruginosa* multifaktorijalna i kombinovana, i da je rezultat kordinovane ekspresije velike grupe gena (Crousilles *i sar.*, 2015; Lee *i sar.*, 2006). Ispitivanje faktora virulencije izolata u okviru ove disertacije pokazalo je da su izolati poreklom od ljudi i životinja izuzetno raznovrsni u odnosu na praćene faktore virulencije i da se značajno ne izdvaja faktor virulencije po kome bi dve vrste uzorka mogle da se razlikuju.

6.2. Analiza ekspresije gena virulencije

Pseudomonas aeruginosa poseduju veliki genom koji u zavisnosti od soja iznosi između pet i sedam miliona baznih parova (Moradali *i sar.*, 2017) i koji omogućava ubikvitarnost ovoj vrsti. Centralni mehanizam preživljavanja ove bakterije je povezan sa prelaskom sa planktonskog načina života na život u okviru biofilma i obrnuto (Waite *i sar.*, 2005). Kordinacija ovih događaja je veoma složen proces koji uključuje brojne kontrolne mehanizme među kojima signalni putevi međubakterijske komunikacije imaju značajno mesto. Profil genske ekspresije bakterija u različitim fazama planktonskog rasta, kao i različitim fazama formiranja biofilma se razlikuje, što ukazuje da biofilmovi ne predstavljaju samo agregate adherentnih ćelija (Dötsch *i sar.*, 2012; Waite *i sar.*, 2006; Waite *i sar.*, 2005). Studije koje su se bavile analizom transkriptoma planktonskih formi i biofilma kod različitih sojeva *P. aeruginosa* pokazale su odstupanja u genskoj ekspresiji zavisno od analiziranog soja, načina pripreme biofilma, kao i od metodološkog pristupa analizi transkriptoma (Dötsch *i sar.*, 2012; Folsom *i sar.*, 2010; Manos *i sar.*, 2009; Manos *i sar.*, 2008; Waite *i sar.*, 2006; Waite *i sar.*, 2005; Whiteley *i sar.*, 2001). Međutim, nejasno je da li geni koji se diferencijano ekspimiraju u planktonskoj i biofilm formi pokazuju razlike u ekspresiji kod izolata čija se sposobnost formiranja biofilma razlikuje i na koji način te razlike, ukoliko postoje, utiču na njihov virulentni potencijal.

Glavne komponente ekstracelularnog matriksa biofilma koje proizvode sojevi *P. aeruginosa* su egzopolisaharidi označeni kao Pel, Psl i alginat, a njihov međusobni odnos i ukupna količina u matriksu variraju između različitih sojeva ove bakterije (Ghafoor *i sar.*, 2011; Lee i Yoon, 2017; Moradali *i sar.*, 2017)

Congo red test je pokazao da ispitivani izolati, BU31A, BK25H i BR2A kao i soj PAO1 formiraju kolonije različitog izgleda i boje što ukazuje na različit sastav i odnos pojedinih egzopolisaharidnih komponenti koje ispitivani izolati i soj PAO1 proizvode. U odnosu na koloniju koju formira PAO1, kolonije ispitanih izolata su imale različite nijanse roze usled različite apsorpcije boja koje se nalaze inkorporisane u podlogama na kojima su izolati gajeni, a što je u vezi sa proizvodnjom Pel polisaharida koji utiče na sposobnost sojeva *P. aeruginosa* da vezuju boje iz podloge (Colvin *i sar.*, 2011).

Uočeno je i da kolonije izolata BU31A i BK25H nemaju glatke ivice, što se takođe dovodi u vezu sa većom proizvodnjom Pel polisaharida (Colvin *i sar.*, 2013; Friedman i Kolter, 2004b).

Polisaharid Pel je nedavno otkrivena komponenta ekstracelularnog matriksa čija struktura još nije potpuno određena, mada se zna da je reč o polisaharidu bogatom glukozom (Colvin *i sar.*, 2011). Sinteza ovog polisaharida je kompleksna i uključuje komponente kodirane sa sedam gena koji se nalaze na *pel* operonu (*pelA-F*) (Friedman i Kolter, 2004a). U ovoj doktorskoj disertaciji praćena je ekspresija gena *pelA* za koji su Colvin i saradnici (2013) utvrdili da je neophodan za sazrevanje ovog polisaharida i njegovu sekreciju iz bakterijske ćelije. Već je rečeno da je odnos pojedinih vrsta polisaharida u ekstracelularnom matriksu determinisan razlikama u genomu svakog soja *P. aeruginosa*. Za soj PAO1 je pokazano da PelA polisaharid ne igra važnu ulogu u formiranju biofilma već da je Psl glavni polisaharid ekstracelularnog matriksa ovog soja (Colvin *i sar.*, 2011; Colvin *i sar.*, 2012). Veća ekspresija Pel gena kod izolata gajenih u formi planktonskih ćelija zajedno sa rezultatima Congo red testa pokazuje da je Pel egzopolisaharid kod ispitivanih izolata značajna komponenta ekstracelularnog matriksa za razliku od PAO1 soja. Interesantno je da ekspresija gena *pelA* u biofilmovima izolata i do 75% manja u odnosu na ekspresiju ovog gena kod soja PAO1 što ukazuje na značaj Pel egzopolisaharida u inicijalnim fazama formiranja biofilma. Kod soja PA14 Pel polisaharid igra važnu ulogu u procesu proizvodnje biofilma na granici vazduh-tečnost, odnosno u obrazovanju pelikule (Colvin *i sar.*, 2012). Iako su ispitivani izolati pokazali značajno veću ekspresiju *pelA* gena interesantno je da su proizvodili do pet puta manje A-L biofilma u odnosu na soj PAO1.

Polisaharid Psl je polimer sastavljen od D-manoze, L-ramnoze i D-glukoze čija je sinteza pod kontrolom *pslA* genskog klastera (Franklin *i sar.*, 2011). Polisaharidi Pel i Psl su važni za formiranje i održavanje biofilma, ali je moguće da bakterija formira biofilm i bez ekspresije jednog od njih (Ghafoor *i sar.*, 2011). Značajna ekspresija *pslA* gena kod izolata gajenih u formi planktonskih ćelija je detektovana samo kod BR2A izolata i bila je pet puta veća u odnosu na soj PAO1. Veća ekspresija ovog gena kod ispitivanih izolata zabeležena je kada su oni gajeni u formi biofilma što ukazuje na značaj ovog egzopolisaharida u ekstracelularnom matriksu zrelih biofilmova.

Alginat je važna komponenta ekstracelularnog matriksa ali i važan faktor virulencije *P. aeruginosa*. Iako ovaj polisaharid nije značajan za inicijaciju i formiranje biofilma, ima ulogu u kasnijim fazama sazrevanja biofilma (Hay *i sar.*, 2009; Wozniak *i sar.*, 2003). Sinteza alginata uključuje aktivnost 12 gena smeštenih na *algA-AlgD* operonu. Ekspresija *algA-algD* operona je regulisana aktivnošću *algD* gena koji je opet pod negativnom kontrolom antisigma faktora MucA (Ramsey i Wozniak, 2005). Usled mutacije antisigma faktora MucA dolazi do oslobađanja sigma faktora AlgU čime se stimuliše transkripcija alginatnog operona što vodi pojavi mukoidnog fenotipa (Yang *i sar.*, 2017). Analizom ekspresije gena *mucA* kod ispitivanih izolata zaključeno je da je ekspresija ovog gena kod izolata BU31A jednaka ekspresiji kod soja PAO1 dok je kod druga dva ispitivana izolata manja. Kolonije BU31A izolata na Congo red agar podlogama, ali i na standardnim LA podlogama imale su klasičan alginatni fenotip koji može biti posledica prisustva mutacije u *mucA* genu što ostavlja prostor za dalje istraživanje.

Mutacije na *mucA* genu koje dovode do prevelike produkcije alginata utiču i na smanjenu aktivnost sekrecionog sistema tipa III (Wu *i sar.*, 2004) kao i na smanjenu sposobnost kretanja plivanjem (Tart *i sar.*, 2005). U saglasnosti sa literaturnim podacima, izolat BU31A koji je pokazao alginatni fenotip imao je i smanjenu pokretljivost u odnosu na druga dva ispitivana izolata kao i u odnosu na soj PAO1. Takođe, slabiji infektivni potencijal ovog izolata može se dovesti u vezu sa smanjenom aktivnosti sekrecionog sistema tipa III.

Pseudomonas aeruginosa sekretuje termostabilne glikolipide koji se nazivaju ramnolipidi i koji imaju ulogu surfaktanta i hemolitičku aktivnost. Ramnolipidi su važni za formiranje biofilma, reorganizaciju ćelija unutar biofilma kao i za otpuštanje ćelija iz formiranog biofilma (Davey *i sar.*, 2003). Sinteza ramnolipida se odvija u tri reakcije koje katalizuju enzimi ramnozil-transferaze (RhlA, RhlB i RhlC) koji su kodirani genima *rhlAB* (u operonu) i genom *rhlC* (Soberón-Chávez *i sar.*, 2005). Izolat BR2A je proizvodio biofilm u količini oko 20 puta manjoj od one koju je proizvodio referentni soj PAO1, dok je ekspresija *rhlA* gena kod ovog izolata bila oko 90 puta veća nego kod referentnog soja. Povećana proizvodnja ramnolipida kao i aplikacija egzogenih ramnolipida sprečava formiranje biofilmova i dovodi do rasturanja već formiranih

biofilmova (Aleksic *i sar.*, 2017) čime se može objasniti slaba sposobnost formiranja biofilma izolata BR2A.

Sposobnost *P. aeruginosa* da proizvodi ramnolipide utiče i na sposobnost ove vrste da se kreće rojenjem. Mutanti, kod kojih je aktivnost *rhlA* gena suprimirana nemaju sposobnost kretanja rojenjem, dok mutanti kod kojih je suprimirana aktivnost *rhlB* gena imaju sposobnost kretanja rojenjem (Déziel *i sar.*, 2003; Lee *i sar.*, 2018; Okkotsu *i sar.*, 2013). Značajno veća ekspresija *rhlA* gena kod izolata BR2A u odnosu na soj PAO1, koincidira i sa površinom koju je ovaj izolat prelazio rojenjem, a koja je bila jedan i po put veća od referentnog soja PAO1.

