

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej



**Aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych
wobec biofilmu gronkowcowego w warunkach przepływowych**

Maciej Jaśkiewicz

Praca doktorska wykonana
w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Katedry i Zakładu
Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Kamysz
Promotor
Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Kamysz

Gdańsk 2019



*Część wyników zamieszczonych w niniejszej pracy
otrzymana została w ramach projektu realizowanego
ze środków Narodowego Centrum Nauki
Nr 2011/03/B/NZ7/00548*

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania
Promotorowi mojej pracy doktorskiej
Panu Profesorowi Wojciechowi Kamyszowi
Za pokazanie mi jak pasjonująca może być Nauka*

*Realizacja niniejszej pracy doktorskiej
Nie obyła się bez wsparcia osób,
Z którymi miałem okazję współpracować.*

*W tym miejscu
Chciałbym podziękować
Koleżankom i Kolegom
Z Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej*

*Dr n. med. Sylwii Bartoszewskiej
Dr n. farm. Marcie Bauer
Mgr. farm. Dariuszowi Markowi
Mgr. inż. Damianowi Neubauerowi
Dr. n. chem. Karolowi Sikorze*

*Ponadto serdecznie dziękuję
Dr n. med. Izabeli Błazewicz*

oraz

*Pani Profesor Wioletcie Barańskiej-Rybak
Z Katedry i Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Za doskonałą współpracę i pomyślną realizację
Wszystkich celów naukowych*

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI STOSOWANYCH W PRACY	8
SYMBOLE AMINOKWASÓW	11
I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	12
1. GRONKOWIEC ZŁOCISTY	12
1.1. INFEKCJE POWODOWANE PRZEZ <i>S. AUREUS</i>	14
1.1.1. Bakteriemia <i>S. aureus</i>	15
1.1.2. Zakażenia skóry i tkanek miękkich.....	17
1.1.3. Infekcyjne zapalenie wsierdza.....	18
1.1.4. Zakażenia kostno-stawowe	19
1.1.5. Zapalenie płuc.....	20
1.1.6. Zakażenia związane z protezami i biomateriałami	21
1.2. UDZIAŁ GRONKOWCÓW W ZAKAŻENIACH SZPITALNYCH.....	22
1.3. CZYNNIKI WIRULENCJI ORAZ OPORNOŚĆ NA ANTIBIOTYKI	24
1.3.1. Czynniki adhezyjne.....	24
1.3.2. Enzymy gronkowcowe	24
1.3.3. Egzotoksyny.....	25
1.3.4. Oporność na antybiotyki	26
2. BIOFILM	29
2.1. ETAPY TWORZENIA SIĘ BIOFILMU	30
3. TERAPIA INKFEKCJI GRONKOWCOWYCH.....	32
3.1. ANTIBIOTYKOTERAPIA.....	32
4. PRZEPŁYWOWY MODEL BADANIA BIOFILMU	38
4.1. PODSTAWOWE METODY OKREŚLANIA AKTYWNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ	38
4.2. METODY WYKORZYSTYWANE W OCENIE ELIMINACJI BIOFILMU	39
4.3. MODEL PRZEPŁYWOWY	41
44	
5. PEPTYDY PRZECIWDROBNOUSTROJOWE	46
5.1. PODZIAŁ ZWIĄZKÓW	46
5.2. MECHANIZM DZIAŁANIA	51
5.3. SYNTETYCZNE PEPTYDY O PODWYŻSZONEJ AKTYWNOŚCI.....	53

II.	CEL PRACY	57
III.	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	58
1.	MATERIAŁY I METODY	58
1.1.	APARATURA.....	58
1.2.	ODCZYNNIKI	60
1.3.	MATERIAŁY LABORATORYJNE JEDNORAZOWEGO UŻYTKU	62
1.4.	LINIE KOMÓRKOWE ORAZ SZCZEPY DROBNOUSTROJÓW	63
1.5.	SYNTEZA ORAZ OCZYSZCZANIE PEPTYDÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH	65
1.6.	WYMIANA ORAZ OZNACZANIE PRZECIWJONÓW W PEPTYDACH	71
1)	<i>Otrzymywanie soli chlorkowych</i>	71
2)	<i>Otrzymywanie soli octanowych</i>	71
3)	<i>Oznaczenie zawartości przeciwwjonów</i>	72
1.7.	OZNACZENIE ZAWARTOŚCI PEPTYDU	73
1.8.	OCENA AKTYWNOŚCI BADANYCH ZWIĄZKÓW WOBEC SZCZEPÓW <i>S. AUREUS</i>	74
1)	<i>Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego wzrost</i>	74
2)	<i>Wyznaczanie minimalnego stężenia eliminującego biofilm</i>	75
3)	<i>Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego rozwój biofilmu</i>	76
1.9.	DODATKOWE BADANIA MIKROBIOLOGICZNE	77
1)	<i>Badanie zjawiska narastania oporności</i>	77
2)	<i>Ocena depolaryzacji błon</i>	77
1.10.	WYZNACZANIE CYTOTOKSYCZNOŚCI BADANYCH ZWIĄZKÓW	79
1)	<i>Ocena toksyczności wobec linii komórkowej keratynocytów ludzkich</i>	79
2)	<i>Ocena aktywności hemolitycznej</i>	80
1.11.	UKŁADY PRZEPŁYWOWE Z POLI(DIMETYLOSILOKSANU)	81
1.12.	OCENA AKTYWNOŚCI PEPTYDÓW PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH WOBEC BIOFILMU GRONKOWCOWEGO W WARUNKACH PRZEPŁYWOWYCH	83
1)	<i>Minimalne stężenia eliminującego biofilm w przepływie</i>	84
2)	<i>Badanie zjawiska narastania oporności w przepływowym modelu badawczym</i>	85
3)	<i>Badanie wpływu peptydów przeciwdrobnoustrojowych na formowanie się biofilmu w warunkach przepływowych</i>	86
IV.	OMÓWIENIE WYNIKÓW ORAZ DYSKUSJA	87
1.	OCENA WRAŻLIWOŚCI SZCZEPÓW KLINICZNYCH NA ANTIBIOTYKI I AMPs.....	87
2.	PRZECIWGRONKOWCOWA AKTYWNOŚĆ RETRO ANALOGÓW	90
3.	WPŁYW PRZECIWJONÓW NA AKTYWNOŚĆ PRZECIWGRONKOWCOWĄ PEPTYDÓW	93
4.	PRZECIWGRONKOWCOWA AKTYWNOŚĆ OMIGANANU I RETRO-OMIGANANU	101
4.1.	WYMIANA PRZECIWJONÓW	102
4.2.	AKTYWNOŚĆ RÓŻNYCH RODZAJÓW SOLI.....	102

4.3.	OZNACZENIE ZAWARTOŚCI PEPTYDÓW	110
4.4.	CYTOTOKSYCZNOŚĆ RÓŻNYCH RODZAJÓW SOLI	112
4.5.	BADANIE ZJAWISKA NARASTANIA OPORNOŚCI	115
4.6.	OCENA DEPOLARYZACJI BŁON	117
4.7.	MINIMALNE STĘŻENIE ELIMINUJĄCE BIOFILM W PRZEPŁYWIE	118
4.8.	BADANIE ZJAWISKA NARASTANIA OPORNOŚCI W BIOFILMIE W PRZEPŁYWIE	119
4.9.	WPLYW NA FORMOWANIE BIOFILMU W PRZEPŁYWIE	122
V.	WNIOSKI.....	126
VI.	STRESZCZENIE	128
VII.	SUMMARY.....	131
VIII.	LITERATURA	134
IX.	APPENDIX.....	150

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI STOSOWANYCH W PRACY

ABS	poli(akrylonitrylo-butadieno-styren)
ACN	acetonitryl
AMPs	peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. <i>antimicrobial peptides</i>)
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
ATCC	Amerykańska Kolekcja Kultur Typowych (ang. <i>American Type Culture Collection</i>)
AZS	atopowe zapalenie skóry
CAI	zakażenie pozaszpitalne (ang. <i>community-associated infection</i>)
CA-MRSA	pozaszpitalne szczepy gronkowca złocistego opornego na metycylinę (ang. <i>community associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
CLSI	Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (ang. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
clf	czynnik skupiania, koagulaza związana (ang. <i>clumping factor</i>)
CNS	gronkowce koagulazoujemne (ang. <i>coagulase-negative staphylococci</i>)
CPS	gronkowce koagulazododatnie (ang. <i>coagulase-positive staphylococci</i>)
DCM	dichlorometan
DIC	<i>N,N'</i> -diizopropylkarbodiimid
DMEM	modyfikowana pożywka Eagle'a Dulbecco (ang. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMF	<i>N,N</i> -dimetyloformamid
ECM	macierz pozakomórkowa (ang. <i>extracellular matrix</i>)
ESI-MS	spektrometria mas z jonizacją poprzez rozpylanie w polu elektrycznym (ang. <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>)
EPS	polisacharydowe substancje zewnątrzkomórkowe (ang. <i>extracellular polymeric substances</i>)

FBS	płodowa surowica wołowa (ang. <i>fetal bovine serum</i>)
FDA	Amerykańska Agencja ds. Żywności oraz Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
Fmoc	osłona 9-fluorenylometoksy-karbonyłowa
HAI	zakażenie szpitalne (ang. <i>Hospital-associated infections</i>)
HA-MRSA	szczepy szpitalne gronkowca złocistego opornego na metycylinę (ang. <i>hospital associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
IC	chromatografia jonowa (ang. <i>ion chromatography</i>)
IZW	infekcyjne zapalenie wsierdza (ang. <i>infective endocarditis, IE</i>)
MBEC	minimalne stężenie eliminujące/eradykujące biofilm (ang. <i>minimal biofilm eliminating/eradication concentration</i>)
MBEC _f	minimalne stężenie eliminujące/eradykujące biofilm w przepływie
MBIC	minimalne stężenie hamujące rozwój biofilmu (ang. <i>minimal biofilm inhibitory concentration</i>)
MIC	minimalne stężenie hamujące wzrost (ang. <i>minimal inhibitory concentration</i>)
MH	Mueller-Hinton
MRSA	gronkowiec złocisty oporny na metycylinę (ang. <i>methycillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
MSCRAMMs	substancje rozpoznające adhezyjne molekuly macierzy (ang. <i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>)
MTT	sól tetrazolowa (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy)
PIA	wewnątrzkomórkowa adhezyna polisacharydowa (ang. <i>polysaccharide intercellular adhesin</i>)

RP-HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (ang. <i>reversed-phase high-performance liquid chromatography</i>)
SPPS	synteza peptydów na stałym nośniku polimerowym (ang. <i>solid-phase peptide synthesis</i>)
SSI	zakażenie miejsca operowanego (ang. <i>surgical site infection</i>)
SSTI	zakażenie skóry i tkanek miękkich (ang. <i>skin and soft tissue infections</i>)
SIRS	ogólnoustrojowa reakcja zapalna organizmu (ang. <i>systemic inflammatory response syndrome</i>)
TFA	kwas trifluorooctowy (ang. <i>trifluoroacetic acid</i>)
TIS	triizopropylosilan
TSS	zespół wstrząsu toksycznego (ang. <i>toxic shock syndrome</i>)
VISA	gronkowiec złocisty średniooporny na wankomycynę (ang. <i>vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i>)
VRSA	gronkowiec złocisty oporny na wankomycynę (ang. <i>vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
XTT	sól sodowa 2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo)-2H-tetrazolio-5-karboksyanilidu
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)

SYMBOLE AMINOKWASÓW

A	Alanina (Ala)
C	Cysteina (Cys)
D	Kwas asparaginowy (Asp)
E	Kwas glutaminowy (Glu)
F	Fenyloalanina (Phe)
G	Glicyna (Gly)
H	Histydyna (His)
I	Izoleucyna (Ile)
K	Lizyna (Lys)
L	Leucyna (Leu)
M	Metionina (Met)
N	Asparagina (Asn)
P	Prolina (Pro)
Q	Glutamina (Gln)
R	Arginina (Arg)
S	Seryna (Ser)
V	Walina (Val)
T	Treonina (Thr)
W	Tryptofan (Trp)
Y	Tyrozyna (Tyr)

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

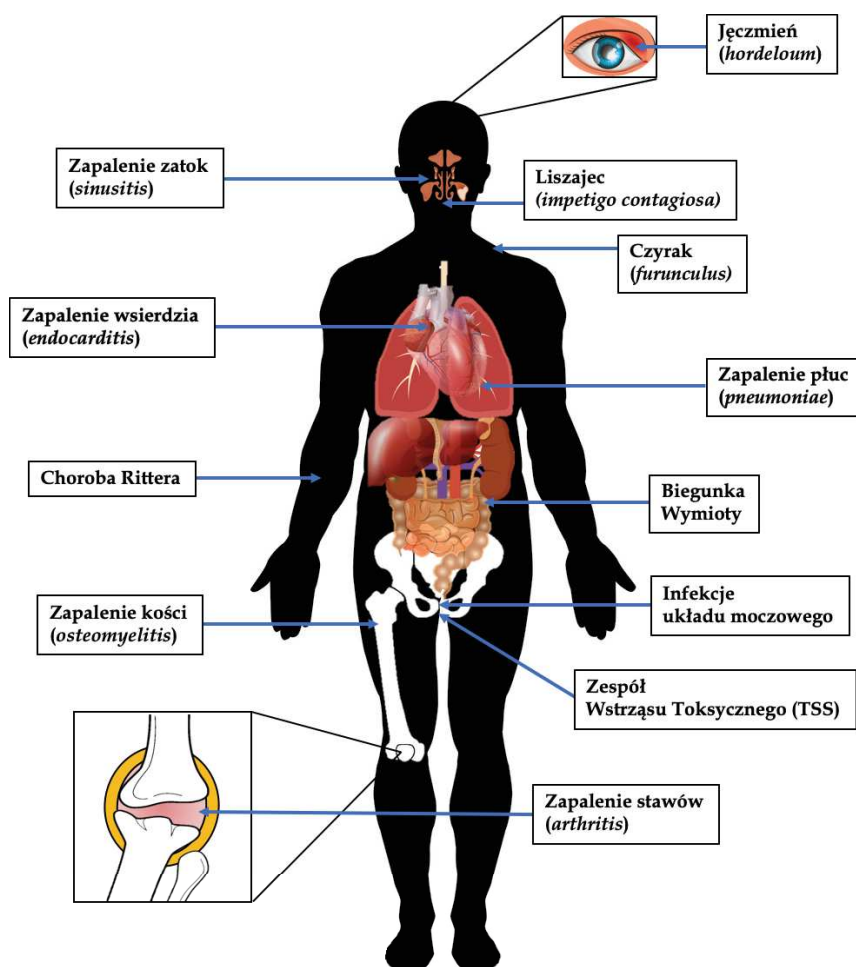
1. GRONKOWIEC ZŁOCISTY

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) jest gatunkiem bakterii chorobotwórczych, należącym do Gram-dodatnich, względnie beztlenowych ziarenkowców rzędu *Bacillales* z rodziny *Staphylococcaceae*. Cechą wspólną dla tej grupy jest kulisty lub owalny kształt komórek (o wielkości od 0,7 do 1,2 μm) i tworzenie charakterystycznych par podziałowych (tetrad, łańcuszków lub pakietów) [1]. Sam rodzaj po raz pierwszy opisany został przez szkockiego chirurga Alexandra Ogstona w 1882 roku [2]. Zaobserwował on, że bakterie wyizolowane z ropni pooperacyjnych w obrazie mikroskopowym przypominają kiści winogron i nazwał je *Staphylococcus*, od greckich słów *staphylē* (grono) oraz *kókkos* (ziarno). Co ciekawe, gatunek *S. aureus* opisany został dwa lata później (1884 r.) przez niemieckiego lekarza Friedricha Juliusa Rosenbacha [3]. Wyizolowane przez niego gronkowce, na podłożu stałym rosły w postaci żółtych i żółto-pomarańczowych kolonii. Zaadaptował on zdefiniowaną przez Ogstona nazwę rodzajową, zaś sam sformułował nazwę gatunkową, od łacińskiego słowa *aureus*, oznaczającego „złoty” [4], [5]. Zasadniczo, ziarenkowce należą do bakterii komensalnych, wchodzących w skład mikroflory człowieka oraz zwierząt. Jednakże niektóre z nich, m.in. *S. aureus* mogą być bezwzględnie patogenami lub warunkowo prowadzić do różnego rodzaju infekcji oportunistycznych. Bakterie, które należą do flory fizjologicznej mogą bytować zarówno na skórze jak i błonach śluzowych górnych odcinków układu oddechowego oraz przewodu pokarmowego. W przypadku *S. aureus*, kolonizacja najczęściej obejmuje powierzchnię śluzówki nosa i dotyczy ok. 20 – 40% populacji ogólnej [6]. Pomimo, iż nosicielstwo często przebiega bezobjawowo, to jednak u tych osób najczęściej obserwuje się zakażenia gronkowcowe [7]. Ponadto warto podkreślić, że bezobjawowi nosiciele stanowią główną przyczynę rozprzestrzeniania się gronkowców w środowisku. Tym bardziej, iż nie tylko kontakt bezpośredni, lecz również styczność z przedmiotami codziennego użytku takimi jak pościel, kłamki, uchwyty

w komunikacji miejskiej, a nawet mankiety aparatów do mierzenia ciśnienia może stanowić źródło transmisji patogenów [8], [9]. Kluczowe dla znaczenia epidemiologicznego gatunku *S. aureus* było pojawienie się szczepów opornych na metycylinę – MRSA (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), a pierwszy raport dotyczący tego zjawiska ukazał się na łamach *British Medical Journal* w styczniu 1961 roku [10]. Co istotne, było to dwa lata po wprowadzeniu metycyliny do praktyki klinicznej. Fakt ten jednocześnie potwierdza wysoką skłonność *S. aureus* do nabywania oporności na antybiotyki. Chociaż metycylina obecnie nie jest stosowana w leczeniu (głównie ze względu na toksyczność) to jednak odgrywa ona istotną rolę przy określaniu antybiotykowrażliwości gronkowców złocistych [11]. Udowodniono, że szczepy MRSA wykazują podwyższoną predyspozycję do nabywania oporności na inne grupy antybiotyków [12]. Oprócz wyżej wymienionego, w diagnostyce mikrobiologicznej funkcjonuje również inne kryterium o wysokim znaczeniu klinicznym i obejmuje określenie zdolności gronkowców do wykrzepiania osocza (próba na koagulazę). Użycie tego testu zapoczątkowane zostało już w 1903 roku i pozwala różnicować gronkowce na koagulazododatnie (CPS – ang. *coagulase-positive staphylococci*), do których należał *S. aureus* oraz koagulazoujemne (CNS – ang. *coagulase-negative staphylococci*) [13]. Mimo, że test ten wciąż stanowi wartościowy wskaźnik różnicujący w obrębie rodzaju *Staphylococcus* to jednak jego znaczenie diagnostyczne traci na znaczeniu. Między innymi dlatego, iż coraz częściej spotykane są inne gatunki wykazujące aktywność koagulazy, a także opisywane są kliniczne szczepy *S. aureus* nie wykazujące tej cechy [14], [15]. Należy również wspomnieć o pozostałych gatunkach w obrębie rodzaju takich jak *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* oraz *S. saprophyticus*, które wielokrotnie izolowane były w praktyce klinicznej [16]–[20]. Jednakże, w związku z powszechnym występowaniem, znaczącym udziałem w zakażeniach szpitalnych oraz szerzeniem się szczepów wielolekoopornych, to *S. aureus*, a dokładnie MRSA został w 2017 roku umieszczony przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) na liście patogenów, wobec których pilnie poszukiwane są nowe antybiotyki [21].

