

Gdański Uniwersytet Medyczny

Wioletta Barańska-Rybak

ANALIZA SZCZEPÓW STAPHYLOCOCCUS AUREUS IZOLOWANYCH
OD PACJENTÓW Z WYBRANYMI CHOROBYMI SKÓRY W ASPEKCIE
ICH WŁAŚCIWOŚCI GENETYCZNYCH I WRAŻLIWOŚCI NA
KLASYCZNE ANTIBIOTYKI ORAZ PEPTYDY
PRZECIWDROBNOUSTROJOWE

Rozprawa habilitacyjna

Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. Jadwiga Roszkiewicz

Gdańsk 2011

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Wydawca: Gdański Uniwersytet Medyczny
Druk: Dział Wydawnictw GUMed
Gdańsk, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a
Zlecenie KW/254/11

PODZIĘKOWANIA

Pani Profesor Jadwidze Roszkiewicz wyrażam wdzięczność za stworzenie mi warunków do pracy naukowej i klinicznej oraz za zapewnienie swobody realizacji moich pasji naukowych.

Panu Profesorowi Wojciechowi Kamyszowi dziękuję za udostępnienie profesjonalnego laboratorium i pomoc w wykonywaniu badań.

Spis treści

WYKAZ PRAC BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ	7
WYKAZ SKRÓTÓW	8
1. WSTĘP.....	11
2. CELE PRACY	16
3. MATERIAŁY I METODY	17
3.1. Pozyskiwanie szczepów <i>S. aureus</i>	17
3.2. Metody genetyczne wykorzystane w identyfikacji szczepów <i>S. aureus</i>	17
3.2.1. Izolacja DNA bakteryjnego i technika ADSRRS – <i>fingerprinting</i>	17
3.2.2. Technika PCR MP.....	19
3.2.3. Wykrywanie genów toksyn SEA-D, TSST-1 , ETA, ETB przy pomocy Multiplex PCR.....	19
3.3. Ocena wrażliwości szczepów <i>S. aureus</i> na klasyczne antybiotyki	20
3.3.1. Metoda dyfuzyjno-krażkowa w agarze	20
3.3.2. MIC – metoda oznaczania minimalnego stężenia hamującego	21
3.4. Badania nad peptydami	21
3.4.1. Otrzymywanie związków peptydowych	21
3.4.2. Technika radiodyfuzji	22
3.4.3. CFU - metoda jednostek tworzących kolonie	23
3.4.4. MIC dla wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych	23
3.4.5. Technika frakcjonowanych stężeń hamujących.....	24
3.5. Badania wpływu różnych czynników na aktywność przeciwbakteryjną ludzkiej katelicydyny LL-37	24
3.5.1. Izolaty bakteryjne	25
3.5.2. Technika radiodyfuzji	25
3.5.3. Metoda oznaczania glikozaminoglikanów	25
3.5.4. Ocena zawartości protein	25
3.5.5. Oznaczanie wiązania polisacharydów.....	26
3.5.6. Metody statystyczne	26
4. WYNIKI.....	26

4.1. Badania właściwości genetycznych szczepów <i>S. aureus</i>	26
4.1.1. Wykorzystanie technik ADSRRS-fingerprinting i PCR MP w badaniach nad genetycznym zróżnicowaniem szczepów <i>S. aureus</i> w czyraczności nawrotowej	26
4.1.2. Dominacja genu <i>agr</i> wśród szczepów <i>S.aureus</i> wywołujących czyraczność nawrotową.....	28
4.1.3. Identyfikacja superantygenów wydzielanych przez szczepy <i>S. aureus</i> izolowane od chorych z erytrodemią	29
4.2. Czynniki wpływające na aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych.....	30
4.3. Wrażliwość na klasyczne antybiotyki i peptydy przeciwdrobnoustrojowe szczepów <i>S. aureus</i> izolowanych od chorych z wybranymi deratozami	31
4.3.1. Badania wrażliwości na antybiotyki, naturalne ludzkie peptydy i białka przeciwdrobnoustrojowe : LL-37, Hbd3, laktoferrynę i lizozym	31
4.3.2. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych i klasycznych antybiotyków w stosunku do wydzielających superantygeny szczepów <i>S. aureus</i> izolowanych od pacjentów z erytrodemią na podłożu zapalnym i nowotworowym.....	32
4.3.3. Badanie aktywności mikrobiologicznej krótkich lipopeptydów wobec klinicznych szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> w aspekcie potencjalnych zastosowań terapeutycznych	33
5. DYSKUSJA	34
6. WNIOSKI	41
7. PIŚMIENNICTWO.....	42
8. PRACE BĘDĄCE PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ.....	53

WYKAZ PRAC BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY HABILITACYJNEJ

1. Barańska-Rybak W., Sonesson A., Nowicki R., Schmidtchen A. Glycosaminoglycans inhibit the antibacterial activity of LL-37 in biological fluids. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57, 260-265. [IF 3,891]
2. Krawczyk B., Leibner J., Barańska-Rybak W., Samet A., Nowicki R., Kur J., ADSRRS-fingerprinting and PCR MP techniques for studies of intraspecies genetic relatedness in *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Meth.* 2007; 71, 114-122. [IF 2,153]
3. Barańska-Rybak W., Nowicki R., Sokołowska-Wojdyło M., Michajłowski I., Starzyńska A., Maciejewska K., Drogoszewska B., Gawrońska-Skorkowska J., Włodarkiewicz A., Identification of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the patients with recurrent furunculosis by ADSRRS-fingerprinting PCR. *Pol. J. Environ. Study* 2009; 18, (1A), 160-163. [IF 0,947]
4. Barańska-Rybak W., Nowicki R., Sokołowska-Wojdyło M., Michajłowski I., Starzyńska A., Maciejewska K., Drogoszewska B., Włodarkiewicz A. The potential role of antimicrobial peptides in recurrent furunculosis. *Pol. J. Environ. Study* 2009; 18, (1A), 179-183. [IF 0,947]
5. Barańska-Rybak W., Sokołowska-Wojdyło M., Trzeciak M., Michajłowski I., Maciejewska-Radomska A., Nowicki R., Roszkiewicz J. Rola superantygenów bakteryjnych w chorobach skóry. *Przegl. Dermatol.* 2009; 96, 4, 301-304.
6. Garbacz K., Piechowicz L., Barańska-Rybak W., Dąbrowska-Szponar M. *Staphylococcus aureus* isolated from patients with recurrent furunculosis carrying Pantone-Valentine leukocidin genes represent *agr* specificity group IV. *Eur. J. Dermatol.* 2011; 21 (1): 43-46.[IF 2,251]
7. Barańska-Rybak W., Cirioni O., Dawgul M., Sokołowska-Wojdyło M., Naumiuk Ł., Szczerkowska-Dobosz A., Nowicki R., Roszkiewicz J., Kamysz W. Activity of antimicrobial peptides and classic antibiotics against superantigen positive *Staphylococcus aureus* isolated from the patients with neoplastic and inflammatory erythrodermia. *Chemother. Res. Practice* 2011;art. nr 270932, [6 s.].
8. Dawgul M., Barańska-Rybak W., Greber K., Guzik Ł., Kamysz W., Łukasiak J. Aktywność mikrobiologiczna krótkich lipopeptydów wobec klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus*. *Alergia, Astma, Immunol* 2011; 16(1): 31-36.

WYKAZ SKRÓTÓW

ADSRRS-fingerprinting - *Amplification of DNA fragments Surrounding Rare Restriction Sites* / amplifikacja fragmentów restrykcyjnych DNA

Agr - *Accesory gene regulator*

AMPs - *antimicrobial peptides* / peptydy przeciwdrobnoustrojowe)

AZS - atopowe zapalenie skóry

CF - *clumping factor*/ czynnik zlepiający

CFU - *Colony Forming Units*/ jednostki tworzące kolonie

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*/ Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych

CTCL - *Cutaneous T-cell Lymphoma*/ Chłoniaki Pierwotnie Skórne z komórek T

DIC - diizopropylokarbamid

DMF/DCM - Dimetyloformamid/Dichlorometan

DMSO - dimetylosulfotlenek

FIC - *Fractional Inhibitory Concentration*/ frakcjonowane stężenie hamujące

GAGs - *Glycosaminoglicans*/glikozaminoglikany

hBD3 - *human beta defensin 3*/ ludzka beta defensyna 3

HOBt - 1-hydroksybenzotriazol

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*/ wysokosprawna chromatografia cieczowa

LL- 37 - ludzka katelicydyna – peptyd przeciwdrobnoustrojowy złożony z 37 aminokwasów

MBC - *minimal bactericidal concentration*/ minimalne stężenie bakteriobójcze

MHB- bulion Muller-Hintona

MIC - *minimal inhibitory concentration*/ minimalne stężenie hamujące

MLSB - oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B

MRSA - *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*/
oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*

MSSA - *Methicillin Susceptible Staphylococcus aureus*/
wrażliwy na metycylinę *Staphylococcus aureus*

PCR - *polymerase chain reaction*/ polimerazowa reakcja łańcuchowa

PFGE - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*/ elektroforeza pulsacyjna fragmentów restrykcyjnych

PVL - *Panton-Valentine Leukocidin*/ leukocydyna Panton-Valentina

RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*/ technika PCR umożliwiająca wykrycie polimorfizmu genetycznego mikroorganizmów

RDA - *Radial Diffusion Assay*/technika radiodyfuzji

RPM - *Rotation Per Minute*/ ilość obrotów na minutę

SEA-D - *Staphylococcal Enterotoxins A-D*/ gronkowcowe enterotoksyny A-D

SupAg - *Superantigens*/ superantygeny

SS - *Szary Syndrome*/ Zespół Sezaryego

TCR - *T-cell Receptor*/receptor limfocytów T

TSST-1 - *Toxic Shock Syndrome Toxin-1*/Toksyna Wstrząsu Septycznego 1

ŹRÓDŁA FINANSOWANIA PRACY

Praca W-149 Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego realizowana w latach 2006-2008 pt. „Rola superantygenów *Staphylococcus aureus* w erytrodermiach o podłożu nowotworowym (chłoniaki pierwotnie skórne z komórek T, zespół Sezaryego) i zapalnym (atopowe zapalenie skóry, łuszczyca, inne)”. Kierownik projektu: dr n. med. Wioletta Barańska-Rybak.

Grant MNiSW nr NN402 195235 (G-809) w latach 2008-2011 o charakterze projektu badawczego własnego pt. „Rola superantygenów *Staphylococcus aureus* w erytrodermiach o podłożu nowotworowym (chłoniaki pierwotnie skórne z komórek T) i zapalnym (atopowe zapalenie skóry, łuszczyca, inne). Udział w projekcie: główny wykonawca. Kierownik projektu: prof. dr hab. med. Jadwigi Roszkiewicz

Grant MNiSW nr NN 405 6278 38 (G-79) w latach 2010-2012 o charakterze projektu badawczego własnego pt. „Badanie aktywności i toksyczności wybranych antybiotyków peptydowych pod kątem ich zastosowania w gronkowcowych zakażeniach skórnych”. Kierownik projektu: dr n. med. Wioletta Barańska-Rybak

1. WSTĘP

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) jest poważnym czynnikiem infekcyjnym dla człowieka i jednym z pierwszych zidentyfikowanych patogenów bakteryjnych w historii. Pierwszy opis gronkowca złocistego jako czynnika chorobotwórczego wyizolowanego z wydzieliny ropnej został sporządzony przez Aleksandra Ogstona 130 lat temu [72, 91]. *S. aureus* jest uznany za jeden z wiodących patogenów odpowiedzialnych za schorzenia układu oddechowego, skóry i tkanek miękkich oraz kości na wszystkich kontynentach [37]. Odpowiedzialny jest zarówno za schorzenia nabywane w warunkach poza szpitalnych jak i szpitalnych. Oszacowano, że w Stanach Zjednoczonych na infekcje gronkowcowe rocznie zapada ok. pół miliona osób, a koszt ich leczenia w 2003 roku wyniósł 14 bilionów dolarów [59, 76]. *S. aureus* może stanowić bezobjawowy element kolonizujący przedsionek nosa u 30% populacji nie wywołując żadnej infekcji [50]. W warunkach sprzyjających zaś posiada unikalną zdolność wywoływania szerokiego spektrum schorzeń i objawów począwszy od zakażeń skóry i tkanek miękkich, infekcji pokarmowych, wstrząsu toksycznego, poprzez bakteriemie, posocznice, zapalenia wsierdza, kości czy martwicze zapalenia powięzi oraz zapalenia płuc. Charakterystyczna budowa ściany komórkowej, obejmująca kompleksy białkowo-cukrowe, kwas teichowy i białko A oraz duża ilość enzymów i toksyn wydzielanych przez poszczególne szczepy gronkowcowe czyni je niezwykle patogennymi [44]. Na przestrzeni ostatnich 70 lat zaobserwowano dynamiczną ewolucję gatunku *S. aureus* w kierunku rozwinięcia wysoce patogennych i opornych na antybiotyki szczepów. Stanowi to istotny problem w aspekcie aktualnych możliwości terapeutycznych [36, 81]. Szczególnie alarmujące jest narastanie w warunkach ambulatoryjnych infekcji wywoływanych przez oporne na metycylinę szczepy *S. aureus* (MRSA) [35].

Gronkowcowe infekcje skóry można podzielić na powierzchowne (liszajec pęcherzowy, zakażone zadrapania czy otarcia, zapalenie mieszków włosowych) oraz głębokie (ropień, fi-gówka, czyraczność, *cellulitis* czy zakażone owrzodzenia i rany) [70]. Typową cechą gronkowcowych chorób skóry i tkanek miękkich jest nawrotowość, która dotyczy 30% pacjentów. Zarówno obserwacje kliniczne jak i badania na zwierzętach wykazały, że schorzenia wywoływane przez *S. aureus* nie powodują wytworzenia ochronnej odpowiedzi immunologicznej [58, 85]. W wyniku zakażenia *S. aureus* uruchamia kilka mechanizmów inaktywujących komórki układu immunologicznego poprzez hamowanie rekrutacji leukocytów [44]. Enzymy (hemolizyny, leukotoksyny, leukocydyny, lipazy czy proteinazy) i toksyny gronkowcowe

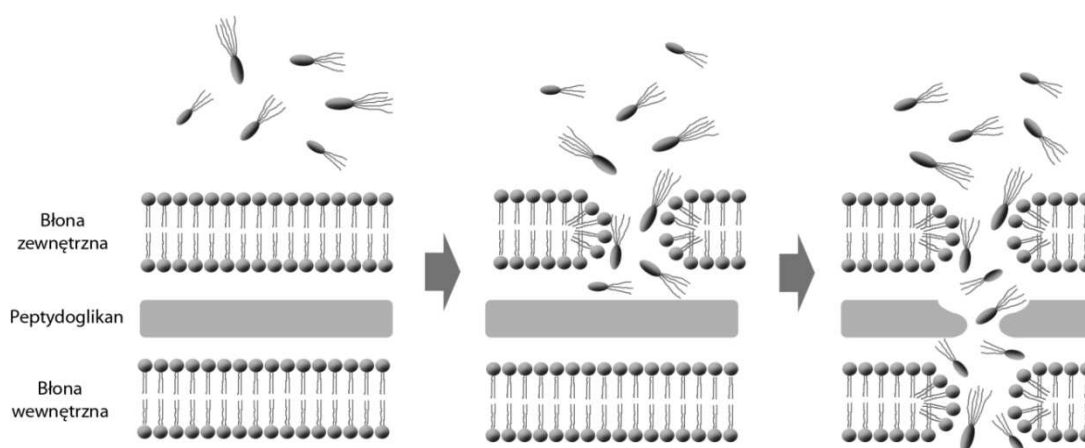
($\alpha - \gamma$, epidermolityczna, wstrząsu toksycznego) są odpowiedzialne za uszkodzenie komórek gospodarza i rozwój infekcji [44]. Wiadomo, że liszajec pęcherzowy jest wywoływany przez szczepy *S. aureus* produkujące eksfoliatynę i stanowi zlokalizowaną postać zapalenia pęcherzowego i złuszczonego skóry, natomiast w czyracznosci stwierdzono ekspresję genu *agr* grupy IV oraz genu dla leukocydyny *lukS/lukF-PV* [46]. Zarówno liczne czynniki zjadliwości jak i unikatowe zdolności szybkiego nabywania oporności na powszechnie stosowane antybiotyki determinują patogenność tego gatunku drobnoustrojów.