Pseudomonas aeruginosa proizvodi dva tipa fosfolipaza C: hemolitičku (PlcH) i nehemolitičku (PlcN) i nekoliko homologa (Barker *i sar.*, 2004). Za analizu genske ekspresije je izabrana hemolitička fosfolipaza C koja može sama da izazove inflamaciju i odgovorna je za direktnu lizu eritrocita ovce i čoveka (Gellatly i Hancock, 2013). Pod ispitivanim uslovima nije bilo razlike u ekspresiji gena *plcH* između odabranih izolata u odnosu na referentni soj PAO1, osim u biofilmovima izolata BU31A gde je detektovana niža ekspresija.

Kod izolata BU31A koji je proizvodio najveću količinu biofilma među ispitanim izolatima je detektovano statistički značajno smanjenje proizvodnje autoinducera za sva tri ispitana sistema međubakterijske komunikacije u donosu na soj PAO1. Iako je značaj ispitivanih sistema međubakterijske komunikacije u formiranju biofilma dobro dokumentovana, u literaturi su već opisani izolati koji formiraju biofilm, ali ne proizvode C4-HSL i 3-oxo-C12-HSL autoinducere (Lee *i sar.*, 2018). Rezultati navode na zaključak o značaju drugih sistema međubakterijske komunikacije, poznatih ili još neotkrivenih, u grupisanju bakterija i kordinaciji ekspresije njihovih gena značajnih za formiranje biofilma. Kod izolata BR2A detektovana je povećana ekspresija *rhlI* gena, kod bakterija gajenih u planktonskoj i biofilm formi, dok je značajno veća ekspresija receptora uočena samo kod bakterija gajenih u biofilm formi. Ovi rezultati koincidiraju sa prethodno navedenom većom ekspresijom *rhlA* gena za sintezu ramnolipida.

Analiza ekspresije gena za komponente sistema međubakterijske komunikacije je pokazala najveće odstupanje od referentnog soja kod izolata BR2A. Sintetaze RhII, LasI i PqsA su bile dva do pet puta više eksprimirane i u planktonskoj i u biofilm formi u odnosu na referentni soj. Takođe, receptori sva tri autoinducera značajno su više

ekspimirani u biofilmovima ovog izolata u poređenju sa PAO1. Geni koji kodiraju receptore *lasR* i *pqsR* su više bili ekspimirani u planktonskoj formi, dok je nivo ekspresije gena za receptor *rhlR* bio u nivou ekspresije ovog gena kod referentnog soja. Ekspresija gena za komponente Las sistema međubakterijske komunikacije je bila povećana kod izolata BR2A u odnosu na *P. aeruginosa* PAO1 kao i druge ispitivane izolate.

Veći nivo ekspresije gena koji kodiraju komponente PQS sistema međubakterijske komunikacije je zabeležen kod izolata BU31A gajenog u formi biofilma. Ekspresija ovih gena kod bakterija gajenih u formi planktonskih ćelija je u nivou ekspresije kod soja PAO1. Interesantno je da ovaj podatak ne koincidira sa malom količinom kvantifikovanih 2-heptil-3-hidroksi-4-hinolona u odnosu na soj PAO1.

6.3. Ispitivanje osetljivosti izolata *P. aeruginosa* na komplekse srebra

Ozbilnost infekcija izazvanih vrstom *P. aeruginosa* i sve učestalija antibiotska rezistencija bolničkih sojeva ove bakterije, kao i sojeva izolovanih od životinja zahtevaju pronalazak novih načina lečenja. Usled značajne antibakterijske aktivnosti i relativno niske toksičnosti za eukariotske ćelije, srebro(I) jedinjenja pokazuju poželjnije terapijske karakteristike od ostalih vrsta metala sa antibakterijskim svojstvima (Lemire *i sar.*, 2013). Izbor liganda je od velike važnosti u sintezi kompleksa srebra(I), jer omogućava podešavanje lipofilnosti, solubilnosti i reaktivnosti samih kompleksa, što rezultira boljom terapijskom aktivnošću (Savic *i sar.*, 2016b). Kompleksi srebra(I) sa heterocikličnim aromatičnim prstenom koji sadrži azot su pokazala značajnu antimikrobnu aktivnost na različite vrste Gram-pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Lysteria monocytogenes*), Gram-negativnim bakterijama (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*), kao i na gljivicu *Candida albicans*. (Glisic *i sar.*, 2016; Savic *i sar.*, 2016a; Savic *i sar.*, 2016b).

Dva kompleksa srebra(I) sa ftalazinom (BG1 i BG2), čija je detaljna hemijska struktura opisana u radu Glišić i saradnici (2016), su pokazala visoku aktivnost na izolatima *P. aeruginosa* poreklom od ljudi i životinja. Vrednosti MIK su se kretale od 1,56 µg/ml do 12,5 µg/ml za kompleks BG1, odnosno od 3,9 µg/ml do 25 µg/ml za kompleks BG2, što su vrednosti slične onima već opisanim u literaturi (Abu-Youssef *i sar.*, 2006; Glisic *i sar.*, 2016; Kalinowska-Lis *i sar.*, 2016; Kasuga *i sar.*, 2011; Savic *i sar.*, 2016a; Savic *i sar.*, 2016b). U poređenju sa citotoksičnim potencijalom ispitanih kompleksa, BG1 kompleks je imao vrednost MIK i do 10 puta manju za različite izolate *P. aeruginosa* nego što je njegova citotoksičnost, što kandiduje ovaj kompleks za široku terapijsku primenu. Osim toga, vrednost MIK ovog kompleksa za čak 10 značajnih kliničkih izolata je bila manja od 4 µg/ml što je manje nego prijavljene vrednosti MIK za slične komplekse srebra(I) za kliničke izolate *P. aeruginosa* (Abu-Youssef *i sar.*, 2006; Glisic *i sar.*, 2016; Kasuga *i sar.*, 2011). Od velikog je značaja da su vrednosti MIK oba kompleksa za multirezistentni izolat BR5H bile niske (3,12 µg/ml).

U studiji koju su sprovedi Glišić i saradnici (2016), kao kontrola antimikrobne aktivnosti ispitanih kompleksa, korišćena je so AgNO₃ koja ima dugu tradiciju kao

antibakterijska supstanca korišćena u medicini (Bjarnsholt *i sar.*, 2007). Interesantno je primetiti da je vrednost MIK AgNO₃ na referentni soj *P. aeruginosa* PAO1 bila i do 5 puta manja nego vrednost MIK za ispitane komplekse, dok je ta razlika za kliničke sojeve ispitane u ovoj studiji bila 2, odnosno 3 puta veća. Ovo sugeriše da antibakterijski efekat kompleksa srebra nije povezan isključivo sa koncentracijom jona srebra, već da je multifaktorijalne prirode tj. zavisi od dinamike njihovog otpuštanja od liganda (Glisic *i sar.*, 2016).

Biofilmovi predstavljaju jednu od nezaobilaznih meta u terapiji hroničnih infekcija, jer su jedan od važnih uzroka povećane rezistencije na antibakterijske agense. Inhibicija njihovog formiranja predstavlja važan način borbe protiv infekcija praćenih biofilmovima. U literaturi je prijavljeno korišćenje endotrahealnih tubusa i katetera presvučenih srebrom koji su sprečavali formiranje biofilma od strane *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterococcus spp.* kao i *C. albicans* (Berra *i sar.*, 2008; Roe *i sar.*, 2008). Polazeći od važnosti pronalaska novih terapeutika koji bi inhibirali formiranje biofilmova, u okviru ove teze je testirana sposobnost kompleksa BG1 i BG2 da u različitim koncentracijama, nižim od MIK inhibiraju formiranje biofilma. Iako je bilo primetno kod većeg broja izolata smanjenje količine formiranog biofilma u odnosu na kontrolu, te vrednosti kod najvećeg broja izolata nisu bile velike (do 20%). Kod nekoliko izolata primećena je stimulacija formiranja biofilma u koncentracijama manjim od vrednosti MIK. Stimulacija formiranja biofilma kod nekih izolata može biti posledica aktivacije različitih signalnih puteva specifičnih za testirane komplekse srebra(I) sa ftalazinom kao što je pokazano za različite vrste antibiotika (Gotoh *i sar.*, 2008; Hoffman *i sar.*, 2005; Jones *i sar.*, 2013; Linares *i sar.*, 2006). Ono što je interesantno je da smanjenje količine formiranog biofilma nije bilo zavisno od koncentracije kompleksa BG1 i BG2.

Biofilmovi su česti pratioci akutnih rana i gotovo nezaobilazni pratioci hroničnih rana različite etiologije (Tolker-Nielsen, 2014; Turner *i sar.*, 2014; Westgate *i sar.*, 2010). Podaci govore da je 54 % hroničnih rana kolonizovano vrstom *P. aeruginosa* i da su takve rane značajno veće i mnogo teže za lečenje (Bjarnsholt i Givskov, 2006; Tolker-Nielsen, 2014). Uzimajući u obzir važnost pronalaženja novih terapeutika kojima bi se razorio već formirani biofilm, ispitana je sposobnost kompleksa srebra BG1 i BG2 da razaraju 24 sata stare biofilmove kod 14 kliničkih izolata *P. aeruginosa*

poreklom od ljudi i životinja, kao i biofilm koji je formirao *P. aeruginosa* PAO1. U prethodnim istraživanjima je utvrđeno da su kompleksi srebra sposobni da razaraju već formirani biofilm u koncentracijama koje su znatno veće od vrednosti MIK koja je dobijena ispitivanjem efikasnosti kompleksa srebra na planktonskim ćelijama u tečnoj podlozi (Bjarnsholt *i sar.*, 2007; Glisic *i sar.*, 2016). Rezultati su pokazali da su kompleksi srebra sa ftalazinom korišćeni u ovoj disertaciji efikasni u razaranju već formiranog biofilma sa procentom smanjenja količine biofilma i do 90% kada su dodati u koncentraciji dva puta većoj od vrednosti MIK. Ove koncentracije su u slučaju kompleksa srebra BG1 bile niže od citotoksičnih koncentracija, osim kod izolata BU22A. Kod kompleksa BG2 korišćene 2×MIK koncentracije su bile kod šest izolata niže od citotoksične koncentracije za ovaj kompleks, dok je kod dva izolata ova vrednost bila i do pet puta veća od IC₅₀. Kod određenog broja izolata primećena je stimulacija formiranja biofilma posle tretmana kompleksima srebra u pomenutoj koncentraciji. Interesantno je primetiti da su oba kompleksa razorila oko 50% biofilma koji je formirao izolat BU31A, najveći proizvođač ukupnog biofilma. Razlika u uspešnosti razaranja biofilma kod različitih izolata može biti povezana sa kompozicijom njihovog ekstracelularnog matriksa od koje zavisi prodiranje antibakterijskih agenasa u dublje slojeve biofilma. Kompleksi srebra(I) sa ftalazinom su bili podjednako efikasni u razaranju biofilmova koje su formirali izolata poreklom od ljudi, odnosno poreklom od životinja.