1.1. Infekcje powodowane przez *S. aureus*

Gronkowce złociste są gatunkiem powszechnie występującym w środowisku i odpowiedzialne są za szereg infekcji zarówno u zwierząt jak i ludzi. Heterogenność tych zakażeń determinowana jest występowaniem wielu klonów, zróżnicowanych pod względem posiadanych czynników zjadliwości oraz mechanizmów oporności na antybiotyki. Cechy te pozwalają na adaptację, przetrwanie i rozprzestrzenianie się. Dzięki umiejętności dostosowywania się, szczepy patogenne specyficzne dla poszczególnych gatunków spotykane są zamiennie u innych, zarówno u ludzi jak i zwierząt. Ponadto coraz częściej odnotowywane są przypadki zakażeń krzyżowych pomiędzy zwierzętami domowymi a ich właścicielami [22]–[24]. U ludzi, infekcje wywoływane przez *S. aureus* dzieli się na zakażenia szpitalne (HAIs – ang. *healthcare-associated infections*) oraz pozaszpitalne (CAI – ang. *community-acquired infections*). Podział ten wykorzystywany jest także przy różnicowaniu etiologii zakażeń MRSA. Szczepy, które stanowiły florę szpitalną nazywane są HA-MRSA (ang. *hospital-associated MRSA*). Natomiast te, które powodują infekcje poza nim, CA-MRSA (ang. *community-associated MRSA*) [25]. Zakażenia wywoływane przez obie wskazane populacje mogą charakteryzować się zróżnicowaniem pod względem lokalizacji (Rycina 1) jak i przebiegu i skuteczności antybiotykoterapii. Z tego względu zarówno dla HA-MRSA jak i CA-MRSA stosuje się zróżnicowany algorytm postępowania terapeutycznego [26]. Tym nie mniej, wśród najczęstszych zakażeń wywoływanych przez gronkowce złociste wymienia się przede wszystkim infekcje skóry i tkanek miękkich (SSTI – ang. *skin and soft tissue infections*) oraz bakteriemie. Ponadto, to właśnie obecność *S. aureus* często stanowi o komplikacjach terapeutycznych wielu innych schorzeń, które leczone niewłaściwie mogą doprowadzić do dalszego rozprzestrzeniania się drobnoustrojów. W sprzyjających warunkach bakterie mogą przedostać się krwioobieg. W efekcie może dojść do rozwoju bakteriemii i zakażeń o charakterze uogólnionym. Warto podkreślić, że coraz częściej zakażenia te wywoływane są przez szczepy wielolekooporne [27]–[31].



Rycina 1. Schemat przedstawiający różnorodność infekcji powodowanych przez *S. aureus*

1.1.1. Bakteriemia *S. aureus*

Bakteriemia jest terminem odnoszącym się do obecności żywych bakterii w krwioobiegu, która nie zawsze przebiega z występowaniem objawów klinicznych. Generalnie wyróżnia się trzy rodzaje bakteriemii:

- Bakteriemia przejściowe, czyli związane z krótkotrwałą obecnością bakterii we krwi na skutek przerwania ciągłości błon śluzowych oraz skóry. Zwykle tego typu infekcje przebiegają bezobjawowo, gdyż fizjologicznie, organizm wyposażony jest w wiele mechanizmów usuwania drobnoustrojów z krwioobiegu. Najczęstszą przyczyną przejściowej bakteriemii są np. zabiegi na zakażonych tkankach.

- Bakteriemia nawracająca, często też nazywane okresowymi lub przerywanymi. W tym wypadku najczęstszą przyczyną pojawienia się bakterii w krwioobiegu jest ich uwalnianie z ognisk infekcyjnych, najczęściej ropni. Wówczas mamy do czynienia z masowym rozsiewem drobnoustrojów, któremu towarzyszy gorączka oraz dreszcze.
- Bakteriemia stała lub też ciągle odnoszą się do sytuacji, w której spotykana jest permanentna obecność bakterii w krwioobiegu. Najczęstszą przyczyną tego zjawiska jest stosowanie skolonizowanych cewników wewnątrznaczyniowych oraz endoprotez. Niekiedy źródłem zakażenia mogą być skolonizowane skrzepliny na zastawkach serca.

Rozsiew bakterii w krwioobiegu jest zjawiskiem szczególnie groźnym dla zdrowia. W skrajnych warunkach, przy obniżonej aktywności lub dysfunkcji układu odpornościowego może dojść do przekształcenia bakteriemii w sepsę. Wówczas dochodzi do ogólnoustrojowej reakcji zapalnej organizmu (SIRS, ang. *systemic inflammatory response syndrome*) oraz wstrząsu [1]. Wówczas może dojść do aktywacji układu krzepnięcia i fibrynolizy w obrębie całego organizmu, zaburzenia przepływu krwi, niedokrwienia i niedotlenienia narządów, a w rezultacie do ich całkowitej dysfunkcji. Bakteriemia *S. aureus* są najlepiej opisanym rodzajem zakażeń tymi bakteriami w literaturze, a najczęstszym źródłem pojawienia się tych bakterii we krwi jest układ oddechowy, ropnie skóry oraz tkanek miękkich, a także stosowanie zainfekowanych cewników donaczyniowych i otrzewnowych [32]–[35]. Ponadto, właściwie każda infekcja gronkowcowa, niezależnie od umiejscowienia w sytuacji zaostrzenia lub nieefektywnej antybiotykoterapii może przerodzić się w bakteriemię. Z tego powodu, jak również ze względu na niedostateczną liczbę prospektywnych badań obserwacyjnych, trudno jest określić dokładną częstość oraz śmiertelność tego typu zakażeń. Szacuje się, iż częstość bakteriemii *S. aureus* wynosi od 20 do 50 przypadków na każde 100 tysięcy mieszkańców rocznie, a śmiertelność waha się pomiędzy 10 a 30% [36]. Co więcej czynnikami predysponującymi są przede wszystkim starszy wiek, płeć męska, status ekonomiczny oraz nosicielstwo wirusa HIV [37]–[40].

1.1.2. Zakażenia skóry i tkanek miękkich

Bakterie gronkowca złocistego ze względu na unikalną skłonność do kolonizowania skóry oraz przedsionka jamy nosowej są typowym patogenem spotykanym w praktyce dermatologicznej. *S. aureus* powoduje szereg SSTI, począwszy od łagodnie przebiegających jak liszajec czy niepowikłane zapalenie tkanki łącznej, po zagrażające życiu zakażenia miejsca operowanego (SSI – ang. *surgical site infection*). Generalnie, łżejsze postaci SSTI są często spotykane w praktyce lekarskiej, zarówno lekarzy rodzinnych czy internistów. Z tego względu istotnym jest, by praktycy również tych specjalności posiadali wiedzę na temat potencjalnych czynników etiologicznych niektórych z tych schorzeń. Wśród nich należy wymienić takie jak czyraki (łac. *furunculus*), czyli rozlane zapalenie okołomieszkowe oraz ropne zapalenie gruczołów potowych (łac. *hidradenitis suppurativa*). W przypadku tych chorób gronkowiec złocisty jest najczęściej izolowanym gatunkiem bakterii [41], [42]. Atopowe zapalenie skóry (AZS, łac. *dermatitis atopica*) jest przykładem dermatozy przewlekłej o podłożu genetycznym, której cechą charakterystyczną jest skłonność do nawrotowych zakażeń. Głównie są to infekcje *S. aureus*, co może być związane z tym, że ok. 80 do 100 % pacjentów z AZS wykazuje kolonizację tymi bakteriami [43], [44]. Warto również wspomnieć o zakażeniach towarzyszących stopie cukrzycowej, które zwykle są zakażeniami wielobakteryjnymi. Jednakże wiele prac wskazuje na dominujący udział bakterii *S. aureus* [45], [46]. Choroba Rittera, zwana również gronkowcowym zespołem oparzonej skóry (ang. *staphylococcal-scaled skin syndrome, SSSS*) jest uogólnioną, ropną chorobą skóry, która obarczona jest wysokim ryzykiem śmiertelności i w dominującej większości dotyka dzieci poniżej 5 roku życia [47]. Cechą charakterystyczną tego schorzenia jest występowanie rozległych pęcherzy oraz złuszczenie naskórka (aż do skóry właściwej), głównie w obrębie głowy oraz szyi. Czynnikiem etiologicznym choroby Rittera są szczepy *S. aureus* produkujące toksyny: eksfoliatynę A oraz B [47]. Natomiast predyspozycję do tego zakażenia przypisuje się brakowi odpowiednich przeciwciał skierowanych przeciwko toksynom gronkowcowym,

niedostatecznej funkcji nerek i ograniczonym klirensiem eksfoliatyn oraz zwiększoną ilością desmogleiny-1 w skórze [48], [49]. Wszystkie te cechy są typowe dla młodego organizmu, dlatego też choroba ta najczęściej dotyka właśnie dzieci. Pomimo, że gronkowce złociste są typowym patogenem w SSTI, w ciągu ostatnich 20 lat kliniczne znaczenie zakażeń tymi bakteriami istotnie wzrosło. Głównie ze względu na fakt, że coraz częściej izolowane są szczepy CA-MRSA, co dodatkowo wiąże się z komplikacjami terapeutycznymi [50]–[52].

1.1.3. Infekcyjne zapalenie wsierdzia

Zakażenia *S. aureus* głównie kojarzone są z chorobami skóry i większość schorzeń dermatologicznych związanych jest ze współistnieniem tych bakterii. Jednakże obecnie gronkowce często wymieniane są jako za dominujący czynnik etiologiczny infekcyjnego zapalenia wsierdzia (IZW) [53]. Cechą charakterystyczną IZW jest relatywnie wysoka śmiertelność, związana przede wszystkim z opornością gronkowców na antybiotyki, natomiast częstość tego schorzenia waha się od 3 do 6 przypadków na 100 tys. rocznie a prawdopodobieństwo wystąpienia rośnie wraz z wiekiem pacjentów [54]. IZW jest chorobą, która rozwija się w wyniku zakażenia wsierdzia, głównie w obrębie zastawek, komór i przedsionków lub dużych naczyń krwionośnych klaki piersiowej [55]. Główną przyczyną kolonizacji bakteryjnej jest przede wszystkim stosowanie iniekcji dożylnych oraz zabiegi kardiochirurgiczne obejmujące wszczepienie kardiostymulatora lub zastawek [56]. Dawniej IZW było dość często spotykane u narkomanów, u których dochodziło do uszkodzenia śródbłona mięśnia sercowego przez drobnoziarnisty materiał znajdujący się w nieoczyszczonej porcji narkotyków. W tym przypadku, następujące zmiany w obrębie śródbłona prowadzą do ekspresji białek macierzy pozakomórkowej, czynnika tkankowego oraz gromadzenia się płytek krwi i fibryny, które stanowią dogodne podłoże dla kolonizacji bakteryjnej. Obecnie ta tendencja się zmienia i najliczniejszą grupę chorych stanowią pacjenci kardiochirurgiczni. Związane jest to przede wszystkim ze znaczącym wzrostem ilości zabiegów w obrębie serca.

1.1.4. Zakażenia kostno-stawowe

Zakażenia kostno-stawowe są szeroką grupą infekcji, o zróżnicowanej lokalizacji, charakteryzujących się ostrym lub przewlekłym stanem zapalnym w obrębie kości, stawów oraz szpiku. Choroby te często związane są z występowaniem bakteriemii, a grupę ryzyka stanowią przede wszystkim pacjenci po wszczepieniu protez oraz implantów [57]. Najważniejszymi schorzeniami w obrębie tej grupy są zapalenie kości i szpiku (łac. *osteomyelitis*), zapalenie stawów (łac. *arthritis*) oraz zakażenia stawów okołoprotezowych (ang. *prosthetic joint infections*), a najczęściej izolowanymi drobnoustrojami ze wszystkich wymienionych są bakterie z rodzaju *S. aureus* [58]–[64]. Manifestacją kliniczną zapalenia kości oraz szpiku jest niszczenie oraz martwica kości następująca w skutek przewlekłej reakcji zapalnej o różnej etiologii [65]. Może ona nastąpić drogą krwi i wtedy nazywane są zakażeniami hematogennymi lub krwiopochodnymi. Bardzo często są to ostre zapalenia kości obejmujące przede wszystkim kości długie (kości udowe, piszczele oraz kości ramienne), które w większości przypadków dotyczą dzieci oraz młodzieży [66]–[69]. U dorosłych, stan zapalny swym zasięgiem obejmuje częściej elementy szkieletu osiowego. Ponadto stanem zapalnym objęte mogą zostać również wolne przestrzenie stawowe oraz tkanki miękkie. W tym wypadku bezpośrednią przyczyną zakażenia jest najczęściej uraz lub zabieg chirurgiczny. Ostatnią dość ważną przyczynę zapalenia kości stanowią dysfunkcje w obrębie drobnych naczyń dystalnych, które sprzyjają rozwojowi stanu zapalnego i mnożeniu się bakterii. W tym wypadku dominującą grupę chorych stanowią pacjenci ze stopą cukrzycową [70]. Infekcyjne zapalenie stawów jest dość rzadko występującą chorobą infekcyjną (4 do 10 przypadków na 100 tys. mieszkańców rocznie) charakteryzującą się dość bolesnym przebiegiem, a przyczyną zakażenia jest napływ bakterii drogą krwi bądź uraz [71]–[73]. Najważniejszą grupę chorych stanowią niemowlęta i osoby starsze, a najczęściej współistniejącymi schorzeniami są reumatoidalne zapalenie stawów i cukrzyca typu 2. Infekcyjne zapalenie stawów może również wystąpić u pacjentów po operacjach stawów z towarzyszącymi zakażeniami skóry [74]. Ostatnią, bardzo istotną grupą

schorzeń w obrębie zakażeń kostno-stawowych są infekcje stawów okołoprotezowych. Stanowią one bardzo poważne powikłanie po alloplastyce (endoprotezoplastyce), które obarczone jest dużym ryzykiem rozwoju infekcji. Komplikacja ta wiąże się przede wszystkim z bardzo silnym bólem, przedłużonym pobytem w szpitalu, wieloma re-operacjami i w konsekwencji może prowadzić do zgonu [75]. Częstość występowania tych zakażeń ściśle powiązana jest ze stale rosnącą ilością zabiegów chirurgicznych, w szczególności w krajach rozwiniętych. Natomiast, wśród głównych czynników predysponujących do rozwoju infekcji wymienia się wcześniejsze zabiegi w obrębie stawów, otyłość, reumatoidalne zapalenie stawów, długi czas operacji oraz stosowanie immunosupresji [76]–[78]. Warto podkreślić, że we wszystkich wskazanych przypadkach dane literaturowe wskazują na dominujący udział gronkowców złocistych. Ponadto coraz częściej z tego typu zakażeń izolowane są bakterie metycylinooporne, szczególnie szczepy CA-MRSA, które charakteryzują się większą zjadliwością i znacznie przyczyniają się do przedłużonej i bardziej kosztownej hospitalizacji pacjentów [79]–[82].

1.1.5. Zapalenie płuc

Pomimo, że szczepy *S. aureus* nie stanowią głównej przyczyny bakteryjnego zapalenia płuc (ok. 10% wszystkich przypadków) to jednak kolonizacja tymi bakteriami może znacząco ograniczyć skuteczność leczenia oraz rokowanie pacjentów [83]. Gronkowcowe zapalenie płuc wymaga natychmiastowego leczenia i wdrożenia odpowiedniej antybiotykoterapii. Głównie ze względu na rosnącą częstość szczepów CA-MRSA powodujących tego typu zakażenia [84]. Warto podkreślić, że śmiertelność z powodu zapalenia płuc wywołanego przez *S. aureus* może sięgać nawet 80%, w szczególności w przypadku powikłań takich jak bakteriemie oraz ropnie. Ponadto gronkowce złociste obok paciorkowców *Streptococcus pneumoniae* oraz Gram-ujemnych pałeczek *Hemophilus influenzae* stanowią główny czynnik wtórnego zapalenia płuc po infekcji wirusowej [85]. Z tego względu bakterie tego gatunku w żaden sposób nie powinny być pomijane, a ich udział bagatelizowany. Co istotne,

bardziej znaczącą rolę w infekcjach układu oddechowego bakterie te odgrywają w zakażeniach szpitalnych. W tym wypadku zapalenie płuc wywoływane jest poprzez stosowanie wentylacji mechanicznej (ang. *ventilator-associated pneumonia*, VAP), a źródłem zakażenia jest skolonizowany sprzęt medyczny [86]–[88].

1.1.6. Zakażenia związane z protezami i biomateriałami

Niemalże wszystkie wcześniej wymienione infekcje gronkowcowe w pewnym stopniu związane są ze stosowaniem zakażonych materiałów medycznych lub też implantacją skolonizowanych protez lub biomateriałów. Dlatego też wyodrębnienie osobnej grupy jednostek chorobowych, w tym wypadku wydaje się być uzasadnione. Głównie dlatego, że stanowią one dość ważną przyczynę infekcji bakteryjnych, które związane są nie tylko z nieskuteczną terapią, lecz również przedłużoną hospitalizacją pacjentów. Cechą wspólną tych zakażeń jest obecność biofilmu na powierzchniach abiotycznych, będących w bezpośrednim kontakcie z pacjentem [33]. Do najważniejszych infekcji w tej grupie należą zakażenia związane z wszczepieniem elektrostymulatorów lub zastawek serca, ze stosowaniem cewników donaczyniowych, protez oraz implantów. Niewątpliwie stosowanie urządzeń wspierających pracę serca takich jak rozruszniki lub pompy wspomagające znacznie przyczyniło się do poprawy jakości życia pacjentów. Jednakże zabiegi te obarczone są wysokim ryzykiem infekcji *S. aureus* oraz towarzyszącym temu komplikacjami [89]. Ponadto częstość tego typu zakażeń z roku na rok rośnie co związane jest ze znacznym wzrostem liczby zabiegów oraz ośrodków realizujących takie świadczenia [90], [91]. Co więcej, do rozwoju tego typu zakażeń może dojść na skutek implantacji już skolonizowanego materiału medycznego bądź też kolonizacji *in vivo* jako wtórnej komplikacji już toczącej się bakteriemii. W obu wypadkach może dojść do eskalacji zakażenia, w tym również do rozwoju infekcyjnego zapalenia wsierdza, które jest stanem zagrażającym życiu [92], [93]. Z kolei zakażenia odcewnikowe związane są przede wszystkim ze stosowaniem cewników

donaczyniowych i ich zainfekowaniem na etapie wklucia bądź też późniejszych manipulacji w ich obrębie, co w efekcie może prowadzić do zakażenia krwioobiegu [94]–[96]. Co prawda, w ciągu ostatnich 10 lat ilość zakażeń odcewnikowych znacznie zmalała, głównie za sprawą odpowiedniej polityki prewencyjnej oraz restrykcji związanymi z minimalizowaniem zakażeń szpitalnych [97], [98]. Tym nie mniej, te powodowane przez *S. aureus* wciąż są najczęstsze i dodatkowo obarczone są dość wysokim stopniem śmiertelności [99]–[102]. Niewątpliwe również osiągnięcia medycyny estetycznej, w szczególności chirurgii plastycznej oraz stale rosnąca ilość zabiegów przyczyniły się również do wzrostu infekcji *S. aureus*, stanowiących bezpośrednią ich komplikację. Od około 3 do 24% wszystkich zabiegów wszczepiania implantów piersi (np. po mastektomii) związanych jest z ryzykiem rozwoju zakażenia, z czego nawet dominująca część może być spowodowana przez szczepy gronkowca złocistego [103]–[105]. Z tego względu coraz częściej stosuje się antybiotykoterapię przed i po zabiegu bądź też implanty lub specjalne siatki do implantów impregnowane antybiotykiem [106], [107]. Zespół wstrząsu toksycznego (ang. *toxic shock syndrome*, TSS) jest rzadkim, lecz zagrażającym życiu powikłaniem powstałym na skutek działania toksyn gronkowcowych takich jak TSST-1 czy enterotoksyny [108]. TSS głównie kojarzony jest jako powikłanie po zabiegach ginekologicznych oraz jako komplikacja po stosowaniu mechanicznych środków antykoncepcyjnych oraz tamponów. Jednakże ze względu na pojawiające się przypadki po zabiegach implantacji piersi, a także dość typową etiologię *S. aureus* opisana została w tym dziale [109].