Wprowadzenie do leczenia penicyliny w 1940 roku zapoczątkowało tzw. „erę antybiotykową”, niemniej jednak już od 1942 roku coraz więcej pisano o oporności gronkowców na ten antybiotyk [84]. Wprowadzenie penicylin półsyntetycznych rozwiązało problem terapii infekcji gronkowcowych zaledwie do roku 1959, w którym odnotowano wysoki odsetek szczepów opornych na tę grupę antybiotyków, a sytuacja zaczęła przypominać erę przedantybiotykową [25]. Od 1961 roku zaobserwowano pojawienie się szczepów MRSA u pacjentów hospitalizowanych, czyli obarczonych wieloma czynnikami ryzyka, a od 1990 roku u pacjentów w środowisku pozaszpitalnym [11, 103]. Stale obserwuje się narastanie oporności na erytromycynę i klindamycynę wśród szczepów MSSA odpowiedzialnych za ropne infekcje skórne [77]. Zwiększa się też odsetek szczepów opornych na mupirocynę i kwas fusydowy [6]. Stwierdzono ponadto, że szczepy MRSA izolowane w warunkach pozaszpitalnych częściej niż szczepy szpitalne są wrażliwe na klindamycynę i kotrimoksazol [33]. Szczególnie interesującym jest fakt, że w 90% są one izolowane od pacjentów ze schorzeniami skóry i tkanek miękkich, głównie ropni, czyraków czy *cellulitis* z ropnym wysiękiem [57]. Najbardziej prawdopodobną przyczyną pojawienia się szczepów MRSA w warunkach pozaszpitalnych wydaje się nadużywanie antybiotyków w terapii różnych infekcji u chorych ambulatoryjnych. Co prawda szczepy te nie występują jeszcze w naszym kraju w ilościach alarmujących, niemniej jednak fakt ich pojawienia się powinien być poważnym ostrzeżeniem.

Poza gronkowcowymi chorobami skóry obecność *S. aureus* jest stwierdzana na skórze chorych z atopowym zapaleniem skóry (AZS), z czego 75-100% w obrębie zmian skórnych, a 30-50% w obrębie skóry niezmienionej [23]. Nasilonej kolonizacji bakteryjnej skóry w AZS mogą sprzyjać zarówno zaburzenia odporności humoralnej jak i komórkowej [40]. *S. aureus* stymuluje reakcje zapalne zarówno przez bezpośrednie działanie prozapalne, jak również przez alergenowe działanie szeregu czynników (np. białek ściany komórkowej oraz egzotoksyn). W surowicy chorych stwierdza się swoiste przeciwciała IgE przeciw antygenom *S. aureus* oraz jego toksynom (SEB, SEA), a poziomy tych przeciwciał korelują z zaawansowa-

niem klinicznym choroby. Dodatkowo enterotoksyny gronkowcowe wykazują działanie superantygenowe prowadząc do oligoklonalnej aktywacji 30% limfocytów T. Wykazano, że bakterie lokalizują się w powierzchownych warstwach skóry, a ich toksyny penetrują skórę właściwą i aktywują produkcję licznych cytokin prozapalnych [2]. Enterotoksyna gronkowcowa B (SEB) po aplikacji miejscowej na skórę zdrową i zmienioną w przebiegu AZS wyzwała reakcję zapalną [52, 96]. W skórze chorych z AZS stwierdza się zwiększoną ilość komórek TH2 co prowadzi do wzmożonej ekspresji uwalnianych przez nie cytokin: IL4, IL10 oraz IL13 i niskich poziomów cytokin prozapalnych (TNF- α , IFN- γ , IL1 β) [75]. Udowodniono, że IL4 i 13 hamują indukcję peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs – *Antimicrobial Peptides*), głównie HBD-2 i HBD-3 (human beta defensin 2 i 3) w keratynocytach [79]. Dodatkowo brak stymulatorów IL1 β oraz IL22 prowadzi do zmniejszonej ekspresji AMPs w skórze chorych z AZS i to zarówno HBD2 i HBD3 jak i LL-37 [109]. Analiza AMPs w skórze przy pomocy techniki mikromacierzy wykazała znacznie niższe poziomy ww. peptydów w AZS aniżeli u łuszczyca, w której wydzielane są w bardzo dużych ilościach [75, 79]. Udowodniono, że podwyższony poziom LL-37 w skórze łuszczykowej jest czynnikiem chroniącym przed zakażeniami gronkowcowymi, a obniżony w AZS predysponuje do infekcji typu liszajec zakaźny [112]. Dodatkowymi czynnikami sprzyjającymi kolonizacji *S. aureus* u pacjentów z AZS są: zasadowe pH=7-8, niski poziom ceramidów, obniżona ilość wolnych kwasów tłuszczowych polarnych lipidów powierzchniowych, a także odsłonięcie receptorów fibronektyny wiążących bakteryjne adhezyny ściany komórkowej [48].

W aspekcie narastania oporności *S.aureus* na powszechnie stosowane antybiotyki uzasadnionym wydaje się poszukiwanie nowych metod terapeutycznych opartych na AMPs. Są to struktury stanowiące naturalne składniki układu odpornościowego organizmów z królestwa Prokariota i Eucariota. Ludzki organizm wyposażony jest w ponad 20 AMPs będących integralnym składnikiem odporności wrodzonej. Mają one zdolność zabijania bakterii poprzez przenikanie i niszczenie ich błony komórkowej, inaczej niż tradycyjne antybiotyki które działają poprzez wiązanie się ze specyficzną strukturą komórkową. Brak konkretnego celu molekularnego w komórce bakteryjnej minimalizuje ryzyko rozwoju oporności, stąd też AMPs stały się przedmiotem intensywnych badań laboratoryjnych w ostatnim dwudziestolecu.



Ryc. 1. Schemat mechanizmu działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych na błonę komórkową bakterii.

Nie podlega wątpliwości, że poszukiwanie nowych związków aktywnych w stosunku do gronkowca złocistego stanowi ogromną potrzebę dzisiejszej medycyny. Na wdrożenie oczekuje wiele związków, w tym liczna grupa AMPs. Zaprojektowano szereg syntetycznych analogów antybiotyków peptydowych, opracowane zostały optymalne metody pozyskiwania oraz oczyszczania tych związków, przebadano także ich aktywność przeciwdrobnoustrojową [14, 28, 29, 47, 56, 91] .

Możliwość wdrożenia peptydów do leczenia wymaga rozszerzenia prowadzonych badań w kilku kierunkach. Rozpatrując je jako potencjalne związki do stosowania w dermatologii należy przeprowadzić badania aktywności mikrobiologicznej względem szczepów izolowanych od pacjentów z chorobami gronkowcowymi skóry czy też badanych pod kątem nosicielstwa (np. w AZS) oraz badania bezpieczeństwa tych związków w aspekcie aplikacji na skórę.

Rozważanych jest kilka możliwości zastosowania AMPs w zwalczaniu infekcji bakteryjnych: jako pojedyncze substancje aktywne, co stanowiłoby alternatywę dla konwencjonalnych antybiotyków, w terapii skojarzonej z dotychczas stosowanymi lekami przeciwbakteryjnymi lub przeciwwirusowymi w celu uzyskania działania synergistycznego, jako środki immunostymulujące lub neutralizujące endotoksyny. Mechanizm działania większości antybiotyków peptydowych opiera się na permeabilizacji błony drobnoustrojów, rzadziej polega na uwalnianiu ATP z komórek, zatrzymywaniu replikacji DNA bakteryjnego lub hamowaniu ekspresji ich białek strukturalnych. Peptydy, które mają strukturę hydrofobową lub amfipa-

tyczną, wiążą się z błoną drobnoustroju dzięki oddziaływaniom hydrofobowym i elektrostatycznym, co wprowadza naprężenia w dwuwarstwie lipidowej. Gdy energia naprężeń przekroczy wartość krytyczną błona zostaje rozerwana, a peptyd ulega wbudowaniu. Prowadzi to do niekontrolowanego przemieszczania się jonów i związków organicznych, ucieczki ATP, napływu wody i ostatecznie śmierci komórki. Niebywałymi zaletami wynikającymi z mechanizmu działania antybiotyków peptydowych są ich aktywność bakteriobójcza oraz niskie ryzyko wytworzenia przez bakterie mechanizmów oporności na te związki [14].

2. CELE PRACY

1. Zastosowanie technik: ADSRRS-fingerprinting i PCR MP do badań nad genetycznym zróżnicowaniem szczepów *S. aureus*.
2. Analiza szczepów *S. aureus* izolowanych od chorych z czyracznością nawrotową pod kątem obecności genów *agr* i toksyn (SEA, SEB, SEC, SED, TST, ETA, ETB, lukS/lukF-PV) jako czynników determinujących ciężki przebieg choroby.
3. Badanie czynników wpływających na aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych.
4. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych i klasycznych antybiotyków w stosunku do wydzielających superantygeny szczepów *S. aureus* izolowanych od pacjentów z erytrodemią na podłożu zapalnym i nowotworowym oraz szczepów izolowanych od chorych z czyracznością.
5. Badanie aktywności mikrobiologicznej krótkich lipopeptydów wobec klinicznych szczepów *S. aureus* w aspekcie potencjalnych zastosowań terapeutycznych.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Pozyskiwanie szczepów *S. aureus*

Szczepy gronkowcowe pozyskano od następujących grup pacjentów: chorych z czyracznością nawrotową oraz z erytrodemią na podłożu zapalnym (atopowe zapalenie skóry, łuszczyca) i nowotworowym (chłoniaki pierwotnie skórne z komórek T – CTCL (*Cutaneous T-cell Lymphoma*, zespół Sezary’ego).

Grupę badaną stanowiło 46 pacjentów (23 kobiety i 23 mężczyzn) w wieku 3-90 lat leczonych z powodu czyraczności w Klinice Dermatologii GUMed. Od wszystkich chorych były pobierane wymazy ze zmian skórnych, nosa i gardła, a w przypadku pacjentów z nawracającą czyracznością dodatkowo wymazy z nosa i gardła od członków ich rodzin pod kątem badania nosicielstwa. Szczepy *S. aureus* w liczbie 70 zidentyfikowano na podstawie morfologii kolonii (Becton Dickinson, Niemcy), badania metodą Gram, zdolności produkcji katalazy i pozytywnego wyniku testu koagulacji (Staphaurex, Biomerieux). Przy pomocy 2 technik PCR: ADSRRS-fingerprinting oraz PCR MP analizowano 13 szczepów *S. aureus* uzyskanych od członków 4 różnych rodzin z problemem czyraczności rodzinnej w których co najmniej jedna osoba cierpiała z powodu tej jednostki chorobowej oraz 24 szczepy od chorych z czyracznością nawrotową.

Drugą grupę pacjentów stanowiło 28 chorych z erytrodemią hospitalizowanych w Klinice Dermatologii GUMed. Od wszystkich pobierano wymazy ze skóry obu zgięć łokciowych. Identyfikacji mikrobiologicznej dokonywano analogicznie jak przedstawiono powyżej. Następnie wyizolowane szczepy były badane pod kątem zdolności do wydzielania superantygenów przy pomocy techniki Multiplex PCR oraz biernej aglutynacji lateksowej (SET-RPLA oraz TST-RPLA TOXIN DETECTION KIT, Oxoid).

3.2. Metody genetyczne wykorzystane w identyfikacji szczepów *S. aureus*

3.2.1. Izolacja DNA bakteryjnego i technika ADSRRS – *fingerprinting*

Genomowe DNA *S. aureus* pozyskano na drodze izolacji zgodnie z procedurą załączaną do zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology, Polska). Zawartość DNA w próbce ustalono przy pomocy elektroforezy agarozowej (Sigma, St. Louis, MO, USA). W celu wizualizacji wyników (do barwienia prążków DNA w żelu) użyto roztworu bromku etydydny o stężeniu 5

μl/ml dodawanego przed wylaniem żelu na płytkę (Sigma-Aldrich Chemic GmbH, Steinheim, Germany).

Wszystkie szczepy *S. aureus* zostały zidentyfikowane na podstawie techniki ADSRRS-fingerprinting [69] po trawieniu przy pomocy 2 enzymów restrykcyjnych: *BamHI* (10 U/μl) (Sigma) i *XbaI* (10 U/μl) (Sigma) przez 2-3 h w temperaturze 37°C w całkowitej objętości 50 μl właściwego związku buforującego. Do każdej próbki poddawanej trawieniu dodawano 20 μl 3 M NaAc, 150 μl buforu TE, 400 μl 96% etanolu i 3 μl glikogenu (20 mg/ml) (Sigma), następnie worteksowano, mieszano oraz inkubowano w – 20°C przez 60 min, a następnie wirowano z prędkością 12.000×g przez 10 min. Następnie zlewano supernatant i osad przemywano 300 μl 70% etanolu, po czym wirowano próbki kolejne 10 minut przy obrotach 12 tys. RPM. Po wirowaniu zlewano supernatant i osad suszono w temperaturze pokojowej. Po wysuszeniu, osad zawieszano w 20 μl wody jałowej- otrzymując w ten sposób próbki przygotowane do reakcji ligacji z adaptorami.

W skład każdego z adaptorów wchodzi oligonukleotyd pomocniczy (*pomlong* lub *pomshort*), który w etapie ligacji do trawionego DNA genomowego, pomaga wiązaniu się właściwego oligonukleotydu, tzw. oligonukleotydu ligowanego (*bisshort* lub *liglong*), lepkich końców pozostawionych po trawieniu restryktazami na matrycy. Dzięki komplementarności oligonukleotydów zawsze *pomlong* hybrydyzuje z *liglong*, a *pomshort* z *bisshort*.

Otrzymanie adaptorów polegało na sporządzeniu równomolowych mieszanin odpowiednich oligonukleotydów w wodzie. Mieszaniny takie inkubowano w 90°C przez 1 minutę, a następnie chłodzi przez kolejne 10 minut w temperaturze pokojowej.

Do probówek z mieszaniną ligacyjną dodano bufor TE rozcieńczając próbę do objętości 80 μl i prowadzono precypitację z zastosowaniem równej objętości alkoholu izopropylowego zgodnie z procedurą. Po odwirowaniu z prędkością 12.000×g przez 10 min, osad DNA rozpuszczono w 20 μl TE.