Imajući na umu važnost pokretljivosti *P. aeruginosa* u patogenezi pseudomonasne infekcije, ispitana je potencijalna inhibitorna aktivnost kompleksa srebra(I) sa ftalazinom na tri vrste pokretljivosti – plivanje, rojenje i grčenje. Veza između postojanja flagele, tip IV pila i karakterističnih pokreta bakterije je od ključnog značaja za nastanak infekcije, za inicijaciju formiranja biofilma, za sazrevanje biofilma, ali i za otpuštanje ćelija iz biofilma i diseminaciju infekcije (Barken *i sar.*, 2008; Floyd *i sar.*, 2016; Köhler *i sar.*, 2000; Lee i Yoon, 2017; Mattick, 2002; O'Toole i Kolter, 1998). U literaturi nema podataka o aktivnosti srebra na pokretljivost *P. aeruginosa*. Efekat kompleksa srebra(I) na pokretljivost ispitan je kod kliničkog izolata BK25H (izolat sa najvećim virulentnim potencijal na model sistemima *C. elegans* i embrionu zebra ribica *in vivo*) i referentnog soja *P. aeruginosa* PAO1. Kod kliničkog izolata BK25H inhibicija je bila vidljiva samo u pokretima grčenja, dok je kod referentnog soja

inhibicija bila vidljiva u zavisnosti od kompleksa na sve tri vrste pokretljivosti. Kako u literaturi nema podataka o aktivnosti srebra na pokretljivost *P. aeruginosa*, analiza razlika u inhibiciji različitih pokreta kod BK25H i *P. aeruginosa* PAO1 zahteva dodatna ispitivanja, kako bi se utvrdio mehanizam koji do te inhibicije dovodi.

Proizvodnja piocijanina je jedna od najvažnijih karakteristika virulencije *P. aeruginosa* (Lau *i sar.*, 2004a; Lau *i sar.*, 2004b; Liu i Nizet, 2009). Kako su potvrdili i rezultati u okviru ove disertacije, proizvodnja piocijanina je važna za uspostavljanje akutne infekcije *P. aeruginosa* (Hall *i sar.*, 2016; Lau *i sar.*, 2004a). Piocijanin ima i važnu regulatornu ulogu u biofilmu (Dietrich *i sar.*, 2008). U okviru ove disertacije ispitana je potencijalna inhibitorna aktivnost kompleksa srebra sa ftalazinom na proizvodnju piocijanina. Kako bi se sprečila mogućnost da razlog smanjene količine piocijanina bude usled smanjenog broja ćelija proizvođača, koncentracije kompleksa su bile 10% od vrednosti MIK. Promene u proizvodnji piocijanina nisu detektovane kod kliničkog izolata BK25H koji je, u odnosu na sve druge izolate ispitane u ovoj disertaciji, proizvodio najveću količinu piocijanina. Kompleksi srebra(I) sa ftalazinom nemaju uticaja na međubakterijsku komunikaciju koja reguliše proizvodnju piocijanina.

Uzimajući u obzir rezultate dobijene u okviru ovog ispitivanja može se zaključiti da kompleksi srebra(I) sa ftalazinom imaju potencijal da nađu primenu kao terapeutici za lečenje hroničnih infekcija izazvanih vrstom *P. aeruginosa* kod ljudi i životinja. Aktivnost kompleksa u sprečavanju formiranja biofilma nije bila velika ali je njihova aktivnost u razaranju već formiranih biofilmova kod velikog broja ispitivanih izolata bila vrlo dobra. Ovi rezultati daju prostora za dalja ispitivanja koja bi išla ka primeni ovih kompleksa u vidu topikalnih preparata za lečenje hroničnih pseudomonasnih infekcija kože praćenih biofilmovima.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ispitivanja sprovedenih u okviru ove disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

1. Od 202 ispitana izolata *P. aeruginosa*, gotovo svi izolati poreklom od životinja (93%), odnosno poreklom od ljudi (96%) su imali sposobnost da proizvode biofilmove u mikrotitracionim pločama.
2. Korelacije između sedam ispitivanih faktora virulencije i citotoksičnog efekta kod odabranih izolata (30 izolata koji su proizvodili biofilm u količinama većim od PAO1 i 10 izolata koji su proizvodili biofilm u količinama znatno manjim od PAO1), utvrđene neparametrijskom statističkom analizom, iako nisu bile velike, bile su statistički značajne. Najveća pozitivna korelacija uočena je između hemolitičke aktivnosti i pokreta rojenja, dok je najveća negativna korelacija uočena između sposobnosti formiranja biofilma na granici vazduh-tečnost i pokreta rojenja.
3. Hijerarhijskim klasterovanjem nije uočeno grupisanje izolata ni po poreklu ni po karakteristikama virulencije, kao ni u filogenetskoj analizi parcijalne sekvence gena za 16S rRNK.
4. Prediktivni model koji je konstruisan primenom metode mašinskog učenja je od sedam analiziranih karakteristika virulencije izdvojio sposobnost formiranja biofilma kao važan faktor u predikciji citotoksičnosti izolata *P. aeruginosa*.
5. Na osnovu rezultata Wilcoxon Rank-Sum testa i Relative effect testa, zaključeno je da najveće razdvajanje između izolata poreklom iz tečnih uzoraka i onih poreklom iz briseva postoji u sposobnosti proizvodnje A-L biofilma - veću sposobnost proizvodnje A-L biofilma imaju izolati izolovani iz tečnih uzoraka. S druge strane, razdvajanje između izolata poreklom od životinja u odnosu na one poreklom od ljudi je najveće na osnovu citotoksičnog efekta - veću citotoksičnost pokazuju izolati poreklom od ljudi.

6. Pod ispitivanim uslovima, piocijanin je bio najznačajniji faktor virulencije u izazivanju letalnog efekta kod nematoda *Caenorhabditis elegans* AU 39, odnosno embriona ribica *Danio rerio*.
7. Analizom ekspresije gena koji kodiraju strukturne komponente matriksa biofilma uočen je viši nivo ekspresije *pelA* gena u formi planktonskih ćelija testiranih izolata, što koincidira sa važnošću Pel polisaharida za inicijalnu fazu formiranja biofilma. S druge strane, veća ekspresija *pslA* gena kod ispitivanih izolata zabeležena je kada su oni gajeni u formi biofilma, što ukazuje na značaj ovog egzopolisaharida u ekstracelularnom matriksu zrelih biofilmova.
8. Mala sposobnost izolata da formira biofilm bila je povezana sa povećanjem aktivnosti Rhl signalnog puta međubakterijske komunikacije, kao i povećanom ekspresijom *rhlA* gena.
9. Iako su procesi povezani sa formiranjem biofilma regulisani signalnim putevima međubakterijske komunikacije, sposobnost izolata da formiraju biofilm ne mora da bude direktno povezana sa količinom proizvedenih autoinducera za tri glavna signalna puta kod vrste *P. aeruginosa*.
10. Kompleksi srebra(I) sa ftalazinom uspešno su inhibirali rast planktonskih oblika izolata *P. aeruginosa* u koncentracijama od 2,5 do 25 µg/ml, dok su u subinhibitornim koncentracijama pokazali umereno inhibitorno dejstvo na formiranje biofilmova. Kompleksi su posebno bili efikasni u degradovanju već formiranih biofilmova (do 90%), pri koncentracijama dva puta višim od vrednosti MIK. Kompleksi srebra(I) sa ftalazinom su bili umereno efikasni u inhibiciji pokretljivosti *P. aeruginosa* i nisu uticali na proizvodnju piocijanina.

8. LITERATURA

1. Abu-Youssef, M.A.M., Langer, V., Ohrstrom, L., 2006. Synthesis, a case of isostructural packing, and antimicrobial activity of silver(I) quinoxaline nitrate, silver(I)(2,5-dimethylpyrazine) nitrate and two related silver aminopyridine compounds. *Dalton Transactions*, 2542-2550.
2. Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., Maier, R.M., 2000. Rhamnolipid-Induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3262-3268.
3. Aleksic, I., Petkovic, M., Jovanovic, M., Milivojevic, D., Vasiljevic, B., Nikodinovic-Runic, J., Senerovic, L., 2017. Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives. *Frontiers in Microbiology* 8.
4. Allen, J.L., Begg, A.P., Browning, G.F., 2011. Outbreak of equine endometritis caused by a genotypically identical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 1236-1239.
5. Aloush, V., Navon-Venezia, S., Seigman-Igra, Y., Cabili, S., Carmeli, Y., 2006. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 43-48.
6. Antunes, L.C., Ferreira, R.B., Buckner, M.M., Finlay, B.B., 2010. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* 156, 2271-2282.
7. Arora, S.K., Neely, A.N., Blair, B., Lory, S., Ramphal, R., 2005. Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infection and Immunity* 73, 4395-4398.
8. Asad, S., Opal, S.M., 2008. Bench-to-bedside review: quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Critical care* 12, 236.
9. Ball, G., Durand, É., Lazdunski, A., Filloux, A., 2002. A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 43, 475-485.