1.2. **Udział gronkowców w zakażeniach szpitalnych**

Powszechne występowanie zakażeń szpitalnych (ang. *healthcare-associated infections*, HAIs) i fakt, że stanowią one nieodłączne powikłanie wielu zabiegów medycznych sprawiło, iż stały się one problemem globalnym. Obecnie jako zakażenia szpitalne określa się wszystkie infekcje, które zostały nabyte w trakcie hospitalizacji lub takie, które wystąpiły w ciągu 30 dni po otrzymaniu opieki zdrowotnej [110], [111]. Znaczenie kliniczne HAIs odzwierciedla fakt, że stanowią one najczęstszą przyczynę komplikacji po zabiegach i jedną

z głównych przyczyn zgonów z tego powodu na świecie. Według raportów WHO na każde 100 pacjentów hospitalizowanych w krajach rozwiniętych, u siedmiu wystąpi zakażenie szpitalne jako komplikacja po zabiegu [112]. Tymczasem szacunki Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. *The European Centre for Disease Prevention and Control*) wskazują, iż rocznie rejestrowanych jest ponad 2,6 miliona nowych przypadków zakażeń związanych z opieką zdrowotną [113], [114]. Udział bakterii *S. aureus*, w szczególności MRSA w rozwoju HAIs jest istotny, a wiele prac wieloośrodkowych wskazuje, iż drobnoustroje te stanowią dominującą pulę patogenów je wywołujących [110], [115]–[117]. Do najczęstszych HAIs powodowanych przez gronkowce złociste należą infekcje układu moczowego, infekcje miejsca operowanego (ang. *surgical site infections*), bakteryjne zapalenia płuc oraz bakteriemie [118]. Ponadto, badania epidemiologiczne ostatnich lat wskazują na znaczną redukcję ilości zakażeń powodowanych przez *S. aureus* (w szczególności MRSA). Dodatkowo, według najnowszych danych (2013–2016) z Europejskiej Sieci Nadzoru nad Opornością na Antybiotyki (*EARS-Net*), u ponad jednej trzeciej krajów o niskim, jak i wysokim wskaźniku występowania MRSA zaobserwowany został znaczący spadek ilości infekcji o tej etiologii. Tym nie mniej, przyczyny tego zjawiska nie są w pełni poznane. Prawdopodobnie związane jest to z wprowadzeniem odpowiednich praktyk prewencyjnych w zakładach opieki zdrowotnej oraz odpowiedniej edukacji. Pomimo to zapobieganie infekcjom *S. aureus* wciąż pozostaje priorytetem zdrowia publicznego w Europie, ponieważ w 10 z 30 krajów biorących udział w badaniu stwierdzono obecność MRSA w zakażeniach szpitalnych powyżej 25% [119], [120].

1.3. Czynniki wirulencji oraz oporność na antybiotyki

Trudności terapeutyczne zakażeń powodowanych przez *S. aureus* związane są przede wszystkim z szeregiem czynników wirulencji charakterystycznych dla tego gatunku. Sprzyjają one kolonizacji tkanek, ich uszkodzeniu oraz przetrwaniu wewnątrz komórek gospodarza. Do czynników wirulencji gronkowców złocistych zalicza się m.in. egzotoksyny oraz enzymy umożliwiające namnażanie się oraz rozprzestrzenianie wewnątrz zainfekowanego organizmu [121]. Jednakże kluczową cechą umożliwiającą przetrwanie bakteriom jest ich zdolność do tworzenia biofilmu [122]. Wszystkie wyżej wymienione czynniki oraz naturalna tendencja szczepów *S. aureus* do nabywania oporności sprawiają, że infekcje powodowane przez te drobnoustroje stają się coraz większym wyzwaniem, nie tylko dla klinicystów, lecz również naukowców zajmujących się opracowywaniem nowych leków.

1.3.1. Czynniki adhezyjne

Ważnym procesem inicjującym kolonizację bakteryjną jest adhezja, która u *S. aureus* jest regulowana przez szereg białek, które kowalencyjnie zakotwiczone są w peptydoglikanie ściany komórkowej. Białka te specyficzenie wiążą się ze składnikami osocza lub macierzy pozakomórkowej, a grupa ta u gronkowców złocistych nosi nazwę substancji rozpoznających adhezyjne molekuły macierzy (ang. *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*, MSCRAMMs). Typowymi przedstawicielami tej grupy białek są białko gronkowcowe A (SpA), białka wiążące fibronektynę A i B (FnbpA i FnbpB), białka wiążące kolagen oraz białka czynnika krzepnięcia A i B (Clf A i B), które wykazują powinowactwo m.in. do fibronektyny oraz fibrynogenu [123]–[126]

1.3.2. Enzymy gronkowcowe

Kolonizacja oraz rozprzestrzenianie się gronkowców wewnątrz zainfekowanego organizmu możliwe jest dzięki wielu enzymom, które nie tylko

prowadzą do degradacji cząsteczek gospodarza, lecz również zakłócają wiele kaskad sygnalizacyjnych. Przykładowo niespecyficzne proteazy takie jak gronkowcowa aureolizyna powoduje degradację różnych białek m.in. insuliny. Moduliny rozpuszczalne w fenolu (ang. *phenol soluble modulins*, PSM) powodują chemotaksję i lizę neutrofilów oraz wykazują działanie bakteriobójcze wobec innych szczepów zapewniając przewagę nad pozostałymi, konkurencyjnymi drobnoustrojami [126]. Ponadto aureolizyna, endopeptydaza glutamylowa oraz proteazy cysteinowe wpływają na układ dopełniacza, blokując tym samym reakcje obronne organizmu [126]. Staphylokinaza aktywuje przekształcenie plazminogenu w plazminę, tym samym pośrednio katalizuje rozkładanie skrzepów. Aktywność ta bezpośrednio przyczynia się do zmniejszenia się siatki fibrynowej, która wspomaga aktywność układu odpornościowego. Również ten sam enzym ułatwia penetrację *S. aureus* w głąb skóry. Koagulazy gronkowcowe indukują tworzenie się skrzepów fibryny na powierzchni komórek bakterii, hamując tym samym ich fagocytozę i tworzenie ropni [126].

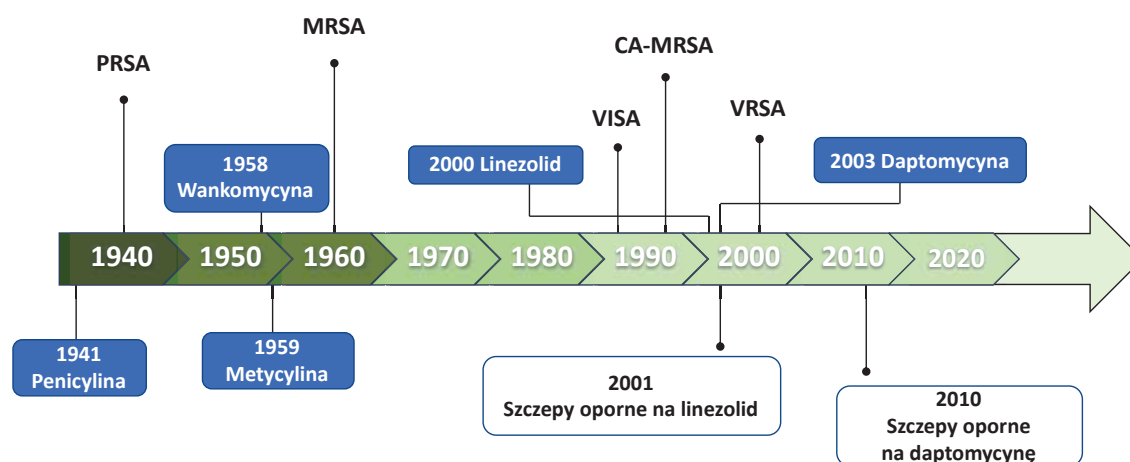
1.3.3. Egzotoksyny

Najważniejszą rolę w szerzeniu się infekcji powodowanych przez *S. aureus* odgrywają przede wszystkim produkowane toksyny, spośród których część wykazuje właściwości superantygenów (o niespecyficznym powinowactwie do receptorów powierzchniowych limfocytów T i aktywujące je). Do toksyn gronkowcowych zalicza się m.in. hemolizyny oraz leukocydyny. Charakter superantygenów wykazują zaś enterotoksyny, toksyny szoku toksycznego (TSST-1) oraz toksyny złuszczone. Hemolizyny α , β oraz γ prowadzą do lizy nie tylko erytrocytów, ale również innych komórek krwi poprzez tworzenie kanałów w błonach komórkowych. Leukocydyny, w tym leukocydyna Panton-Valentine'a, leukotoksyna ED oraz leukotoksyna AG/BH także prowadzą do niszczenia komórek gospodarza (neutrofilów, monocytów oraz makrofagów) poprzez tworzenie porów w błonach, przy czym ich działanie oparte jest na skojarzonym działaniu wytwarzanych przez gronkowce monomerów [126]. Enterotoksyny stanowią rodzinę białek, które przede wszystkim odpowiedzialne są za powodowanie zatruc pokarmowych. Jako

superantygeny prowadzą do nieuregulowanej odpowiedzi immunologicznej, której następstwem może być masywna produkcja cytokin (zespół wstrząsu toksycznego), niewydolność wielonarządowa, a ostatecznie śmierć [127], [128]. Jednakże najszerszej opisanymi toksynami gronkowcowymi są termostabilne toksyny szoku toksycznego (TSST), które w wyniku swojej aktywności prowadzą do wzmożonego uwalniania interleukin (IL-1, IL-2), cytokin prozapalnych oraz TNF- α prowadzące do zespołu wstrząsu toksycznego. Eksfoliatyny (zwane również toksynami epidermolitycznymi) są natomiast proteazami serynowymi, które rozpoznają i rozkładają kadheryny desmosonalne w powierzchniowych warstwach skóry. Klinikną manifestacją tego zjawiska jest choroba Rittera [129].

1.3.4. Oporność na antybiotyki

Bez wątplenia gronkowiec złocisty jest przykładem gatunku bakterii, który jest w stanie nabyć oporność na niemal wszystkie dostępne środki przeciwdrobnoustrojowe. Przykładowo, szczepy oporne na penicylinę czy linezolid odnotowane zostały już rok po wprowadzeniu tych związków do leczenia, natomiast na wankomycynę prawie trzydzieści lat później (Rycina 2). Oporność u *S. aureus* może rozwijać się w efekcie mutacji, poziomego transferu genów lub też ekspresji pomp błonowych.



Rycina 2. Oś czasu określająca pojawianie się najważniejszych leków stosowanych w terapii infekcji *S. aureus* oraz szczepów opornych.

W rezultacie terapia infekcji gronkowcowych stanowić może poważne wyzwanie terapeutyczne. Dlatego też przy opracowywaniu nowych leków skutecznych w walce z zakażeniami *S. aureus* ważnym jest by uwzględniać wszystkie mechanizmy leżące u podstaw oporności oraz czynniki wirulencji, w tym ich zdolność do formowania biofilmu. Do najważniejszych z klinicznego punktu widzenia mechanizmów oporności należą przede wszystkim:

1) *Oporność na antybiotyki β -laktamowe*

Mechanizm działania tej grupy antybiotyków polega na hamowaniu aktywności transpeptydaz (ang. *penicillin-binding protein*, PBP) biorących udział w syntezie peptydoglikanu. Przykładem antybiotyku o takiej aktywności jest penicylina G (benzylopenicylina). Jednakże, niedługo po wprowadzeniu jej do terapii w latach 40. XX w. zanotowano obecność szczepów opornych (Rycina 2), które wykazywały ekspresję β -laktamazy. Enzymu, który wykazuje zdolność do hydrolizy wiązania β -laktamowego antybiotyku. By móc obejść wskazany mechanizm działania opracowane zostały nowe półsyntetyczne pochodne (np. metycylina oraz oksacylina), u których do grupy aminowej kwasu 6-aminopenicylanowego przyłączone zostały nowe podstawniki. W efekcie związki te przestały być celem dla enzymów bakteryjnych. Jednakże również wobec tych antybiotyków pojawiły się szczepy oporne (MRSA). W tym wypadku podstawą uzyskania oporności było nabycie genu (*mecA*) kodującego homolog PBP o nazwie PBP2a. W rezultacie antybiotyki β -laktamowe utraciły swoją bakteriobójczą aktywność [130], [131].

2) *Oporność na wankomycynę*

Wankomycyna jest antybiotykiem glikopeptydowym, który jest szeroko stosowany w leczeniu poważnych zakażeń wywołanych przez szczepy MRSA. Mechanizm jej działania polega na hamowaniu polimeryzacji peptydoglikanu katalizowanej przez transpeptydazy. Uzyskanie oporności na wankomycynę przez gronkowce (ang. *vancomycin-intermediate S. aureus*, VISA oraz *vancomycin-*

resistant S. aureus VRSA) prawdopodobnie nastąpiło na skutek nabycia genu *van* od enterokoków, wykazujących naturalny brak wrażliwości. Geny te znajdują się na ruchomych elementach genetycznych i kodują indukowalne enzymy, które przejmują biosyntezę prekursorów peptydoglikanu [130], [132].

Warto podkreślić, że cechą charakterystyczną dla wyżej wymienionych szczepów (MRSA, VISA, VRSA) jest to, iż często wykazują dodatkowo oporność na inne z dostępnych środków przeciwdrobnoustrojowych [133]. Przykładem jest oporność na daptomycynę, cykliczny lipopeptyd zalecany w szczególności w terapii MRSA. Mechanizm działania tego antybiotyku oparty jest na dezintegracji błon komórkowych, tym samym rozwój oporności na ten związek winien być ograniczony. Również w tym wypadku niedługo po wprowadzeniu daptomycyny do terapii zaczęły być odnotowywane szczepy odporne. Oporność na ten antybiotyk wynika z mutacji genów odpowiedzialnych za mechanizmy naprawcze bakterii i powstała najprawdopodobniej na skutek współistnienia wielu czynników takich jak przedłużona terapia oraz wysokie miano bakterii (np. w zapaleniu wsierdza). Ponadto niektóre badania wskazują, że wcześniejsza terapia wankomycyną przyspiesza pojawienie się tej oporności [134], [135]. Mechanizm działania wielu innych antybiotyków stosowanych w terapii *S. aureus* oparty jest na zakłócaniu biosyntezy białek poprzez wiązanie się z podjednostkami rybosomów (50S oraz 30S). Mechanizm oporności na te związki oparty jest na mutacjach w obrębie miejsc wiążących lub enzymów (np. metylotransferazy rRNA) katalizujących translację białek. Przykładem jest oporność na makrolidy, linkozamidy oraz linezolid [130]. Brak wrażliwości na ostatni z wymienionych związków jest bardzo istotny z klinicznego punktu widzenia. Z tego względu, że linezolid jest całkowicie syntetyczną substancją (chemioterapeutyką) oddziałującą na podjednostki rybosomów i w momencie wprowadzenia (Rycina 2) stanowił nową klasę związków, zatwierdzoną do terapii ciężkich zakażeń MRSA. Początkowo sądzono, że bakterie nie będą w stanie rozwinąć oporności. Jednakże w 2001 roku odnotowany został pierwszy przypadek *S. aureus* wyizolowany od pacjenta z zapaleniem otrzewnej [136].

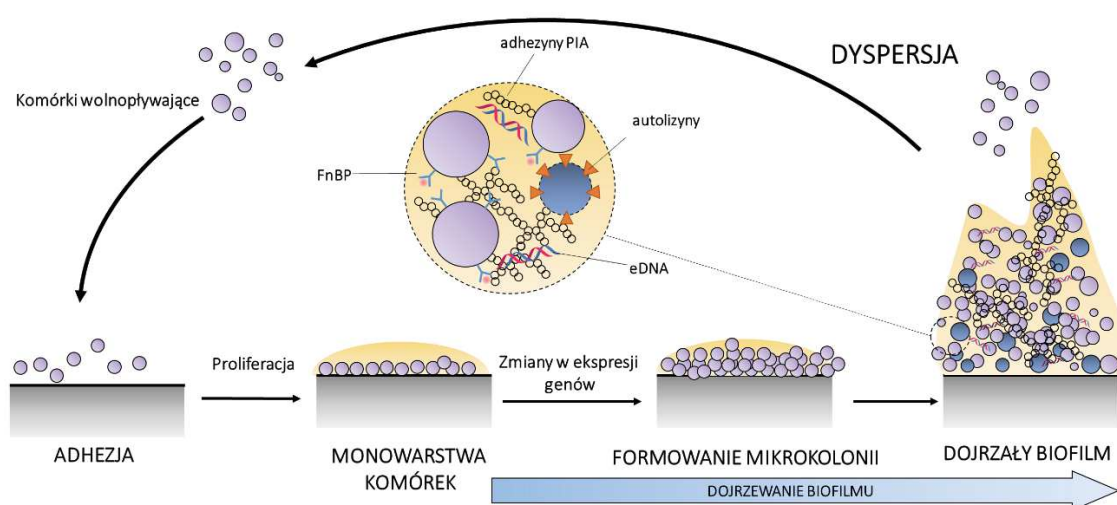
2. BIOFILM

Istotą funkcjonowania wielu mikroorganizmów jest zdolność do tworzenia biofilmu. Termin ten odnosi się do struktury, która może być zdefiniowana jako dobrze zorganizowana społeczność drobnoustrojów, związana z powierzchnią i otoczona macierzą pozakomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM). Bakterie związane z biofilmem, wykazują odmienny fenotyp, przystosowujący je niejako do „osiadłego” trybu życia. Ponadto charakterystyczna struktura zabezpiecza je przed działaniem czynników zewnętrznych takimi jak aktywność układu odpornościowego czy substancje przeciwdrobnoustrojowe [137]. Niewątpliwie z tego względu najważniejszą i zarazem najbardziej kluczową z klinicznego punktu widzenia cechą biofilmu jest jego oporność na antybiotyki. Postuluje się, iż stężenia efektywne wobec tej struktury mogą być nawet 1000-krotnie wyższe w porównaniu do form planktonowych [138]. Ponadto najnowsze dane epidemiologiczne wskazują, że ok. 80% przetrwałych i nawracających infekcji związanych jest z obecnością biofilmu [139]–[142].

Gronkowce złociste są przykładem bakterii, które wykazują predyspozycję do formowania biofilmu. To właśnie zdolność do tworzenia tej struktury determinuje mnogość infekcji przez nie wywoływanych, w szczególności tych związanych ze stosowaniem biomateriałów oraz implantów [140]. Jednym z kluczowych elementów biofilmu jest ECM, która składa się z wody, substancji pozakomórkowych takich jak białka, lipidy, pozakomórkowe DNA (eDNA), polisacharydy oraz substancje odżywcze takie jak związki węgla, azotu oraz fosforany. Bakterie otoczone ECM układają się w wiele warstw, w skład których wchodzi komórki aktywne metabolicznie, martwe oraz komórki przetrwałe (ang. *perister cells*). Obecność różnych rodzajów komórek jak również wielowarstwowa struktura umożliwiają przetrwanie biofilmu i jego łatwą odbudowę w nawet najbardziej niekorzystnych warunkach [137]. Kolejnym istotnym procesem jest zdolność do ekspresji białek adhezyjnych (adhezyn), która inicjuje przyłączenie się bakterii do powierzchni (biotycznej lub abiotycznej) i formowanie się biofilmu.

