



Biyofilmin Diyabetik Yarada Önemi ve Eradikasyon Yöntemleri

Dr. Ş. Barçın ÖZTÜRK

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi

İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji A.D.

Yara iyileşmesi

○ İnflamasyon fazı

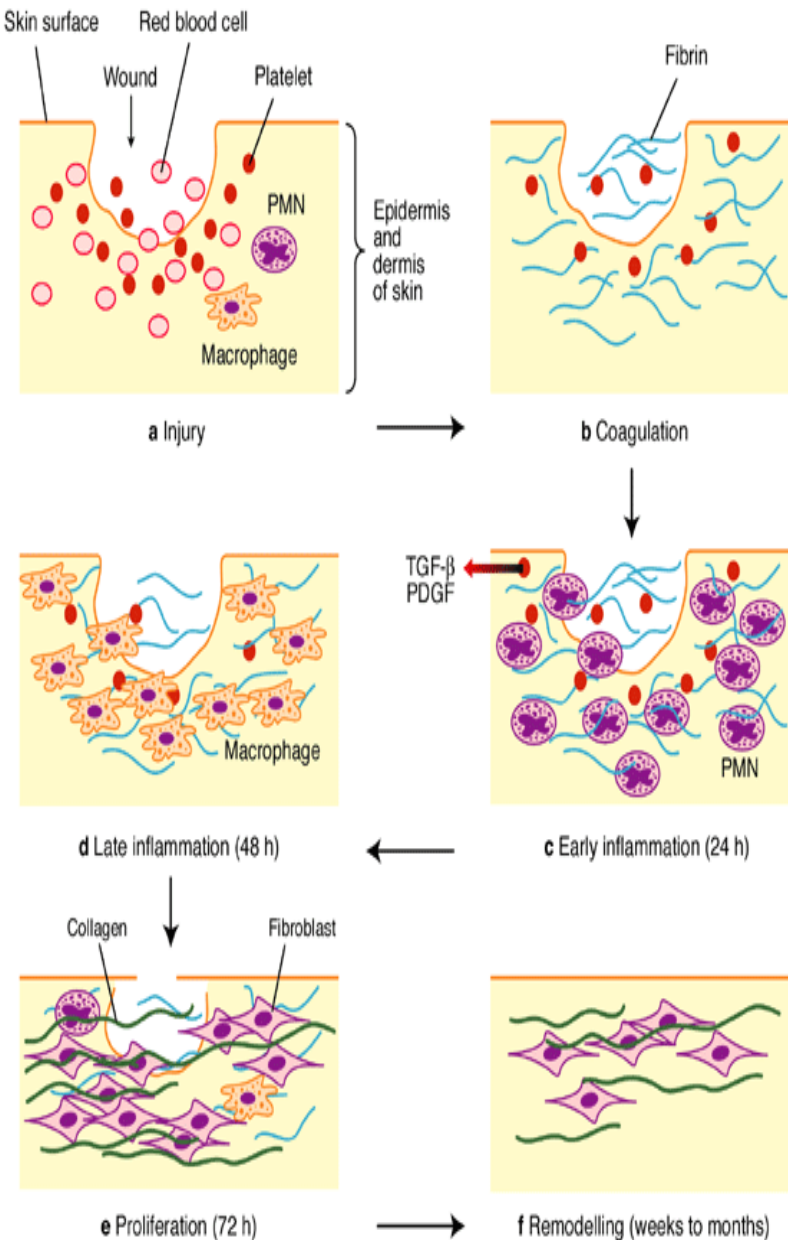
- 4-6 gün

○ Proliferasyon fazı

- 2-3 hafta

○ Matürasyon (remodeling) fazı

- 3 hafta-2 yıl



The phases of cutaneous wound healing

İnflamasyon fazı

(Metabolitler toplanır, 1-6 gün)

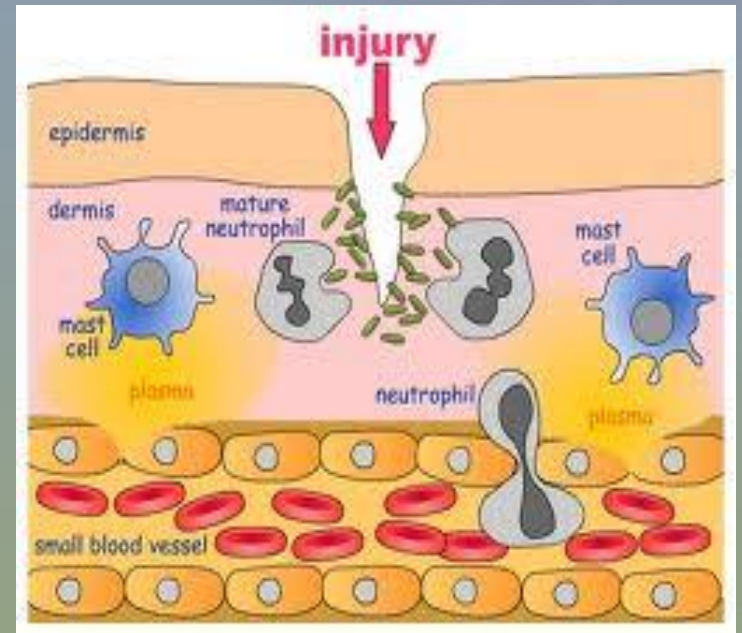
Erken dönem (hemostaz)

Platelet

Geç dönem (fagositoz)