10. Banin, E., Lozinski, A., Brady, K.M., Berenshtein, E., Butterfield, P.W., Moshe, M., Chevion, M., Greenberg, E.P., Banin, E., 2008. The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 16761-16766.
11. Barken, K.B., Pamp, S.J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J.J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch, C.B., Enge, I.J.N., Tolker-Nielsen, T., 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* 10, 2331-2343.
12. Barker, A.P., Vasil, A.I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P.J., Vasil, M.L., 2004. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Molecular Microbiology* 53, 1089-1098.
13. Baron, S.S., Rowe, J.J., 1981. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 20, 814-820.
14. Bartholomew, J.W., Mittwer, T., 1952. The Gram stain. *Bacteriological Reviews* 16, 1-29.
15. Bassler, B.L., 2002. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109, 421-424.
16. Bassler, B.L., Losick, R., 2006. Bacterially Speaking. *Cell* 125, 237-246.
17. Berra, L., Curto, F., Li Bassi, G., Laquerriere, P., Pitts, B., Baccarelli, A., Kolobow, T., 2008. Antimicrobial-coated endotracheal tubes: an experimental study. *Intensive Care Medicine* 34, 1020-1029.
18. Berra, L., Schmidt, U., Wiener-Kronish, J., 2010. Relationship between virulence factors and outcome of ventilator-associated pneumonia related to *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Respiratory Medicine Reviews* 6, 19-25.
19. Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S., Givskov, M., Høiby, N., 2013. Applying insights from biofilm biology to drug development — can a new approach be developed? *Nature Reviews Drug Discovery* 12, 791.
20. Bjarnsholt, T., Givskov, M., 2006. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 409-414.

21. Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Kristiansen, S., Phipps, R., Nielsen, A.K., Jensen, P.Ø., Høiby, N., Givskov, M., 2007. Silver against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *APMIS* 115, 921-928.
22. Blanc, D.S., Francioli, P., Zanetti, G., 2007. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the Intensive care units – A Review. *The Open Microbiology Journal* 1, 8-11.
23. Blumer, C., Haas, D., 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archive of Microbiology* 173, 170-177.
24. Bodenhofer, U., Klawonn, F., 2008. Robust rank correlation coefficients on the basis of fuzzy orderings: initial steps. *Mathware and Soft Computing* 15, 5-20.
25. Boles, B., Thoendel, M., Singh, P., 2005. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology* 57, 1210-1223.
26. Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular Microbiology* 75, 827-842.
27. Brannon, M.K., Davis, J.M., Mathias, J.R., Hall, C.J., Emerson, J.C., Crosier, P.S., Huttenlocher, A., Ramakrishnan, L., Moskowitz, S.M., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion system interacts with phagocytes to modulate systemic infection of zebrafish embryos. *Cellular Microbiology* 11, 755-768.
28. Breathnach, A.S., 2009. Nosocomial infections. *Medicine* 37, 557-561.
29. Burchett, W.W., Ellis, A.R., Harrar, S.W., Bathke, A.C., 2017. Nonparametric inference for multivariate data: The R package nprmv. *Journal of Statistical Software* 76.
30. Caiazza, N.C., O'Toole, G.A., 2004. SadB Is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology* 186, 4476-4485.
31. Calloni, C., Silva Santos, L.F., Martinez, L.S., Salvador, M., 2016. Data on cell viability of human lung fibroblasts treated with polyphenols-rich extract from *Plinia trunciflora* (O. Berg Kausel). *Data in brief* 6, 728-731.

32. Cavalcanti, M., Valencia, M., Torres, A., 2005. Respiratory nosocomial infections in the medical intensive care unit. *Microbes and Infection* 7, 292-301.
33. Chand, N.S., Lee, J.S.-W., Clatworthy, A.E., Golas, A.J., Smith, R.S., Hung, D.T., 2011. The sensor kinase KinB regulates virulence in acute *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Journal of Bacteriology* 193, 2989-2999.
34. Chapon-Hervé, V., Akrim, M., Latifi, A., Williams, P., Lazdunski, A., Bally, M., 1997. Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 24, 1169-1178.
35. Chemani, C., Imberty, A., De Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerová, M., Guery, B.P., Faure, K., 2009. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infection and Immunity* 77, 2065-2075.
36. Chen, T., Guestrin, C. 2016. XGBoost: A scalable tree boosting system. In *Proceedings of the 22nd ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining (San Francisco, California, USA, ACM)*, 785-794.
37. Cipollone, R., Ascenzi, P., Tomao, P., Imperi, F., Visca, P., 2008. Enzymatic detoxification of cyanide: Clues from *Pseudomonas aeruginosa* rhodanese. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 15, 199-211.
38. Clatworthy, A.E., Lee, J.S.-W., Leibman, M., Kostun, Z., Davidson, A.J., Hung, D.T., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants. *Infection and Immunity* 77, 1293-1303.
39. Cockerill, F.R., Wikler, M.A., Alder, J., Dudley, M.N., Eliopoulos, G.M., Ferraro, M.J., Hardy, D.J., Hecht, D.W., Hindler, J.A., Patel, J.B., Powell, M., Swenson, J.M., Thomson, R.B.J., Traczewski, M.M., Turnidge, J.D., Weinstein, M.P., Zimmer, B.L., 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard M07-A9; Ninth edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute* 32, 1-63.
40. Colvin, K.M., Alnabelseya, N., Baker, P., Whitney, J.C., Howell, P.L., Parsek, M.R., 2013. PelA deacetylase activity is required for Pel polysaccharide synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 195, 2329-2339.

41. Colvin, K.M., Gordon, V.D., Murakami, K., Borlee, B.R., Wozniak, D.J., Wong, G.C.L., Parsek, M.R., 2011. The Pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. PLOS Pathogens 7, e1001264.
42. Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., Urbano, R., Whitney, J.C., Ryder, C., Howell, P.L., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2012. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. Environmental Microbiology 14, 19131928.
43. Costerton, J.W., 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science 284, 1318-1322.
44. Cox, C.D., 1986. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. Infection and Immunity 52, 263-270.
45. Crossman, P.J., Hutchinson, I., 1995. Gangrenous mastitis associated with *Pseudomonas aeruginosa*. Veterinary Record 136, 548-552.
46. Crousilles, A., Maunders, E., Bartlett, S., Fan, C., Ukor, E.F., Abdelhamid, Y., Baker, Y., Floto, A., Spring, D.R., Welch, M., 2015. Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections? Future microbiology 10, 1825-1836.
47. D'Argenio, D.A., Gallagher, L.A., Berg, C.A., Manoil, C., 2001. Drosophila as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. Journal of Bacteriology 183, 1466-1471.
48. Das, T., Kutty, S.K., Tavallaie, R., Ibugo, A.I., Panchompoo, J., Sehar, S., Aldous, L., Yeung, A.W.S., Thomas, S.R., Kumar, N., Gooding, J.J., Manefield, M., 2015. Phenazine virulence factor binding to extracellular DNA is important for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. Scientific Reports 5, 8398.
49. Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole, G.A., 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Journal of Bacteriology 185, 1027-1036.
50. Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 280, 295-298.

51. De Abreu, P.M., Farias, P.G., Paiva, G.S., Almeida, A.M., Morais, P.V., 2014. Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard. *BMC Microbiology* 14, 118.
52. De Bentzmann, S., Roger, P., Dupuit, F., Bajolet-Laudinat, O., Fuchey, C., Plotkowski, M.C., Puchelle, E., 1996. Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infection and Immunity* 64, 1582-1588.
53. De Martino, L., Nocera, F.P., Mallardo, K., Nizza, S., Masturzo, E., Fiorito, F., Iovane, G., Catalanotti, P., 2016. An update on microbiological causes of canine otitis externa in Campania Region, Italy. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6, 384-389.
54. Depluvere, S., Devos, S., Devreese, B., 2016. The role of bacterial secretion systems in the virulence of Gram-negative airway pathogens associated with cystic fibrosis. *Frontiers in Microbiology* 7, 1336.
55. Deredjian, A., Colinon, C., Hien, E., Brothier, E., Youenou, B., Cournoyer, B., Dequiedt, S., Hartmann, A., Jolivet, C., Houot, S., Ranjard, L., Saby, N.P.A., Nazaret, S., 2014. Low occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in agricultural soils with and without organic amendment. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4, 53.
56. Devriese, L.A., Viaene, N.J., De Medts, G., 1975. *Pseudomonas aeruginosa* infection on a broiler farm. *Avian Pathology* 4, 233-237.
57. Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., Villemur, R., 2003. RhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149, 2005-2013.
58. Dietrich, L.E.P., Teal, T.K., Price-Whelan, A., Newman, D.K., 2008. Redox-active antibiotics control gene expression and community behavior in divergent bacteria. *Science* 321, 1203-1206.
59. Diggle, S.P., Stacey, R.E., Dodd, C., Cámara, M., Williams, P., Winzer, K., 2006. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 8, 1095-1104.