2.1. Etapy tworzenia się biofilmu

Początkowo wiązanie się *S. aureus* do powierzchni inicjowane jest przez oddziaływania elektrostatyczne, siły *van der Waalsa* oraz tworzenie wiązań wodorowych ze składowymi powierzchni. Następnie dochodzi do ekspresji adhezyn, które zapewniają bardziej stabilne związanie się z powierzchnią. Etapy tworzenia się biofilmu gronkowcowego przedstawione zostały na Rycinie 3.



Rycina 3. Etapy tworzenia się biofilmu *S. aureus*

Po związaniu się z powierzchnią, zachodzą zmiany fenotypowe w komórkach. Przy odpowiednim dostępie do substancji odżywczych komórki zaczynają się dzielić (proliforować). Dochodzi do utworzenia warstwy komórek, która jeszcze na tym etapie jest podatna na oderwanie m.in. przez siły ścinające opływającego płynu. Następnie dochodzi do ekspresji wielu czynników pomagających ustabilizować tę strukturę. Należą do nich adhezyny z rodziny MSCRAMM, m.in. FnBP oraz ClfB [136]. Równocześnie dochodzi do wytwarzania ECM i formowania mikrokolonii. Kluczową rolę w tym wypadku odgrywa wewnątrzkomórkowa adhezyna polisacharydowa (ang. *polysaccharide intracellular adhesin*, PIA), która spaja ze sobą komórki wchodzące w skład biofilmu. Kolejną istotną składową macierzy jest zewnątrzkomórkowe DNA (eDNA), które zapewnia swoiste rusztowanie dla komórek wchodzących

w skład biofilmu oraz może stanowić źródło informacji genetycznej (np. genów oporności) [143]. Ponadto, udowodniono iż ujemnie naładowane eDNA może swoiście wiązać się z kationowymi peptydami przeciwdrobnoustrojowymi gospodarza lub antybiotykami (np. aminoglikozydami) hamując ich działanie [144], [145]. W związku z tym, eDNA oprócz funkcji strukturalnej pełni również kluczową rolę w wirulencji *S. aureus* [146], [147]. Warto również podkreślić, że obecność cząsteczek eDNA w biofilmie gronkowcowym nie jest przypadkowa (pozostałość po martwych komórkach), lecz może nastąpić na skutek wydzielania ich przez metabolicznie aktywne komórki lub w wyniku kontrolowanej autolizy [148]–[150]. Interesującym jest to, że drugi z wymienionych procesów jest analogiczny do mechanizmu zaprogramowanej śmierci komórek spotykanej u organizmów wyższych.

W kolejnym etapie dochodzi do tworzenia struktur mikrokolonii, które zapewniają nie tylko większość objętość i przestrzeń do wymiany i magazynowania substancji odżywczych, lecz również ułatwiają usuwanie metabolitów i substancji toksycznych. Mikrokolonie składają się z wyraźnych skupisk komórkowych, a etap ten charakteryzuje bardzo szybkim podziałem komórek i wzmożoną ekspresją białek. Ponadto wydzielane są cząsteczki autoinduktorów QS (ang. *quorum sensing*, zmysł tłoku). Cząsteczki te odgrywają zasadniczą rolę dla formowanego biofilmu, gdyż niosą ze sobą informację na temat warunków środowiska (m.in. gęstości biofilmu) oraz regulują ekspresję genów czynników wirulencji [136]. Rola cząsteczek QS wydaje się być kluczowa dla zjadliwości patogenów oraz ciężkości zakażenia, dlatego też postuluje się, że mogą one być doskonałym celem molekularnym dla nowych substancji terapeutycznych [151].

Po uformowaniu się dojrzałej struktury, gdy ilość komórek przekroczy wartość krytyczną następuje wzmożone uwalnianie cząsteczek QS, którym przypisuje się kluczową rolę dla procesu dyspersji [152]. Wówczas dochodzi do uwalniania i rozprzestrzeniania się komórek bakteryjnych (np. drogą krwi lub płynów ustrojowych) i kolonizacji dalszych miejsc [153].

3. TERAPIA INKFEKCJI GRONKOWCOWYCH

Terapia infekcji wywołanych przez gronkowce złociste stanowi niekiedy poważne wyzwanie terapeutyczne, głównie ze względu na coraz częstsze występowanie szczepów wielolekoopornych. W takim wypadku nieefektywna antybiotykoterapia może skutkować tym, że nawet z początku niegroźna infekcja może przerodzić się w bakteriemie. Dlatego też ważnym jest by przed wdrożeniem odpowiedniego leczenia wykonać odpowiednią diagnostykę mikrobiologiczną. Identyfikacja *S. aureus* oparta jest na użyciu klasycznych metod mikrobiologicznych, biochemicznych oraz dostępnych komercyjnie zestawów wykrywających np. białko A, gronkowcową DNA-zę, koagulazę lub *clumping factor*. Dodatkowo przy identyfikacji mogą być wykorzystywane metody biologii molekularnej opartych na użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) polegających na wykryciu genu *nuc* nukleazy lub *mecA* determinującego oporność na metycylinę. W przypadku uogólnionych zakażeń często też wykorzystywane są testy immunoenzymatyczne (ELISA) wykrywające obecność kwasu tejchojowego [154]. Niestety, ze względu na dość długotrwały proces identyfikacji oparty na klasycznych metodach mikrobiologicznych i biochemicznych często stosowana jest terapia empiryczna. Wadą tego podejścia jest fakt, iż opiera się na użyciu antybiotyków o szerokim spektrum działania. W efekcie może prowadzić to do dalszej selekcji szczepów opornych [155].

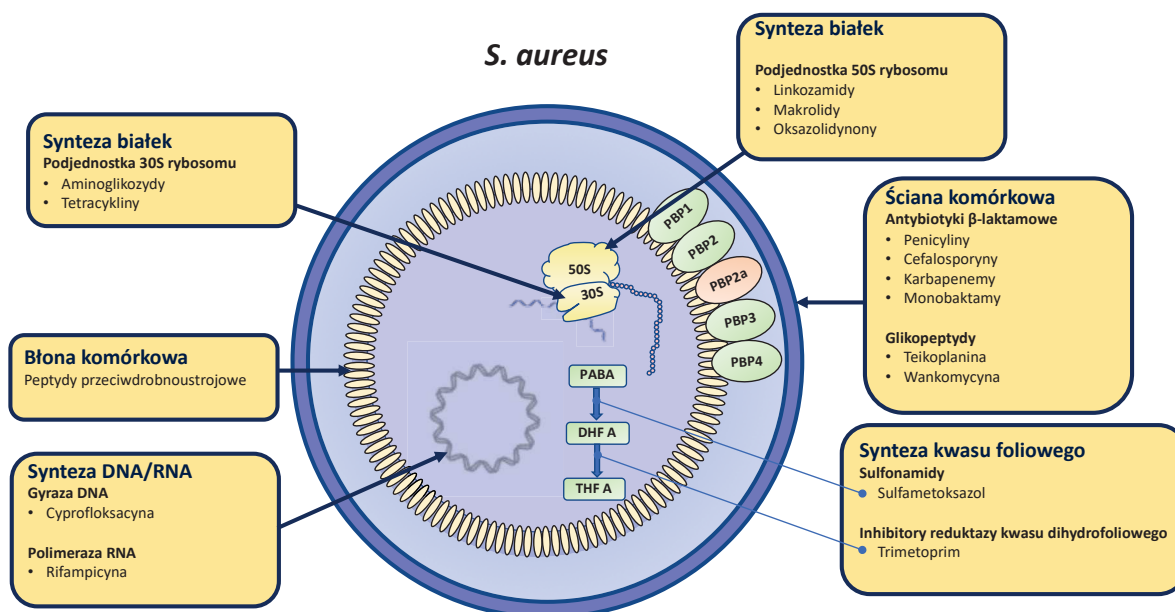
3.1. Antybiotykoterapia

Rodzaj wdrożonej antybiotykoterapii w znaczącym stopniu zależy od objawów klinicznych infekcji oraz jej lokalizacji. Istnieje wiele wytycznych dotyczących schematów postępowania terapeutycznego (terapii empirycznej) obejmujących niemal wszystkie rodzaje zakażeń powodowanych przez *S. aureus*. Zazwyczaj są one opracowywane przez lokalne instytucje nadzorujące (zwykle podległe ministerstwom zdrowia). Chociaż ogólne zasady doboru antybiotyków są podobne dla wielu krajów, istnieją różnice uwzględniające charakterystykę oporności szczepów dla danego regionu [155]–[158]. Tym nie

mniej do najczęściej stosowanych antybiotyków w terapii zakażeń *S. aureus* należą:

1) Aminoglikozydy

Stanowią grupę bakteriobójczych antybiotyków, których podstawową jednostką strukturalną jest aminocukier. Mechanizm działania tych związków oparty jest na trwałym wiązaniu z podjednostką 30S rybosomu, co w efekcie prowadzi do zahamowania syntezy białek bakteryjnych. Wyróżnia się aminoglikozydy naturalne (metabolity drobnoustrojów *Streptomyces* i *Micromonospora*) takie jak gentamycyna, kanamycyna, neomycyna, streptomycyna, tobramycyna oraz półsyntetyczne jak amikacyna i netelmecyna [154]. W terapii infekcji gronkowcowych aminoglikozydy najczęściej stosowane są w terapii zapalenia spojówek [159]. Ponadto gentamycyna zalecana jest w terapii infekcyjnego zapalenia wsierdza [156].



Rycina 4. Cele molekularne antybiotyków i chemioterapeutyków najczęściej stosowanych w terapii infekcji *S. aureus*.

2) Ansamycyny

Są to antybiotyki o działaniu bakteriobójczym, do których należą ryfamycyny stanowiące metabolit *Amycolatopsis rifamycinica* (dawniej *Streptomyces mediterranei*). Mechanizm działania tych związków polega na blokowaniu bakteryjnej polimerazy RNA [154]. Przedstawicielem ansamycyn jest rifampicyna, która w przypadku infekcji o etiologii *S. aureus* stosowana w terapii skojarzonej infekcyjnego zapalenia wsierdza, inwazyjnych infekcji bakteryjnych oraz infekcjach związanych z tworzeniem biofilmu [156], [160].

3) Antybiotyki β -laktamowe

Związki te stanowią liczną i powszechnie stosowaną w terapii grupę antybiotyków, których wspólną cechą jest obecność pierścienia β -laktamowego. Mechanizm aktywności przeciwbakteryjnej tych antybiotyków polega na blokowaniu aktywności transpeptydaz, które odgrywają znaczącą rolę w syntezie ściany komórkowej (sieciowania warstwy mureinowej) [154]. Wyróżnia się pięć głównych podgrup antybiotyków β -laktamowych i są to penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, monobaktamy oraz inhibitory β -laktamaz (kwas klawulanowy, sulbaktam oraz tazobaktam). Generalnie penicylina G nie jest zalecana w terapii infekcji *S. aureus*, aczkolwiek półsyntetyczne penicyliny jak i pozostałe antybiotyki β -laktamowe często są stosowane, w szczególności w leczeniu infekcji MSSA oraz terapii skojarzonej. W przypadku infekcji MRSA, a już w szczególności tych o etiologii szpitalnej zalecane są inne grupy antybiotyków [156].

4) Cykliczne lipopeptydy

Szczególne zastosowanie w terapii bakteriemii *S. aureus*, zakażeń skóry oraz infekcyjnego zapalenia wsierdza znalazły cykliczne lipopeptydy, których przedstawicielem jest daptomycyna. Związek ten występuje naturalnie i izolowany jest z gatunku *Streptomyces roseosporus*. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego oparty jest na nieodwracalnym wiązaniu z błoną

komórkową (w obecności jonów wapnia) i tworzeniu porów, czego efektem jest depolaryzacja błony oraz wyciek jonów potasu z wnętrza komórki. W konsekwencji dochodzi do zatrzymania syntezy białek i śmierci komórki [161]. Istotnym przeciwwskazaniem do stosowania daptomycyny jest bakteryjne zapalenie płuc, gdyż jej aktywność w obecności surfaktantu płucnego jest ograniczona. Podawana jest parenteralnie (pozajelitowo), jednakże ze względu na bardzo dobrą penetrację tkanek stanowi skuteczną alternatywę dla innych antybiotyków (np. glikopeptydów). W szczególności, gdy infekcja powodowana przez szczepy średniowrażliwe lub odporne [154], [155].

5) *Glikopeptydy*

Do tej grupy należą heterocykliczne, wielkocząsteczkowe antybiotyki o selektywnej aktywności bakteriobójczej wobec bakterii Gram-dodatnich. Mechanizm działania tych związków polega na hamowaniu aktywności transglikolaz oraz transpeptydaz – enzymów bakteryjnych katalizujących wydłużanie i sieciowanie peptydoglikanu. Przedstawicielami tej grupy są wankomycyna oraz teikoplanina. Pomimo, że miejsce działania tych związków jest podobne do antybiotyków β -laktamowych to różnica polega na tym, że te pierwsze wiążą się z samym enzymem natomiast wankomycyna oraz teikoplanina z jego substratem [162]. Warto podkreślić, że glikopeptydy te charakteryzują się niewielką biodostępnością, dlatego konieczne jest podawanie ich pozajelitowo. Zarówno wankomycyna jak i teikoplanina najczęściej stosowane są w terapii przewlekłych infekcji MRSA.

6) *Linkozamidy oraz makrolidy*

Obie grupy antybiotyków opisane zostały w jednym dziale z tego względu, iż charakteryzują się zbliżonym zakresem aktywności jak i mechanizmem działania. W obu przypadkach wykazują aktywność bakteriostatyczną polegającą na wiązaniu się z podjednostką 50S rybosomu i oddziaływaniu z kwasem 23S-rRNA tworzącym tę podjednostkę. Jednakże linkozamidy w przeciwieństwie do makrolidów wykazują dodatkowo aktywność

hamującą w stosunku do transferaz peptydylowych rybosomów bakteryjnych [154]. Makrolidy stanowią grupę lipofilnych związków, których wspólną cechą jest pierścień laktonowy zawierającym do 12 do 16 atomów węgla. Przedstawicielem tej grupy jest erytromycyna – antybiotyk wyizolowany od promieniowców z gatunku *Saccharopolyspora erythraea* [163]. Półsyntetyczne pochodne powstałe na skutek modyfikacji erytromycyny to np. azytromycyna, klarytromycyna oraz josamycyna. Przedstawicielami linkozamidów są linkomycyna oraz klindamycyna. Pierwszy antybiotyk pozyskiwany jest od kultur *Streptomyces lincomensis*, natomiast drugi stanowi półsyntetyczną pochodną powstałą w skutek modyfikacji likomycyny w reakcji chlorowania [162]. W terapii infekcji *S. aureus* makrolidy znalazły zastosowanie w terapii bakteryjnego zapalenia spojówek. Klindamycyna zaś zalecana jest we wszelkich terapiach opornych na leczenie, zarówno w przypadku inwazyjnych jak i nieinwazyjnych zakażeń *S. aureus*, w szczególności w zakażeniach kostno-stawowych oraz terapii empirycznej po zabiegach chirurgicznych [155], [164]–[166].

7) Oksazolidynony

Jest to grupa chemioterapeutyków, pochodnych oksazolidynonu, które znalazły zastosowanie w terapii infekcji powodowanych przez bakterie Gram-dodatnie. Mechanizm działania opiera się na specyficznym wiązaniu z centrum aktywnym transferazy peptydylowej (miejscem wiążącym kwasu 23S-rRNA podjednostki 50S rybosomu) i w efekcie hamowaniu biosyntezy białka [154], [162]. Przedstawicielami tej grupy związków są linezolid oraz tedizolid. Ogromną zaletą tych związków jest to, że charakteryzują się praktycznie 100% dostępnością biologiczną, niezależną od dawki i drogi podania oraz dobrą penetracją tkanek. W terapii infekcji *S. aureus* oksazolidynony znalazły zastosowanie zarówno w infekcjach skóry jak i zakażeniach inwazyjnych, szczególnie jako terapia alternatywna dla glikopeptydów [155].

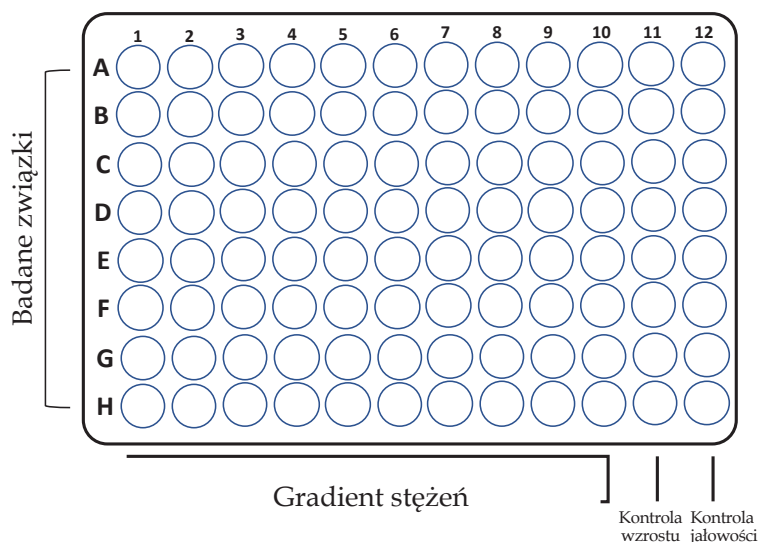
8) *Tetracykliny*

Jest to grupa antybiotyków o szerokim spektrum aktywności, która pierwotnie wyizolowana została ze szczepów *Streptomyces aureofaceins*. Wyróżnia się tetracykliny naturalne takie jak tetracyklina, oksytetracyklina, chlortetracyklina oraz półsyntetyczne jak doskycyklina czy minocyklina. Mechanizm działania polega na blokowaniu przyłączenia się aminoacylo-tRNA do podjednostki 30S rybosomu, co w efekcie prowadzi do zahamowania biosyntezy białek [154], [162]. Tetracykliny znajdują zastosowanie w terapii empirycznej zakażeń gronkowcem złocistym zarówno tych inwazyjnych jak i nieinwazyjnych.