Reakcję PCR przeprowadzono w 50 μl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 2 μl mieszaniny ligacyjnej, 5 μl buforu PCR (100 mM Tris-HCl, pH=8,8; 500 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 1% Triton X-100), 5 μl 2,5 mM dNTP), 1 μl (1 U) polimerazy *Taq* (Shark2, DNA Gdansk II s.c., Poland) lub 1 μl (1 U) polimerazy *Pwo* (DNA Gdansk II s.c., Poland), 50 pM każdego startera i wody do 50 μl. Reakcja została przeprowadzona w termocyklerze Perkin-Elmer GENEAMP® PCR System 2400. Wykorzystano następujący profil termiczny: cykl początkowy 94°C przez 5 min, następnie 72°C przez 5 min, dalej denaturacja w 94°C przez 5 min, po czym 22 cykle w 94°C przez 30 s, 62°C przez 30 s, 72°C przez 90 s, a następnie 5 min w 72°C. Produkty PCR (10 μl z 50 μl) zostały poddane elektroforezie na 6% żelu poliakrylamidowym z TBE. Po zakończeniu rozdziału, żel barwiono w kąpeli barwiącej – woda z dodatkiem bromku etydy, w celu wizualizacji wyników. Wyniki rozdziału produktów PCR były oceniane na transiluminatorze wykorzystującym promieniowanie UV. Izolaty określano jako

epidemiologicznie spokrewnione w przypadku uzyskania identycznych profili lub jeśli niewielkie różnice w intensywności jednego lub dwóch prążków nie zostały potwierdzone w kolejnych eksperymentach.

3.2.2. Technika PCR MP

Przygotowanie DNA było identyczne jak w technice ADSRRS-fingerprinting. 1 µg DNA był trawiony HindIII (5U, Fermentas, Litwa). Po inkubacji w 37°C przez 30 min dodano mieszaniny ligacyjnej: 2 µl dwóch oligonukleotydów (20 pmol każdego) i adaperu: 5'CTCACTCTCACCAACGTCGACAGCTT3' i 3'GGTTGCAGCTGTCTGA5' oraz 5'CTCACTCTCACCAACGTCGAC3', 2,5 µl buforu ligacyjnego (330 mM Tris, pH=7,8, 660 mM octan potasu, 100 mM octan magnezu, 5 mM DTT; Epicentre USA), 0,5 µl 25 mM roztworu ATP (Epicentre USA) i 0,5 µl T4 ligazy DNA (1 U, Epicentre). Następnie próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godz., po czym ogrzewano w termobloku w 70°C przez 10 min i chłodzono w temperaturze pokojowej przez 10 min. Reakcja PCR została przeprowadzona w 50 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 1 µl roztworu ligacyjnego, 5 µl 10×buforu PCR (100 mM Tris-HCl pH=8,5, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 2 µl 50 mM MgCl₂, 5 µl mieszaniny dNTP, 1 µl (2 U) polimerazy *Pwo* (DNA Gdańsk, Polska) oraz 50 pmol primera. Temperatura denaturacji została ustalona podczas optymalizacji doświadczeń dla 2 genetycznie niespokrewnionych szczepów *S. aureus* przy pomocy cyklera gradientów termalnych (Biometra Tgradient Engine) w zakresie 79,5-82,5°C. Reakcję PCR przeprowadzono następująco: 7 min w 72°C do uzyskania ampikonów, początkową denaturację w temperaturze 79,5-82,5°C przez 90 s, 22 cykle denaturacji w 79,5-82,5°C przez 1 min, wyżarzanie i elongację w 72°C przez 2 min 15 s i 72°C przez 5 min po ostatnim cyklu. Reproduktywność była oceniana przy pomocy 2 niezależnych eksperymentów począwszy od izolacji DNA.

3.2.3. Wykrywanie genów toksyn SEA-D, TSST-1, ETA, ETB przy pomocy Multiplex PCR

Badaniu tą techniką poddano szczepy uzyskane od 44 chorych z czyracznością nawrotową oraz szczepy od 24 chorych z erythrodermią. Grupę kontrolną stanowiło 150 wolontariuszy z negatywnym wywiadem w kierunku czyraczności badanych pod kątem nosicielstwa *S. aureus* w nosie. Szczepy referencyjne do detekcji PCR genów czynników wirulencji i grup *agr* zostały zakupione w Krajowym Instytucie Zdrowia Publicznego w Warszawie i w Krajowym Centrum Referencyjnym Gronkowca w Gdańsku. Szczepy referencyjne i kliniczne były

przechowywane w TSB (Tryptic Soy Broth, Oxoid, Anglia) w temperaturze -70°C i zawieszone w 15% glicerolu.

Izolację DNA przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Barskiego i wsp. [13]. Amplifikacji DNA dokonano w termocyklerze Perkin Elmer 2400 (Norwalk, USA). Startery dla enterotoksyn (SEA, SEB, SEC i SED), TSST-1 i eksfoliatyn (ETA, ETB) zostały użyte według opisanych zasad. DNA gronkowcowe (50-100 ng) było amplifikowane w dwóch niezależnych reakcjach PCR – umownie określonych jako A i B. W reakcji A użyto po 20 pmol primerów *sea*, *seb* i *sec* oraz 40 pmol pimera *sed*, podczas gdy w reakcji B zastosowano 50 pmol primeru *eta* i po 20 pmol primerów *etb* i *tst*. Detekcja genów została przeprowadzona w 50 µl mieszaniny zawierającej: 5 µl bakteryjnego DNA (5 ng/µl), 5 µl 10×buforu reakcyjnego (Fermentas, Niemcy), primery *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *ata*, *arb* i *tst* (Sigma-Proligo, USA), 200 µl DTP, 2,5 U polimerazy *Taq* (Fermentas, Niemcy) i sterylnej wody. Amplifikacji DNA dokonano w następujących warunkach: początkowa denaturacja w 94°C przez 5 min, następnie 35 cykli amplifikacji (denaturacja w 94°C przez 2 min, wyżarzanie w 57°C przez 2 min, wydłużanie w 72°C przez 1 min) i ostateczne wydłużanie w 72°C przez 7 min. Amplifikacja genu PVL (*lukS/lukF-PV*) została przeprowadzona według metodyki opisanej przez Lina i wsp. [63]. Specyficzność grup *agr* została określona przy pomocy amplifikacji PCR domen o wysokiej zmienności zaproponowanej przez Shopsisin i wsp. [89]. Produkty reakcji PCR były analizowane na 2% żelu agarozowym (Sigma, USA) w obecności bromku etydyny i sfotografowane pod UV.

3.3. Ocena wrażliwości szczepów *S. aureus* na klasyczne antybiotyki

3.3.1. Metoda dyfuzyjno-krażkowa w agarze

Zawiesina bakteryjna była rozprowadzana w soli fizjologicznej o stężeniu 0,5 mF, a następnie umieszczana na pożywce Mullera-Hintona II na płytce Petriego. Na tak przygotowanej płytce układano krążki bibuły o średnicy 6 mm nasyczone antybiotykami. Lek dyfundując do podłoża, tworzy gradient stężeń o największej koncentracji antybiotyku przy brzegach krążka, zmniejszającej się wraz z odległością. Dzięki temu uzyskuje się strefy zahamowania wzrostu dla wysianej na podłożu zawiesiny drobnoustrojów. Miara oporności badanego szczepu bakterii jest średnica strefy, na podstawie której charakteryzuje się drobnoustrój jako wrażliwy, średnio wrażliwy czy oporny. Ocenie poddano następujące antybiotyki: penicylinę, oksacylinę, doksycyklinę, erytromycynę, klindamycynę, chloramfenikol, ciprofloksacynę, wankomycynę, daptomycynę i tigecyklinę (Oxoid UK) oraz linezolid (Pfizer).

3.3.2. MIC – metoda oznaczania minimalnego stężenia hamującego

Badania MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) wykonano na 96-dółkowych płytkach polistyrenowych (Greiner Bio-one, USA) metodą seryjnych mikrorozcieńczeń w bulionie MH II (Becton, Dickinson and Company, Francja). Oceny wyników dokonywano wizualnie, za MIC uznawano stężenie, po zastosowaniu którego nie obserwowano wzrostu drobnoustrojów. Zawartość dołków ze stężeniami MIC oraz dwoma kolejnymi wyższymi posiewano na podłoże stałe MH II w celu określenia minimalnego stężenia bójczego związków względem badanych szczepów *S. aureus*. Oba badania wykonano zgodnie z bieżącymi zaleceniami CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [104].

3.4. Badania nad peptydami

Wrażliwość na naturalne ludzkie peptydy przeciwdrobnoustrojowe badano na szczepach *S. aureus* izolowanych od chorych z czyracczością, natomiast na peptydy występujące w przyrodzie i syntetyczne lipopeptydy na szczepach izolowanych od chorych z erytrodemią.

3.4.1. Otrzymywanie związków peptydowych

Kationowy peptyd LL-37 o sekwencji aminokwasów LLGDDFRKSKEKIGKEFK-RIVQRIKDFLRNLVPRTES (m.cz. 4492 Da) został zsyntetyzowany przez Innovagen AB (Lund, Szwecja). Czystość i masa cząsteczkowa peptydu została potwierdzona metodą spektrometrii mas (MALDI-TOF). Lizozym uzyskany z białka jaja kurzego i laktoferryne wyizolowana z mleka ludzkiego zostały dostarczone przez firmę Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Ludzka beta defensyna 3 (hBD-3) została zsyntetyzowana przez PeproTech Inc (USA).

Lipopeptydy, Temporyna A, Aureina 1.2, Citropina 1.1, Protegryna 1, Tachyplezyna 3, Uperyna 3.6 zostały zsyntetyzowane metodą na stałym nośniku polimerowym Polistyrene AM-RAM (Rapp Polymere, Niemcy) z wykorzystaniem osłony 9-fluorenylometoksykarbonylowej (Fmoc) [42]. Pozostałe odczynniki zakupiono w firmie Sigma Aldrich (Poznań, Polska).

Schemat syntezy wyglądał następująco: 1) etap deprotrakcji 20% (v/v) roztworem piperidyny w dimetyloformamidzie (DMF) z dodatkiem Tritonu X – 100, 2) acylowanie chronionym aminokwasem w mieszaninie dimetyloformamid/dichlorometan (DMF/DCM, v/v, 1:1) w obecności Tritonu X-100, z zastosowaniem diizopropylkarbodiimidu (DIC) jako środka sprzęgającego oraz 1-hydroksybenzotriazolu (HOBt) jako dodatku przeciwracemizacyjnego. Acylowanie trwało 1,5 h. Przyłączanie reszty kwasu palmitynowego przebiegało wg. identycznej procedury. Stopień każdego acylowania badano testem chloranilowym [27].

Surowe lipopeptydy oczyszczano za pomocą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) na kolumnach ze złożem modyfikowanym łańcuchami oktadecylowymi (C18) [55]. Poszczególne frakcje wymywano ze złoża za pomocą układu rozpuszczalników o stężeniu od 0 do 60% acetonitrylu w wodzie z dodatkiem 0,1% kwasu trifluorooctowego. Eluaty analizowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na chromatografie Knauer z kolumną monolityczną Phenomenex C18, przy przepływie fazy ruchomej 2 ml/min, $\lambda = 214$ nm. Tożsamość lipopeptydów potwierdzono metodą spektrometrii mas (MALDI – TOF).

3.4.2. Technika radiodyfuzji

Metoda ta polegała na pobraniu jednej kolonii bakteryjnej z krwawej płytki agarowej i umieszczeniu jej w bulionie sojowym (10 ml TSB) oraz inkubacji przez 18 godzin w cieplarni w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂.

Technikę radiodyfuzji przeprowadzono według metodyki opisanej przez Lehrera i wsp. [61]. Szczepy *S.aureus* były inkubowane do uzyskania środkowej fazy wzrostu logarytmicznego w 10 ml 3% TSB (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD). Bakterie płukano raz w 10 mM Tris, pH=7,4; 4×10^6 cfu (*colony forming units* – jednostek tworzących kolonie), a następnie dodawano do 5 ml żelowego podłoża agarozowego, składającego się z 0,03% TSB, 1% Low-EEO (niskoelektroendoosmotycznej) agarozy (Sigma, St Louis MO) i 0,02% Tween 20 (Sigma). Podłoże wylewano do płytek Petriego Ø 85 mm. Po zastygnięciu agarozy, urządzeniem do biopsji skórnych wykonano 4 mm średnicy rynienki do których наносzono 6 µl badanego peptydu (laktoferryiny, lizozymu i LL-37 w stężeniu 50 i 100 µM), kombinacji peptyd-peptyd (jako mieszaniny złożonej 3 µl lizozymu i 3 µl LL-37 w stężeniu 50 i 100 µM), antybiotyków: erytromycyny, doksycykliny i klindamycyny (w stężeniu 50 i 100 µM) oraz kombinacji peptyd- antybiotyk (używając mieszaniny 3 µl antybiotyku i 3 µl LL-37 w stężeniu 50 i 100 µM). Płytki były inkubowane przez 3 godziny w temperaturze 37°C w celu uzyskania odpowiedniej dyfuzji peptydów, antybiotyków i badanych kombinacji peptyd-peptyd i peptyd-antybiotyk. Następnie na płytki z badanymi substancjami wylewano żel składający się z 6% TSB i 1,0% Low-EEO agarozy (Sigma, St Louis MO) rozpuszczonych w wodzie destylowanej. Aktywność przeciwbakteryjną testowanego związku oceniano miarą strefy zahamowania wzrostu wokół każdej z rynienek po 18-24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C.

3.4.3. CFU - metoda jednostek tworzących kolonie

Szczepy *S. aureus* były inkubowane w bulionie Todd-Hewitt (TH) (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD) do momentu uzyskania środkowej fazy wzrostu logarytmicznego. Kolejnym krokiem było płukanie i rozcieńczenie bakterii w 10 M Tris pH=7,4 z 5 mM glukozą. Dalej badany szczep (50 μ l; 2×10^6 bakterii w ml) przez 2 godziny był inkubowany w 37°C odpowiednio z lizozymem, LL-37 oraz kombinacją obu związków w stężeniach od 0,03 do 60 μ M. Ilościowa aktywność bakteriobójcza badanych substancji była oceniana dzięki wysiewaniu seryjnych rozcieńczeń inkubowanej mieszaniny na płytki Petriego z agarem Todd-Hewitt (TH) (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD), inkubowaniu w 37°C przez 18 godzin, a następnie liczeniu CFU (*Colony Forming Units*). Brak kolonii bakteryjnych na płytce był wykładnikiem aktywności bakteriobójczej badanej substancji bądź mieszaniny substancji.