60. Donlan, R.M., 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases* 33, 1387-1392.
61. Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8, 881-890.
62. Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 167-193.
63. Dötsch, A., Eckweiler, D., Schniederjans, M., Zimmermann, A., Jensen, V., Scharfe, M., Geffers, R., Häussler, S., 2012. The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing. *PLoS ONE* 7, e31092.
64. Draper, C.S., Walker, R.D., Lawler, H.E., 1981. Patterns of oral bacterial infection in captive snakes. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 11, 1223-1226.
65. Driscoll, J.A., Brody, S.L., Kollef, M.H., 2007. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 67, 351-368.
66. Duan, K., Surette, M.G., 2007. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *Journal of Bacteriology* 189, 4827-4836.
67. Duong, F., Bonnet, E., Géli, V., Lazdunski, A., Murgier, M., Filloux, A., 2001. The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene* 262, 147-153.
68. Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Neilson, K.H., Oppenheimer, N.J., 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20, 2444-2449.
69. ECDC 2017. European Centre for Disease Prevention and Control, Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In Annual epidemiological report for 2015 (Stockholm, ECDC).
70. EUCAST 2016. EUCAST expert rules version 3.1, Intrinsic Resistance and Exceptional Phenotypes Tables (Basel, Switzerland, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

71. Farrer, N.J., Sandler, P.J. 2011. Medicinal inorganic chemistry : state of the art, new trends, and a vision of the future., In: Alession, E. (Ed.) Bioinorganic medical chemistry. Wiley-VCH, Weinheim, ISBN: 9783527326310, 1-47.
72. Fazli, M., Almlad, H., Rybtke, M.L., Givskov, M., Eberl, L., Tolker-Nielsen, T., 2014. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environmental Microbiology* 16, 1961-1981.
73. Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., Prince, A., 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infection and Immunity* 66, 43-51.
74. Fernandez-Pinar, R., Camara, M., Dubern, J.F., Ramos, J.L., Espinosa-Urgel, M., 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone quorum sensing signal alters the multicellular behaviour of *Pseudomonas putida* KT2440. *Research in microbiology* 162, 773-781.
75. Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8, 623-633.
76. Fletcher, M.P., Diggle, S.P., Crusz, S.A., Chhabra, S.R., Cámara, M., Williams, P., 2007. A dual biosensor for 2-alkyl-4-quinolone quorum-sensing signal molecules. *Environmental Microbiology* 9, 2683-2693.
77. Floyd, M., Winn, M., Cullen, C., Sil, P., Chassaing, B., Yoo, D.G., Gewirtz, A.T., Goldberg, J.B., McCarter, L.L., Rada, B., 2016. Swimming motility mediates the formation of neutrophil extracellular traps induced by flagellated *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens* 12, e1005987.
78. Folsom, J.P., Richards, L., Pitts, B., Roe, F., Ehrlich, G.D., Parker, A., Mazurie, A., Stewart, P.S., 2010. Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis. *BMC Microbiology* 10, 294-294.
79. Fonseca, A.P., Correia, P., Sousa, J.C., Tenreiro, R., 2007. Association patterns of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates as revealed by virulence traits, antibiotic resistance, serotype and genotype. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 51, 505-516.
80. Franklin, M.J., Nivens, D.E., Weadge, J.T., Howell, P.L., 2011. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology* 2, 167.

81. Friedman, L., Kolter, R., 2004a. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology* 51, 675-690.
82. Friedman, L., Kolter, R., 2004b. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Journal of Bacteriology* 186, 4457-4465.
83. Fuqua, C., Greenberg, E.P., 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 685-695.
84. Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P., 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology* 13, 34-40.
85. Galili, T., 2015. Dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics (Oxford, England)* 31, 3718-3720.
86. Gallagher, L.A., Manoil, C., 2001. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *Journal of Bacteriology* 183, 6207-6214.
87. Galle, M., Carpentier, I., Beyaert, R., 2012. Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Protein and Peptide Science* 13, 831-842.
88. Garnacho-Montero, J. 2012. *Pseudomonas aeruginosa*, In: Vincent, J., Hall, J. (Eds.) *Encyclopedia of intensive care medicine*. Springer, London, ISBN: 978-3-642-00417-9, 1868-1872.
89. Garner, J.S., Jarvis, W.R., Emori, T.G., Horan, T.C., Hughes, J.M., 1988. CDC definitions for nosocomial infections. *American journal of infection control* 16, 128-140.
90. Gellatly, S.L., Hancock, R.E.W., 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease* 67, 159-173.
91. Ghafoor, A., Hay, I.D., Rehm, B.H.A., 2011. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 5238-5246.
92. Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P., 1973. *In vitro* cultivation of human tumors: Establishment of cell

- lines derived from a series of solid tumors. JNCI: Journal of the National Cancer Institute 51, 1417-1423.
93. Glisic, B.D., Senerovic, L., Comba, P., Wadepohl, H., Veselinovic, A., Milivojevic, D.R., Djuran, M.I., Nikodinovic-Runic, J., 2016. Silver(I) complexes with phthalazine and quinazoline as effective agents against pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains. Journal of inorganic biochemistry 155, 115-128.
 94. Gotoh, H., Zhang, Y., Dallo, S.F., Hong, S., Kasaraneni, N., Weitao, T., 2008. *Pseudomonas aeruginosa*, under DNA replication inhibition, tends to form biofilms via Arr. Research in microbiology 159, 294-302.
 95. Gupta, A., Silver, S., 1998. Molecular genetics: Silver as a biocide: Will resistance become a problem? Nature Biotechnology 16, 888.
 96. Ha, D.-G., Kuchma, S.L., O'Toole, G.A. 2014. Plate-based assay for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*, In: Filloux, A., Ramos, J.-L. (Eds.) *Pseudomonas Methods and Protocols*. Springer New York, 978-1-4939-0473-0, 67-72.
 97. Haenni, M., Hocquet, D., Ponsin, C., Cholley, P., Guyeux, C., Madec, J.-Y., Bertrand, X., 2015. Population structure and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from animal infections in France. BMC Veterinary Research 11, 9.
 98. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature Reviews Microbiology 2, 95-108.
 99. Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A.J., Forbes, A., Perkins, A.V., Davey, A.K., Chess-Williams, R., Kiefel, M.J., Arora, D., Grant, G.D., 2016. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. Toxins 8, 236.
 100. Hauser, A.R., 2009. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. Nature Reviews Microbiology 7, 654-665.
 101. Hawdon, N.A., Aval, P.S., Barnes, R.J., Gravelle, S.K., Rosengren, J., Khan, S., Ciofu, O., Johansen, H.K., Høiby, N., Ulanova, M., 2010. Cellular responses of A549 alveolar epithelial cells to serially collected *Pseudomonas aeruginosa* from

- cystic fibrosis patients at different stages of pulmonary infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 59, 207-220.
102. Hay, I.D., Gatland, K., Campisano, A., Jordens, J.Z., Rehm, B.H.A., 2009. Impact of alginate overproduction on attachment and biofilm architecture of a supermuroid *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6022-6025.
 103. Head, N.E., Yu, H., 2004. Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Biofilm formation, virulence, and genome diversity. *Infection and Immunity* 72, 133-144.
 104. Her, H.-L., Wu, Y.-W., 2018. A pan-genome-based machine learning approach for predicting antimicrobial resistance activities of the *Escherichia coli* strains. *Bioinformatics (Oxford, England)* 34, i89-i95.
 105. Hillier, A., Alcorn, J.R., Cole, L.K., Kowalski, J.J., 2006. Pyoderma caused by *Pseudomonas aeruginosa* infection in dogs: 20 cases. *Veterinary dermatology* 17, 432-439.
 106. Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., Miller, S.I., 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436, 1171.
 107. Hoge, R., Pelzer, A., Rosenau, F., Wilhelm, S. 2010. Weapons of a pathogen: proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, In: Mendez-Vilas, A. (Ed.) *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology* Formatex Research Center, Badajoz, Spain, ISBN: 978-84-614-6194-3, 383-395.
 108. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O., 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35, 322-332.
 109. Hugh, R., Lessel, E., 1966. *Pseudomonas aeruginosa* or *Pseudomonas pyocyanea*? *International Journal of Systematic Bacteriology* 17, 43-51.
 110. Hye, P., Min, H., Sun, H., Young, P., Ka, K., Jang, Y., Sook, S., Jae, K., Yong, P., 2014. Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* related to bovine mastitis. *Acta Veterinaria Hungarica* 62, 1-12.

111. Jeukens, J., Boyle, B., Kukavica-Ibrulj, I., Ouellet, M.M., Aaron, S.D., Charette, S.J., Fothergill, J.L., Tucker, N.P., Winstanley, C., Levesque, R.C., 2014. Comparative genomics of isolates of a *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain associated with chronic lung infections of cystic fibrosis patients. PLOS ONE 9, e87611.
112. Jones, C., Allsopp, L., Horlick, J., Kulasekara, H., Filloux, A., 2013. Subinhibitory concentration of kanamycin induces the *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system. PLOS ONE 8, e81132.
113. Kalinowska-Lis, U., Felczak, A., Chęcińska, L., Szabłowska-Gadomska, I., Patyna, E., Małecki, M., Lisowska, K., Ochocki, J., 2016. Antibacterial activity and cytotoxicity of silver(I) complexes of pyridine and (Benz)Imidazole derivatives. X-ray crystal structure of [Ag(2,6-di(CH₂OH)py)₂]⁺NO₃⁻. Molecules 21, 87.
114. Kaneko, Y., Thoendel, M., Olakanmi, O., Britigan, B.E., Singh, P.K., 2007. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity. The Journal of Clinical Investigation 117, 877-888.
115. Kanthakumar, K., Taylor, G., Tsang, K.W., Cundell, D.R., Rutman, A., Smith, S., Jeffery, P.K., Cole, P.J., Wilson, R., 1993. Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat *in vitro*. Infection and Immunity 61, 2848-2853.
116. Kaplan, H.B., Greenberg, E.P., 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. Journal of Bacteriology 163, 1210-1214.
117. Kaplan, J.B., 2010. Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. Journal of Dental Research 89, 205-218.
118. Kasuga, N.C., Takagi, Y., Tsuruta, S., Kuwana, W., Yoshikawa, R., Nomiya, K., 2011. Synthesis, structure and antimicrobial activities of meso silver(I) histidinate [Ag₂(D-his)(L-his)]_n (Hhis = histidine) showing different self-assembly from those of chiral silver(I) histidinate. Inorganica Chimica Acta 368, 44-48.