Makrofaj

Yaralanma anında başlar



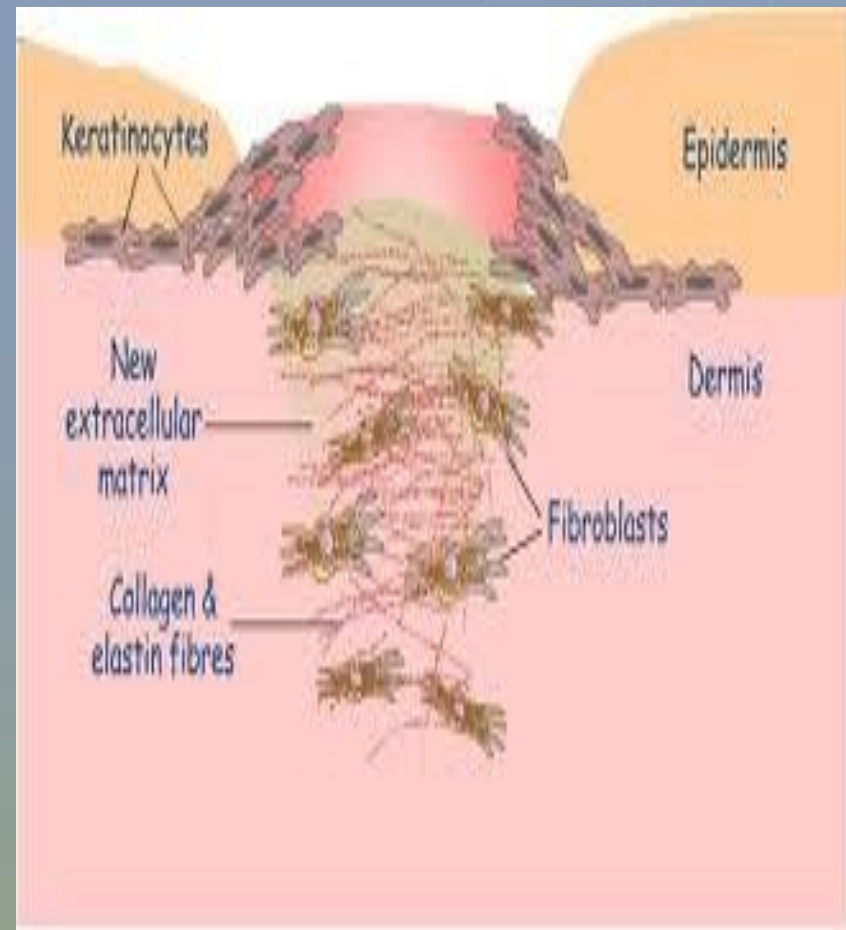
Kızarıklık, şişlik, sıcaklık,
ağrı, fonksiyon kaybı

Proliferasyon fazı

(Angioplazi & Fibroplazi, 6-14 gün)

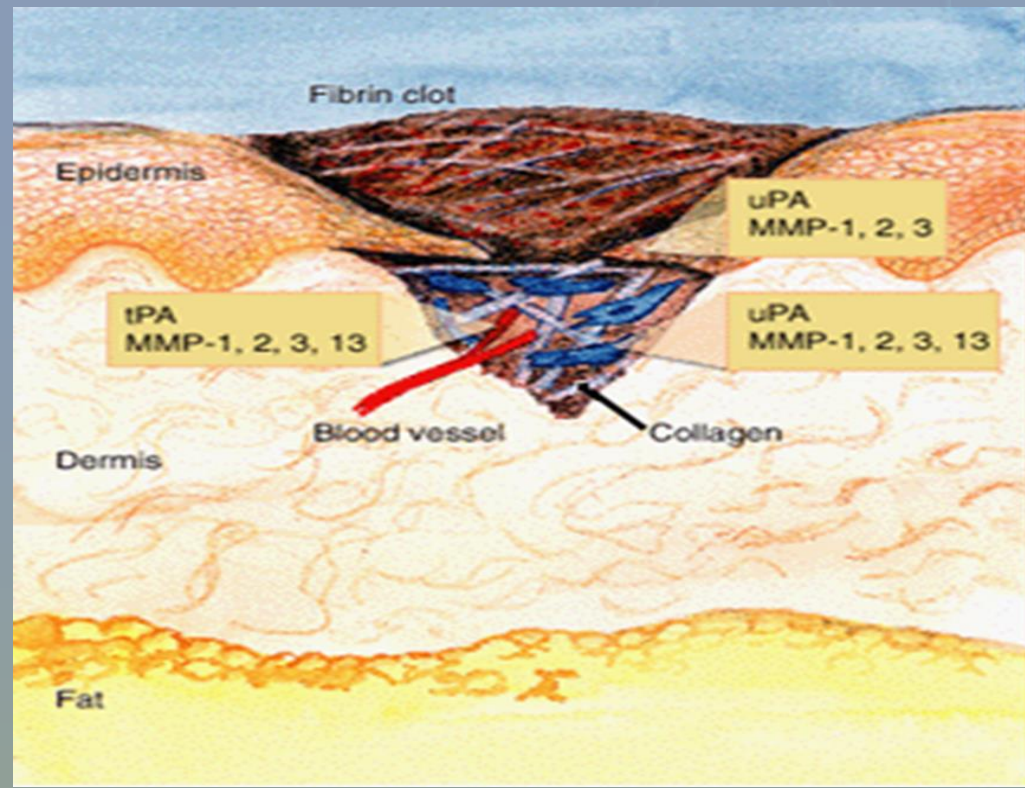
Fibroblast

- Kollajen sentezi
- Angiogenez
- Epitelizasyon
- Doku kuvveti dereceli olarak artar
- Beslenme önemli