3.4.4. MIC dla wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Metodyka analogiczna do opisanej w punkcie 3.3.2 dla następujących peptydów przeciwdrobnoustrojowych występujących w przyrodzie:

- aureina 1.2 Gly-Leu-Phe-Asp-Ile-Ile-Lys-Lys-Ile-Ala-Glu-Ser-Phe-NH₂
- citropina 1.1 Gly-Leu-Phe-Asp-Val-Ile-Lys-Lys-Val-Ala-Ser-Val-Ile-Gly-Gly-Leu-NH₂
- protegryna 1 Arg-Gly-Gly-Arg-Leu-Cys-Tyr-Cys-Arg-Arg-Arg-Phe-Cys-Val-Cys-Val-Gly-Gly-Arg-NH₂
- uperyna 3.6 Gly-Val-Ile-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Val-Val-Asn-Val-Leu-Lys-Asn-Leu-Phe-NH₂
- temporyna A Phe-Leu-Pro-Leu-Ile-Gly-Arg-Val-Leu-Ser-Gly-Ile-Leu-NH₂

oraz syntetycznych lipopeptydów:

- Palm-Lys-Lys-NH₂
- Palm-Lys-Lys-Lys-NH₂
- Palm-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂
- Palm-Lys-Gly-NH₂
- Palm-Lys-Gly-Lys-NH₂

3.4.5. Technika frakcjonowanych stężeń hamujących

Metoda szachownicy została wykorzystana do oceny aktywności przeciwbakteryjnej kombinacji LL-37 z erytromycyną oraz lizozymem [53].

Badane substancje zostały użyte w następujących stężeniach (w mg/l): LL-37: 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 128,0; lizozym: 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 128,0 i erytromycyna: 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0. Peptydy rozpuszczono w 0,01% kwasie octowym zawierającym 0,2% wołowej albuminy, natomiast erytromycynę w wodzie destylowanej. Do badań wykorzystano 96-dołkowe płytki o pojemności 200 µl/dołek. Analizowane związki były nanoszone według następującego schematu: 50 µl badanej substancji przeciwbakteryjnej A (umieszczanej wzdłuż szeregów), 50 µl substancji przeciwbakteryjnej B (nanoszonej wzdłuż kolumn) i 10 µl inokulum rozpuszczonego w podłożu MHB (bulionie Muller – Hinton) (4.6×10^6 CFU/ml). Następnie płytki poddano inkubacji przez 16-20 godzin w 37°C. Minimalne stężenie hamujące (MIC) zdefiniowano jako najniższe stężenie badanej substancji hamujące widoczny wzrost bakterii, zaś minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC) jako najniższe stężenie badanej substancji uniemożliwiające tworzenie kolonii po przeniesieniu próbki na płytkę agarową. Po inkubacji 1 µl inokulum z każdej z 96 dołków był wysiewany na krwawą płytkę agarową, po czym płytki inkubowano przez 24 godziny w 37°C. Użyte frakcjonowane stężenie hamujące (FIC index) zostało wyliczone według wzoru: $FIC = [A]/MIC_A + [B]/MIC_B$, gdzie MIC_A i MIC_B są minimalnymi stężeniami hamującymi substancji A i B użytymi indywidualnie, natomiast $[A]$ i $[B]$ są minimalnymi stężeniami hamującymi substancji A i B użytymi w kombinacji. FIC równy 1,0 świadczy o aktywności addytywnej (podwójne zmniejszenie MIC każdego składnika użytej kombinacji), wartość $<0,5$ świadczy o synergizmie, natomiast $FIC > 4$ obrazuje efekt antagonistyczny. Wszystkie doświadczenia wykorzystane w tej metodzie były powtórzone dwukrotnie.

3.5. Badania wpływu różnych czynników na aktywność przeciwbakteryjną ludzkiej katelicydyny LL-37

W tej serii badań oceniano aktywność przeciwbakteryjną LL-37 w wydzielinach z ran, surowicy i osoczu z dodatkiem heparyny, cytrynianu bądź EDTA. Wydzieliny z 12 ran (WF 1-12, WF – *Wound Fluids*) pochodziły z ran pooperacyjnych po zabiegach mastektomii. Były one przechowywane w temperaturze -20°C. Wykorzystanie tego materiału zostało poprzedzone uzyskaniem zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu w Lund (LU-708-01).

3.5.1. Izolaty bakteryjne

S. aureus i *E.coli* uzyskano od pacjentów z infekcjami skórnymi. Do badań wykorzystano 3 różne genotypy *S. aureus* zidentyfikowane za pomocą opisanej wcześniej techniki *ADSRRS-fingerprinting* (rozdz. 3.2.1). Dodatkowo wykorzystano szczepy referencyjne *S. aureus* ATCC 29213 i *E. coli* ATCC 25922 pozyskane z Zakładu Bakteriologii Klinicznej Uniwersytetu w Lund w Szwecji.

3.5.2. Technika radiodyfuzji

Zasady tej metody zostały dokładnie przedstawione w rozdziale 3.4.2. Badane próbki stanowiły 6 µl próbki zawierające 50 lub 100 µM LL-37 (LLGDDFRKSKEKIGKEFK-RIVQRIKDFLRNLPVPTES ; m.cz.=4492 Da) rozpuszczonego w osoczu z dodatkiem cytrynianu, EDTA, heparyny, surowicy (50 lub 96%) oraz dwunastu wydzielinach z ran (50%). Aktywność przeciwbakteryjna badanego peptydu była mierzona średnicą strefy zahamowania wzrostu bakterii po 18-24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C.

3.5.3. Metoda oznaczania glikozaminoglikanów

Technika z użyciem błękitu alcianu została przeprowadzona zgodnie z wytycznymi producenta (Wieslab, Lund) [16]. Wydzieliny z ran oraz siarczan chondroityny (12,5; 25, 50, 100, 200 i 400 mg/l) zmieszano z 8 M chlorowodorkiem guanidyny (GuHCl) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min. Następnie dodano roztwór SAT (0,3% kwas siarkowy, 0,75% Triton X-100), ponownie inkubowano i dodano roztwór błękitu alcianu. Po 15 min inkubacji w temperaturze pokojowej odwirowano próbki i przemyto osad roztworem DMSO (40% dimetylosulfotlenek w 0,05 M MgCl₂) a następnie dodano roztwór Gu-Prop (4 M GuHCl w 33% 1-propanol oraz 0,25% Triton X-100) i zmierzono absorbancję przy długości fali 600 nm.

3.5.4. Ocena zawartości protein

Stężenie protein w wydzielinach z ran oznaczono metodą Bradforda [15]. Badane próbki rozpuszczono w 100 µl 10 mM Tris o pH=7,4, zmieszano z roztworem Bradforda, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min, po czym mierzono absorbancję przy długości fali 595 nm.

3.5.5. Oznaczanie wiązania polisacharydów

Badania wykonano dokładnie według procedury opisanej przez Schmidtchena i wsp. [87, 88]. LL-37 aplikowano na membrany nitrocelulozowe (Hybond, Amersham) i umieszczono w roztworze: PBS pH=7,4 i 0,25% Tween 20 oraz 3% albumina bydlęca na 1 godzinę oraz inkubowano z wyznakowanym radioaktywnie DS (10 mg/l) przez kolejną godzinę w tym samym buforze. Niewyznakowane polisacharydy dodano celem rywalizacji o miejsce wiązania. Następnie membrany płukano 3-krotnie po 10 min w roztworze: PBS pH=7,4 oraz 0,25% Tween 20. Do wizualizacji radioaktywności użyto systemu Bas 2000 (Fuji).

3.5.6. Metody statystyczne

Analizy statystycznej interakcji pomiędzy zawartością glikozaminoglikanów w wydzielinach z ran a aktywnością przeciwbakteryjną LL-37 dokonano przy pomocy testu U Manna-Whitneya. Różnice uznano za znamienne przy $P < 0,05$. Test korelacji Spearmana został wykorzystany do udowodnienia korelacji pomiędzy zawartością protein i GAG w wydzielinach z ran i ich hamującym wpływem na aktywność LL-37.

4. WYNIKI

4.1. Badania właściwości genetycznych szczepów *S. aureus*

4.1.1. Wykorzystanie technik ADSRRS-fingerprinting i PCR MP w badaniach nad genetycznym zróżnicowaniem szczepów *S. aureus* w czyraczności nawrotowej

Publikacje [**praca 2**, **praca 3**]: Krawczyk B., Leibner J., Barańska-Rybak W., Samet A., Nowicki R., Kur J. ADSRRS-fingerprinting and PCR MP techniques for studies of intraspecies genetic relatedness in *Staphylococcus aureus*. J. Microbiol. Meth. 2007; 71, 114-122 oraz Barańska-Rybak W., Nowicki R., Sokołowska-Wojdyło M., Michajłowski I., Starczyńska A., Maciejewska K., Drogoszewska B., Gawrońska-Skorkowska J., Włodarkiewicz A. Identification of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the patients with recurrent furunculosis by ADSRRS-fingerprinting PCR. Pol. J. Environ. Study 2009; 18, (1A), 160-163 były pierwszymi dotyczącymi tak wnikliwej analizy szczepów *S. aureus* izolowanych od dużej liczby chorych z czyracznością nawrotową.

Pierwsza publikacja [praca 2] poświęcona była czyraczności rodzinnej którą rozpoznaje się wówczas, gdy zmiany skórne występują u co najmniej 2 członków rodziny. Analizie poddano 37 szczepów gronkowcowych (uzyskanych od 4 rodzin, łącznie 20 osób) zidentyfikowanych na podstawie szeregu właściwości fenotypowych i genotypowych przy pomocy technik *ADSRRS-fingerprinting*, PFGE oraz PCR MP. W jednej spośród prezentowanych czterech rodzin czyraki występowały w dniu badania u dwóch członków rodziny. W pozostałych trzech rodzinach aktywne zmiany skórne występowały u jednego z domowników, u pozostałych były w fazie gojenia i nie udało się uzyskać treści ropnej do badania. Od tych osób pobrano tylko badania w kierunku nosicielstwa z jamy nosowo-gardłowej. Na podstawie przebadanych 37 szczepów *S. aureus* wyodrębniono 22 genotypy przy użyciu techniki *ADSRRS-fingerprinting* oraz 22 plus 2 blisko spokrewnione przy pomocy techniki PCR MP, natomiast technika REA-PFGE zróżnicowała 21 genotypów. Stwierdzono, że gradient temperatur 79,5-82,5°C jest najbardziej odpowiedni do różnicowania badanych szczepów *S. aureus* ponieważ zapewnia on dobrą powtarzalność oraz satysfakcjonującą wydajność różnicowania.

U 10 na 16 pacjentów izolaty z nosa i z czyraka reprezentowały ten sam genotyp w obydwu *ADSRRS-fingerprinting* i REA-PFGE. Z kolei izolaty z nosa i czyraka u 9 z 10 chorych należały do tego samego genotypu, a u jednego z pacjentów były blisko spokrewnione. U jednego chorego zbadano 3 izolaty: 2 z czyraków i 1 z nosa uzyskując wyniki identycznych genotypów ze zmian skórnych a odmienny genotyp z nosa (co było również widoczne w odmiennych wzorach wrażliwości na antybiotyki i przynależności do dwóch różnych grup fagowych). Analizując wyniki typowania genetycznego w 4 rodzinach zaobserwowano, że tylko w jednej z nich ten sam genotyp odpowiedzialny był za zmiany skórne występujące u dwóch członków rodziny.

W [pracy 3] przedstawiono wyniki badań puli 70 szczepów gronkowcowych uzyskanych od 46 chorych z czyracznością nawrotową. Dzięki technice *ADSRRS-fingerprinting* wyodrębniono 31 genotypów oznaczonych od A do AF. W przypadku 8 izolatów mimo kilkukrotnych powtórzeń nie udało się precyzyjnie określić genotypu. Pięć najczęstszych genotypów to F (7 izolatów), E, P i R (po 5 izolatów każdy) oraz O (4 izolaty). Szesnaście kolejnych genotypów mających od 2 do 3 izolatów, grupowało 39 izolatów. Pozostałe 11 genotypów było charakterystycznych dla pojedynczych izolatów. Grupa kontrolna obejmująca 12 szczepów *S. aureus* była reprezentowana przez 5 różnych genotypów. Szczep referencyjny ATCC29213 identyfikowany przy pomocy tej metody prezentował odmienny genotyp niż szczepy uzyskane od pacjentów z czyracznością nawrotową i grupy kontrolnej.

Prezentowane techniki: *ADSRRS-fingerprinting* i PCR-MP okazały się równie efektywne w różnicowaniu blisko spokrewnionych szczepów bakteryjnych jak technika PFGE uważana dotąd za „złoty standard” w badaniach epidemiologicznych. Jest ona metodą znacznie

bardziej czasochłonną i kosztowną niż omawiane techniki, dodatkowo zaś może być przeprowadzona tylko w laboratoriach referencyjnych przez przeszkolony do tego celu personel.

W [praca 2] po raz pierwszy zastosowano techniki *ADSRRS-fingerprinting* i PCR – MP do typowania szczepów *S. aureus*. Nie wymagają one wcześniejszej znajomości analizowanej sekwencji, a wyniki mogą być z łatwością analizowane na żelu poliakrylamidowym wybarwionym bromkiem etydydy, zaś jeden zestaw adaptorów i enzymów wystarcza do analizy DNA szeregu gatunków bakterii. Niewątpliwym atutem prezentowanych metod molekularnego typowania izolatów bakteryjnych jest ich efektywność, szybkość oraz niskie koszty [69]. Wyodrębnienie 31 genotypów (od A do AF) z puli 70 szczepów dowodzi dużego zróżnicowania gronkowców u chorych z czyracznością. Uzasadnionym jest zatem poszukiwanie innych przyczyn nawrotowości omawianego schorzenia niż patogenność konkretnego szczepu.

4.1.2. Dominacja genu *agr* wśród szczepów *S.aureus* wywołujących czyraczność nawrotową

Praca opublikowana dzięki współpracy z Katedrą Mikrobiologii GUMed [praca 6]: Garbacz K, Piechowicz L., Barańska-Rybak W., Dąbrowska-Szponar M. *Staphylococcus aureus* isolated from patients with recurrent furunculosis carrying Pantone-Valentine leukocidin genes represent *agr* specificity group IV. Eur. J. Dermatol. 2011; 21 (1): 43-46 jest pierwszą w literaturze dowodzącą dominacji gronkowców należących do IV grupy *agr* wśród szczepów *S. aureus* izolowanych z czyraczności nawrotowej.

Badaniem objęto grupę 44 pacjentów (24 mężczyzn i 20 kobiet) cierpiących z powodu czyraczności nawrotowej. Zmiany skórne występowały przede wszystkim na pośladkach (20/44), kończynach dolnych (19/44) oraz klatce piersiowej (14/44), kończynach górnych (11/44), plecach (8/44) i twarzy (1/44). Ponad połowa pacjentów (21/44) miała czyraki w dwóch lub trzech obszarach anatomicznych. Tylko dwóch badanych pacjentów obciążonych było schorzeniami predysponującymi do czyraczności: cukrzycą typu II i przewlekłą białaczką szpikową.

Patogenność gronkowca złocistego jest związana z produkcją licznych toksyn zewnątrzkomórkowych, enzymów i białek powierzchniowych. Ekspresja większości czynników wirulencji jest kontrolowana przez locus *agr* (*accessory gene regulator*). W oparciu o polimorfizm genów *agrC* i *agrD* szczepy *S. aureus* podzielono na cztery główne grupy (I-IV). Celowym zatem wydało się zbadanie szczepów gronkowcowych izolowanych od chorych z czyracznością pod kątem przynależności do konkretnej grupy *agr* i zdolności wytwarzania poszczególnych toksyn.