119. Kearns, D.B., 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews. Microbiology* 8, 634-644.
120. Kerr, K.G., Snelling, A.M., 2009. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *The Journal of hospital infection* 73, 338-344.
121. Kidd, T.J., Gibson, J.S., Moss, S., Greer, R.M., Cobbold, R.N., Wright, J.D., Ramsay, K.A., Grimwood, K., Bell, S.C., 2011. Clonal complex *Pseudomonas aeruginosa* in horses. *Veterinary microbiology* 149, 508-512.
122. Kieser, M., Friede, T., Gondan, M., 2013. Assessment of statistical significance and clinical relevance. *Statistics in medicine* 32, 1707-1719.
123. Kim, S.-K., Lee, J.-H., 2016. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology* 54, 71-85.
124. King, J.D., Kocíncová, D., Westman, E.L., Lam, J.S., 2009. Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immunity* 15, 261-312.
125. Kingsford, N.M., Raadsma, H.W., 1995. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from ovine fleece washings by PCR amplification of 16S ribosomal RNA. *Veterinary microbiology* 47, 61-70.
126. Kingsford, N.M., Raadsma, H.W., 1997. The occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in fleece washings from sheep affected and unaffected with fleece rot. *Veterinary microbiology* 54, 275-285.
127. Kipnis, E., Sawa, T., Wiener-Kronish, J., 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et Maladies Infectieuses* 36, 78-91.
128. Kirienko, N.V., Cezairliyan, B.O., Ausubel, F.M., Powell, J.R. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 pathogenesis in *Caenorhabditis elegans*, In: Filloux, A., Ramos, J.-L. (Eds.) *Pseudomonas Methods and Protocols*. Springer New York, New York, NY, ISBN: 978-1-4939-0473-0, 653-669.
129. Kirienko, N.V., Kirienko, D.R., Larkins-Ford, J., Wählby, C., Ruvkun, G., Ausubel, F.M., 2013. *Pseudomonas aeruginosa* disrupts *Caenorhabditis elegans* iron homeostasis, causing a hypoxic response and death. *Cell Host and Microbe* 13, 406-416.

130. Klasen, H.J., 2000a. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 26, 117-130.
131. Klasen, H.J., 2000b. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* 26, 131-138.
132. Klausen, M., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003a. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology* 50, 61-68.
133. Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003b. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology* 48, 1511-1524.
134. Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C.F., Tümmler, B., 2011. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Frontiers in Microbiology* 2, 150.
135. Klockgether, J., Munder, A., Neugebauer, J., Davenport, C.F., Stanke, F., Larbig, K.D., Heeb, S., Schöck, U., Pohl, T.M., Wiehlmann, L., Tümmler, B., 2010. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *Journal of Bacteriology* 192, 1113-1121.
136. Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., Pechère, J.-C., 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology* 182, 5990-5996.
137. Koo, H., Allan, R.N., Howlin, R.P., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., 2017. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology* 15, 740-755.
138. Kulasekara, H.D., Ventre, I., Kulasekara, B.R., Lazdunski, A., Filloux, A., Lory, S., 2005. A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Molecular Microbiology* 55, 368-380.
139. Kulshin, V.A., Zahringer, U., Lindner, B., Jager, K.E., Dmitriev, B.A., Rietschel, E.T., 1991. Structural characterization of the lipid A component of

- Pseudomonas aeruginosa* wild-type and rough mutant lipopolysaccharides. European Journal of Biochemistry 198, 697-704.
140. Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology and evolution 33, 1870-1874.
 141. Lam, J., Taylor, V., Islam, S., Hao, Y., Kocíncová, D., 2011. Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. Frontiers in Microbiology 2.
 142. Lamarche, M.G., Déziel, E., 2011. MexEF-OprN efflux pump exports the pseudomonas quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). PLOS ONE 6, e24310.
 143. Lane, D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.) Nucleic acid techniques in bacterial systematic. Wiley, Chichester, ISBN: 0471929069, 115-175.
 144. Lansdown, A.B., 2002. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. Journal of Wound Care 11, 125-130.
 145. Larrosa, M., Truchado, P., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., Allende, A., García-Conesa, M.T., 2012. Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) adhesion to human alveolar epithelial cells A549 using SYTO 9 dye. Molecular and Cellular Probes 26, 121-126.
 146. Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H., Kong, F., 2004a. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends in molecular medicine 10, 599-606.
 147. Lau, G.W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D.J., Mavrodi, D., 2004b. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. Infection and Immunity 72, 4275-4278.
 148. Lazazzera, B.A., Grossman, A.D., 1998. The ins and outs of peptide signaling. Trends in Microbiology 6, 288-294.
 149. Le Berre, R., Nguyen, S., Nowak, E., Kipnis, E., Pierre, M., Quenee, L., Ader, F., Lancel, S., Courcol, R., Guery, B.P., Faure, K., 2011. Relative contribution of three main virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Critical Care Medicine 39, 2113-2120.

150. Ledbetter, E.C., Mun, J.J., Kowbel, D., Fleiszig, S.M.J., 2009. Pathogenic phenotype and genotype of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from spontaneous canine ocular infections. *Investigative ophthalmology & visual science* 50, 729-736.
151. Ledizet, M., Murray, T.S., Puttagunta, S., Slade, M.D., Quagliarello, V.J., Kazmierczak, B.I., 2012. The ability of virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa* to predict clinical disease in hospitalized patients. *PLoS One* 7, e49578.
152. Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M., Deziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L.G., Ausubel, F.M., 2006. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome biology* 7, R90.
153. Lee, D.J., Jo, A.R., Jang, M.C., Nam, J., Choi, H.J., Choi, G.-W., Sung, H.Y., Bae, H., Ku, Y.-G., Chi, Y.-T., 2018. Analysis of two quorum sensing-deficient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis* 119, 162-169.
154. Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., Chang, C., Dong, Y., Williams, P., Zhang, L.-H., 2013. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature Chemical Biology* 9, 339.
155. Lee, J., Zhang, L., 2015. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell* 6, 26-41.
156. Lee, K., Yoon, S.S., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. *Journal of microbiology and biotechnology* 27, 1053-1064.
157. Lemire, J.A., Harrison, J.J., Turner, R.J., 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature reviews. Microbiology* 11, 371-384.
158. Lewis, K., 2010. Persister Cells. *Annual Review of Microbiology* 64, 357-372.
159. Li, G., Peng, H., Zhang, J., Zhu, L., 2012. Robust rank correlation based screening. *The Annals of Statistics* 40, 1846-1877.

160. Lin, D., Foley, S.L., Qi, Y., Han, J., Ji, C., Li, R., Wu, C., Shen, J., Wang, Y., 2012. Characterization of antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Journal of Applied Microbiology* 113, 16-23.
161. Linares, J.F., Gustafsson, I., Baquero, F., Martinez, J.L., 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19484-19489.
162. Lister, P.D., Wolter, D.J., Hanson, N.D., 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews* 22, 582-610.
163. Liu, G.Y., Nizet, V., 2009. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in microbiology* 17, 406-413.
164. Llamas, M.A., Van der Sar, A., Chu, B.C.H., Sparrius, M., Vogel, H.J., Bitter, W., 2009. A novel extracytoplasmic function (ECF) sigma factor regulates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens* 5, e1000572.
165. Long, G.G., Gallina, A.M., Gorham, J.R., 1980. *Pseudomonas pneumonia* of mink: pathogenesis, vaccination and serological studies. *American Journal of Veterinary Research* 10, 1720-1725.
166. Lukac, M., Matanovic, K., Barbic, L., Seol, B., 2013. Combination treatment of a pseudomonad abscess in a western black-tailed rattlesnake *Crotalus molossus molossus*: a case report *Veterinari Medicina* 12, 637-640.
167. Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B., 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection* 2, 1051-1060.
168. Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B., 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 194-222.
169. Mack, W., 1975. Microbial film development in a trickling filter *Microb Ecol* 2, 215-226.
170. Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., O'Toole, G.A., 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426, 306.

171. Majumdar, S.S., Padiglione, A.A., 2012. Nosocomial infections in the intensive care unit. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 13, 204-208.
172. Mann, E., Wozniak, D., 2012. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 893-916.
173. Manos, J., Arthur, J., Rose, B., Bell, S., Tingpej, P., Hu, H., Webb, J., Kjelleberg, S., Gorrell, M.D., Bye, P., Harbour, C., 2009. Gene expression characteristics of a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm and planktonic growth. *FEMS Microbiology Letters* 292, 107-114.
174. Manos, J., Arthur, J., Rose, B., Tingpej, P., Fung, C., Curtis, M., Webb, J.S., Hu, H., Kjelleberg, S., Gorrell, M.D., Bye, P., Harbour, C., 2008. Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung. *Journal of Medical Microbiology* 57, 1454-1465.
175. Markey, B., Leonard, F., Archambaut, M., Culinane, A., Magurie, D. 2013. *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Stenotrophomonas* species, In: Markey, B. (Ed.) *Clinical Veterinary Microbiology*. Elsevier, London.
176. Massai, F., Imperi, F., Quattrucci, S., Zennaro, E., Visca, P., Leoni, L., 2011. A multitask biosensor for micro-volumetric detection of N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone quorum sensing signal. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 3444-3449.
177. Mattick, J.S., 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology* 56, 289-314.
178. McFee, R.B., 2009. Nosocomial or hospital-acquired infections: an overview. *Disease-a-month : DM* 55, 422-438.
179. Mekić, S., Matanović, K., Šeol, B., 2011. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. *Veterinary Record* 169, 125-125.
180. Merritt, J.H., Brothers, K.M., Kuchma, S.L., O'Toole, G.A., 2007. SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *Journal of Bacteriology* 189, 8154-8164.