Maturasyon fazı

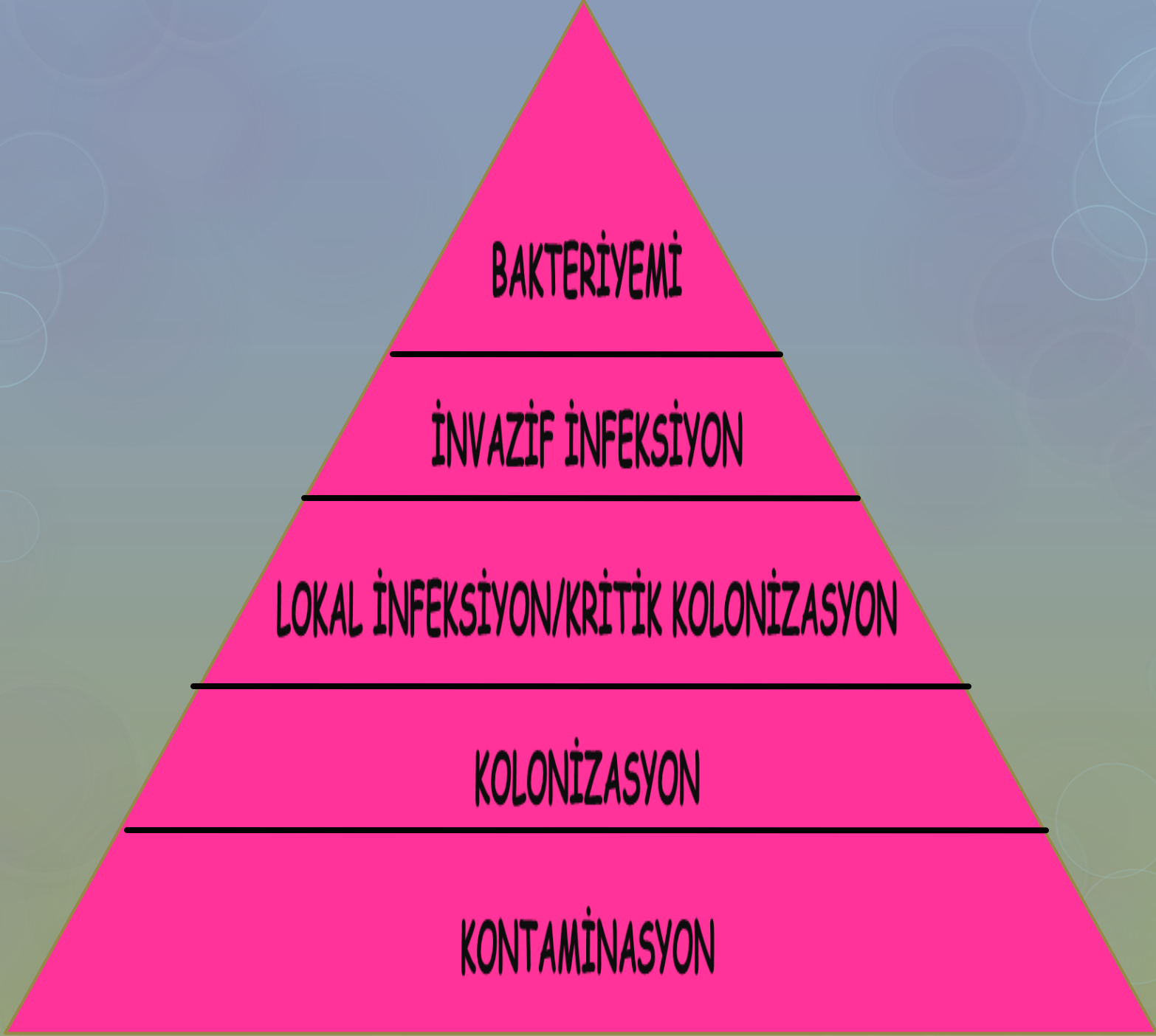
(Remodelling, 14-21 gün)



- Kollajen çapraz bağlarla şekillenir
- Doku kuvveti daha da artar
- Normal kuvvetin %80' i
- 2 yıla kadar sürebilir

Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

- **İnfeksiyon**
- İskemi (Sigara, **DM**, Şok, Anemi)
- Malnütrisyon, dehidratasyon
- Yaş
- **DM**
- Steroidler/sitotoksik ilaçlar
- Obezite
- Bağ dokusu ve damar hastalıkları
- Üremi
- Karaciğer hastalıkları



BAKTERİYEMİ

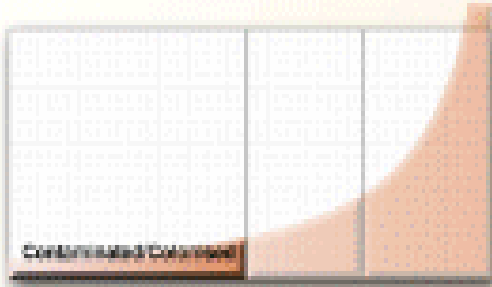
İNVAZİF İNFEKSİYON

LOKAL İNFEKSİYON/KRİTİK KOLONİZASYON

KOLONİZASYON

KONTAMİNASYON

Contaminated and colonised



- Yarada replike olmayan veya doku hasarı yapmadan replikasyon
- Endojen flora ve/veya çevre kaynaklı
- Tüm kronik yaralar kontaminedir
- Yara iyileşmesini geciktirmez



Critically colonised



- Yara yatağında bakteri yükü artmıştır
- Lokal immun yanıt artar
- Yara beklenen oranda iyileşir



Infected



- Eşlik eden konak doku hasarı ile birlikte yarada replike olan mikroorganizma varlığı
- Lokal/Sistemik konak immun yanıtıyla ilişkili
- Yarada infeksiyon bulguları (ağrı, eksuda, anormal granülasyon)





Akut yaralar

- Beklenen sürede iyileşir
- Etken geçicidir
- İyileşmeyi engelleyen faktörler az sayıdadır
- İyileşme devamlıdır

Kronik yaralar

- İyileşmeyen, yavaş iyileşen
- Etken devamlıdır
- İyileşmeyi engelleyen faktörler çok sayıdadır
- Yara iyileşse bile tekrar eder

**Diyabetik
Ayak**



Biyofilm



- 17. yy Van Leeuwenhoek
- 70' ler J.W. Costerton

- Glikokaliks matriks içinde yapışkan bakteri toplulukları
- Adezyona yol açan gen sunumu