35 z 44 badanych szczepów izolowanych z czyraków charakteryzowała obecność genów dla leukocydyny: *lukS/lukF-PV*, a 12 – genu dla enteroksyny *seb*. Współistnienie genów PVL i *seb* potwierdzono u 7 na 44 szczepów. Przynależność do grupy IV *agr* stwierdzono u 43 badanych szczepów, a jeden szczep sklasyfikowano jako należący do grupy II *agr*. Wszystkie szczepy posiadające geny *lukS/lukF-PV* należały do grupy IV *agr*. Nosicielstwo *S. aureus* w nosie stwierdzono u 27/44 chorych z czyracznością (61,3%) oraz u 43/150 w grupie kontrolnej (28,6%). U wszystkich chorych z czyracznością szczepy izolowane z nosa były identyczne jak ze zmian skórnych aspekcie specyficzności *agr* i obecności genów *lukS/lukF-PV*.

4.1.3. Identyfikacja superantygenów wydzielanych przez szczepy *S. aureus* izolowane od chorych z erytrodermią

W pracy poświęconej temu zagadnieniu [**praca 7**]: Barańska-Rybak W., Cirioni O., Dawgul M., Sokołowska-Wojdyło M., Naumiuk L, Szczerkowska-Dobosz A., Nowicki R., Roszkiewicz J, Kamysz W. Activity of antimicrobial peptides and classic antibiotics against superantigen positive *Staphylococcus aureus* isolated from the patients with neoplastic and inflammatory erythrodermia. *Chemother. Res. Practice* 2011; art. nr 270932, 6 s. wykazałam, że szczepy gronkowcowe wydzielające superantygeny wykazują większą oporność w stosunku do antybiotyków niż szczepy nie posiadające tej aktywności.

W grupie 28 chorych z erytrodermią (11 w przebiegu łuszczycy, 9 atopowego zapalenia skóry, 6 CTCL i 2 zespołu Sezary’ego) obecność *S. aureus* stwierdzono w 24 przypadkach. Negatywne hodowle w kierunku gronkowca uzyskano w przypadku trzech chorych z erytrodermią łuszczycową. 14/24 szczepy *S. aureus* wydzielaly enterotoksyny: SEA (8 szczepów), SEC (3 szczepy) i/lub SED (5 szczepów). Tylko jeden szczep z badanej puli wydzielal TSST-1. W grupie 9 chorych z AZS szczepy wydzielające superantygeny stwierdzono u 6 pacjentów, u 6 chorych z CTCL – u 3 pacjentów, a spośród 8 chorych z łuszczycą zaledwie u 3. Szczepy *S. aureus* izolowane od 2 chorych z SS nie wydzielaly żadnych superantygenów.

Wiedzę przeglądową na temat superantygenów przedstawiono w [**pracy 5**]: Barańska-Rybak W., Sokołowska-Wojdyło M., Trzeciak M., Michajłowski I., Maciejewska-Radomska A., Nowicki R., Roszkiewicz J. Rola superantygenów bakteryjnych w chorobach skóry. *Przegl. Dermatol.* 2009; 96, 4, 301-304 [9].

4.2. Czynniki wpływające na aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Na aktywność przeciwbakteryjną peptydów przeciwdrobnoustrojowych mają wpływ różne czynniki, między innymi: zawartość soli, pH czy obecność protein. Dzięki współpracy z Centrum Biomedycznym w Lund w Szwecji badaliśmy aktywność przeciwbakteryjną ludzkiej katelicydyny LL-37 w wydzielinach z ran, surowicy i osoczu z dodatkiem heparyny, cytrynianu bądź EDTA. 5 z 12 wydzielin z ran wykazywało silny efekt hamujący aktywność przeciwbakteryjną LL-37, co ściśle korelowało z zawartością GAG (0-48 mg/l) w badanych wydzielinach (im wyższa zawartość GAG tym silniejszy efekt hamujący). Wydzieliny zawierające 20-48 mg/l GAG znacznie hamowały aktywność 100 μ M LL-37 w stosunku do trzech genotypów *S. aureus* (O, L i W). Podobnie silne właściwości hamujące aktywność LL-37 wykazywało osocze z dodatkiem heparyny. Efektem tych badań jest **[praca 1]** : Barańska-Rybak W., Sonesson A., Nowicki R., Schmidtchen A. Glycosaminoglycans inhibit the antibacterial activity of LL-37 in biological fluids J. Antimicrob. Chemother.2006; 57,260-265. Obserwując zjawisko wiązania i hamowania LL-37 przez GAG zadaliśmy sobie pytanie czy inne polikationy mogłyby hamować tę interakcję. Niezwykle interesującym było odkrycie, że interakcja pomiędzy LL-37 a GAG była znoszona przez polimery kationowe: dekstran DEAE oraz chitozan. Co więcej, związki te zwiększały aktywność przeciwdrobnoustrojową LL-37. Badaliśmy również wpływ zawartości protein w wydzielinach z ran na aktywność LL-37. Zawrtość protein w badanych wydzielinach mieściła się w zakresie 34-60 g/l co korespondowało z doniesieniami literaturowymi [88]. Niezależnie od zawrtości proteiny w badanych wydzielinach nie wywierały hamującego wpływu na aktywność LL-37 w naszym badaniu.

Przedstawiana praca była cytowana 30 razy przez badaczy podejmujących tematykę peptydów przeciwdrobnoustrojowych (zgodnie z Google Scholar) . Dodatkowo autorce została przyznana Nagroda La Fondation La Roche-Posay Laboratoire Pharmaceutique za najlepszą zgłoszoną publikację naukową w dziedzinie dermatologii klinicznej i doświadczalnej na arenie międzynarodowej w 2007 roku.

4.3. Wrażliwość na klasyczne antybiotyki i peptydy przeciwdrobnoustrojowe szczepów *S. aureus* izolowanych od chorych z wybranymi dermatozami

4.3.1. Badania wrażliwości na antybiotyki, naturalne ludzkie peptydy i białka przeciwdrobnoustrojowe : LL-37, Hbd3, laktoferrynę i lizozym

Badaniem objęto 70 szczepów *S. aureus* izolowanych od pacjentów z czyracznością nawrotową. Większość badanych izolatów (89%) charakteryzowała oporność na penicylinę, 20,6%; 19,5% i 6,5% wykazywało odpowiednio oporność na: erytromycynę, klindamycynę i doksycylinę. Wszystkie badane szczepy były wrażliwe na oksacylinę i ciprofloksacynę.

W celu określenia aktywności przeciwwgronkowcowej wybranych AMPs wyselekcjonowano 21 szczepów bakteryjnych należących do 21 różnych genotypów. Oceniano właściwości przeciwbakteryjne laktoferryny, lizozymu, LL-37 przy pomocy techniki radiodyfuzji stosując stężenia 10, 50 i 100 μM każdego z peptydów lub białek. Aktywność hBD3 i dodatkowo LL-37 badano przy pomocy metody jednostek tworzących kolonie.

Wszystkie analizowane szczepy wykazywały wrażliwość na LL-37 w stężeniu 50 μM , podczas gdy tylko 3 spośród nich były wrażliwe na lizozym w analogicznym stężeniu. Wszystkie badane szczepy były odporne na laktoferrynę nawet przy stężeniu 100 μM . W metodzie jednostek tworzących kolonie bakteriobójcze stężenia LL-37 w stosunku do badanych szczepów były znacznie niższe niż w technice radiodyfuzji i mieściły się w granicach od 0.6 do 3 μM . Dla szczepu referencyjnego ATCC29213 wartość ta wynosiła 3 μM . W przypadku oznaczania aktywności przeciwbakteryjnej hBD-3 ustalono, że stężenia bakteriobójcze tego peptydu w stosunku do analizowanych szczepów *S. aureus* wynoszą od 3 do 5 $\mu\text{g/ml}$, natomiast dla szczepu referencyjnego 2 $\mu\text{g/ml}$.

Doświadczenia wykorzystujące zastosowanie kombinacji LL-37 z antybiotykami (erytromycyną, klindamycyną i doksycyliną) przeciwko szczepom izolowanym od chorych z czyracznością nawrotową w RDA pokazały, że spośród badanych antybiotyków tylko erytromycyna zwiększała aktywność bakteriobójczą LL-37. Dla potwierdzenia tych obserwacji zastosowano metodę frakcjonowanych stężeń hamujących stosowaną dla wykrywania interakcji synergistycznych. Ustalono, że wartości MIC dla LL-37 mieściły się w granicach 8-64 $\mu\text{g/ml}$, a 2-4 $\mu\text{g/ml}$ dla erytromycyny (w przypadku szczepów wrażliwych na ten antybiotyk). Wartości MBC były takie same jak MIC.

Do dalszych eksperymentów wykorzystano jeden szczep *S. aureus* odporny (MIC dla erytromycyny > 4 $\mu\text{g/ml}$) i jeden wrażliwy na erytromycynę (MIC dla erytromycyny ~ 2 $\mu\text{g/ml}$). Badano możliwość wystąpienia efektów synergistycznych z LL-37 w obydwu

przypadkach. Dla obu testowanych szczepów uzyskano $FIC < 0,5$; co świadczy o synergistycznym działaniu erytromycyny i LL-37 względem *S. aureus*. Prezentowane wyniki zostały opublikowane w publikacji [praca 4]: Barańska-Rybak W., Nowicki R., Sokołowska-Wojdyło M., Michajłowski I., Starzyńska A., Maciejewska K., Drogoszewska B., Włodarkiewicz A. The potential role of antimicrobial peptides in recurrent furunculosis. Pol. J. Environ. Study 2009; 18, (1A), 179-183.

4.3.2. Ocena aktywności przeciwbakteryjnej wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych i klasycznych antybiotyków w stosunku do wydzielających superantygeny szczepów *S. aureus* izolowanych od pacjentów z erytrodemią na podłożu zapalnym i nowotworowym

Wrażliwość na antybiotyki oceniana przy pomocy metody dyfuzyjno-krażkowej oraz seryjnych mikrorozcieńczeń dała identyczne wyniki. Antybiotyki i chemioterapeutyki użyte w badaniach: rifampicyna, tigecyklina, vankomycyna, daptomycyna, ciprofloksacyna, chloramfenikol, klindamycyna i erytromycyna wykazywały zróżnicowaną aktywność w stosunku do klinicznych szczepów *S. aureus* [praca 7]: Barańska-Rybak W., Cirioni O., Dawgul M., Sokołowska-Wojdyło M., Naumiuk L., Szczerkowska-Dobosz A., Nowicki R., Roszkiewicz J., Kamysz W. Activity of antimicrobial peptides and classic antibiotics against superantigen positive *Staphylococcus aureus* isolated from the patients with neoplastic and inflammatory erythrodermia. Chemother Res Practice 2011; art. nr 270932, 6 s. Najniższe wartości MIC w granicach 1-4 mg/l odnotowano dla ryfampicyny, tigecykliny, wankomycyny i daptomycyny. Najwyższą aktywnością przeciwbakteryjną w stosunku do badanych szczepów charakteryzowały się następujące AMPs: tachyplezyna, lipopeptydy oraz protegryna (MIC w granicach 1-8 mg/l). Szczepy referencyjne wykazywały większą wrażliwość zarówno na konwencjonalne antybiotyki jak i AMPs w porównaniu ze szczepami klinicznymi.

Nie zaobserwowano różnicy we wrażliwości na AMPs wśród szczepów wydzielających i nie wydzielających superantygenów (SEA, SEC, SED, TSST-1). Całkowicie odmienna zależność została stwierdzona w przypadku badania wrażliwości na klasyczne antybiotyki. Szczepy wydzielające superantygeny wymagały znacznie wyższych wartości MIC i MBC badanych związków aniżeli szczepy nie wydzielające superantygenów.

Uzyskane wyniki badań zostały nagrodzone przez radę naukową 39. Zjazdu Europejskiego Towarzystwa Dermatologii Doświadczalnej w Budapeszcie we wrześniu 2009, gdzie prezentowałam je w formie referatu pt. „Are the superantigens producing *Staphylococcus aureus* strains more resistant to antimicrobial peptides?”.

4.3.3. Badanie aktywności mikrobiologicznej krótkich lipopeptydów wobec klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus* w aspekcie potencjalnych zastosowań terapeutycznych

Szczepy kliniczne *S. aureus* zostały wyizolowane z wymazów ze zmian skórnych od pacjentów z zapaleniem mieszków włosowych, czyracznością i atopowym zapaleniem skóry leczonych w Klinice Dermatologii i Wenerologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Na dwudziestu szczepach klinicznych gronkowca złocistego przeprowadzono oznaczenia MIC oraz MBC dla czterech konwencjonalnych antybiotyków : chloramfenikolu, wankomycyny, erytromycyny oraz penicyliny G i pięciu lipopeptydów: Palm-KK-NH₂, Palm-KKK-NH₂, Palm-KKKK-NH₂, Palm-KG-NH₂, Palm-KGK-NH₂.

Badane szczepy charakteryzowały się znacznym zróżnicowaniem wrażliwości na stosowane związki. Otrzymane wyniki zestawiono w publikacji [praca 8]: Dawgul M., Barańska-Rybak W., Greber K., Guzik Ł., Kamysz W., Łukasiak J. Aktywność mikrobiologiczna krótkich lipopeptydów wobec klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus*. Alergia, Astma, Immunol 2011, 16 (1): 31-36.

Zidentyfikowano pojedyncze szczepy o zwiększonej oporności na erytromycynę oraz penicylinę G. Oporność ta charakteryzowała różne szczepy – nie znaleziono szczepu opornego jednocześnie na oba te antybiotyki. Szczepy oporne na powyższe związki charakteryzowały się także zmniejszoną wrażliwością na chloramfenikol, który wykazuje działanie bakteriostatyczne. Związek ten okazał się być mało aktywny w stosunku do zdecydowanej większości szczepów *S. aureus* wykorzystanych w badaniach. Wankomycyna wykazywała niemalże jednakową aktywność hamującą w stosunku do wszystkich szczepów. Wartości MBC dla wankomycyny oraz penicyliny G były w większości przypadków równe ich stężeniom hamującym wzrost bakterii. W przypadku erytromycyny MBC zazwyczaj przekraczało wartość MIC czterokrotnie. Syntetyczne lipopeptydy, podobnie jak wankomycyna nie wykazywały zróżnicowania aktywności w zależności od badanego szczepu. Związki te działały z jednakową siłą na szczepy wrażliwe bądź oporne na erytromycynę, penicylinę G i/lub chloramfenikol. Stężenia hamujące wzrost szczepów *S. aureus* są kilkukrotnie wyższe w porównaniu z wankomycyną, jednak znacznie niższe niż chloramfenikolu. Lipopeptydy prezentowały aktywność bakteriobójczą w stosunku do szczepów gronkowca złocistego, a stężenia „bójcze” tych związków są równe MIC lub dwukrotnie wyższe.

5. DYSKUSJA

S. aureus jest kluczowym patogenem odpowiedzialnym za zakażenia skóry i tkanek miękkich, a wykazanie w ostatnich latach biologicznego działania egzotoksyn, enterotoksyn i toksyny wstrząsu toksycznego, charakterystycznego dla superantygenów, świadczy o wyjątkowej zjadliwości tego drobnoustroju wśród innych bakterii [3, 38, 43].