4. PRZEPŁYWOWY MODEL BADANIA BIOFILMU

4.1. Podstawowe metody określania aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Nowo opracowywane związki w początkowym etapie prac badawczych winny być przetestowane przy zastosowaniu jak najbardziej powtarzalnych metod, tak aby wykazywały pożądaną skuteczność również w dalszych etapach prac doświadczalnych m.in. na modelu zwierzęcym *in vivo*. Nie należy zapominać, iż oznaczanie wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki stanowi także kluczowy element rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej. Między innymi z tego względu, iż wyniki tych oznaczeń determinują skuteczność wdrożonej antybiotykoterapii. Procedury te są wystandaryzowane i stale uaktualniane. Wśród metod oznaczania lekowrażliwości wyróżnia się metody jakościowe, takie jak metoda dyfuzyjno-krażkowa oraz metody ilościowe takie jak metoda rozcieńczeń w agarze czy metoda seryjnych rozcieńczeń w bulionie [167]. Ta ostatnia, ze względu na prostotę wykonania, możliwość testowania szerokiego wachlarza związków oraz możliwość ilościowego określenia najniższego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów (MIC, w $\mu\text{g/ml}$) jest najczęściej stosowana w badaniach naukowych. Dawniej oznaczenia te wykonywane były w probówkach, jednakże obecnie do tego celu wykorzystywane są 96-dołkowe płytki mikrotitracyjne (Rycina 5). Ich zastosowanie umożliwia przetestowanie dużej liczby związków



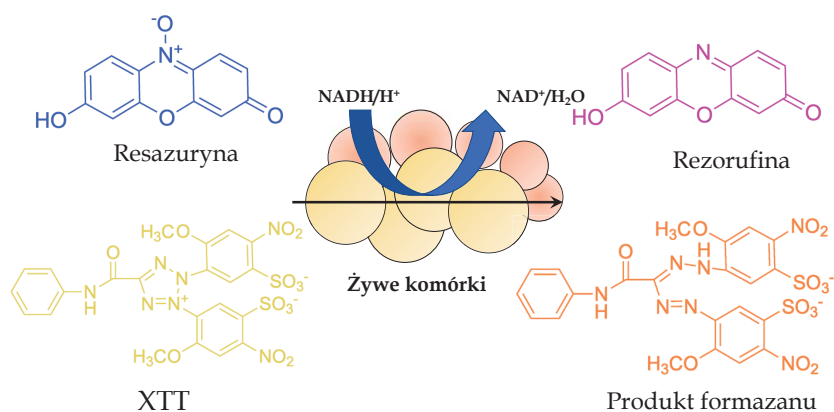
Rycina 5. Przykładowy schemat płytki mikrotitracyjnej przygotowanej do oznaczenia MIC.

przy relatywnie niskim zużyciu odczynników. Ponadto, protokół przygotowany przez Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) stanowi metodę odniesienia i jest najczęściej stosowany w tego typu oznaczeniach. Ponadto zakłada użycie odpowiedniego podłoża mikrobiologicznego, ściśle określonej liczby drobnoustrojów oraz sposobu ich hodowli i czasu inkubacji [168]. Co istotne, rekomendacje CLSI są powszechnie akceptowane przez międzynarodowe gremia zajmujące się określaniem norm w badaniach mikrobiologicznych. Wśród nich wymienić należy EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), *British Society for Antimicrobial Chemotherapy*, *Deutsches Institut für Normung* i *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* [169].

4.2. Metody wykorzystywane w ocenie eliminacji biofilmu

Mając na uwadze fakt, iż około 80% przetrwałych infekcji *S. aureus* związanych jest z występowaniem biofilmu ważne jest, aby przy projektowaniu nowych związków przeciwdrobnoustrojowych uwzględniać aktywność wobec tej struktury. Do tej pory opracowanych zostało wiele metod *in vitro*, które pozwalają ocenić zdolność do eradykacji biofilmu [170]. Co istotne, wszystkie te podejścia oparte są na wykorzystaniu 96-dołkowych płaskodennych płytek mikrotitracyjnych oraz specyficznych związków, pozwalających ocenić wielkość biofilmu lub aktywność metaboliczną komórek go tworzących. Tak jak w przypadku oznaczeń MIC związki badane są w gradiencie stężeń, jednakże dodanie związków poprzedzone jest wytworzeniem biofilmu na powierzchni dołków. Niekiedy w tego typu oznaczeniach wykorzystywane są płytki typu Calgary (ang. *Calgary device*) ze zmodyfikowanymi przykrywkami z wypustkami, na których formowany jest biofilm [171], [172]. Parametrem, który wyznaczany jest przy użyciu tych metod jest minimalne stężenie eliminujące biofilm (ang. *minimal biofilm eliminating concentration*, MBEC). Ogólny schemat wszystkich tych procedur składa się z etapu formowania biofilmu, w którym do dołków płytek dodawana jest ściśle określona ilość bakterii. Następnie płytki inkubowane są przez ściśle określony czas. Dochodzi do adhezji drobnoustrojów i formowania biofilmu. Po inkubacji, biofilm jest

płukany, najczęściej przy użyciu jałowej wody dejonizowanej, soli fizjologicznej lub buforu fosforanowego (PBS) celem pozbycia się wolnopływających komórek. Po płukaniu, procedura badawcza przebiega analogicznie do tej używanej przy określaniu MIC. Dodawana jest świeża pożywka oraz związki w gradiencie stężeń. Po kolejnym etapie inkubacji następuje odczyt wyników. Najczęściej przy wyznaczaniu MBEC wykorzystuje się metodę bioluminescencyjną, fiolet krystaliczny, safraninę, sole tetrazolowe (najczęściej XTT) oraz resazurynę. W metodzie bioluminescencyjnej wykorzystuje się pomiar stężenia wewnątrzkomórkowego ATP w reakcji dekarboksylacji oksydatywnej lucyferyny przez lucyferazę. By reakcja mogła zajść, niezbędne jest ATP, które ulega hydrolizie do AMP i pirofosforanu. Przemianom tym towarzyszy emisja kwantu światła, która w kompleksie ATP/lucyferyna-lucyferaza jest wprost proporcjonalna do ilości komórek. Co istotne w metodzie tej wykrywane są wszystkie komórki, niezależnie od ich aktywności metabolicznej [173], [174]. Fiolet krystaliczny oraz safranina są powszechnie stosowane w badaniach biofilmu *S. aureus* przy ocenie ilościowej [175]–[177]. W obu metodach barwniki te interkalują w głąb biofilmu wiążąc się z ujemnie naładowanymi cząsteczkami (np. błonami komórkowymi, eDNA oraz metabolitami bakteryjnymi). Po inkubacji związki te są wypłukiwane przy użyciu określonych rozpuszczalników (np. mieszanin alkoholi, acetonu lub roztworu kwasu octowego), a wartość absorbancji jest wprost proporcjonalna do ilości powstałej biomasy. Wadą tych metod jest fakt, iż nie dają one odpowiedzi na temat ilości bakterii tworzących biofilm oraz ich stanu metabolicznego, lecz odzwierciedlają jedynie objętość powstałej biomasy. Wartości te mogą być w całkowicie odmienne, również w obrębie tego samego gatunku bakterii. Tym samym wyniki oznaczeń przy użyciu fioletu krystalicznego oraz safraniny mogą nie odzwierciedlać rzeczywistej aktywności badanych związków [178]. Z drugiej strony są metody oparte na pomiarze aktywności metabolicznej, w których wykorzystywane są resazuryna oraz XTT. W metodach tych substraty redukowane są w trakcie oddychania komórkowego (Rycina 6).



Rycina 6. Produkty reakcji redukcji resazuryny oraz XTT w kontakcie z żywymi komórkami.

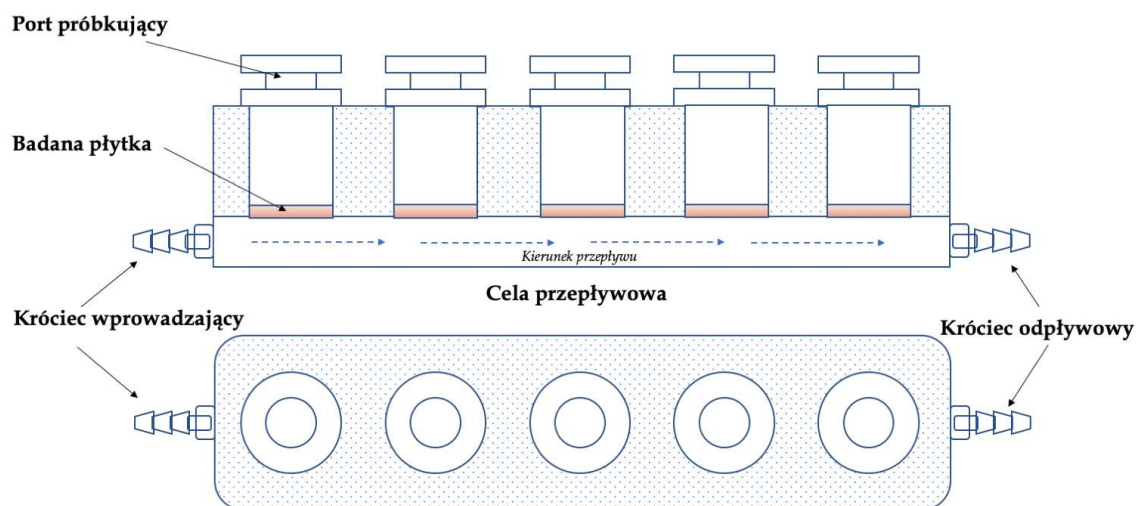
XTT jest rodzajem bezbarwnej lub lekko żółtej soli tetrazoliowej, która zredukowana jest do rozpuszczalnej w wodzie, jasno pomarańczowej pochodnej formazanu. Resazurna natomiast jest niebieskim związkami, który w kontakcie z żywymi komórkami jest nieodwracalnie metabolizowany do różowej rezorufiny [179]. Związek ten dodatkowo wykazuje własności fluorescencyjne, w związku z tym jej można ocenić zarówno spektrofotometrycznie jak i fluorymetrycznie.

4.3. Model przepływowy

Jednym z ograniczeń wcześniej opisanych metod jest to, że model badawczy realizowany jest w warunkach stacjonarnych. Biofilm klinicznie spotykany jest jako struktura dynamiczna, którego charakterystyka zależy od dostępności do substancji odżywczych, temperatury, a nawet czynników stresowych (np. aktywność układu odpornościowego, substancje przeciwdrobnoustrojowe). Dlatego też w badaniach nad biofilmem coraz częściej stosowane są układy przepływowe. Przewagą tego podejścia jest to, iż pozwalają na formowanie oraz badanie biofilmu w warunkach kontrolowanych. Możliwe jest regulowanie m.in. temperatury, dostępu do substancji odżywczych (pożywki) oraz szybkości przepływu. Ponadto udowodniono, że cyrkulacja cieczy indukuje powstanie sił ścinających na granicy ciecz-biofilm, co wpływa na wielkość biofilmu, jego kształt oraz ilość ECM [180]. W rezultacie, to w jakich

warunkach zostanie on uformowany może przekładać się na jego oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe. Modulowanie charakterystyki biofilmu poprzez zastosowanie przepływu cieczy w znacznym stopniu pozwala na odtworzenie warunków spotykanych *in vivo*. Co więcej, tym sposobem promuje się namnażanie tylko tych bakterii, które związały się z powierzchnią, natomiast wypłukiwane są formy planktonowe. Dodatkowo przepływ cieczy pozwala na wymycie toksycznych metabolitów, a niektóre badania wskazują, iż wpływa on na wewnętrzną sygnalizację (ang. *quorum sensing*, QS) u *S. aureus*, co może być związane z wymywaniem cząsteczek sygnałowych [181], [182]. Tym samym wskazany model badawczy uznaje się jako bardziej odpowiedni. Dotychczas opracowano wiele podejść wykorzystujących przepływ cieczy, które z powodzeniem stosowane są w badaniach nad biofilmem *S. aureus* [183], [184].

Pierwszym i najprostszym modelem badawczym jest ten oparty na użyciu zmodyfikowanego urządzenia Robbinsa (ang. *modified Robbins Device*, MDR), które składa się z kwadratowej rury z portami próbkującymi, w których montowane są badane płytki (Rycina 7).

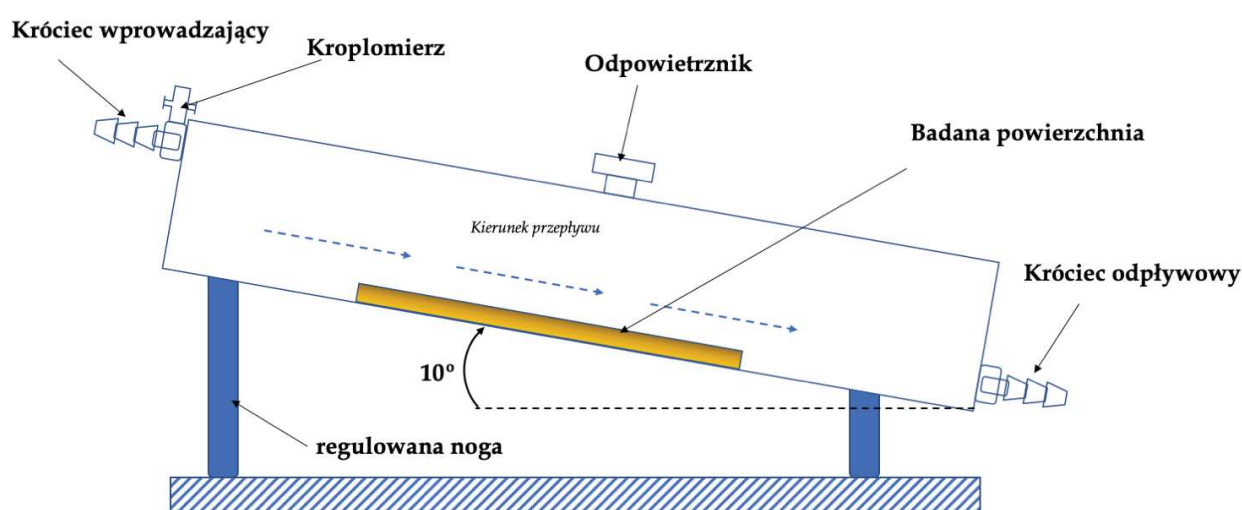


Rycina 7. Schemat przedstawiający zmodyfikowane urządzenie Robbinsa.

Umożliwia on tworzenie biofilmu na różnych rodzajach powierzchni, w kontrolowanych warunkach przepływu. W przypadku *S. aureus* zastosowano go na przykład w określaniu skuteczności usuwania biofilmu przy użyciu

nowych środków dezynfekujących lub w badaniu cementów kostnych impregnowanych gentamycyną [185], [186].

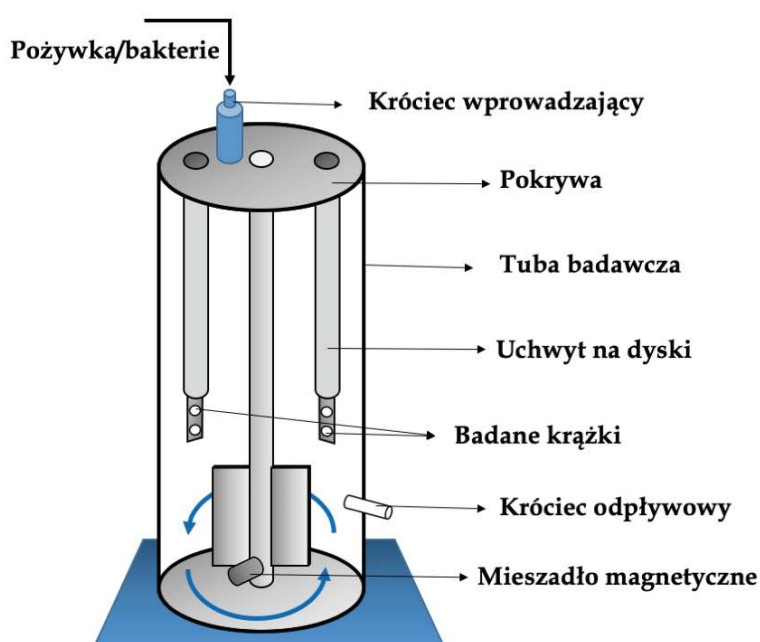
Następnym modelem badawczym jest reaktor biofilmu z przepływem kroplowym (ang. *drip flow reactor*), który opracowany został przez Darlę Goeres i wsp. z Centrum Inżynierii Biofilmu na Uniwersytecie Stanowym w Montanie (Rycina 8) [187]. W reaktorze tym biofilm tworzony jest w warunkach niskiego ścinania na granicy faz powietrze-ciecz. Urządzenie składa się z kilku komór z badanymi powierzchniami, które podłączone są przy pomocy węży silikonowych (z kroplomierzem) do pożywki mikrobiologicznej. W trakcie pracy reaktor obracany jest o 10° od poziomu, co indukuje swobodny przepływ cieczy. Reaktor z przepływem kroplowym wykorzystany został m.in. przez Agostinho i wsp. przy badaniach nad biofilmem MRSA w modelu rany przewlekłej [188].



Rycina 8. Schemat reaktora biofilmu z przepływem *drip-flow*.

Kolejną instytucją badawczą, w której zaprojektowano jeden z przepływowych modeli badawczych jest amerykańskie Centrum do Kontroli Chorób (ang. *The Center for Disease Control, CDC*). Opracowany tam reaktor składa się z ośmiu uchwytów na płytki polipropylenowe, które zawieszone

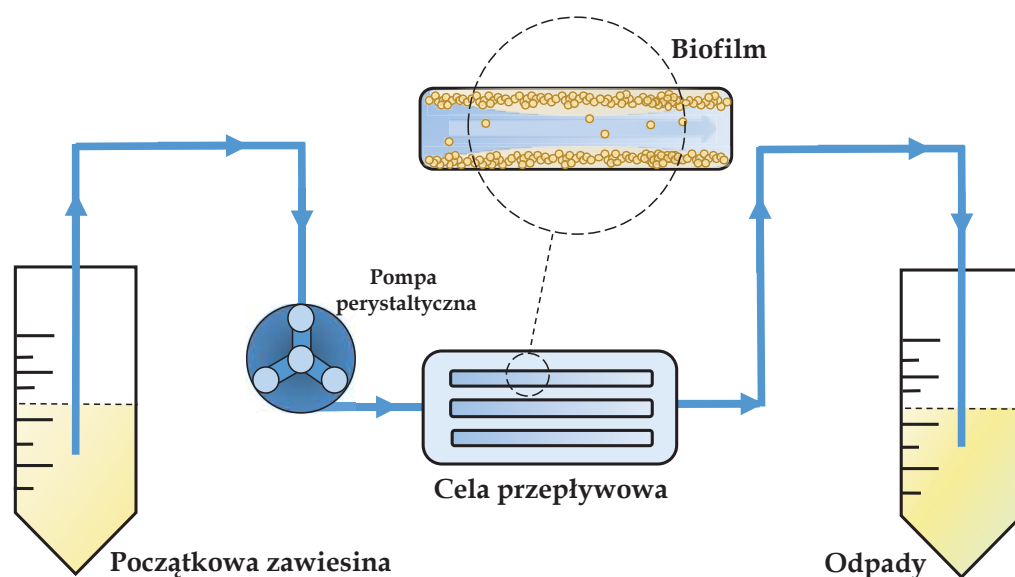
są w tubie z pokrywką i portem polietylenowym. Płytki te można testować w różnych warunkach przepływu cieczy, ponieważ są one połączone z dyskiem przymocowanym do magnesu (Rycina 9). W momencie badania reaktor umieszcza się na mieszadle magnetycznym co pozwala na regulowanie prędkości obrotowej. Obrót dysku powoduje ścinanie powierzchni cieczy w poprzek badanych płytek z biofilmem. W przypadku *S. aureus* reaktor CDC wykorzystano między innymi przy tworzeniu biofilmu na membranach. Po wytworzeniu się struktur na powierzchniach badawczych wszczepiane były do modelu zwierzęcego. Celem tego modelu badawczego była symulacja infekcji związanej z implantem ortopedycznym [189].



Rycina 9. Schemat przedstawiający reaktor CDC.