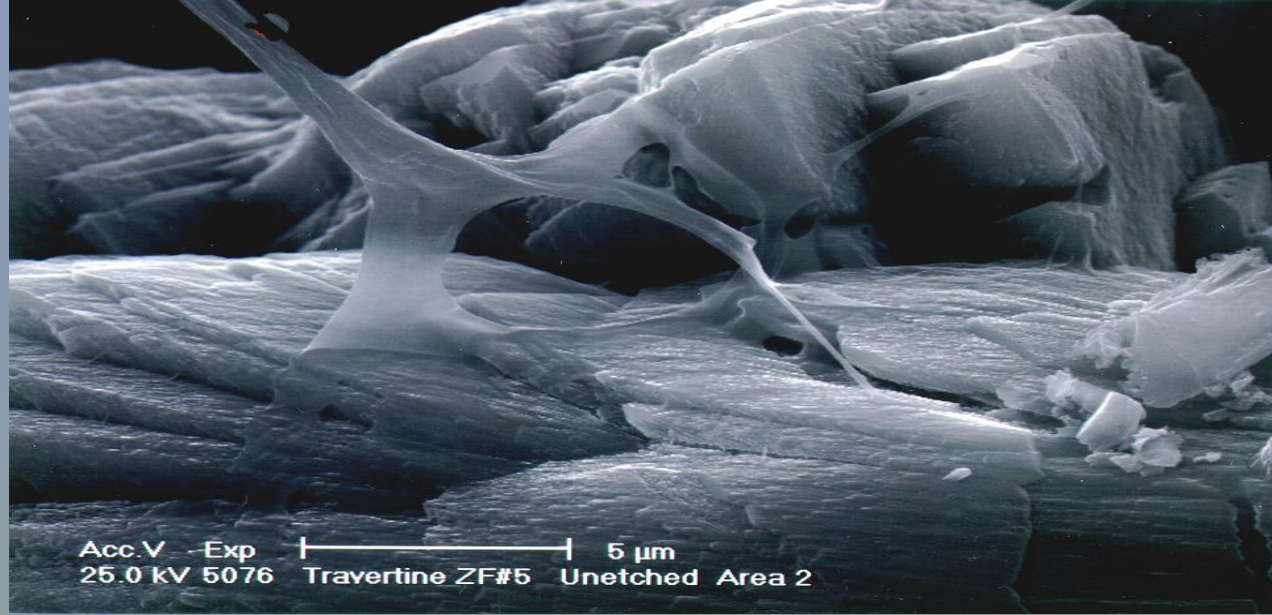


Biofilms Impact . . .



- Mikroorganizmaların birlikte yaşayabilmek ve sağ kalabilmek için oluşturduğu
- Ekstrasellüler Polimerik Madde (EPS) ile yüzeye, birbirlerine ve ara yüzeylere yapışmalarını sağlayan
- Gen transkripsiyonu ile mikroorganizmaların fenotipik değişiklikler gösterdiği

MATRİKS

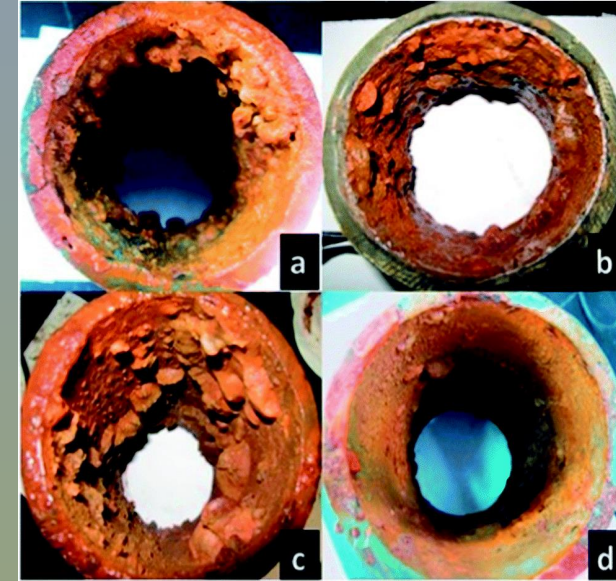


- Biyofilm farklı bakterilerin aynı ortama adapte olmasıdır (topluluk oluşturma özelliği)
 - Metabolik yükü paylaşmak
 - Gen transferi
 - Özverili davranış gibi bir dizi düzenlenebilir davranış

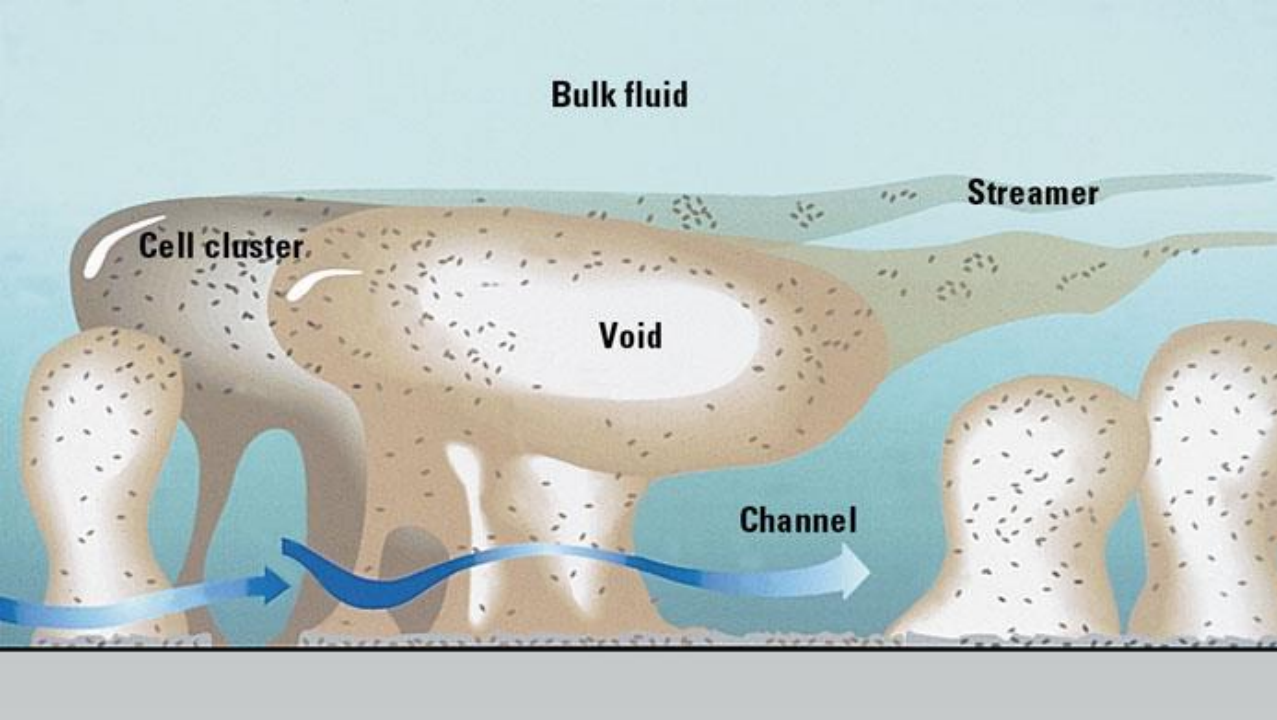


○ Mikroorganizmaların sağ kalma stratejisi

- Eski bir prokaryotik adaptasyon
- Yakındaki besinleri kullanma
- Atıkları uzaklaştırma
- Metabolik hız düzenleme
- Genetik materyal transferi