181. Merritt, J.H., Kadouri, D.E., O'Toole, G.A., 2005. Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology* Chapter 1, Unit 1B.1.
182. Michalska, M., Wolf, P., 2015. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in Microbiology* 6, 963.
183. Milic, N., Krnjaić, D., Mišić, D., Nišavić, J., Radojičić, M., 2017. *Mikrobiologija sa imunologijom*. Naučna KMD, Beograd.
184. Miller, M.B., Bassler, B.L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55, 165-199.
185. Mišić, D., 2013. *Metode mikrobiološke dijagnostike - Ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike*. Elit Medica, Beograd, ISBN: 978-86-7222-105-3.
186. Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S., Harjai, K., 2009. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Journal of infection and public health* 2, 101-111.
187. Mittal, R., Sharma, S., Chhibber, S., Aggarwal, S., Gupta, V., Harjai, K., 2010. Correlation between serogroup, *in vitro* biofilm formation and elaboration of virulence factors by uropathogenic *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58, 237-243.
188. Moradali, M.F., Ghods, S., Rehm, B.H., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A Paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7, 39.
189. Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., Quax, W.J., 2012. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 76, 46-65.
190. Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W., 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology* 104, 313-322.
191. Nguyen, A.T., O'Neill, M.J., Watts, A.M., Robson, C.L., Lamont, I.L., Wilks, A., Oglesby-Sherrouse, A.G., 2014. Adaptation of iron homeostasis pathways by a *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine mutant in the cystic fibrosis lung. *Journal of Bacteriology* 196, 2265-2276.
192. Nomiya, K., Yoshizawa, A., Tsukagoshi, K., Kasuga, N.C., Hirakawa, S., Watanabe, J., 2004. Synthesis and structural characterization of silver(I),

- aluminium(III) and cobalt(II) complexes with 4-isopropyltropolone (hinokitiol) showing noteworthy biological activities. Action of silver(I)-oxygen bonding complexes on the antimicrobial activities. *Journal of inorganic biochemistry* 98, 46-60.
193. O'Loughlin, C.T., Miller, L.C., Siryaporn, A., Drescher, K., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L., 2013. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 17981-17986.
 194. O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30, 295-304.
 195. Okkotsu, Y., Tieku, P., Fitzsimmons, L.F., Churchill, M.E., Schurr, M.J., 2013. *Pseudomonas aeruginosa* AlgR Phosphorylation Modulates Rhamnolipid Production and Motility. *Journal of Bacteriology* 195, 5499-5515.
 196. Olejnickova, K., Hola, V., Ruzicka, F., 2014. Catheter-related infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: virulence factors involved and their relationships. *Pathogens and Disease* 72, 87-94.
 197. Oppenheimer-Shaanan, Y., Steinberg, N., Kolodkin-Gal, I., 2013. Small molecules are natural triggers for the disassembly of biofilms. *Trends in Microbiology* 21, 594-601.
 198. Osborne, A.D., Armstrong, K., Catrysse, N.H., Butler, G., Versavel, L., 1981. An outbreak of pseudomonas mastitis in dairy cows. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne* 22, 215-216.
 199. Palleroni, J.N., 2010. The pseudomonas story. *Environmental Microbiology* 12, 1377-1383.
 200. Palleroni, J.N. 2015. *Pseudomonas*, In: *Bergey's Manual of systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley and sons, Inc. in association with Bergey's Manula Trust, Online ISBN: 9781118960608.
 201. Pamp, S.J., Tolker-Nielsen, T., 2007. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 189, 2531-2539.

202. Papenfort, K., Bassler, B.L., 2016. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 14, 576.
203. Park, H.-J., Kim, J.Y., Kim, J., Lee, J.-H., Hahn, J.-S., Gu, M.B., Yoon, J., 2009. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Research* 43, 1027-1032.
204. Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 13, 27-33.
205. Parsons, J.F., Greenhagen, B.T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H., Ladner, J.E., 2007. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 46, 1821-1828.
206. Patriquin, G.M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E.P., Poole, K., 2008. Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 190, 662-671.
207. Pekmezovic, M., Aleksic, I., Barac, A., Arsic-Arsenijevic, V., Vasiljevic, B., Nikodinovic-Runic, J., Senerovic, L., 2016. Prevention of polymicrobial biofilms composed of *Pseudomonas aeruginosa* and pathogenic fungi by essential oils from selected Citrus species. *Pathogens and Disease* 74, ftw102-ftw102.
208. Percival, S.L., Bowler, P.G., Russell, D., 2005. Bacterial resistance to silver in wound care. *The Journal of hospital infection* 60, 1-7.
209. Percival, S.L., Malic, S., Cruz, H., Williams, D.W. 2011. Introduction to biofilms, In: Percival, S.L., Knottenbelt, D., Cochrane, C. (Eds.) *Biofilms and Veterinary Medicine*. Springer - Verlag, Berlin, 41-658.
210. Pereira, S.G., Rosa, A.C., Ferreira, A.S., Moreira, L.M., Proenca, D.N., Morais, P.V., Cardoso, O., 2014. Virulence factors and infection ability of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a hydropathic facility and respiratory infections. *J Appl Microbiol* 116, 1359-1368.
211. Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., Iglewski, B.H., 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America 96, 11229-11234.
212. Pesesky, M.W., Hussain, T., Wallace, M., Patel, S., Andleeb, S., Burnham, C.-A.D., Dantas, G., 2016. Evaluation of Machine Learning and Rules-Based Approaches for Predicting Antimicrobial Resistance Profiles in Gram-negative Bacilli from Whole Genome Sequence Data. *Frontiers in Microbiology* 7.
 213. Petersen, A.D., Walker, R.D., Bowman, M.M., Schott, H.C., 2nd, Rosser, E.J., Jr., 2002. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997). *Journal of the American Animal Hospital Association* 38, 407-413.
 214. Petrova, O.E., Sauer, K., 2009. A novel signaling network essential for regulating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLoS Pathogens* 5, e1000668.
 215. Pillar, C.M., Hobden, J.A., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and keratitis in mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 43, 1437-1444.
 216. Pitt, L.T., Simpson, J.H.A. 2006. *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp., In: Gillespie, S., Hawkey, P. (Eds.) *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*, Second Edition. John Wiley & Sons Ltd, UK, ISBN: 9780470849767.
 217. Poonsuk, K., Chuanchuen, R., 2012. Contribution of the MexXY multidrug efflux pump and other chromosomal mechanisms on aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine and feline infections. *Journal of Veterinary Medical Science* 74, 1575-1582.
 218. Prakash, B., Veeregowda, B.M., Krishnappa, G., 2003. Biofilms: A survival strategy of bacteria. *Current Science* 85, 1299 -1306.
 219. Prasad, B.M., Srivastava, C.P., Narayan, K.G., Prasad, A.K., 1967. *Pseudomonas pneumonia* in calves. *Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 17, 363-369.
 220. Pritchard, D.I., 2006. Immune modulation by *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. *International Journal of Medical Microbiology* 296, 111-116.

221. Pye, C.C., Yu, A.A., Weese, J.S., 2013. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility *in vitro*. *Veterinary dermatology* 24, 446-449, e498-449.
222. Qi, J., Li, L., Du, Y., Wang, S., Wang, J., Luo, Y., Che, J., Lu, J., Liu, H., Hu, G., Li, J., Gong, Y., Wang, G., Hu, M., ShiganYan, Liu, Y., 2014. The identification, typing, and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from mink with hemorrhagic pneumonia. *Veterinary microbiology* 170, 456-461.
223. Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Hartigan, P., Fanning, S., Fitzpatrick, E.S., 2011. *Veterinary microbiology and Microbial disease*, 2nd Edition. Wiley-Blackwell, UK, ISBN: 978-1-405-15823-7.
224. Rahme, L., Stevens, E., Wolfort, S., Shao, J., Tompkins, R., Ausubel, F., 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268, 1899-1902.
225. Rampioni, G., Pustelny, C., Fletcher, M.P., Wright, V.J., Bruce, M., Rumbaugh, K.P., Heeb, S., Cámara, M., Williams, P., 2010. Transcriptomic analysis reveals a global alkyl-quinolone-independent regulatory role for PqsE in facilitating the environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to plant and animal hosts. *Environmental Microbiology* 12, 1659-1673.
226. Rampioni, G., Schuster, M., Greenberg Everett, P., Bertani, I., Grasso, M., Venturi, V., Zennaro, E., Leoni, L., 2007. RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 66, 1557-1565.
227. Ramsey, D.M., Wozniak, D.J., 2005. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Molecular Microbiology* 56, 309-322.
228. Randall, C.P., Oyama, L.B., Bostock, J.M., Chopra, I., O'Neill, A.J., 2013. The silver cation (Ag⁺): antistaphylococcal activity, mode of action and resistance studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68, 131-138.
229. Rasika, M.H., 2003. Bacterial motility on a surface: Many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology* 57, 249-273.

230. Roe, D., Karandikar, B., Bonn-Savage, N., Gibbins, B., Rouillet, J.-B., 2008. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61, 869-876.
231. Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Hamood, A.N., 2000. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and Infection* 2, 1721-1731.
232. Rybtke, M., Jensen, P., Hoiby, N., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Bjarnsholt, T., 2011. The implication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in infections. *Inflammation & Allergy - Drug Targets (Discontinued)* 10, 141-157.
233. Sakuragi, Y., Kolter, R., 2007. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 189, 5383-5386.
234. Salomonsen, C.M., Themudo, G.E., Jelsbak, L., Molin, S., Hoiby, N., Hammer, A.S., 2013. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hemorrhagic pneumonia in mink (*Neovison vison*). *Veterinary microbiology* 163, 103-109.
235. Sanderson, K., Wescombe, L., Kirov, S.M., Champion, A., Reid, D.W., 2008. Bacterial cyanogenesis occurs in the cystic fibrosis lung. *The European respiratory journal* 32, 329-333.
236. Savic, N.D., Glisic, B.D., Wadeh, H., Pavic, A., Senerovic, L., Nikodinovic-Runic, J., Djuran, M.I., 2016a. Silver(I) complexes with quinazoline and phthalazine: synthesis, structural characterization and evaluation of biological activities. *Medicinal Chemistry Communications* 7, 282-291.
237. Savic, N.D., Milivojevic, D.R., Glisic, B.D., Ilic-Tomic, T., Veselinovic, J., Pavic, A., Vasiljevic, B., Nikodinovic-Runic, J., Djuran, M.I., 2016b. A comparative antimicrobial and toxicological study of gold(III) and silver(I) complexes with aromatic nitrogen-containing heterocycles: synergistic activity and improved selectivity index of Au(III)/Ag(I) complexes mixture. *RSC Advances* 6, 13193-13206.
238. Scaccabarozzi, L., Leoni, L., Ballarini, A., Barberio, A., Locatelli, C., Casula, A., Bronzo, V., Pisoni, G., Jousson, O., Morandi, S., Rapetti, L., García-Fernández, A., Moroni, P., 2015. *Pseudomonas aeruginosa* in dairy goats:

- Genotypic and phenotypic comparison of intramammary and environmental isolates. PLoS ONE 10, e0142973.
239. Schalk, I., Guillon, L., 2013. Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. Environmental Microbiology 15, 1661-1673.
240. Schuster, M., Hawkins, A.C., Harwood, C.S., Greenberg, E.P., 2004. The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. Molecular Microbiology 51, 973-985.
241. Scoffone, V.C., Chiarelli, L.R., Makarov, V., Brackman, G., Israyilova, A., Azzalin, A., Forneris, F., Riabova, O., Savina, S., Coenye, T., Riccardi, G., Buroni, S., 2016. Discovery of new diketopiperazines inhibiting *Burkholderia cenocepacia* quorum sensing *in vitro* and *in vivo*. Scientific Reports 6, 32487.
242. Shapiro, S.S., Wilk, M.B., 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52, 591-611.
243. Silver, S., Phung, L.T., Silver, G., 2006. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 33, 627-634.
244. Singh, P.K., Parsek, M.R., Greenberg, E.P., Welsh, M.J., 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature 417, 552.
245. Skindersoe, M.E., Zeuthen, L.H., Brix, S., Fink, L.N., Lazenby, J., Whittall, C., Williams, P., Diggle, S.P., Froekiaer, H., Cooley, M., Givskov, M., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. FEMS Immunology & Medical Microbiology 55, 335-345.
246. Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., Miller, S.I., Ramsey, B.W., Speert, D.P., Moskowitz, S.M., Burns, J.L., Kaul, R., Olson, M.V., 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 8487-8492.
247. Soberón-Chávez, G., Lépine, F., Déziel, E., 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Microbiology and Biotechnology 68, 718-725.