Urządzenia mikroprzepływowe (ang. *microfluidic devices*, MD) są uważane za najbardziej obiecującą platformę do badań nad biofilmami (ogólny schemat przedstawiony został na Rycinie 10). Przede wszystkim zapewniają zamknięty układ badawczy, w którym biofilm może być hodowany

w różnych warunkach hydrodynamicznych oraz z regulowaną temperaturą i dostępem do substancji odżywczych. Ponadto, charakteryzują się niskim zużyciem odczynników i umożliwiają obrazowanie mikroskopowe oraz śledzenie badań w trakcie całego przebiegu eksperymentu. Dzięki wykorzystywaniu pomp perystaltycznych, możliwe jest regulowanie przepływu ciecchy. Ponadto MD pozwalają na dowolne dozowanie pożywek czy badanych związków przeciwdrobnoustrojowych, w związku z tym dają możliwość optymalizacji modelu badawczego oraz badania wielu czynników równocześnie. Cele przepływowe, w których formowany jest biofilm z kolei można wytwarzać z szerokiej gamy materiałów, w tym ze szkła, materiałów termoplastycznych i elastycznego polidimetylosiloksanu (PDMS). Ten ostatni w szczególności jest wykorzystywany w badaniach biofilmu, ponieważ umożliwia łatwe przygotowanie układów o dowolnym kształcie, jest odporny na sterylizację oraz pozwala na funkcjonalizację jego powierzchni [190]–[192]. W związku z powyższym tego typu układy znalazły zastosowanie w badaniach nad powlekanymi biomateriałami o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, aby móc lepiej odzwierciedlić warunki *in vivo*. Szczególne zastosowanie w tym wypadku znalazły nanocząstki metali oraz peptydy przeciwdrobnoustrojowe [193]–[197].



Rycina 10. Schemat przedstawiający zasadę działania modelu przepływowego

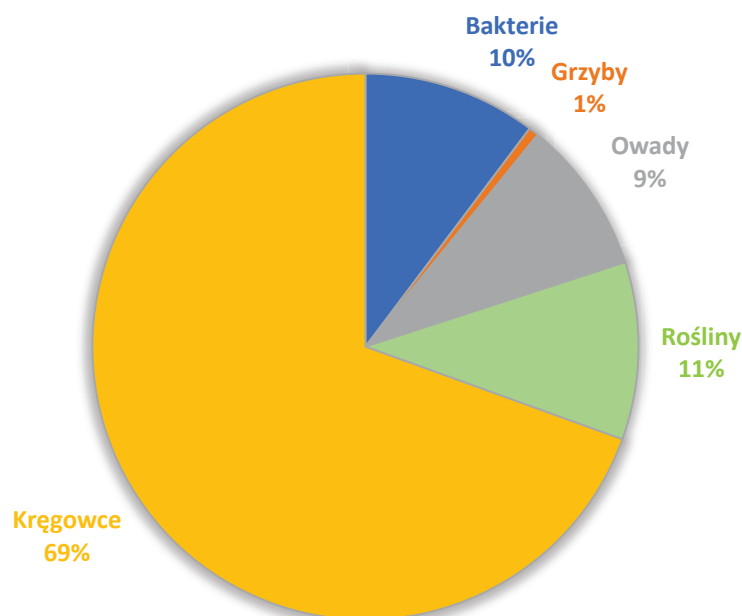
5. PEPTYDY PRZECIWDROBNOUSTROJOWE

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. *Antimicrobial peptides*, AMPs) należą do substancji szeroko rozpowszechnionych w naturze i spotykane są praktycznie we wszystkich królestwach, od organizmów prokariotycznych do eukariotycznych [198]. Cechą charakterystyczną tych związków jest szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, która swym zasięgiem obejmuje zarówno bakterie, grzyby, pierwotniaki oraz wirusy [199]. Ponadto, w odróżnieniu od klasycznych antybiotyków charakteryzują się wysoką aktywnością wobec biofilmu [200]. U bakterii związki te, dzięki swoim właściwościom zapewniają organizmowi producenckiemu przewagę populacyjną nad pozostałymi mikroorganizmami [201]. Uzyskana w ten sposób dominacja w danej niszy ekologicznej pozwala na dostęp do substancji odżywczych i umożliwia przetrwanie danego gatunku. U organizmów wyższych peptydy przeciwdrobnoustrojowe stanowią przede wszystkim kluczowy element odporności nieswoistej. W tym wypadku, poza bezpośrednią aktywnością przeciwdrobnoustrojową mogą pełnić również funkcję immunomodulującą. Przykładowo, poprzez oddziaływanie na limfocyty (zwiększona proliferacja), wzmacnianie aktywności cytotoksycznej komórek NK oraz wzrost ekspresji cytokin [202]. Podstawowym elementem budowy chemicznej wszystkich AMPs są aminokwasy i większość z tych związków posiada nie więcej niż 50 reszt w sekwencji. Na ogół związki te posiadają ok. połowy aminokwasów o charakterze hydrofobowym oraz wysoką zawartość reszt zasadowych takich jak arginina czy lizyna [203]. Wypadkowy ładunek dodatni AMPs m.in. umożliwia wiązanie z ujemnie naładowanymi błonami mikroorganizmów doprowadzając do ich dezintegracji, a w efekcie do lizy komórek.

5.1. Podział związków

Generalny podział peptydów przeciwdrobnoustrojowych oparty jest na źródle pochodzenia. Na chwilę obecną opisanych zostało **3128** związków, które indeksowane są i stale aktualizowane w internetowej bazie danych

prowadzonej przez Wanga i wsp [204]. Ilość opisanych w literaturze peptydów, ze względu na rodzaj organizmu produkującego przedstawiony został na Rycinie 11, a ogólna ich charakterystyka omówiona została w dalszych częściach tego działu.



Rycina 11. Procentowy udział AMPs opisanych w literaturze, ze względu na pochodzenie.

1) Peptydy przeciwdrobnoustrojowe bakterii

AMPs bakterii, zwane bakteriocynami, są heterogenną grupą związków, syntezowaną rybosomalnie, które charakteryzują się różną wielkością oraz odmiennym mechanizmem działania, zależnym od organizmu produkującego. W przypadku bakterii Gram-ujemnych najczęściej bakteriocyn scharakteryzowanych zostało u *Escherichia coli* i innych gatunków z rodziny *Enterobacteriaceae*. W tej grupie wyróżnia się małe mikrocyyny oraz kolicyny. Bakteriocyny szczepów Gram-dodatnich dzielą się na dwie główne klasy: lantybiotyki oraz bakteriocyny nielantybiotyczne. Lantybiotyki to małe peptydy o długości 19–38 aminokwasów, zawierające modyfikacje potranslacyjne, w tym struktury pierścieniowe oparte na mostkach tioeterowych (znane jako lantionina lub β -metyloditionina). Najlepiej opisanym lantybiotykiem jest Nizyna [201]. Peptyd ten produkowany jest przez bakterie

z rodzaju *Lactococcus lactis*. Cechą charakterystyczną tego związku jest wysoka odporność termiczna, dlatego też znalazł on zastosowanie jako konserwant. Nizyna często stosowana jest m.in. w produktach mlecznych oraz konserwach hamując namnażanie bakterii tworzących przetrwalniki (np. *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Listeria* i *Clostridium*) [180].

2) Peptydy przeciwdrobnoustrojowe roślin

Rośliny stanowią odrębną grupę organizmów produkujących peptydy przeciwdrobnoustrojowe, gdyż ewoluowały one w sposób odmienny od pozostałych form życia. AMPs roślin są bogate w reszty cysteiny i ich cechą charakterystyczną jest obecność wielu mostków disulfidowych, które zapewniają im wysoką stabilnością chemiczną, termiczną oraz proteolityczną. Do najlepiej opisanych peptydów roślinnych należą tioniny oraz defensyny. Jednakże istnieją również inne grupy związków charakteryzujących się różnym mechanizmem aktywności. Na przykład peptydy heweinowe (ang. *hevein-like peptides*) wiążą chitynę, knotyny hamują aktywność enzymów proteolitycznych, a peptydy LPT (ang. *lipid transfer protein*) wiążą lipidy, aby zakłócać przenikanie drobnoustrojów do błon komórkowych [205].

3) Peptydy przeciwdrobnoustrojowe owadów

U owadów AMPs dzielą się na trzy najważniejsze grupy: liniowe α -helikalne cekropiny, defensyny oraz peptydy bogate w reszty glicyny oraz proliny. Niewątpliwie te pierwsze stanowią najlepiej zbadaną grupę peptydów. Cekropiny po raz pierwszy wyizolowane zostały z hemolimfy największej ćmy Ameryki Południowej z gatunku *Hyalophora cecropia*. Peptydy te zawierają ok. 35 reszt aminokwasowych w sekwencji i wykazują silną toksyczność wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych a także grzybów [206]. Kolejnym dość istotnym peptydem pozyskanym od owadów jest melityna. Peptyd ten jest kluczową składową apitoksyny tj. jadu pszczelego, która stanowi wydzielinę gruczołu jadowego pszczoły miodnej. Warto podkreślić, iż ten 26-aminokwasowy liniowy peptyd wykazuje szerokie spektrum aktywności

przeciwdrobnoustrojowej. Jednakże ze względu na wysoką cytotoksyczność jego zastosowanie terapeutyczne jest wysoce ograniczone.

4) Peptydy przeciwdrobnoustrojowe kręgowców

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe u kręgowców stanowią największą i najlepiej poznaną grupę tych związków, a wg danych literaturowych to skóra płazów stanowi jedno z najbogatszych ich źródeł [207]. Doskonałym przykładem jest Aureina 1.2. Jest to krótki peptyd (13 reszt aminokwasowych) o strukturze α -heliakalnej który wyizolowany został ze skóry australorzekotki złocistej (*Ranoidea aurea*). Dodatkowo liczne prace badawcze wykazały, iż charakteryzuje się ona nie tylko szerokim spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, ale również przeciwnowotworowej [208]–[210]. Kolejnym, dobrze poznanym peptydem płazów jest Citropina 1.1. Związek ten zbudowany jest z 16 reszt aminokwasowych, który początkowo wyizolowany został z gruczołów grzbietowych australorzekotki szmaragdowej (*Ranoidea citropa*). Wiele prac badawczych udowodniło szereg aktywności biologicznych tego peptydu. Oprócz właściwości przeciwdrobnoustrojowych oraz przeciwnowotworowych wykazuje on również aktywność inhibitora oksydazy tlenu azotu. [211]–[214]. Temporyny z kolei należą do AMPs, które wyizolowane zostały z sekrecji skórnych żaby trawnej (*Rana temporaria*). Rodzina tych związków charakteryzuje się różnorodną strukturą, z pojedynczymi resztami aminokwasów zasadowych (argininy lub lizyny), a Temporyna A stanowi jeden z najlepiej poznanych związków z tej grupy [215]. Ssaki obok płazów stanowią drugą co wielkości gromadę zwierząt stanowiących bogate źródło AMPs. Wśród nich dominującą grupę związków stanowią katelicydyny oraz defensyny. Jednakże związki te obecne są praktycznie u wszystkich kręgowców. Ich synteza regulowana jest poprzez modyfikacje potranslacyjne, które obejmują głównie proteolizę, amidację, ADP-rybozylację, glikozylację i fosforylację białek prekursorowych. Oprócz działania przeciwdrobnoustrojowego, wykazują one aktywność przeciwwirusową, immunomodulującą oraz regulują procesy nowotworzenia [216]. Przykładowo u ludzi jedyną poznaną katelicydyną jest

LL-37, którego prekursorem jest białko hCAP-18 (ang. *human cathelicidin antimicrobial protein-18*). LL-37 jest kationowym peptydem zbudowanym 37 reszt aminokwasowych wytwarzanym przez komórki nabłonkowe błony śluzowej, neutrofile, makrofagi, komórki tuczne, a także limfocyty [217]. Warto podkreślić, że u drobiu poznane i wyizolowane zostały dwa peptydy z rodziny katelicydyn: CATH-B1 oraz CATH 1-3, zaś u świń aż 11. Wśród nich wyróżnia się protegryny, oraz mieloidalne świńskie peptydy przeciwdrobnoustrojowe PMAP (ang. *pig myeloid antimicrobial peptide*) [218].

Drugą z metod klasyfikacji AMPs jest podział ze względu na specyficzną zawartość poszczególnych aminokwasów. Przykładowo peptydy bogate w prolinę (ang. *Pro-rich AMPs*) penetrują komórki bakteryjne poprzez kanały białkowe. Peptydy bogate w cysteinę (ang. *Cys-rich AMPs*) zaś w swej strukturze zawierają mostki disulfidowe, które są niezbędne do formowania porów w błonach komórkowych [219]. Jednak najczęściej stosowany podział, w szczególności dla peptydów kręgowców oparty został o cechy strukturalne (strukturę drugorzędową), na podstawie których wyróżnia się trzy podstawowe grupy związków:

1) *Peptydy liniowe o budowie α -helikalnej, nie posiadające reszt cysteiny*

Związki te stanowią jedną z najlepiej poznanych grup peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Większość z tych związków w roztworach wodnych przyjmuje nieuporządkowaną strukturę, która ustala się w obecności trifluoroetanolu, miceli dodecylsulfianu sodu (SDS), pęcherzyków fosfolipidów lub lipidów. Wówczas cząsteczka przyjmuje postać helisy [220]. Co istotne, badania wskazują, iż to właśnie helikalność związków znacząco wpływa na ich aktywność przeciwdrobnoustrojową [220]. Wśród peptydów z tej grupy wyróżnia się te izolowane od żab (aureiny, citropiny oraz magaininy) owadów (cekropiny oraz melityna), a także katelicydyny [221]. Ta ostatnia grupa AMPs stanowi jedną z najbardziej różnorodnych grup u kręgowców, do których należy m.in. ludzki peptyd LL-37 [222]–[225].

2) *Peptydy o budowie β -kartki*

Peptydy z tej grupy posiadają w sekwencji reszty cysteiny, a ich struktura stabilizowana jest przez mostki disulfidowe. Taka budowa zapewnia większą stabilność strukturalną oraz minimalizuje degradację proteolityczną. Dzięki dość sztywnej strukturze substancje te nie ulegają poważnym zmianom konformacyjnym w momencie oddziaływania z błonami drobnoustrojów. Defensyny stanowią największą i najbardziej poznaną grupę AMPs o strukturze β -kartki. Wśród nich wyróżnia się α -defensyny i β -defensyny (3 mostki disulfidowe) oraz θ -defensyny (cykliczne). Kolejną dość dobrze opisaną grupą są protegryny. Są to bogate w reszty cysteiny peptydy, które wyizolowane zostały z leukocytów wieprzowych. Tachyplezyny zaś są bogatymi w arginę (ok 30% sekwencji) peptydami wyizolowanymi z hemocytów kraba podkowiastego [223], [226]–[228].

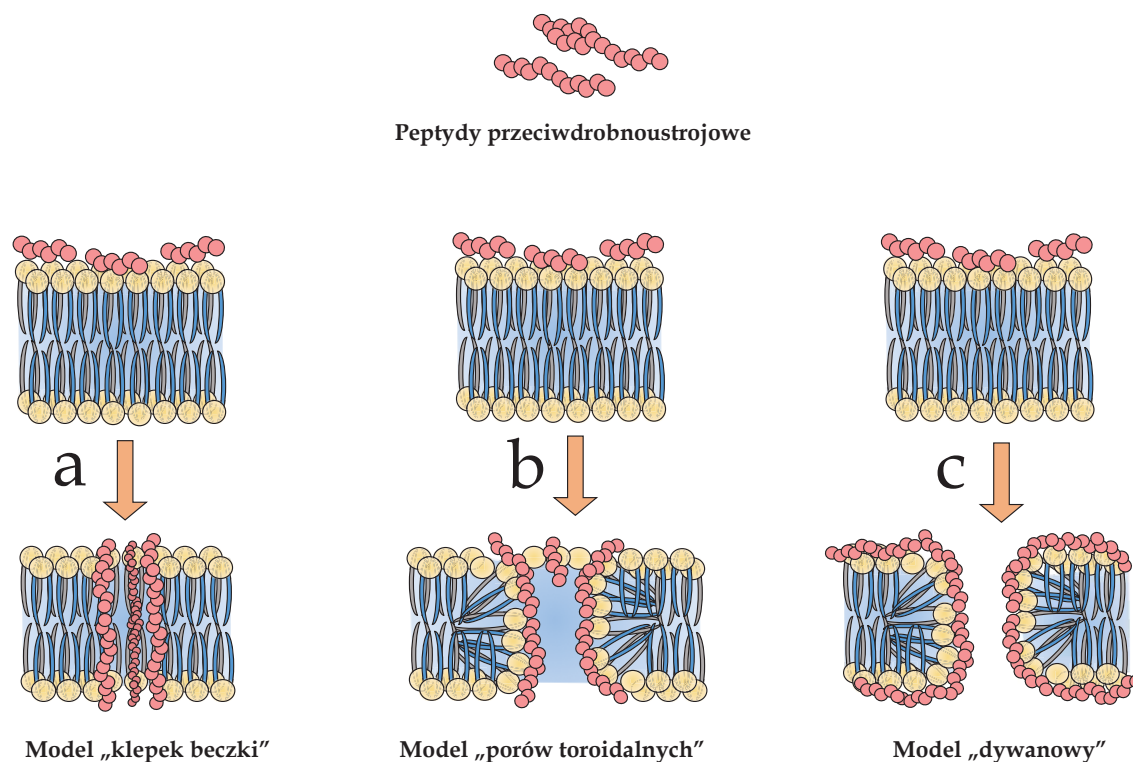
3) *Peptydy o rozszerzonej strukturze*

Trzecia i zarazem ostatnio grupa peptydów przypisana została do cząsteczek, których nie można przypisać do żadnej z powyższych. Charakteryzują się one dość unikalną strukturą. W sekwencji zawierają wiele reszt proliny bądź tryptofanu. Przykładem peptydu przeciwdrobnoustrojowego z tej grupy jest indolicydyna. Związek ten wyizolowany został z ziarnistości granulocytów bydłych. Badania nad aktywnością oraz strukturą tego związku udowodniły, iż po związaniu z błoną drobnoustrojów przyjmuje rozszerzoną strukturę, tworzy kanały doprowadzając równocześnie do jej lizy [220].

5.2. Mechanizm działania

Mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego AMPs jest dwukierunkowy. Tak jak wcześniej wspomniano, u organizmów wyższych opiera się na bezpośrednim zabijaniu drobnoustrojów (ang. *direct killing*) oraz stymulacji układu odpornościowego. W wypadku tego pierwszego, niszczenie i dezintegracja błon komórkowych opiera się na początkowych oddziaływaniach AMPs z ich powierzchnią. Po związaniu się dodatnio naładowanego peptydu,

z powierzchnią ujemnie naładowanej błony dochodzi do zaburzenia jej struktury oraz ciągłości. W literaturze opisanych zostało wiele rodzajów mechanizmów niszczenia błon, jednakże najlepiej opisanymi są: model „klepek beczki”, „porów toroidalnych” oraz „dywanowy” (Rycina 12).



Rycina 12. Mechanizm działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych

1) *Model klepek beczki*

Ten model jest charakterystyczny dla peptydów o strukturze α -helisy bądź β -kartki i oparty jest na tworzeniu swoistych kanałów. Hydrofobowe regiony peptydu układają się w kierunku acylowych łańcuchów dwuwartstwy lipidowej błony, zaś części hydrofilowe wyścielają wewnątrz szczeliny. Charakterystyczne ułożenie peptydu (Rycina 9a) przypomina beczkę ułożoną z klepek (peptydów). Powstałe w błonie pory powodują wyciekanie elementów wewnątrzkomórkowych. Przykładem AMPs wykazujących ten mechanizm działania są protegryny [220].