○ Çeşitli dağılma mekanizmaları ile yeni odakların kolonize olması

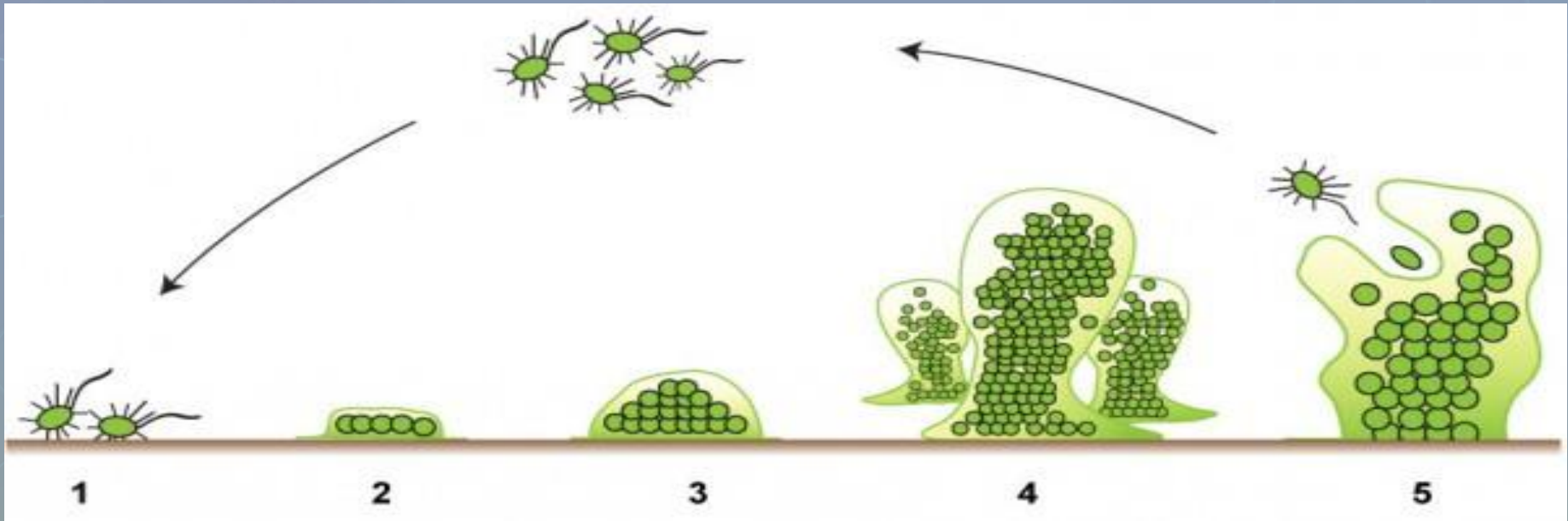


○ Olumsuz ortam >> Biyofilm

- Pürüzlü yüzeyler, besin noksanlığı, O_2 radikalleri, ısı, pH
- Dayanıklı, viskozite
- Kullanılabilir kaynaklar

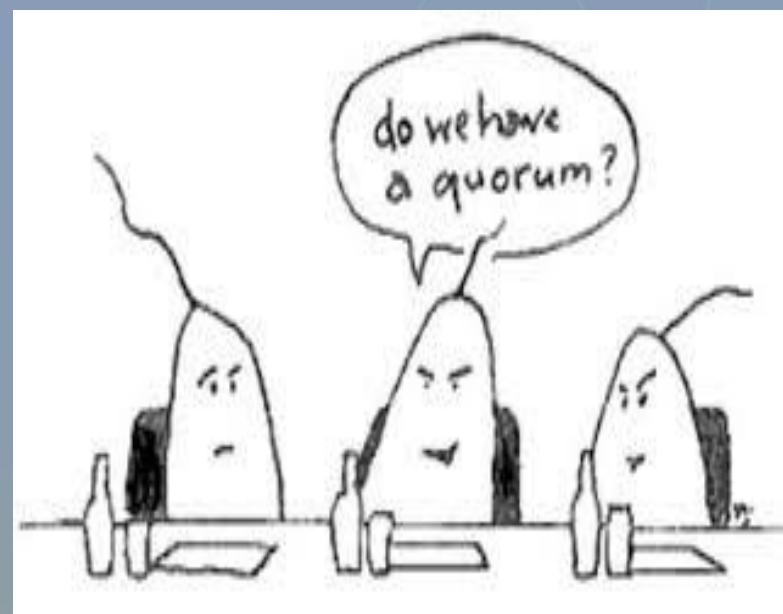
Dişabet

glukoz >> Biyofilm



1. Tutunma (adezyon)
2. İrreversibl bağlanma
3. Mikrokoloni
4. Matür biyofilm
5. Biyofilmden kopma (planktonik form)

Quorum Sensing (Çoğunluğu Algılama)



- Birlikte davranabilme / yaşayabilme

- Üreme hızı, toksin oluşumu, iletişim, invazyon

- Sinyal moleküller (autoinducer)

- Acyl-homoserine lactones (AHLs)
- Autoinducer peptides (AIPs)
- Autoinducer-2 (AI-2)



Microreview

Evolving concepts in biofilm infections

Luanne Hall-Stoodley^{1,2*} and Paul Stoodley^{1,2}

¹Center for Genomic Sciences, Allegheny-Singer Research Institute, Pittsburgh, PA 15212, USA.