248. Spencer, D.H., Kas, A., Smith, E.E., Raymond, C.K., Sims, E.H., Hastings, M., Burns, J.L., Kaul, R., Olson, M.V., 2003. Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 185, 1316-1325.
249. Stiernagle, T., 2006. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1-11.
250. Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., Olson, M.V., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959-964.
251. Streeter, K., Katouli, M., 2016. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment. *Infection, Epidemiology and Medicine* 2, 25-32.
252. Streips, U., Yasbin, R. 2002. Modern microbial genetics, In: Fuqua, C., Parsek, M.R. (Eds.) *Modern microbial genetics*, Second editon. Wiley-Liss, Inc., UK, ISBN: 978-0-471-38665-0, 361-384.
253. Tart, A.H., Wolfgang, M.C., Wozniak, D.J., 2005. The Alternative Sigma Factor AlgT Represses *Pseudomonas aeruginosa* Flagellum Biosynthesis by Inhibiting Expression of fleQ. *Journal of Bacteriology* 187, 7955-7962.
254. Team, R.C. 2014. R: A language and environment for statistical computing. In <http://www.r-project.org/>, Computing, R.F.f.S., ed. (Vienna, Austria.).
255. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
256. Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., 2005. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* 151, 1313-1323.

257. Tolker-Nielsen, T., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: From molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS* 122, 1-51.
258. Trautmann, M., Lepper, P.M., Haller, M., 2005. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *American journal of infection control* 33, S41-49.
259. Turnbull, L., Whitchurch, C.B. 2014. Motility assay: Twitching motility, In: Filloux, A., Ramos, J.-L. (Eds.) *Pseudomonas Methods and Protocols*. Springer, New York, ISBN: 978-1-4939-0473-0, 73-86.
260. Turner, K.H., Everett, J., Trivedi, U., Rumbaugh, K.P., Whiteley, M., 2014. Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* acute burn and chronic surgical wound infection. *PLoS genetics* 10, e1004518.
261. Ueda, A., Wood, T.K., 2009. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, Pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathogens* 5, e1000483.
262. Utari, P.D., Quax, W.J., 2013. *Caenorhabditis elegans* reveals novel *Pseudomonas aeruginosa* virulence mechanism. *Trends in Microbiology* 21, 315-316.
263. Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A., Filloux, A., 2001. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6911-6916.
264. Van Delden, C., Iglewski, B.H., 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infectious Diseases* 4, 551-560.
265. Venturi, V., 2006. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas* *FEMS Microbiology Reviews* 30, 274-291.
266. Vives-Florez, M., Garnica, D., 2006. Comparison of virulence between clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 9, 247-252.
267. VLA surveillance report for England and Wales 2006. Botulism in sheep associated with broiler litter. *Veterinary Record* 158, 145-148.

268. Wagner, V.E., Iglewski, B.H., 2008. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in CF Infection. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 35, 124-134.
269. Waite, R.D., Paccanaro, A., Papakonstantinou, A., Hurst, J.M., Saqi, M., Littler, E., Curtis, M.A., 2006. Clustering of *Pseudomonas aeruginosa* transcriptomes from planktonic cultures, developing and mature biofilms reveals distinct expression profiles. *BMC Genomics* 7, 162-162.
270. Waite, R.D., Papakonstantinou, A., Littler, E., Curtis, M.A., 2005. Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* growth: Comparison of gene expression in planktonic cultures and developing and mature biofilms. *Journal of Bacteriology* 187, 6571-6576.
271. Wakshlak, R.B., Pedahzur, R., Avnir, D., 2015. Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the "zombies" effect. *Scientific Reports* 5, 9555.
272. Waldron, K.J., Robinson, N.J., 2009. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nature Reviews Microbiology* 7, 25.
273. Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 317-323.
274. Westgate, S., Percival, S., Knottenbelt, D., Clegg, P., Cochrane, C., 2010. Chronic equine wounds: What is the role of infection and biofilms? . *Wounds* 22, xf.
275. Westman, E.L., Matewish, J.M., Lam, J.S. 2010. *Pseudomonas*, In: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. (Eds.) *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Wiley-Blackwell, 443-468.
276. Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S., 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487-1487.
277. White, B.A., 1997. *PCR Cloning Protocols*. Humana Press INC, USA, ISBN: 1592591779.
278. Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P., 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413, 860.

279. Winstanley, C., Fothergill, J.L., 2009. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiology Letters* 290, 1-9.
280. Winzer, K., Falconer, C., Garber, N.C., Diggle, S.P., Camara, M., Williams, P., 2000. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-III are controlled by quorum sensing and by RpoS. *Journal of Bacteriology* 182, 6401-6411.
281. Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J.O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G.A., Parsek, M.R., 2003. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 7907-7912.
282. Wright, E.A., Di Lorenzo, V., Trappetti, C., Liciardi, M., Orru, G., Viti, C., Bronowski, C., Hall, A.J., Darby, A.C., Oggioni, M.R., Winstanley, C., 2015. Divergence of a strain of *Pseudomonas aeruginosa* during an outbreak of ovine mastitis. *Veterinary microbiology* 175, 105-113.
283. Wu, W., Badrane, H., Arora, S., Baker, H.V., Jin, S., 2004. MucA-mediated coordination of type III secretion and alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 186, 7575-7585.
284. XChi, E., Nunn, M., Lory, S., 1991. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infection and Immunity* 52, 822-828.
285. Yang, J., Toyofuku, M., Sakai, R., Nomura, N., 2017. Influence of the alginate production on cell-to-cell communication in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environmental Microbiology Reports* 9, 239-249.
286. Yang, L., Nilsson, M., Gjermansen, M., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2009. Pyoverdine and PQS mediated subpopulation interactions involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Molecular Microbiology* 74, 1380-1392.
287. Zolfaghar, I., Evans, D.J., Fleiszig, S.M.J., 2003. Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 71, 5389-5393.

Biografija

Dušan Milivojević je rođen u Valjevu 17. avgusta 1986. godine gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Fakultet veterinarske medicine je upisao školske 2005/2006 godine. Diplomirao je 22. maja 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,4 i stekao zvanje doktora veterinarske medicine. Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine upisao je školske 2014/2015 godine. Položio je sve ispite u predviđenom roku sa prosečnom ocenom 9,79.

Od oktobra 2014. godine je zaposlen u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu kao istraživač pripravnik, a sadašnje zvanje istraživač saradnik stekao je u martu 2016. godine.

Predmet njegovog naučnog interesovanja su molekularni mehanizmi patogenosti bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, bakterijski biofilmovi, interakcije između patogena i domaćina, kao i međubakterijska komunikacija (*eng.* quorum sensing) sa ciljem pronalazaženja antibakterijskih supstanci koje bi mogle naći primenu u humanoj i veterinarskoj medicini.

U sklopu kontinuiranog usavršavanja boravio je na Institutu Cluster of Excellence in Cellular Stress Responses in Aging-associated Diseases Univerziteta u Kelnu (Nemačka) u laboratoriji prof. Dr Aleksandre Trifunović gde je prošao obuku za rad sa *in vivo* model sistemom *Caenorhabditis elegans*. Kao stipendista Evropskog udruženja kliničkih mikrobiologa (ESCMID) bio je polaznik škole o biofilmovima „Medical Biofilm Techniques 2016“, održanoj na Tehničkom univerzitetu u Kopenhagenu (Danska).

Pored angažovanja na domaćem projektu „Izučavanje mikrobiološkog diverziteta i karakterizacija korisnih sredinskih mikroorganizama“ (OI 173048), učesnik je i na međunarodnom projektu „Nove sinergističke strategije za lečenje hroničnih infekcija rana“ (Collaborative Research Project 2016). Član je udruženja mikrobiologa Srbije i evropskog udruženja mikrobiologa (ESCMID).

Do sada je kao autor i koautor objavio 5 radova u časopisima međunarodnog značaja (M21 i M22).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Душан Миливојевић

број уписа 14/7

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање одабраних фактора вируленције код изолата *Pseudomonas aeruginosa* и њихова осетљивост на комплексе сребра

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 17.08.2018

Потпис докторанда

Душан Миливојевић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Душан Миливојевић
Број уписа	14/7
Студијски програм	Докторске академске студије
Наслов рада	Испитивање одабраних фактора вируленције код изолата <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и њихова осетљивост на комплексе сребра
Ментор	др Душан Мишић, ванредни професор др Лидија Шенеровић, виши научни сарадник

Потписани Душан Миливојевић

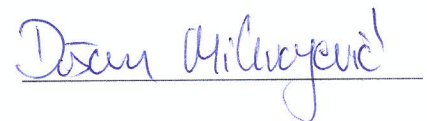
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 17.08.2018.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање одабраних фактора вируленције код изолата *Pseudomonas aeruginosa* и њихова осетљивост на комплексе сребра

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 17.08.2018