2) *Model porów toroidalnych*

W modelu porów toroidalnych AMPs również ustawiają się prostopadle do dwuwarstwy lipidowej i indukują powstanie lokalnej krzywizny z porami częściowo utworzonymi przez peptydy, a częściowo przez głowy fosfolipidów. Powstała w ten sposób przejściowa supramolekuła lipid-peptyd określana jest jako „por toroidalny” (Rycina 12b). W odróżnieniu od modelu „klepek beczki” pory powstają w sytuacji, gdy hydrofobowy i hydrofilowy układ jest zakłócony. Ponadto w tym modelu niekiedy cząsteczki AMPs wnikają do wnętrza cytoplazmy oddziałując bezpośrednio ze składnikami wewnątrzkomórkowymi [229]. Przykładem peptydów wykazujących ten mechanizm działania są magaininy [226].

3) *Model dywanowy*

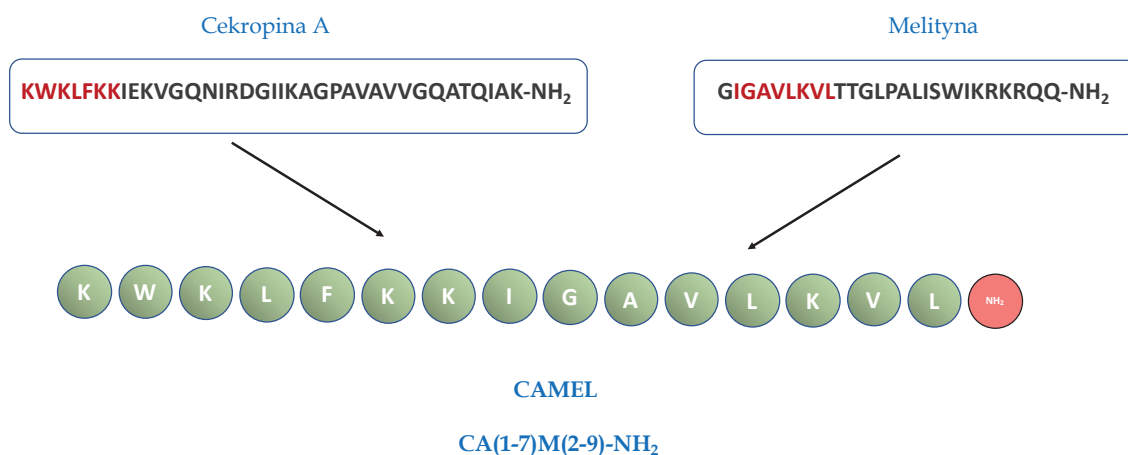
Należy zaznaczyć, że AMPs mogą niszczyć komórki bez tworzenia porów błonowych. Przykładem jest model „dywanowy”, w którym peptydy kumulują się na powierzchni dwuwarstwy lipidowej (Rycina 12c). Peptydy układając się na powierzchni błony powodują jej destabilizację. Następnie dochodzi do jej pęknięcia i wycieku składników wewnątrzkomórkowych. W modelu tym nie zachodzą żadne specyficzne interakcje peptyd-peptyd ze związanymi z błoną monomerami. Natomiast dochodzi do niszczenia błony poprzez zerwanie wiązań lipidowych, podobnie jak w przypadku użycia detergentów. Również związane z utworzeniem miceli fragmentów błony. Przykładem peptydów oddziałujących w ten sposób są Aureina 1.2, cekropiny czy też LL-37 [221], [230].

5.3. **Syntetyczne peptydy o podwyższonej aktywności**

Jednym z największych osiągnięć chemii organicznej było opracowanie syntezy peptydów na nośniku stałym (ang. *Solid-phase peptide synthesis*, SPPS) przez Roberta B. Merrielfielda w latach 60. XX wieku [231]. Dokonanie to niewątpliwie stanowiło kamień milowy współczesnej nauki, gdyż

nieprzerwanie od ponad 50 lat metoda ta wykorzystywana jest do otrzymywania peptydów o aktywności biologicznej zarówno w laboratoriach badawczych jak i przemysłowych. Dzięki SPPS możliwe jest nie tylko odtworzenie naturalnych sekwencji, lecz również wprowadzanie takich modyfikacji, aby móc otrzymać analogi o zupełnie nowych lub poprawionych właściwościach.

Cechą charakterystyczną niektórych AMPs jest to, że tylko część ich sekwencji aminokwasowej odgrywa szczególną rolę dla aktywności przeciwdrobnoustrojową. Dlatego też połączenie kluczowych fragmentów dwóch różnych związków (hybryda) wydaje się być interesującym podejściem pozwalającym na pozyskanie nowego związku o zupełnie nieznanej aktywności. Doskonałym przykładem peptydu hybrydowego jest CAMEL (Rycina 13).



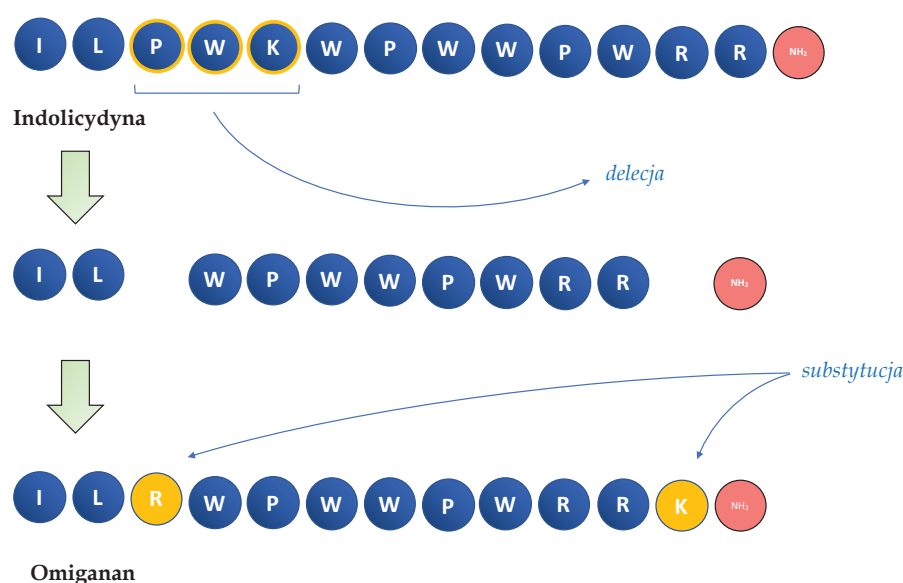
Rycina 13. Sekwencja aminokwasowa peptydu CAMEL oraz schemat powstania hybrydy.

Peptyd ten zawiera 15 reszt aminokwasowych, z których pierwsze 7 pochodzi od Cekropiny A natomiast kolejne 8 od melityny [232]. W efekcie powstał nowy związek charakteryzujący się poprawionymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi oraz szerokim spektrum aktywności [233], [234].

Niekiedy do syntezy wykorzystywane są izomery (β lub D-aminokwasy), aby móc zwiększyć stabilność i odporność na proteolizę lub też syntezuje się analogi o odwróconej sekwencji (retro analogi). Takie peptydy charakteryzują się tą samą konfiguracją centrów chiralnych, natomiast posiadają odwrotną

kolejność reszt aminokwasowych [235]. Przykładowo retro-analog hybrydy Cekropiny A(1-13) i melityny(1-13) charakteryzuje się podobnymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Z kolei retro analog peptydu S, będącego składową układu RNAzy S, pomimo zachowania tej samej struktury przestrzennej co macierzysta cząsteczka nie wykazywał powinowactwa do białka S [235]. Dodatkowo, przy opracowywaniu peptydów do zastosowań terapeutycznych brany pod uwagę jest aspekt przeciwwionów. Synteza peptydów w większości prowadzi się na stałym nośniku polimerowym związana jest z użyciem kwasu trifluorooctowego. W związku z tym produktem końcowym są sole trifluorooctanowe (TFA⁻). Obecność tych anionów może mieć wpływ tych na zmianę konformacji peptydów, a w efekcie również ich aktywność biologiczną. Dlatego też wymiana przeciwwionów, w szczególności przy realizacji bardziej złożone analiz fizyko-chemiczne oraz biologicznych powinna być brana pod uwagę. Zazwyczaj stosowane bardziej biozgodne, takie jak chlorki oraz octany, a w literaturze opisanych jest szereg procedur [236].

Omiganan (MBI 226) jest krótkim (12 reszt) kationowym analogiem indolicydyny. Związek ten uzyskany został poprzez delecję trzech środkowych aminokwasów i wprowadzenie argininy w pozycji drugiej i lizyny na końcu łańcucha (Rycina 14). W rezultacie uzyskany został nowy związek o obiecujących właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.



Rycina 14. Schemat przedstawiający otrzymanie Omigananu.

Warto zaznaczyć, że Omiganan jest jednym z najszerzej badanych AMPs w badaniach klinicznych i jest jednym z ostatnich, który przeszedł III fazę badań [237].

Pexiganan (MSI-78) jest analogiem Magaininy, w którym poprawione właściwości przeciwdrobnoustrojowe uzyskane zostały poprzez delecję oraz substytucję poszczególnych reszt aminokwasowych resztami lizyny (Rycina 15). W efekcie pozyskany analog charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych [237]. Początkowo Pexiganan opracowany został jako potencjalny środek do terapii owrzodzeń stopy cukrzycowej. Niestety nie przeszedł on II fazy badań klinicznych [237].

GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS-NH₂

Magainina

GIGKFLKKA~~K~~FGKAFV~~K~~IL~~K~~K-NH₂

Pexiganan

Rycina 15. Sekwencje aminokwasowe Magaininy oraz Pexigananu.

II. CEL PRACY

Celem głównym pracy doktorskiej było zbadanie aktywności wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs) wobec biofilmu gronkowcowego w warunkach przepływowych. Realizacja powyższego poprzedzona została dokładnymi analizami mikrobiologicznymi wobec szeregu syntetycznych związków, a do badań wykorzystano referencyjne jak i kliniczne szczepy *S. aureus*.

W pierwszym etapie scharakteryzowano szeroki wachlarz szczepów klinicznych pod kątem wrażliwości na antybiotyki konwencjonalne oraz wybrane AMPs. Na tej podstawie możliwe było wytypowanie reprezentatywnej grupy szczepów, wobec których realizowane były dalsze prace.

Selekcja AMPs charakteryzujących się najlepszymi właściwościami przeciwostronkowcowymi oparta była na dwóch pomniejszych celach szczegółowych obejmujących:

- 1) Ocenę wpływu wymiany przeciwostronów w różnych AMPs na aktywność przeciwdrobnoustrojową, które zrealizowane zostały na licznej grupie szczepów klinicznych.
- 2) Ocenę aktywności AMPs retro analogów. Badania te zrealizowano tylko wobec szczepów referencyjnych, aby zweryfikować, czy odwrócenie sekwencji w AMPs może wpłynąć na poprawę aktywności przeciwostronkowej.
- 3) Analiza cytotoksyczności, która pozwoliła na wytypowanie AMPs o najwyższym potencjale wobec *S. aureus* i na tych związkach zrealizowane zostały dalsze prace, na które składały się:

- 1) Szeroki panel badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej zarówno wobec form planktonowych oraz biofilmu.
- 2) Analizy cytotoksyczności
- 3) Badania w unikalnym, specjalnie zaprojektowanym układzie przepływowym, aby móc dokładnie ocenić wpływ badanych związków wobec biofilmu *S. aureus*.

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. MATERIAŁY I METODY

1.1. Aparatura

1) Autoklawy

- Autoklaw mikrofalowy ENBIOJET (ENBIO, Polska)
- Autoklaw TAU CLAVE 3000 (Tau Steril, Włochy)
- Autoklaw Tuttnauer 2540ML (Tuttnauer, USA)

2) Chromatografy cieczowe

- Chromatograf jonowy ICS-5000+ (Thermo Fisher Scientific)
- Wysokosprawny chromatograf preparatywny ECOM (ECOM, Czechy)
- Wysokosprawny chromatograf cieczowy Waters Alliance e2695 z detektorem masowym ACQUITY QDa (Waters, USA)
- Wysokosprawny chromatograf cieczowy Varian PROSTAR HPLC System 210 (Varian Inc., USA)

3) Czytniki do pomiaru absorbancji i fluorescencji

- Czytnik mikroplamki Multiskan™ GO (Thermo Scientific, USA)
- Czytnik mikroplamki Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific, USA)

4) Demineralizator wody wodociągowej HLP 5 (Hydrolab, Polska)

5) Inkubatory

- Inkubator z wytrząsaniem oraz chłodzeniem Incu-Shaker 10L (Benchmark Scientific, USA)
- Inkubator z wytrząsaniem IKA KS 4000i control (IKA Werke GmbH, Niemcy)
- Suszarka SML (Zalmet, Polska)

6) Liofilizator ALPHA 1-2 LD Plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Niemcy)

7) Mieszadło magnetyczne Magnetic Stirrer Type MM 6 (POLAMED, Polska)

- 8) Mikroskop Delta Optical Evolution 100 Trino Plan Led (Delta Optical, Polska)
- 9) Mikrofalowy syntezytor peptydów Liberty Blue (CEM Corporation, USA)
- 10) Komory laminarne
 - Komora laminarna I klasy bezpieczeństwa z pionowym przepływem powietrza ALPINA KL01L (ALPINA, Polska)
 - Komora laminarna II klasy bezpieczeństwa ALPINA BIO 100 typu A2 (ALPINA, Polska)
- 11) Pompy perystaltyczne
 - Trzy pompy perystaltyczne Kamush® (Lipopharm.pl, Polska)
- 12) Pipety automatyczne
 - Jednokanałowe Eppendorf Research® plus 2-20; 20-200, 100-1000 µL
 - 8-kanałowe Eppendorf Research® plus 30-300 µL (Eppendorf, Niemcy)
- 13) Termoblok laboratoryjny TD 100 P1 (FALC Instruments S.r.l., Włochy)
- 14) Wagi laboratoryjne
 - Waga analityczna AS 60/220/C/2 (Radwag Wagi Elektroniczne, Polska)
 - Waga analityczna WAS 160/X (Radwag Wagi Elektroniczne, Polska)
 - Waga laboratoryjna WTB 200 (Radwag Wagi Elektroniczne, Polska)
 - Waga precyzyjna PS 210 R2 (Radwag Wagi Elektroniczne, Polska)
- 15) Wirówki laboratoryjne
 - Wirówka uniwersalna Sorval ST16 z chłodzeniem (Thermo Scientific, USA)
 - Wirówka Hettich EBA 20S (Andreas Hettich GmbH & Co., Niemcy)
- 16) Wstrząsarki laboratoryjne
 - Vortex Lab Dancer yellow line (IKA Werke GmbH, Niemcy)
 - Multi Speed Vortex MSV-3500 (BioSan, Łotwa)
 - Multi-Vortex V32 (BioSan, Łotwa)
- 17) Zgrzewarka Stomatologiczna ZS (SPÓŁDZIELNIA PRACY „ELKON”, Polska)

1.2. Odczynniki

- Acetaldehyd (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Aceton (POCH, Polska)
- Acetonitryl (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Ampicylina (Carl Roth, Niemcy)
- Bicyna (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Bufor fosforanowy, tabletki PBS (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylotetrazoliowy - MTT (Sigma-Aldrich, USA)
- Chloranil (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Ciekły azot (Air Products, Polska)
- Cyprofloksacyna (Sigma-Aldrich, USA)
- Daptomycyna (Sigma-Aldrich, USA)
- Dichlorometan - DCM (POCH SA, Polska)
- Dimetylosulfotlenek - DMSO (Sigma-Aldrich, USA)
- Dionex AS22, koncentrat eluentu (4,5 mM NaCO₃, 1,4 mM NaHCO₃)(Thermo Fisher Scientific, USA)
- Dopamina (chlorowodorek) (Sigma-Aldrich, USA)
- Dulbecco's Minimum Essential Medium, (Sigma Aldrich, USA)
- Erytromycyna (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Etanol (Sigma Aldrich, USA)
- Eter dietylowy (POCH S.A., Polska)
- HEPES (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Jodek 3,3'dipropylotiakarbocyaniny - DiSC₃(5) (Thermo Fisher, USA)
- Kwas fusydowy (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Kwas octowy (POCH S.A., Polska)
- Kwas trifluorooctowy (Iris Biotech GmbH, Niemcy)
- L-aminokwasy z osłoną Fmoc (Orpegen, Niemcy)
- Line-Antybakteria 70 (Linegal Chemicals Sp. z o. o. Polska)
- Linezolid (Pfeizer, USA)

- Linkomycyna (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Metanol (POCH SA, Polska)
- Mupirocyna (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- *N,N*-diizopropylloetyloamina – DIPEA (Iris Biotech GmbH, Niemcy)
- *N,N*-diizopropyllokarbodiimid – DIC (Iris Biotech GmbH, Niemcy)
- *N,N*-dimetyloformamid - DMF (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Oxyrna Pure (Iris Biotech GmbH, Niemcy)
- Piperidyna (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Podłoże agarowe Mueller-Hinton (BioMaxima, Polska)
- Podłoże chromID® MRSA/ chromID® *S. aureus* (BioMérieux, Francja)
- Podłoże płynne Mueller-Hinton (BioMaxima, Polska)
- Poli(dimetylosiloksan), Sylgard 184 (Dow Corning, USA)\
- Resazuryna (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Resazuryna (sól sodowa) (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Surowica wołowa - FBS (Sigma Aldrich, Niemcy)
- Tetracykлина (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich, USA)
- Triizopropylsilan – TIS (Iris Biotech GmbH, Niemcy)
- Triton X-100, (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Trypsyna (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypsyna (0,25 % roztwór EDTA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Wankomycyna (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Żywica Rink Amide AM Resin 100-200 mesh, 0,4-0,74 mmol/g (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- Żywica Wanga

1.3. Materiały laboratoryjne jednorazowego użytku

- Fiolki do autosamplera Dionex (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Filament poli(akrylonitrylo-butadieno-styrenowy, ABS)
- Jednorazowe sterylne ezy mikrobiologiczne 10 μ l
- Jednorazowe sterylne głaszczki (Biologix, Chiny)
- Kolumnienki z żywicą jonowymienną VariPure (Agilent, USA)
- Końcówki do pipet 20-200; 100-1000; 1000-5000, 10000-10000 μ l (Eppendorf, Niemcy)
- Kriofiolki do przechowywania drobnoustrojów, Roti®-Store (Carl-Roth GmbH, Niemcy)
- Kuwety spektrofotometryczne z polistyrenu 0,5-2,5 ml (MedLab Products Sp. z o. o., Polska)
- Płytki mikrotitracyjne – 96 dołkowe, okrągłodenne, V-kształtne oraz płaskie (Kartell, Włochy)
- Probówki polipropylenowe 5 ml (Eppendorf, Niemcy)
- Probówki typu Eppendorf, 2 ml (MedLab Products Sp. z o. o., Polska)
- Rękaw do sterylizacji (Sogeva, Włochy)
- Sterylne probówki polietylenowe, okrągłodenne, 11ml (MedLab Products Sp. z o. o., Polska)
- Sterylne probówki polipropylenowe typu “falcon” 15, 50 ml (Nest Scientific Biotechnology, Chiny)
- Sterylne Szalki Petriego z polistyrenu 60 mm
- Sterylne Szalki Petriego z polistyrenu 90 mm
- Wąż silikonowy Tygon®3350 2,4×0,8×0,8 mm (Saint-Gobain Performance Plastics, Francja)
- Wymazówki z tworzywa z podłożem transportującym (MedLab Products Sp. z o. o., Polska)

1.4. Linie komórkowe oraz szczepy drobnoustrojów

1) Nienowotworowa, unieśmiertelniona linia keratynocytów ludzkich HaCaT (ATTC, USA)