²Department of Microbiology and Immunology, Drexel University College of Medicine, Allegheny Campus, Pittsburgh, PA 15212, USA.

growth that allows bacteria to survive in hostile environments and to colonize new niches by various dispersal mechanisms (Hall-Stoodley and Stoodley, 2005; Purevdorj-Gage *et al.*, 2005; Mai-Prochnow *et al.*, 2008). Biofilm bacteria demonstrate coordinated behaviour with the formation of complex three-dimensional structures (Fig. 1) and functionally heterogeneous bacterial commu-

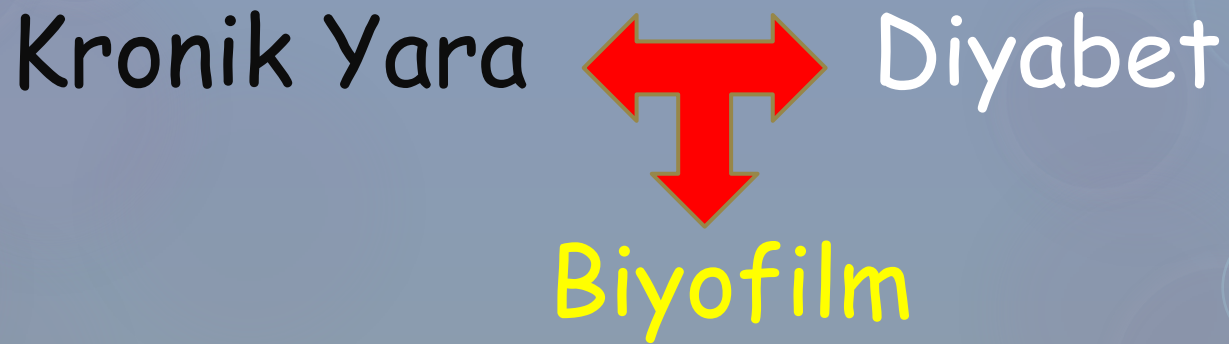
- Yabancı cisim infeksiyonları
 - Kateter, greft, pacemaker, protez kalp kapağı, kontakt lens, ortopedik protez.....
- Kistik fibrozis
- Kronik yara / Diyabetik ayak / Osteomyelit



Biyofilm İnfeksiyonları Tanı Kriterleri (Parsek - Singh Kriterleri)

- Yüzeyle ilişkili patojenik bakteriler
- İnfekte doku >> matriks kaplı hücre kümesi (mikrobiyal agregat)
- Lokalize infeksiyon
- Antibiyotiklere duyarlı planktonik bakteriler >> tedavi yanıtsızlığı
- Negatif kültür sonucu >> klinik infeksiyon
- Konağın farklı dokularında bakteriyel mikrokoloniler >> yetersiz klirens





○ Polimikrobiyal ilişkiler yara iyileşmesinde rol oynar

- ≥ 4 bakteri yara iyileşmesini olumsuz etkiler
- Polimikrobiyal biyofilmde virulans faktörleri sinerjistik (QS molekülleri)
- Hiperglisemi mikroorganizmaların virulansını $\uparrow$

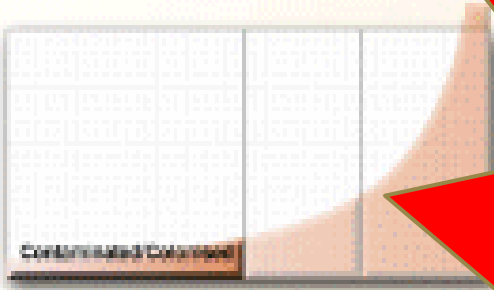
Kronik Yara ↔ Diyabet

Biyofilm

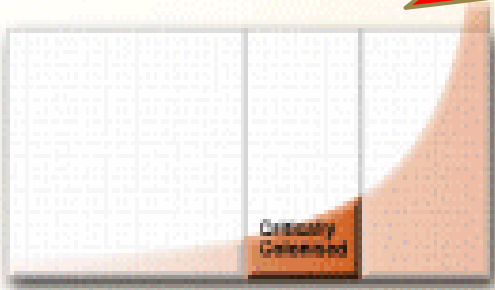
○ Kronik yaralar proteinleri (kollajen, fibronektin) ve hasarlı doku gibi bağlanmayı sağlayan özellikleri ile biyofilm oluşumu için ideal koşullar sağlar

- Biyofilm oluşumunun ilk basamağı
- Kronik yaraların % 60'ı akut yaraların % 6' sı biyofilm içerir*
- Glukozun bakteri tarafından kullanılması biyofilm oluşumunu ↑ (EPS ekspresyonu, ica düzenlenmesi)

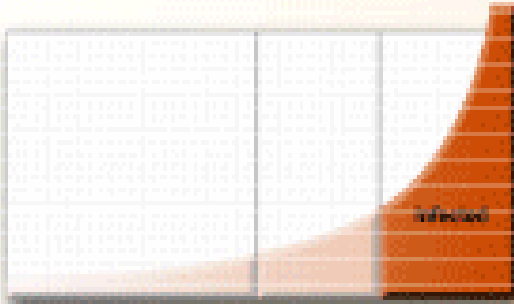
Contaminated and colonised



Critically colonised



Infected



- Yarada replike olan mikroorganizma varlığından dolayı yara iyileşir ve yeni doku hasarı olmadan replike olur

Nemli yüzey

Biyofilm

Kronik kolonizasyon

- Yarada replike olan mikroorganizma varlığından dolayı yara iyileşir ve yeni doku hasarı olmadan replike olur
- Lokal/sistemik konak immün yanıtı ile ilişkili
- Yara iyileşen durumda iyileşir

- Eşlik eden konak doku hasarı ile birlikte yarada replike olan mikroorganizma varlığı
- Lokal/Sistemik konak immün yanıtıyla ilişkili
- Yarada infeksiyon bulguları (ağrı, eksuda, anormal granülasyon)



Kronik Yara ↔ Diyabet

Biyofilm

- Kronik yarada dokuda persiste eden bakteriler granülasyon dokusunu ↑, anjiogenesisi ↑, PNL ve monosit ↑, kollajen formasyonu ↑
 - Glikoz ↑ olması lökosit adezyonunu ↓, lökosit mobilizasyonu yavaştır
 - Diyabette kemotaktik faktörler ↓, nötrofil ve monosit kemotaksisi ↓
 - Kompleman 3 (C3) nonenzimatik glikolizasyonuna bağlı fagositer hücre opsonizasyonu bozuk
 - Diyabette poliyol yolu kullanıldığı için NADPH tükenir, oksijen bağımlı öldürme bozulur
 - Diyabette kapiller BM kalınlaşır, lökosit geçişi ↓, lökositlere enerji için insülin ve glukoz ulaşamaz