W serii omawianych publikacji dokonano dokładnej analizy szczepów *S. aureus* izolowanych od pacjentów z czyracznością nawrotową przy pomocy metod fenotypowych oraz genotypowych: *ADSRRS-fingerprinting*, PFGE, PCR-MP oraz Multiplex PCR. Pozwoliło to na opracowanie nowych możliwości diagnostycznych w tym schorzeniu oraz znaczne poszerzenie wiedzy w zakresie patogenności szczepów za nie odpowiedzialnych. Dokonano również szczegółowych badań nad szczepami *S. aureus* kolonizującymi skórę pacjentów z erytrodemią na podłożu zapalnym i nowotworowym celem oceny ich roli w tych schorzeniach. Przeprowadzono ponadto szereg nowatorskich badań nad wrażliwością omawianych szczepów gronkowca złocistego na naturalne antybiotyki peptydowe pochodzenia ludzkiego oraz naturalnie występujące w przyrodzie pod kątem ich potencjalnego zastosowania w terapii. Zbadano również aktywność omawianych związków w różnych środowiskach ze szczególnym uwzględnieniem czynników hamujących ich aktywność przeciwbakteryjną [praca 1-praca 8].

Czyraczność nawrotowa najczęściej dotyczy młodych ludzi a patogenеза tego schorzenia jest dość złożona [39, 111]. Nawrotowości schorzenia sprzyjają: otyłość, alkoholizm, złe nawyki żywieniowe, zaburzenia hematologiczne, immunosupresja, AIDS oraz cukrzyca [79]. W badanej grupie chorych z czyracznością zaledwie u 2 stwierdzono czynniki predysponujące, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi [39, 111]. Większy odsetek nosicielstwa *S. aureus* w nosie u chorych z czyracznością niż w grupie kontrolnej stwierdzony w naszych badaniach [praca 3, praca 6] był również obserwowany przez El-Gilany i wsp oraz Masiuka i wsp. [39, 68]. Według Toshkovej i wsp. nosicielstwo w nosie może wystąpić u 100% chorych z czyracznością nawrotową [101].

W celu dokładnej analizy materiału genetycznego badanych szczepów wykorzystano cztery techniki PCR: *ADSRRS-fingerprinting*, PFGE, PCR-MP oraz Multiplex PCR.

W prezentowanych pracach po raz pierwszy zastosowano techniki *ADSRRS-fingerprinting* oraz PCR-MP do typowania szczepów *S. aureus* [praca 2, praca 3]. Wszystkie użyte techniki PCR udowodniły pokrewieństwo epidemiologiczne szczepów izolowanych z nosa i zmian skórnych przy dość dużej różnorodności genetycznej szczepów [praca 3]. Należy również pamiętać, że genotyp danego szczepu odpowiedzialnego za zmiany skórne u jednej osoby może zmieniać się na skutek genomowych rearanżacji i rozprzestrzeniania np. w obrębie

rodziny dając nieco inny wzór na żelu elektroforetycznym. Możliwa jest również sytuacja, że osoby podatne na nosicielstwo *S. aureus* nabywają go innymi drogami niż przez kontakt z członkami rodziny, co sprawia, że bakterie izolowane od chorego różnią się fenotypowo i genotypowo od patogenów izolowanych od domowników [31]. Udowodniono ponadto, że u pacjentów cierpiących z powodu przewlekłych chorób infekcyjnych często dochodzi do zmian w genomie gronkowca złocistego na skutek delecji, konwersji lub mobilizacji fagów [49].

Zainspirowani uzyskanymi wynikami badań postanowiliśmy przebadać szczepy gronkowcowe pod kątem obecności genów dla poszczególnych toksyn (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *tst*, *eta*, *etb*) i genów *agr* oraz *lukS/lukF-PV* wykorzystując technikę Multiplex PCR. Stwierdzono [praca 6], że aż 43/44 szczepów izolowanych od chorych z czyracznością nawrotową i zaledwie 6/43 nosicieli *S. aureus* w nosie bez czyraczności w wywiadzie należało do grupy IV *agr*. We wcześniejszej publikacji Nolte'a i wsp. [74] ustalono, że zaledwie 39,6% szczepów izolowanych z ropni skórnych lub czyraków należało do tej grupy. W świetle bieżącego piśmiennictwa nasz zespół jako pierwszy opublikował dominację grupy IV *agr* w czyraczności nawrotowej co rzuca nowe światło na patogenezę tego schorzenia. Dodatkowo większość badanych szczepów (21/27) w przeciwieństwie do grupy kontrolnej (0/43) wykazywała ekspresję genu leukocydyny Pantone-Valentine (PVL) odpowiedzialnej za niszczenie leukocytów i martwicę tkanek. Gen PVL został stwierdzony u szczepów *S. aureus* wywołujących ciężką postać martwiczego zapalenia płuc i czyraczność [63]. W dotychczas opublikowanych pracach [4, 63, 111] stwierdzono obecność genów dla PVL u 30% szczepów *S. aureus* w Zachodniej Afryce, 40% w Japonii aż po 93% we Francji. Wydzielanie tej leukocydyny ma również wpływ na nawrotowość czyraków. Couppie i wsp. [32] dowiedli, że aż 92% szczepów *S. aureus* izolowanych od chorych z czyracznością nawrotową wydzielало PVL w porównaniu z 33% szczepów izolowanych od chorych z czyracznością sporadyczną. Analogiczną zależność stwierdziliśmy w naszym badaniu – obecność genów *lukS/lukF* determinuje ciężki przebieg czyraczności.

Pojedyncze prace, np. [19] dowodzą, że PVL jest markerem genetycznym szczepów metycylinoopornych *S. aureus* (MRSA). Ten typ oporności jest również typowy dla PVL dodatnich szczepów izolowanych od pacjentów z zapaleniem płuc, posocznicy i innych zakażeń ogólnoustrojowych, natomiast nie dla czyraczności. Zarówno w naszym badaniu jak i pracach opublikowanych przez Nolte'a [74], Wiese-Posselta [106] i Pereza-Rotha [82] stwierdzono obecność PVL dodatnich szczepów *S. aureus* wrażliwych na metycylinę (MSSA) w przeciwieństwie do szczepów izolowanych z ciężkich infekcji. Niemniej jednak w naszym badaniu stwierdziliśmy duży odsetek szczepów zawierających gen PVL wśród wrażliwych na metycy-

linę gronkowców izolowanych od chorych z czyracznością. Jest to wskazówka, aby diagnostyki tego typu infekcji nie opierać jedynie na oznaczeniu lekowrażliwości.

W aspekcie uzyskanych wyników interesującym wydało się zbadanie szczepów *S. aureus* izolowanych od pacjentów z erytrodermią na podłożu zapalnym (łuszczyca, atopowe zapalenie skóry) i nowotworowym (CTCL, Zespół Sezary'ego) pod kątem zdolności do wydzielania superantygenów. Jak dotychczas przeprowadzono niewiele badań dotyczących roli *S. aureus* w erytrodermii na różnym podłożu w populacji polskiej. Problem podejmowany jest w nieco szerszym zakresie w literaturze światowej, jednakże nadal wiele kwestii wymaga wyjaśnienia. Prace na ten temat dotyczą najczęściej jednej jednostki chorobowej i oparte są na niedużej liczbie pacjentów.

Superantygeny wykazują zdolność stymulowania dużej liczby limfocytów T. W przeciwieństwie do klasycznych antygenów reagujących z tzw. „kieszonką immunologiczną”, superantygeny wiążą się bezpośrednio z głównym kompleksem zgodności tkankowej (MHC klasy II) na powierzchni komórki prezentującej antygen, na zewnątrz receptora TCR [67]. Dzięki temu pobudzają nie tylko jeden klon limfocytów swoiście rozpoznających antygen, jak klasyczne antygeny, lecz wszystkie limfocyty mające daną odmianę łańcucha V β , należące do różnych klonów, bez względu na swoistość receptora TCR. Superantygeny powodują więc pobudzenie i proliferację poliklonalną limfocytów CD4+ i CD8+ w tkance i we krwi obwodowej, w przypadku niektórych superantygenów nawet 5-30% wszystkich limfocytów. Liczba pobudzonych limfocytów jest zatem 10-100 razy większa niż w przypadku reakcji z klasycznym antygenem [92]. Superantygeny gronkowcowe mają zdolność penetracji naskórka i skóry właściwej, reagują z różnymi komórkami układu immunologicznego skóry stymulując procesy zapalne, indukują reakcję zapalną w miejscu aplikacji na skórze oraz stymulują produkcję IgE skierowanych przeciwko poszczególnym superantygenom.

Podczas gdy rola superantygenów *S. aureus* w zaostrzaniu objawów AZS jest dość dobrze poznana, ich działanie w łuszczycy nie zostało w pełni udowodnione. Istnieją pojedyncze doniesienia, np w [99], na temat korelacji ciężkości przebiegu AZS i łuszczycy a zdolnością do wydzielania enterotoksyn przez szczepy *S. aureus* izolowane od pacjentów z tymi dermatozami. Superantygeny odgrywają ważną rolę w patogenezie przewlekłych chorób zapalnych, ale także niektórych nowotworów. Znane są powiązania superantygenów bakteryjnych i wirusowych z rakiem piersi. Ostatnio rozważa się także rolę tych superantygenów w pierwotnych chłoniakach skóry z komórek T (CTCL – *Cutaneous T Cell Lymphoma*). Zaangażowanie superantygenów w ekspansję komórek nowotworowych guza tłumaczy się w dwojaki sposób. Pierwsza teoria zakłada, że superantygeny promują przewlekłą odpowiedź zapalną w skórze zaburzając rozwój klonów T-komórkowych, co prowadzi do rozwoju nowotworu. Druga, że transformacja nowotworowa zachodząca pierwotnie w skórze umożliwia superantygenom stymulację komórek prowadzącą do wzrostu guza. Rozważając związek pomię-

dzy działaniem superantygenów, a patogenezą nowotworów nie można pominąć roli łańcucha V β receptora TCR, od którego zależy i reakcja na superantygeny i ekspansja złośliwych limfocytów T. Bakteryjne zakażenia skóry indukują nagromadzenie złośliwych i nienowotworowych komórek T o tym samym łańcuchu TCR V β [64]. Indukuje to pytanie czy rodzaj TCR V β samodzielnie może stanowić marker komórek nowotworowych w CTCL. Ma to ważne implikacje w procesie diagnostycznym CTCL, w którym wykorzystuje się analizę molekularną rearanżacji genów TCR, w tym TCR V β [26]. Znane są tylko pojedyncze doniesienia określające rolę superantygenów *S. aureus* w erythrodermicznych postaciach CTCL. Opisywano zmniejszenie stanu zapalnego oraz częściowo masy guza po leczeniu chłoniaka antybiotykami [26, 54, 64] .

Teoretycznie można założyć, że podobnie jak w innych dermatozach, w których rolę odgrywają limfocyty T, do rozwoju CTCL dochodzi u pacjentów z pewnym typem determinant HLA, u których kontakt z określonymi antygenami i superantygenami prowadzi do uruchomienia odpowiedzi immunologicznej z zaangażowaniem odpowiednich cytokin i chemokin. U pacjentów tych wykazujące epidermotropizm limfocyty T nie poddają się procesowi apoptozy i dzielą się w sposób niekontrolowany tworząc nowotworowy klon. Superantygeny *S.aureus* prezentowane przez komórki Langerhansa oraz keratynocyty indukują produkcję cytokin stymulujących limfocyty T. Stała kolonizacja tych bakterii może doprowadzić do rozrostu epidermotropowych limfocytów T oraz produkcji cytokin/chemokin, m.in. indukowanego interferonem białka 10, zdolnego do nasilenia zachodzącej reakcji poprzez rekrutację kolejnych komórek [86, 97]. Wychodząc z tych założeń wydaje się, że zależność pomiędzy infekcją gronkowcową, a rozwojem erythrodermii w CTCL powinna być poddana dalszym badaniom.

Najwięcej badań poświęconych roli *S. aureus* dotyczy AZS [73, 110]. Większość szczepów izolowanych od chorych z tą jednostką chorobową wydzielają toksyny pełniące funkcję superantygenów, głównie SEA, SEB, SEC, SED i TSST-1 co potwierdziliśmy również w naszych badaniach (66,7% badanych szczepów wydzielają SupAg) [praca 7], [20, 80].

Liczne badania dotyczące efektu leczenia przeciwbakteryjnego w aspekcie nosicielstwa *S. aureus* w AZS i nasilenia stanu zapalnego dały sprzeczne wyniki. Opublikowano zarówno badania otwarte jak i badania z podwójnie ślepą próbą kontrolowane placebo dotyczące stosowania miejscowych lub doustnych antybiotyków, które wykazywały zmniejszenie gęstości kolonizacji i częściowe zmniejszenie stanu zapalnego [22, 65, 105] jak i badania dowodzące braku poprawy u chorych AZS leczonych doustnymi antybiotykami [17, 41]. Niezależnie od proponowanej metody leczenia do rekolonizacji *S. aureus* dochodziło po 4-8 tygodniach [20].

Kolonizacja i wtórne infekcje wywoływane przez gronkowce i paciorkowce mają również zaostřejający wpływ na przebieg łuszczycy [62, 102]. Obecność *S. aureus* w erythro-

dermii łuszczycowej potwierdzono u 8 na 11 chorych, podczas gdy zdolność do wydzielania SupAg stwierdzono tylko u 3 szczepów. Tomi i wsp. stwierdzili obecność *S. aureus* u 50% chorych z łuszcycą na skórze i w nosie, a nasilenie choroby koreluje ze zdolnością do wydzielania enterotoksyn SEA-D przez kolonizujące szczepy [99].

W erytrodermicznych postaciach CTCL obecność szczepów wydzielających SupAg stwierdzono w 50% przypadków. Wartość ta jest niższa niż w badaniu Jackowa, który stwierdził *S. aureus* na skórze lub we krwi u 32 na 42 chorych z erytrodermiczną postacią CTCL [54]. Zaobserwował on ponadto przewagę TSST1 nad innymi superantygenami co ściśle korelowało z oligoklonalną ekspansją genu V β receptora TCR. W naszym badaniu, prawdopodobnie z uwagi na niewielką liczbę pacjentów z tą chorobą nie obserwowano tej zależności. Niemniej jednak badanie obecności *S. aureus* u chorych z CTCL jest bardzo ważne z uwagi na opisywane u nich bakteriemie i posocznice często bez gorączki [54].

Badając wrażliwość szczepów *S. aureus* w stosunku do AMPs nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy wydzielającymi i nie wydzielającymi SupAg. Odminną sytuację zaobserwowano podczas oznaczania wrażliwości na klasyczne antybiotyki. Szczepy *S. aureus* wydzielające SupAg wymagały znacznie wyższych wartości MIC i MBC niż nie wydzielające SupAg. Szczególnie alarmująca jest większa oporność tych szczepów w stosunku do makrolidów i linkozamidów [1, 95]. Niepokojącym jest również fakt, że antybiotyki β -laktamowe tak powszechnie stosowane w terapii infekcji skóry i tkanek miękkich mogą zwiększać produkcję toksyn przez szczepy gronkowcowe [95]. Szczepy wydzielające superantygeny mogą wytwarzać dodatkowe mechanizmy obronne przez co stają się coraz bardziej odporne na tradycyjną antybiotykoterapię. Adachi i wsp. [1] spekulowali, czy inhibitory syntezy protein mogą mieć wpływ na zahamowanie produkcji SupAg przez *S. aureus*. Niemniej jednak zahamowanie wydzielania SupAg przez antybiotyki niekoniecznie musi pokrywać się z ich skutecznością kliniczną.