Kronik Yara Diyabet

Biyofilm

- Kronik yarada dokuda persiste eden bakteriler granülasyon dokusunu ↑, anjiogenesisi ↑, PNL ve monosit ↑, kollajen formasyonu ↑
 - EPS makrofaj opsonizasyonundan korur
 - QS sinyal moleküllerine bağlı üretilen virulans faktörleri PNL fagositik aktivitesine karşı koruyucudur
 - Fagositik hücrelerin biyofilme penetrasyonu ↓ (EPS bariyeri, bakteri ürünleri)
 - Nötrofiller biyofilm içindeki bakteriyi öldüremez, ancak salgıladıkları proinflamatuvar sitokinler kronik inflamasyona neden olur

Kronik Yara ↔ Diyabet

Biyofilm

Biyofilm
oluşturur

○ Kronik yarada görülen etkenlerin % 70' i
Pseudomonas ve Stafilokoklardır*

- Diyabette özellikle deride *S.aureus* ve *C.albicans* taşıyıcılığı ↑
- Diyabette bazı bakteriyel antijenlere (*S.aureus*) karşı antikor yanıtı ↓
- *P.aeruginosa* ve *E.coli* gibi Gram negatif bakterilerin ürettiği lipopolisakkarit, QS moleküllerinin etkisiyle yara iyileşmesinin proliferasyon aşamasında keratinosit inhibisyonuna neden olur*

*Hill K.E. et.al. J. Med. Microbiol. 2003;52:365-69

Devies C.E. et.al.Wound Repair Regen 2001;9:332-40

*Loryman C. et.al. Wound Repair Regen 2008, 16(1):45-51.

Bozuk / Yetersiz konak yanıtı



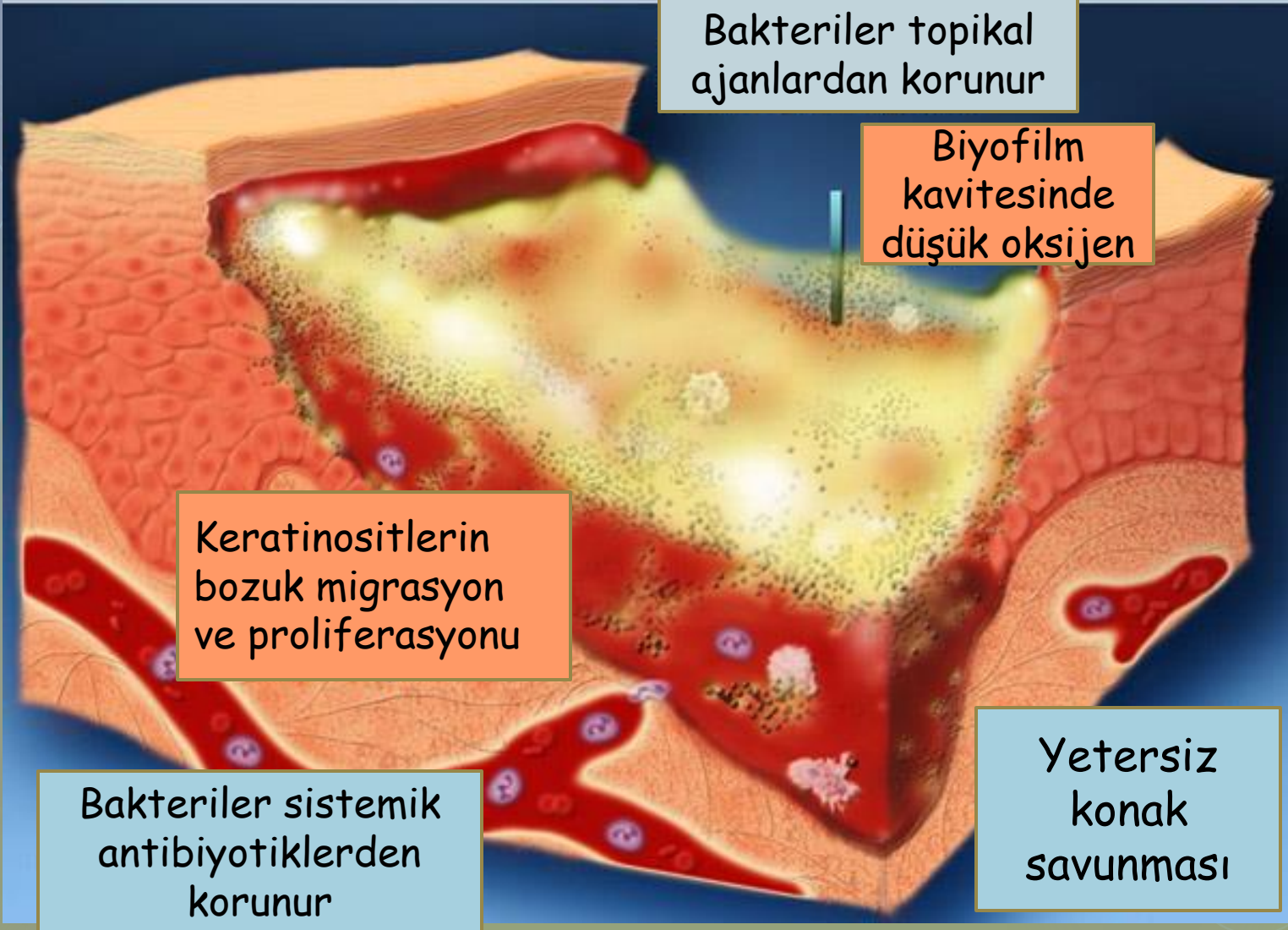
Biyofilm

Kronik
inflamatuvar
faz

İyileşmeyen yaralar

- uzamış inflamasyon
- yetersiz re-epitelizasyon
- bozuk matriks şekillenmesi

Bakteriyal Biofilm Yara İyileşmesinde En Büyük Engeldir



Pseudomonas aeruginosa

○ Aljinik asit üretimi

- yüksek ozmolarite
- yüksek oksijen basıncı
- etanol maruziyeti
- azot sınırlaması

Hiperglisemi
Sorbitol
etkisi

○ Glukozun bakteriyi gerilim oluşturan güçlerden ve inflamatuvar hücrelerin fagositozundan korur

nilabilir
presyonu

arını arttırır

Pseudomonas aeruginosa

- Polimorf nüveli nötrofiller (PMN) >> biyofilmde EPS matriks içinde immobilizedir
- PMN lerin varlığı, *Pseudomonas aeruginosa* biyofilminin gelişimini artırır

Staphylococcus aureus

- Glikokaliks veya yapışkan matriks tabakası içinde gömülü çok katmanlı biyofilm
- Polisakkarid İntersellüler Adezin (PIA) >> spesifik polisakkarid antijen >> intersellüler adezyon (ica) gen bölgesi
 - Glikoz, etanol, ozmolarite, sıcaklık, oksijen düzeyleri ve tetrasiklin gibi antibiyotikler >> ica düzenlenmesi

Biyofilmi Önlemek/Azaltmak

- Bakteriyel bağlanmanın önlenmesi
- Topikal antimikrobiyal penetrasyonunu arttırmak için biyofilmi hasarlamak
- Quorum sensing inhibitörleri
- Bakterinin biyofilmden ayrılmasını sağlamak

Davis SC et.al. Curr Diab Rep 2006 Dec;6(6): 439-45

Antibiyofilm Ajanlar



○Laktoferrin

- Demir bağlayan antimikrobiyal protein
- Antibiyotik kombinasyonları içinde daha etkili

○Gallium

- Demir bağlayıcı
- Biyofilm oluşumunu önler, in vitro biyofilmi öldürür

Antibiyofilm Ajanlar

○ Xylitol

- Dental plak (biyofilm)



○ Dispersin B

Quorum Sensing İnhibitörleri

- RNA III inhibitör peptid

- Agr sistemi / Gram pozitif

- Furonlar

- AHL / Gram negatif (*Pseudomonas* spp)

- Tobramisin / Bizmut

- Sinerjistik aktivite
 - Liposomal formülasyon

Quorum Sensing İnhibitörleri

○ Sarımsak



○ Bal



Alternatif Tedaviler

○ Ultrason debritmanı

- Quarum sensing' e zarar verir
- Koordineli virulansı azaltır
- Breakthrough !!

Güncel Tedavi

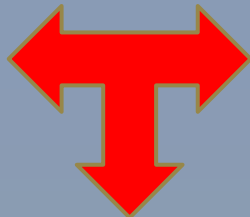
○ Debritman, Debritman, Debritman

○ Biyosidler

○ Antiseptikler

- Nonspesifik (Hipokloröz asid, peroksid, iyodin vb)
- Spesifik (iyonik Ag^+ , cadexomer iodine)

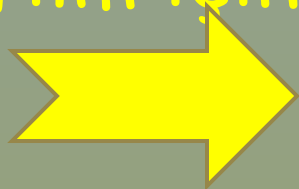
○ Antibiyotik

Kronik Yara  Diyabet

Biyofilm

○ Diyabette mikroanjiyopatiye bağlı antibiyotik emilimi bozulmuştur.

○ Yara bakterilerinin ürettiği eksotoksin doku nekrozunu ↑, damar oklüzyonu ile lokal hipoksi

○ Antibiyotiklerin biyofilme penetrasyon güçlüğü ve biyofilm içindeki bakterilerin düşük metabolik hızı  ANTİBİYOTİK ????

○ İmipenemin sub-lethal konsantrasyonlarının *P.aeruginosa*' da biyofilm oluşumunu arttırdığı saptanmış

- Bagge N et.al. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48(4):1175-1187.

○ Aminoglikozidlerin sub-inhibitör konsantrasyonlarının *P.aeruginosa* ve *E.coli*' de biyofilm oluşumunu indüklediği gösterilmiştir

- Hoffmann N et.al. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51(10):3677-3687.

○ Makrolid kombinasyonları fagositlerin biyofilm içine invazyonunu arttırabilir

○ Eritromisin, biyofilm formasyonunda inhibitör rol oynar

- Mitsua Y. et.al. J. Infect. Chemother. 2000; 6: 45-50
- Yamasaki O. et. al. J. Antimicrob. Chemother. 2001; 48: 573-577

Wound Biofilm Center



**Phil
Fleckman,
MD**

**John
Olerud, MD**

**Phil
Stewart**

**Garth
James**

**Randy
Wolcott,
MD**

BACTERIALITY

Exploring Chronic Disease

[About Bacteriality](#)[About the Marshall Protocol](#)[NEWS FLASH \(archives\)](#)

13
APR
2008

Interview with Dr. Randall Wolcott, bacterial biofilm wound specialist

Author: Amy Proal

 [Print](#)  [Email](#)

Patients with diabetic neuropathy may not notice minor injuries due to loss of feeling in their lower extremities. Since the Vitamin D Receptor is inactivated by bacterial ligands, a small cut or sore can become infected, and flare into a limb- or life-threatening condition in as little as three days. These wounds are so difficult to heal that most of medicine considers them a lost cause and treats them with amputation. Amputations are often considered to be the beginning of the end for patients with diabetes.

70% of diabetics who undergo an amputation die within five years due to the stress placed on their hearts from their altered circulatory system. During those five years they are likely to have more amputations and to rate their quality of life worse than cancer patients, according to some studies.



NEWS FLASH

- **April 4, 2009:** Milk consumption tied to Parkinson's disease
- **March 21, 2009:** Hey there, how's your Kineosphaeram holding up?

Peer-Reviewed Papers

- Autoimmune disease in the era of the metagenome (PDF)
- Vitamin D: the alternative hypothesis (PDF)
- Dysregulation of the Vitamin D Nuclear Receptor may contribute to the higher prevalence of some autoimmune diseases in women (PDF)
- Vitamin D metabolites as clinical markers in autoimmune and chronic disease (PDF)

Amy's Conference Presentations

Güncel Tedavi

○ Debritman, Debritman, Debritman

○ SABIR

○ İNAT





TEŞEKKÜR EDERİM