Narastanie oporności bakterii na konwencjonalne antybiotyki stanowi poważny problem współczesnej medycyny i skłania do poszukiwania nowych metod terapeutycznych wykorzystujących możliwości obronne ludzkiego ustroju. Zwiększona ekspresja AMPs w łuszczycy koreluje z małą podatnością zmian skórnych w tej chorobie na infekcje bakteryjne. Diametralnie różna sytuacja jest obserwowana u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry, u których obniżony poziom LL-37 i hBD-2 sprzyja częstym infekcjom bakteryjnym i wirusowym [45, 112]. Nie ma doniesień na temat ekspresji AMPs w skórze pacjentów z CTCL, pomimo istniejącej hipotezy, że transformacja i ekspansja nowotworowych limfocytów są prowokowane przez stymulację antygenów i superantygenów bakteryjnych, w tym *S. aureus*. Ograniczenie populacji *S. aureus* w skórze pacjentów z CTCL mogłoby przyczynić się do hamowania procesu nowotworowego. Aktualnie dostępne metody terapeutyczne nie dają możliwości wyleczenia pacjentów z CTCL, a niosą ze sobą liczne powikłania. Chemioterapia sto-

sowana w późnych stadiach CTCL oraz w zespole Sezary'ego powoduje istotny spadek odporności u pacjentów. Znane są przypadki zgonów z powodu posocznicy gronkowcowej.

Niebywałymi zaletami wynikającymi z mechanizmu działania antybiotyków peptydowych są ich aktywność bakteriobójcza oraz niskie ryzyko wytworzenia przez bakterie mechanizmów oporności na te związki. Niezbędne jest przeprowadzenie testów, które potwierdzą brak indukcji zjawiska narastania oporności na antybiotyki peptydowe. Kluczowe są również badania, które udowodnią brak ich działania toksycznego na organizm ludzki. Hipotetycznie można założyć, że związki naturalnie występujące w organizmach *Eucariota* oraz ich bliskie analogi strukturalne powinny być bezpieczne w stosowaniu. Ich selektywność jest warunkowana wartością potencjału błonowego, u *Eukariota* jest ona mniej ujemna niż u *Prokariota*. Spowodowane jest to rozmieszczeniem anionowych lipidów w błonie, które u bakterii skierowane są na zewnątrz błony komórkowej, podczas gdy w komórkach eukariotycznych anionowe lipidy skierowane są do cytoplazmy. Istotna jest również obecność cholesterolu w błonie komórek eukariotycznych.

Zastosowanie krótkich lipopeptydów w terapii gronkowcowych chorób skóry wydaje się być ciekawą alternatywą dla miejscowych antybiotyków. Związki te poza aktywnością przeciwbakteryjną wykazują właściwości powierzchniowo czynne, dzięki czemu mogą służyć jednocześnie jako emulgator do emulsji i konserwant w postaci leku na skórę.

Szerokie zastosowanie w leczeniu infekcji skóry i tkanek miękkich znalazł nowy antybiotyk należący do grupy lipopeptydów – daptomycyna. Charakteryzuje się wysoką aktywnością w stosunku do bakterii Gram dodatnich, w tym *S. aureus* [94].

Badania aktywności mikrobiologicznej naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych – matrycy, na podstawie której zsyntetyzowano grupę krótkich lipopeptydów, potwierdzają ich wysoką aktywność względem szerokiego spektrum drobnoustrojów, w tym szczepów opornych na konwencjonalne antybiotyki takich jak MRSA. Wyniki prezentowanej pracy potwierdzają aktywność lipopeptydów wobec szczepów opornych na erytromycynę, penicylinę oraz chloramfenikol. Wśród badanych szczepów nie zidentyfikowano szczepów wankomycyno opornych [praca 8]. Należałoby rozszerzyć badania aktywności mikrobiologicznej na szerszy zakres bardziej zróżnicowanych szczepów *S. aureus*, charakteryzujących się opornością na antybiotyki konwencjonalne. Wykazanie aktywności krótkich lipopeptydów potwierdziłoby zasadność rozpatrywania tej grupy związków jako przyszłych leków przeciwgronkowcowych. Poza wynikami badań wstępnych dotyczących aktywności lipopeptydów przemawiają za tym również informacje dostępne na temat peptydów przeciwdrobnoustrojowych [66].

Do dnia dzisiejszego opisano ponad 600 tzw. endogennych antybiotyków peptydowych. Charakteryzują się szerokim spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej obejmującym bakterie, wirusy oraz grzyby. Stanowią integralną część układu odpornościowego orga-

nizmów królestwa *Eucaryota*, gdzie są zlokalizowane na wszystkich powierzchniach ekspozowanych na środowisko zewnętrzne. Ludzkie AMP's – defensyny i katelicydyny obecne w leukocytach są także wydzielane przez gruczoły skóry i błon śluzowych i stanowią ważny element ochrony organizmu przed drobnoustrojami. Podobnie jak krótkie lipopeptydy wykazują one aktywność bójczą w stosunku do mikroorganizmów poprzez przenikanie i niszczenie błony komórkowej, inaczej niż tradycyjne antybiotyki działające na konkretną strukturę komórkową. Aktywny peptyd powstały po przemianie ludzkiej katelicydyny – LL37 wykazuje aktywność wobec bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych. Potwierdzono jego obecność w neutrofilach, monocytach, subpopulacjach limfocytów, keratynocytach w warunkach stanu zapalnego oraz miejscach po urazach mechanicznych, gdzie sprzyja ograniczaniu rozwoju infekcji między innymi *S. aureus* [107] .

Szereg związków należących do grupy peptydów przeciwdrobnoustrojowych znajduje się obecnie w trakcie badań klinicznych oraz przedklinicznych. Analog indolicydyny, naturalnie występującej w neutrofilach bydlęcych, MBI 594 AN może znaleźć zastosowanie w leczeniu trądziku. Charakteryzuje się wysoką aktywnością względem *Propionibacterium acnes*, najważniejszej związanej z trądzikiem bakterii, której oporność w stosunku do konwencjonalnych antybiotyków gwałtownie wzrasta [71].

P113 – analog histatyn pochodzących ze śliny ssaków – wykazuje znaczną aktywność *in vitro* w stosunku do bakterii Gram dodatnich, Gram ujemnych oraz *Candida albicans* [83] . Ukończono pomyślnie pierwszy i drugi etap badań klinicznych dotyczących stosowania tego związku w leczeniu kandydozy jamy ustnej pacjentów z HIV [100]. Planuje się także wykorzystanie tego związku w infekcjach płuc *Pseudomonas aeruginosa* u pacjentów chorych na mukowiscydozę. Wyniki badań nad D2A21 przeprowadzone na modelach szczurzych sugerują, że związek ten może być obiecującym antybiotykiem do stosowania miejscowego w leczeniu infekcji skórnych i ran oparzeniowych [24].

Kationowe lipopeptydy są stosunkowo nową grupą związków, więc nie ma jeszcze dostępnych wielu danych dotyczących aktywności tych substancji. Prace dotyczą głównie jednego z lipopeptydów (Palm-KK-NH₂) i jego aktywności *in vitro*. Przeprowadzone zostały także badania na modelach szczurzych, gdzie Palm-KK-NH₂ okazał się być skuteczny wobec indukowanych infekcji gronkowcowych bez wystąpienia skutków ubocznych u badanych szczurów [12, 30, 91].

6. WNIOSKI

1. Techniki *ADSRRS-fingerprinting* i PCR MP wykazały, że w większości przypadków szczepy bakteryjne izolowane od pacjenta: ze zmiany skórnej, nosa i/lub gardła, prezentowały genetyczne podobieństwo umożliwiające zaliczenie ich do tego samego genotypu.
2. Wśród gronkowców izolowanych od pacjentów z nawrotową czyraccznością dominują metycylinowrażliwe szczepy *S. aureus* należące do IV grupy *agr* i posiadające gen leukocydyny *lukS/lukF-PV*.
3. Wydzieliny ustrojowe zawierające wysokie stężenia GAGs hamują aktywność przeciwbakteryjną LL-37, natomiast polikationy wiążące się do GAGs zwiększają aktywność przeciwbakteryjną endogennych antybiotyków peptydowych w wydzielinach zawierających glikozaminoglikany.
4. Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe wydają się interesującą alternatywą dla konwencjonalnej antybiotykoterapii z uwagi na znacznie niższe wartości MIC i MBC oraz odmienny mechanizm działania minimalizujący ryzyko rozwoju oporności.
5. Oporność na antybiotyki nie koreluje z opornością w stosunku do AMPs, a wydzielane superantygeny nie mają wpływu na aktywność przeciwbakteryjną AMPs.
6. Zastosowanie krótkich lipopeptydów w terapii gronkowcowych chorób skóry wydaje się być obiecującą opcją terapeutyczną. Związki te poza aktywnością przeciwbakteryjną wykazują właściwości powierzchniowo czynne, dzięki czemu mogą służyć jednocześnie jako emulgator do emulsji i konserwant w postaci leku na skórę.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Adachi Y, Akamatsu H, Horio T. The effect of antibiotics on the production of superantigen from *Staphylococcus aureus* isolated from atopic dermatitis. J Dermatol Sci. 2002; 28 (1): 76–83.
2. Adamek-Guzik T, Guzik TJ, Czerniawska-Mysik G, Kasprowicz A, Pryjma J. Wpływ leczenia atopowego zapalenia skóry na stopień kolonizacji przez *Staphylococcus aureus*. Alergia, Astma, Immunol. 2002; 7 (1): 33-43.
3. Arbuthnott JP, Coleman DC, de Azavedo JS. Staphylococcal toxins in human disease. J Appl Bacteriol. 1990; 69 (supl):1013-75.
4. Baba Mussa L, Sanni A, Dagnra AY. Approche épidémiologique de l'antibiorésistance et de la production de leucotoxines par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées en Afrique de l'Ouest. Med Mal Infect. 1999; 29: 689-96.
5. Barańska-Rybak W, Cirioni O, Dawgul M, Sokolowska-Wojdyło M, Naumiuk L, Szczerkowska-Dobosz A, Nowicki R, Roszkiewicz J, Kamysz W. Activity of antimicrobial peptides and classic antibiotics against superantigen positive *Staphylococcus aureus* isolated from the patients with neoplastic and inflammatory erythrodermia. Chemotherapy Research and Practice. 2011; art. nr 270932, [6 s.].
6. Barańska-Rybak W, Nowicki R. Zakażenie skóry wywołane przez bakterie wrażliwe na kwas fusydowy. Zakażenia. 2010; 2, 98-102.
7. Barańska-Rybak W, Nowicki R, Sokołowska-Wojdyło M, Michajłowski I, Starzyńska A, Maciejewska K, Drogoszewska B, Gawrońska-Skorkowska J, Włodarkiewicz A. Identification of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the patients with recurrent furunculosis by ADSRRS-fingerprinting PCR. Pol J Environ Study. 2009; 18, (1A), 160-63.
8. Barańska-Rybak W, Nowicki R, Sokołowska-Wojdyło M, Michajłowski I, Starzyńska A, Maciejewska K, Drogoszewska B, Włodarkiewicz A. The potential role of antimicrobial peptides in recurrent furunculosis. Pol J Environ Study. 2009; 18, (1A), 179-83.
9. Barańska-Rybak W, Sokołowska-Wojdyło M, Trzeciak M, Michajłowski I, Maciejewska-Radomska A, Nowicki R, Roszkiewicz J. Rola superantygenów bakteryjnych w chorobach skóry. Przegl Dermatol. 2009; 96 (4), 301-304.
10. Barańska-Rybak W, Sonesson A, Nowicki R, Schmidtchen A. Glycosaminoglycans inhibit the antibacterial activity of LL-37 in biological fluids J Antimicrob Chemother. 2006; 57, 260-65.

11. Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. J Clin Pathol. 1961; 14: 385-93.
12. Barchiesi F, Giacometti A, Cirioni O, Arzeni D, Silvestri C, Kamysz W, Abbruzzetti A, Riva A, Kamysz E, Scalise G. In vitro activity of the synthetic lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH(2) alone and in combination with antifungal agents against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. Peptides. 2007; 28(8), 1509-13.
13. Barski P, Piechowicz L, Galiński J, Kur J. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. Mol Cell Probes. 1996; 10: 471-5.
14. Bastos MC, Ceotto H, Coelho ML, Nascimento JS. Staphylococcal antimicrobial peptides: Relevant properties and potential biotechnological applications. Curr Pharm Biotechnol. 2009; 10(1): 38-61.
15. Berlau J, Lorenz P, Beck R, Makovitzky J, Schlötzer-Schrehardt U, Thiesen HJ, Guthoff R. Analysis of aqueous humour proteins of eyes with and without pseudoexfoliation syndrome. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2001; 239: 743-6.
16. Björnsson S. Quantitation of proteoglycans as glycosaminoglycans in biological fluids using an alcian blue dot blot analysis. Anal Biochem. 1998; 256: 229-37.
17. Boguniewicz M, Sampson H, Leung B, Harbeck R, Leung D. Effects of cefuroxime axetil on *S. aureus* colonization and superantigen production in atopic dermatitis. J Allergy and Clin Immunol. 2001; 108(4): 651-52.
18. Bouzari N, Kim N, Kirsner RS. Defense of the skin with LL-37. J Invest Dermatol. 2009; 129(4), 814-19.
19. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentin leukocidin. Lab Invest. 2007; 87: 3-9.
20. Breuer K, Häussler S, Kapp A, Werfel T. *Staphylococcus aureus*: colonizing features and influence of an antibacterial treatment in adults with atopic dermatitis. Br J Dermatol. 2002; 147(1): 55-61.
21. Breuer K, Kapp A, Werfel T. Bacterial infections and atopic dermatitis, Allergy. 2001; 56(11): 1034-41.
22. Brockow K, Grabenhorst P, Abeck D, Traupe B, Ring J, Hoppe U, Wolf F. Effect of gentian violet, corticosteroid and tar preparations in *Staphylococcus aureus* – colonized atopic eczema. Dermatology. 1999; 199 (3): 231-36.
23. Bunikowski R, Mielke MEA, Skarabis H, Warm M, Anagnostopoulos I, Kolde G, Wahn U, Renz H. Evidence for a disease-promoting effect of *Staphylococcus aureus* – derived exotoxins in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2000; 105: 814-18.

24. Chalekson CP, Neumeister MW, Jaynes J. Treatment of infected wounds with the antimicrobial peptide D2A21. *Trauma*. 2003;54(4):770-74.
25. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7 (9): 629-41
26. Charley M, McCoy JP, Den JS, Jegasothy B. Anti V-region antibodies as “almost” clonotypic’ reagent for the study of cutaneous lymphomas and leukemia. *J Invest Dermatol*. 1990; 95:614-617.
27. Christensen T. Qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil. *Acta Chem Scand Ser B*. 1979; 33: 763.
28. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Kamysz W, Orlando F, Mocchegiani F, Silvestri C, Scalise G. Citropin 1.1-treated central venous catheters improve the efficacy of hydrophobic antibiotics in the treatment of experimental staphylococcal catheter-related infection. *Peptides*. 2006; 27(6): 1210-16.
29. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Kamysz W, Orlando F, Mocchegiani F, Silvestri C, Scalise G. Temporin A alone and in combination with imipenem reduces lethality in a Mouse model of staphylococcal sepsis. *J Infect Dis*. 2005; 192(9): 1613-20.
30. Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Kamysz W, Silvestri C, Orlando F, Mocchegiani F, Vittoria AD, Kamysz E, Saba V, Scalise G. The lipopeptides Pal-Lys-Lys-NH(2) and Pal-Lys-Lys soaking alone and in combination with intraperitoneal vancomycin prevent vascular graft biofilm in a subcutaneous rat pouch model of staphylococcal infection. *Peptides*. 2007; 28(6): 1299-303.
31. Claus H, Cuny B, Passemann B, Witte W. A database system for fragment patterns of genomic DNA of *Staphylococcus aureus*. *Zbl Bacteriol*. 1998; 287:105-16.
32. Couppie P, Cribier B, Prévost G. Lekocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiologic study. *Arch Dermatol*. 1994; 130: 1208-9.
33. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23 (3): 616-87.
34. Dawgul M, Barańska-Rybak W, Greber K, Guzik Ł, Kamysz W, Łukasiak J. Aktywność mikrobiologiczna krótkich lipopeptydów wobec klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus*. *Alergia, Astma, Immunol*. 2011; 16(1): 31-36.
35. DeLeo FR, Diep BA, Otto M. Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2009; 23 (1): 17-34.

36. Deleo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 2010; 375: 1557-68.
37. Dikema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis. 2001; 32 (supl 2): 114-32.
38. Duckworth GJ, Oppenheim BA. Enterotoxin production in epidemic Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 1986; 1: 565-6.
39. El-Gilany AH, Fathy H. Risk factors of recurrent furunculosis. Dermatol Online J. 2009; 18: 179-83.
40. Elliott S, Hanifin J. Delayed cutaneous hypersensitivity and lymphocyte transformation: dissociation in atopic dermatitis. Arch Dermatol 1979; 115: 36-39.
41. Ewing C, Ashcroft C, Gibbs A, Jones GA, Connor PJ, David TJ. Flucloxacillin in the treatment of atopic dermatitis. Br J Dermatol. 1998; 138(6): 1022-29.
42. Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. Int J Pept Protein Res. 1990; 35(3): 161.
43. Fleisher B. The staphylococcal enterotoxins as prototype “superantigens”[w] Staphylococci and staphylococcal infection. [red] Mollby R, Flock JI, Nord CE, Christensson B. [wyd] Gustav Fisher Verlag. 1994; 325-27.
44. Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. Nat Rev Microbiol. 2005; 3 (12): 948-58
45. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Ståhle-Bäckdahl M, Lidén S, Wigzell H, Gudmundsson GH. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. J Biol Chem. 1997; 272: 15258-63.
46. Garbacz K, Piechowicz L, Barańska-Rybak W, Dąbrowska-Szponar M. *Staphylococcus aureus* isolated from patients with recurrent furunculosis carrying Pantone-Valentine leukocidin genes represent *agr* specificity group IV. Eur J Dermatol. 2011; 21 (1): 43-46.
47. Giacometti A, Crioni O, Kamysz W, Silvestri C, Licci A, Riva A, Łukasiak J, Scalise G. In vitro activity of amphibian peptides alone and in combination with antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens isolated from surgical wound infection. Peptides. 2005; 26(11): 2111-16.
48. Gliński W, Rudzki E. Alergologia dla lekarzy dermatologów. Czelej. Lublin 2002; 416-19.

49. Goerke C, Matias Y, Papenberg S, Dasbach S, Dietz K, Ziebach R, Kahl BC, Wolz C. Increased frequency of genomic alternations in *Staphylococcus aureus* during chronic infection is in part due to phage mobilization. J Infect Dis. 2004; 189 (4): 724-34.
50. Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, Jensen BJ, Killgore G, Tenover FC, Kuehnert MJ. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. J Infect Dis. 2008; 197 (9): 1226-34.
51. Hryniewicz W, Jeliaszewicz J. Purification and some properties of staphylococcal extracellular lipase. Biochim Biophys Acta. 1983; 749: 312-17.
52. Huang JT, Abrams M, Tloutan B, Rademaker A, Paller AS. Treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis decreases disease severity. Pediatrics. 2009; 123(5): 808-14.
53. Isenberg HD. Clinical Microbiology Handbook. Asm Press, Washington DC 2003.
54. Jackow CM, Cather JC, Hearne V, Asano AT, Musse JM, Duvic M. Association of erythrodermic Cutaneous T-cell Lymphoma, superantigen-positive *Staphylococcus aureus*, and oligoclonal T-cell receptor V β gene expansion. Blood. 1997; 89: 32-40.
55. Kamysz W, Okrój M, Łempicka E, Ossowski T, Łukasiak J. Fast and efficient purification of synthetic peptides using solid-phase extraction. Acta Chromatographica. 2004; 14: 180-86.
56. Kamysz W, Silvestri C, Crioni O, Giacometti A, Licci A, Della Vittoria A, Okroj M, Scalise G, In vitro activities of the lipopeptides palmitoyl (Pal)-Lys-Lys-NH₂ and Pal-Lys-Lys alone and in combination with antimicrobial agents against multiresistant gram-positive cocci. Antimicrob Agents and Chemother. 2007; 51(1): 354-58.
57. Kaplan SL, Hulten KG, Gonzalez BE, Hammerman WA, Lamberth L, Versalovic J, Mason EO Jr. Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. Clin Infect Dis 2005; 40 (12): 1785-91
58. Kim HK, Cheng AG, Kim HY, Missiakas DM, Schneewind O. Nontoxigenic protein a vaccine for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in mice. J Exp Med. 2010; 207: 1863-70.
59. Klein E, Smith DL, Laxminarayan R. Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. Emerg Infect Dis. 2007; 13 (12): 1840-46.
60. Krawczyk B, Leibner J, Barańska-Rybak W, Samet A, Nowicki R, Kur J. ADSRRS-fingerprinting and PCR MP techniques for studies of intraspecies genetic relatedness in *Staphylococcus aureus*. J Microbiol Meth. 2007; 71: 114 -22.

61. Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS, Jackson R, Eisenhauer P . Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. J Immun Methods.1991;137: 167-73.
62. Leung D, Walsh P, Giorno R, Norris D.A potential role for superantigens in the pathogenesis of psoriasis. J Invest Dermatol.1993;100(3): 225-28.
63. Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J. Involvement of Panton-Valentine leukocidin - producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis. 1999; 29: 1128-32.
64. Linnemann T, Gellrich S, Lukowsky A, Mielke A, Audring H, Sterry W, Walden P . Polyclonal expansion of T cells with TCR V β type of the tumour cell in lesions of cutaneous T-cell lymphoma: evidence for possible superantigen involvement. Br J Dermatol. 2004;150:1013-17.
65. Lubet H, Amornsiripanitch S, Lucky A. Mupirocin and the eradication of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis. Arch Dermatol. 1988; 124(6): 853-54.
66. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. Curr Opin Pharmacol. 2006;6 (5): 468-72.
67. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. Science 1990; 248: 705-11.
68. Masiuk H, Kopron K, Grumann D, Goerke C, Kolata J, Jursa-Kulesza J, Giedrys-Kalemba S, Bröker BM, Holtfreter S. Association of recurrent furunculosis with Panton-Valentine leukocidin and the genetic background of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2010; 48: 1527-35.
69. Masny A, Pócienniczak A. Fingerprinting of bacterial genomes by amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites. Bio Techniques. 2001; 31:930-36.
70. McCaig LF, McDonald LC, Mandal S, Jernigan DB. *Staphylococcus aureus* – associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. Emerg Infect Dis. 2006; 12: 1715-23.
71. Melo MN, Dugourd D, Castanho MA. Omiganan pentahydrochloride in the front line of clinical applications of antimicrobial peptides. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2006;1(2):201-7.
72. Newsom SW. Ogston's coccus. J Hosp Infect. 2008; 70 (4): 369-72.
73. Niebuhr M, Scharonow H, Gathmann M, Mamerow D, Werfel T. Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2010 ;126(6):1176-83.

74. Nolte O, Haag H, Zimmerman A, Geiss HK. *Staphylococcus aureus* positive for Pantone-Valentine Leukocidin genes but susceptible to methicillin in patients with furuncles. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005; 24: 477-79.
75. Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, Darst MA, Gao B, Boguniewicz M, Travers JB, Leung DY. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. J Immunol 2003; 171: 3262-69
76. Noskin GA, Rubin RJ, Schentag JJ, Kluytmans J, Hedblom EC, Jacobson C, Smulders M, Gemmen E, Bharmal M. National trends in *Staphylococcus aureus* infection rates: impact on economic burden and mortality over a 6-year period (1998-2003). Clin Infect Dis. 2007; 45 (9): 1132-40.
77. Nowicki R, Arłukowicz E, Barańska-Rybak W, Samet A. Resistance to clindamycin and erythromycin of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the ambulatory patients with skin lesions in 1998-2001. European Academy of Dermatology and Venereology JEADV.2003; 17 (suppl 3): 189.
78. Nowicki R, Barańska-Rybak W, Arłukowicz E, Samet A. Rola *Staphylococcus aureus* w chorobach skóry. Zakażenia 2003; 4: 90-95.
79. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL, Leung DY. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis N Engl J Med. 2002; 347: 1151-60.
80. Ong PY, Patel M, Ferdman RM, Dunaway T, Church JA. Association of staphylococcal superantigen-specific immunoglobulin e with mild and moderate atopic dermatitis. J Pediatr. 2008 ;153(6):803-6.
81. Otto M. Basis of virulence in community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Rev Microbiol. 2010; 64: 143-62.
82. Pérez-Roth E, Alcoba-Flórez J, López-Aguilar C, Gutiérrez-González I, Rivero-Pérez B, Méndez-Alvarez S. Familial furunculosis associated with community-acquired leukocidin-positive methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* ST152. J Clin Microbiol. 2010; 48: 329-32.
83. Peters BM, Zhu J, Fidel PL Jr, Scheper MA, Hackett W, El Shaye S, Jabra-Rizk MA. Protection of the oral mucosa by salivary histatin-5 against *Candida albicans* in an ex vivo murine model of oral infection. FEMS Yeast Res. 2010;10(5):597-604.
84. Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. Proc Soc Exp Biol Med. 1942; 51 (3): 386-89.

85. Rogers DE, Tompsett R. The survival of staphylococci within human leukocytes. J Exp Med. 1952; 95: 209-30.
86. Sarris AH, Esgleyes-Ribot T, Crow M, Broxmeyer HE, Korasavvas N, Pugh W, Grossman D, Deisseroth A, Duvic M. Cytokine loops involving interferon-gamma and IP-10, a cytokine chemotactic for CD4-positive lymphocytes: an explanation for the epidermotropism of cutaneous T cell lymphoma. Blood. 1995; 86:651.
87. Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Björck L . Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. Mol Microbiol. 2002 ; 46 : 157-68.
88. Schmidtchen A, Frick IM, Björck L. Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial α -defensin. Mol Microbiol. 2001; 39: 708-13.
89. Shopsis B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, Martinez J, Kreiswirth BN. Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. J Clin Microbiol. 2003; 41: 456-59.
90. Simonetti O, Arzeni D, Ganzetti G, Silvestri C, Cirioni O, Gabrielli E, Castelletti S, Kamysz W, Kamysz E, Scalise G, Offidani A, Barchiesi F. In vitro activity of the lipopeptide derivative (Pal-Lys-Lys-NH), alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of dermatophytes. Br J Dermatol. 2009; 161(2): 249-52.
91. Simonetti O, Cirioni O, Goteri G, Ghiselli R, Kamysz W, Kamysz E, Silvestri C, Offidani A. Temporin A is effective in MRSA-infected wounds through bactericidal activity and acceleration of wound repair in a murine model. Peptides. 2008; 29(4): 520-28.
92. Skov L, Baadsgaard O. Bacterial superantigens and inflammatory skin diseases. Clin Exp Dermatol. 2000; 25: 57-61.
93. Smith G. Ogston's coccus: 102 years and still going strong. South Med. J. 1982; 12: 1559-62.
94. Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM, Tally FP. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. J Antimicrob Chemother. 2005; 55: 283–88.
95. Stevens D, Ma Y, Salmi D, McIndoo E, Wallace RJ, Bryant AE. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 2007; 195(2): 202-11.

96. Strange P, Skov L, Lisby S, Nielsen PL, Baadsgaard O . Staphylococcal enterotoxin B applied on intact normal and intact atopic skin induces dermatitis. Arch Dermatol. 1996; 132: 27-33.
97. Tan RS, Butterworth CM, McLaughlin H, Malka S, Samman PD. Mycosis fungoides – a disease of antigen persistence. Br J Dermatol. 1974;91:607-16.
98. Tokura Y, Furukawa F, Wakita H, Yogi H, Ushijima T, Takigawa H. T-cell proliferation to superantigen –releasing *Staphylococcus aureus* by MHC class II – bearing keratinocytes under protection from bacterial cytolysin. J Invest Dermatol. 1997; 108: 488-94.
99. Tomi NS, Kranke B, Aberer E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. J Am Acad Dermatol. 2005; 53: 67-72.
100. Torres SR, Garzino-Demo A, Meiller TF, Meeks V, Jabra-Rizk MA. Salivary histatin-5 and oral fungal colonisation in HIV+ individuals. Mycoses. 2009; 52(1):11-5.
101. Toshkova K, Annemüller C, Akineden O, Lämmler C. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. FEMS Microbiol Lett. 2001; 202: 17-24.
102. Travers J, Hamid Q, Norris D, Kuhn C, Giorno RC, Schlievert PM, Farmer ER, Leung DY. Epidermal HLA-DR and the enhancement of cutaneous reactivity to superantigenic toxins in psoriasis. J Clin Invest. 1999;104(9): 1181-89.
103. Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwartz C, Rosdahl VT, Braveny I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994; 13 (1): 50-55.
104. Wayne PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2006.
105. White M, Noble W. Consequences of colonization and infection by *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis. Clin Exp Dermatol. 1986;11(1): 34-40.
106. Wiese-Posselt M, Heuck D, Draeger A, Mielke M, Witte W, Ammon A, Hamouda O. Successful termination of a furunculosis outbreak due to lukS-lukF-positive, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a German village by stringent decolonization, 2002-2005. Clin Infect Dis. 2007; 44: 88-9.
107. Wiesner J, Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. Virulence. 2010; 1(5):440-64.

108. Williams C, Davis DL. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* fomite survival. Clin LabSci. 2009; 22(1), 34-38.
109. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. Immunity. 2004; 21: 241-54.
110. Yagi S, Wakaki N, Ikeda N, Takagi Y, Uchida H, Kato Y, Minamino M. Presence of staphylococcal exfoliative toxin A in sera of patients with atopic dermatitis. Clin Exp Allergy. 2004; 34(6): 984-93.
111. Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, Akiyama H, Arata J, Narita S, Chiba J, Kamio Y, Iwatsuki K . The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. Clin Infect Dis. 2005; 40: 381-5.
112. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. J Leu Biol. 2004; 75: 39-48.