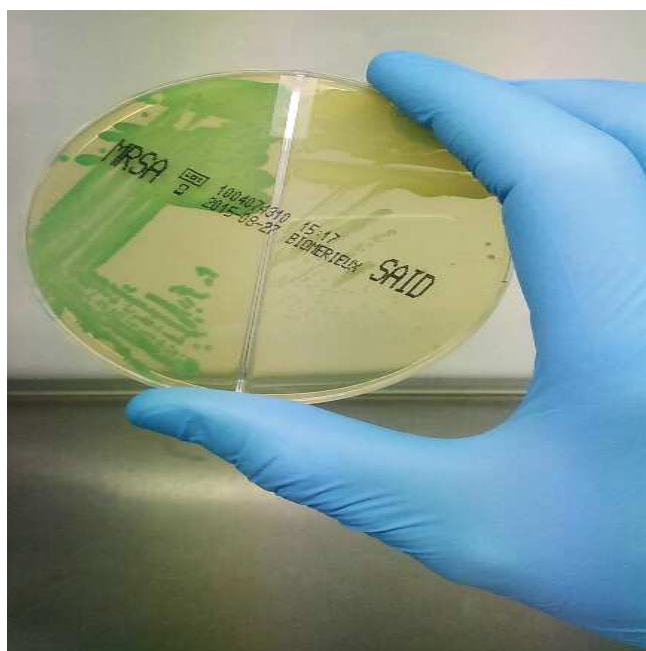
2) Referencyjne szczepy drobnoustrojów

- *S. aureus* ATCC 25923
- *S. aureus* ATCC 6538
- *S. aureus* ATCC 6538/P
- *S. aureus* ATCC 9144
- *S. aureus* ATCC 12592
- *S. aureus* ATCC 33591

3) Szczepy kliniczne

Kliniczne szczepy *S. aureus* wykorzystane w pracy doktorskiej pozyskane zostały od pacjentów Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w okresie od sierpnia 2014 do sierpnia 2015 (nr zgody komisji bioetycznej NKBBN/242-477/2014). Wymazy pobrane zostały ze zgięcia łokciowego oraz przedsionka nosa od 100 pacjentów z rozpoznaniem AZS oraz od 50 zdrowych ochotników. Wstępna selekcja i identyfikacja poszczególnych szczepów dokonana została przy użyciu dwudzielnego podłoża ChromID MRSA/ChromID *S.aureus* (BioMérieux), które wykorzystywane jest do przesiewowego badania w kierunku nosicielstwa *S. aureus* oraz MRSA. Podłoże to podzielone jest na dwie części, a w skład których wchodzi bogata baza odżywcza łącząca różnego rodzaju peptony oraz antybiotyków (cefoksytyna). Dlatego też, w pożywce tej promowany jest wzrost gronkowców. Natomiast część oznaczona jako MRSA zawiera chromogeny substrat dla α -glukozydazy (chroniony patentem), dzięki czemu szczepy metycylinooporne rosną w postaci zielonych lub zielono-seledynowych kolonii

(Rycina 10). Wszystkie wyizolowane szczepy, po odpowiedniej kwalifikacji przenoszone były do probówek z podłożem krioprotekcyjnym i szklanymi kulkami Roti-Store (Carl-Roth GmbH) i przechowywane w -20°C. W ten sposób zabezpieczone drobnoustroje stanowiły przedmiot dalszych prac badawczych.



Rycina 16. Zdjęcie przedstawiające wzrost szczepu MRSA na podłożu dwudzielnym chromID MRSA/*S. aureus*.

1.5. Synteza oraz oczyszczanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Syntezę, oczyszczanie oraz potwierdzenie tożsamości peptydów przeciwdrobnoustrojowych (szczegółowa charakterystyka otrzymanych związków w Tabelach 1-3) wykorzystanych w pracy doktorskiej przeprowadzono w laboratorium Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Peptydy Omiganan oraz retro-Omiganan zsyntezowałem samodzielnie, pozostałe otrzymane zostały przez pracowników Zakładu i dostarczone w ramach realizowanych przedsięwzięć badawczych.

Związki otrzymano metodą syntezy na stałym nośniku polimerowym (SPPS – ang. *solid-phase peptide synthesis*) przy zastosowaniu strategii Fmoc, w której do ochrony grupy N^α-aminowej stosuje się zasadolabilne ugrupowanie 9-fluorenylometoksykarbonylowe. [238]. Jako stały nośnik wykorzystano żywice Rink amide oraz żywicę Wanga. Syntezę prowadzono manualnie w temperaturze pokojowej lub też przy użyciu reaktora mikrofalowego Discover SP (CEM Corporation) celem uzyskania wyższej wydajności [239].

Synteza składała się z następujących etapów:

1) Deprotekcja – czyli usunięcie osłony Fmoc z aminokwasu (lub z żywicy) za pomocą 20% (v/v) roztworu piperydyny w DMF (15 min). W przypadku syntezy wspomaganej mikrofalami, etap ten prowadzony był w 75°C przy użyciu 30W (3 min).

2) Przemywanie stałego nośnika przy użyciu:

- DMF (3 × 2 min)
- DCM/DMF w stosunku objętościowym 1:1 (3 × 2 min)
- DCM (3 × 2 min)

3) Test chloranilowy – analiza ta pozwala na wykrycie wolnych grup aminowych. W tym celu niewielką ilość ziaren żywicy przenoszono do roztworu

testowego (mieszaniny 2% roztworów acetaldehydu i chloranilu w DMF). W przypadku obecności wolnych grup aminowych dochodzi do zmiany zabarwienia ziaren żywicy na kolor zielony.

4) Acylowanie – jest to proces, w którym dochodzi do wytworzenia wiązania peptydowego. Reakcja ta prowadzona była przez 1,5 godziny, przy zastosowaniu 4-krotnego nadmiaru Fmoc-chronionych aminokwasów stosunku do grup aminowych mogących wciąć udział w reakcji (nadmiar substratów był obliczany po uwzględnieniu masy żywicy oraz jej stopnia osadzenia). Reakcję sprzęgania przeprowadzono poprzez aktywację grupy karboksylowej chronionego aminokwasu przy zastosowaniu *N,N'*-diizopropylkarbodiimidu (DIC) w mieszaninie DMF/DCM oraz OxymaPure, która stosowana jest aby zapobiec racemizacji aminokwasów. Każdy etap poprzedzony został przemywaniem żywicy roztworem DMF. W przypadku syntezy mikrofalowej reakcję sprzęgania prowadzono w DMF, w 75°C, mocy mikrofal 30W przez 5 min.

5) Przemywanie – tak jak w pkt 2. Proces ten był prowadzony celem pozbycia się substratów oraz przygotowania do deprotekcji lub też odszczepienia peptydu od żywicy.

6) Kontrola acylowania – tak jak w pkt 3. Po prawidłowym przyłączeniu kolejnego aminokwasu do łańcucha, wynik tego testu powinien być negatywny (brak wolnych grup aminowych i tym samym brak zmiany zabarwienia ziaren).

Wszystkie powyższe etapy prowadzone były aż do uzyskania pożądanej sekwencji aminokwasowej peptydu. Deprotekcja jak i acylowanie prowadzone były przy wykorzystaniu wytrząsarki laboratoryjnej. Po zakończonej syntezie nośnik stały przemywany był przy użyciu eteru dietylowego.

Odszczepienie peptydów z żywicy wraz z usunięciem grup ochronnych przeprowadzono poprzez zastosowanie mieszanin: (A) TFA, TIS oraz woda (95: 2,5: 2,5 *v/v*) oraz (B) TFA, TIS, fenol oraz woda (92,5: 2,5: 2,5: 2,5 *v/v*).

Mieszanina (B) stosowana była przypadku peptydów zawierających tryptofan (W) w sekwencji. Natomiast mieszanina (A) stosowana była dla pozostałych peptydów. Proces odszczepiania prowadzony był przez 90 min w naczyniu wraz z mieszadłem magnetycznym

W kolejnym etapie roztwór otrzymanych peptydów przesączano przez lejek ze szklanym spiekem, aby oddzielić ziarna żywicy od roztworu. Następnie peptydy wytrącano przy użyciu zmrożonego roztworu eteru dietylowego. Uzyskane w ten sposób osady odwirowano, rozpuszczano w wodzie i liofilizowano. W przypadku trudności z rozpuszczalnością stosowano niewielki dodatek kwasu octowego.

Po procesie liofilizacji, surowe peptydy analizowane były przy zastosowaniu RP-HPLC (Varian ProStar) w liniowym gradiencie eluentów: (B) 0,1% TFA w acetonitrylu (ACN) oraz (A) 0,1% TFA w wodzie. W tym celu wykorzystano kolumnę Phenomenex Luna C18 (10 μm , 4,6 $\times$ 150 mm, 100 Å), szybkość przepływu 2 ml/min, czas analizy 10 min, długość fali 214 nm.

Oczyszczanie surowych peptydów przeprowadzone zostało przy użyciu chromatografii preparatywnej (ECOM) w liniowym gradiencie eluentów B oraz A przy zastosowaniu kolumny Phenomenex Luna C18 (10 $\times$ 250 mm, 100 Å) przy przepływie 5 ml/min oraz detekcji przy długości fali $\lambda = 214$ nm.

Czystość oraz tożsamość peptydów określona była przy zastosowaniu systemu RP-HPLC Waters Alliance e2695 z detektorami Waters 2998 PDA oraz Acquity QDa. Wszystkie analizy przeprowadzono na kolumnie Waters XBridge™ Shield RP-18 (3,5 μm , 4,6 $\times$ 150 mm, 130 Å). W tym celu próbki o objętości 10 μl analizowano w liniowym gradiencie 10–90% ACN w wodzie dejonizowanej przez 10 minut. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,5 ml/min. Oba eluenty zawierały 0,1% (v/v) kwasu mrówkowego. Detekcję UV przeprowadzono przy długości 214 nm. Potwierdzenie masy peptydy następowało poprzez porównanie obliczonych wartości m/z dla jonów do wartości zmierzonych. Do dalszych badań wykorzystano frakcje o czystości $\geq 95\%$ (według analizy RP-HPLC), które następnie zebrano i liofilizowano.

Tabela 1. Charakterystyka otrzymanych peptydów

Peptyd	Sekwencja	Ładunek wypadkowy	Śr. masa cząsteczkowa (Da)	Wyniki analizy MS		
				z^a	m/z^b	m/z^c
Aureina 1.2	GLFDIIKKIAESF-NH ₂	+1	1479,78	2	740,9	740,7
				3	494,3	494,3
retro-Aureina 1.2	FSEAIKKIIDFLG-NH ₂	+1	1479,78	2	740,9	740,9
				3	494,3	494,4
CAMEL	KWKLFKKIGAVLKVL-NH ₂	+6	1770,33	2	886,2	886,1
				3	591,1	591,3
				4	443,6	443,9
retro-CAMEL	LVKLVAGIKKFLKWK-NH ₂	+6	1770,33	2	886,2	886,0
				3	591,1	591,0
				4	443,3	443,6
				5	355,1	355,1
Citropina 1.1	GLFDVIKKVASVIGGL-NH ₂	+2	1614,99	2	808,5	808,5
				3	539,3	539,5
retro-Citropina 1.1	LGGIVSAVKKIVDFLG-NH ₂	+2	1614,99	2	808,5	808,4
				3	539,3	539,4

^a ładunek jonu

^b obliczona wartość m/z

^c zmierzona wartość m/z

Tabela 2. Charakterystyka otrzymanych peptydów (cd.)

Peptyd	Sekwencja	Ładunek wypadkowy	Śr. masa cząsteczkowa (Da)	Wyniki analizy MS		
				z^a	m/z^b	m/z^c
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKD- FLRNLVPRTEs	+6	4493,33	4	1124,3	1124,3
				5	899,6	899,6
				6	749,9	750,0
				7	642,9	643,1
				8	562,6	562,7
Melityna	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	+6	2846,46	3	950,1	949,8
				4	712,8	712,9
				5	570,4	570,5
Omiganan	ILRWPWWPWRRK-NH ₂	+5	1779,15	2	890,6	890,3
				3	594,1	594,0
				4	445,8	445,8
retro-Omiganan	KRRWPWWPWRLI-NH ₂	+5	1779,15	2	890,6	890,5
				3	594,1	594,1
				4	445,8	445,9

^a ładunek jonu

^b obliczona wartość m/z

^c zmierzona wartość m/z

Tabela 3. Charakterystyka otrzymanych peptydów (cd.)

Peptyd	Sekwencja	Ładunek wypadkowy	Śr. masa cząsteczkowa (Da)	Wyniki analizy MS		
				z^a	m/z^b	m/z^c
Pexiganan	GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKK-NH ₂	+10	2477,21	2	1239,6	1239,8
				3	826,7	826,6
				4	620,3	620,4
				5	496,5	496,6
				6	413,9	414,0
retro-Pexiganan	KKLIKVFAGFKKAKKLFKGIG-NH ₂	+10	2477,21	3	826,2	826,6
				4	619,9	620,4
				5	496,1	496,5
				6	413,6	414,0
Temporyna A	FLPLIGRVLSGIL-NH ₂	+2	1396,78	2	699,4	699,3
retro-Temporyna A	LIGSLVRGILPLF-NH ₂	+2	1396,78	2	699,4	699,5

^a ładunek jonu

^b obliczona wartość m/z

^c zmierzona wartość m/z

1.6. Wymiana oraz oznaczanie przeciwciał w peptydach

Wszystkie peptydy otrzymane przy użyciu SPPS są solami trifluorooctanowymi (TFA⁻). W ramach niniejszej pracy doktorskiej dokonałem wymiany przeciwciał na biokompatybilne chlorki (Cl⁻) oraz octany (AcO⁻).

1) Otrzymywanie soli chlorkowych

Wymiana na Cl⁻ przeprowadziłem przy zastosowaniu metody opracowanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego zakładającej użycie acetonitrylu nasyconego gazowym 0,5% HCl [240]. By wymienić TFA⁻ peptyd rozpuszczano we wskazanym roztworze, odparowywano przy użyciu wyparki próżniowej i liofilizowano. Proces ten powtarzano czterokrotnie.

2) Otrzymywanie soli octanowych

Wymiana TFA⁻ na AcO⁻ przeprowadziłem w dwóch etapach. Początkowo aniony TFA⁻ usunięto przy zastosowaniu kolumnienek z żywicą jonowymienną VariPure (Agilent). W tym celu roztwór peptydu rozpuszczony w wodzie przepuszczano przez kolumnienkę założoną na kolbę ssawkową. Po związaniu z fazą stałą peptyd wymywano przy użyciu ACN i zbierano od osobnej probówki. Tak pozyskaną frakcję rozpuszczano w wodzie, mrożono i liofilizowano. Po liofilizacji do suchego peptydu dodawano rozcieńczony roztwór kwasu octowego w wodzie i powtórnie przeprowadzano liofilizację. Proces ten powtarzano trzykrotnie.

3) Oznaczanie zawartości przeciwjonów

Przed przystąpieniem do analiz przygotowałem trzy naważki soli: chlorku sodu (NaCl), octanu sodu (AcONa) oraz trifluorooctanu sodu (TFANa) tak aby stężenie roztworu wyjściowego wyniosło 200 µg/ml. Z roztworów tych przygotowałem serię roztworów o różnych rozcieńczeniach (0,5; 1,0; 10; 20; 30; 40; 50; 75; 100; 125; 150; 175 µg/ml), które następnie posłużyły do przygotowania krzywych kalibracyjnych. Analizy zawartości przeciwjonów wykonałem przy użyciu chromatografu jonowego Dionex-ICS 5000⁺ (Thermo Fisher Scientific).

Parametry analizy chromatograficznej:

Kolumna: Dionex Ion Pack™ AS22 4×250 (Thermo Fisher Scientific)

Supresor: ASRS 300 4mm, natężenie prądu 31 mA

Faza ruchoma: 4,5 mM węglan sodu 1,4 mM wodorowęglan sodu

Przepływ eluentu: 1,2 ml/min

Objętość analizowanej próbki: 20 µl

Temperatura celi pomiarowej: 35°C

Temperatura kolumny: 30°C

Do oznaczenia zawartości przeciwjonów przygotowałem po trzy naważki badanych peptydów tak, aby stężenia badanych roztworów wynosiły 500 µg/ml. Dla każdego z badanych związków wykonano analizy zawartości przeciwjonów. Zawartość przeciwjonów odczytano z wcześniej przygotowanych krzywych kalibracyjnych. Każdą analizę wykonano w trzech powtórzeniach. Walidacja metody przeprowadzona została zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Rady Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ICH) [241].

1.7. Oznaczenie zawartości peptydu

Peptydy otrzymane metodą SPPS po liofilizacji mogą zawierać nieokreśloną ilość wody oraz przeciwjonów, które mogą się wahać między od 10 do aż 70% masy próbki. Bardziej hydrofilowe związki ogólnie zawierają więcej wody i soli w porównaniu do tych hydrofobowych. W związku z powyższym trudno jest ocenić rzeczywiste stężenie peptydu w oparciu o zmierzoną masę zliofilizowanej próbki.

Jednakże, jeśli peptyd posiada w sekwencji reszty aminokwasów zawierających ugrupowania chromoforowe takie jak tryptofan (W) lub tyrozyna (Y), stężenie peptydu można określić na podstawie molowego współczynnika absorpcji tych reszt. Współczynnik ten jest wartością stałą dla tych aminokwasów i przy długości fali 280 nm, drodze optycznej wynoszącej 1 cm i obojętnego roztworu wynosi:

Dla Tryptofanu: 5560 AU/mmol/ml

Dla Tyrozy: 1200 AU/mmol/ml

Współczynnik ten ma charakter addytywny, w związku z powyższym wartość tego współczynnika dla danego peptydu zależy od rodzaju oraz liczby reszt chromoforowych w sekwencji [242]. Obliczenia wykonałem wg wzoru:

$$C \text{ [mg/ml]} = \frac{Abs \times R \times M_w}{[(W \times 5560) + (Y \times 1200)]}, \text{ gdzie:}$$

Abs – wartość absorbancji

R – rozcieńczenie

M_w – masa cząsteczkowa

W – ilość reszt tryptofanu

Y – ilość reszt tyrozyny

1.8. Ocena aktywności badanych związków wobec szczepów *S. aureus*

Wszystkie szczepy wykorzystywane w badaniach przechowywane były w probówkach z podłożem krioprotekcyjnym na szklanych kulkach Roti-Store (Carl Roth GmbH) w temperaturach -20 lub -80°C. Przed przystąpieniem do prac eksperymentalnych, kulki szklane przenosiłem były do probówek z płynną pożywką MH, które inkubowane były przez 24 godziny w 37°C z wytrząsaniem 120 rpm. Z płynnych zawiesin następnie przygotowywałem posiewy redukcyjne na stałym podłożu MH Agar, które po 24 godzinach inkubacji w 37°C i uzyskaniu odpowiedniego wzrostu kolonii przenoszone były do lodówki. W tych warunkach, w temperaturze 7°C szczepy na stałym podłożu agarowym były przechowywane nie dłużej niż 1 miesiąc i służyły do przygotowywania zawiesin badanych. Gęstość hodowli określałem spektrofotometrycznie przy użyciu czytnika Multiskan™ GO przy długości fali 600 nm.

Badania mikrobiologiczne przeprowadzałem w warunkach aseptycznych, w komorze bezpieczeństwa typu II (Alpina) z laminarnym przepływem powietrza. Ponadto, przed przystąpieniem do pracy powierzchnię roboczą dezynfekowałem przy użyciu roztworu na bazie alkoholu etylowego Line-Antybakteria 70 oraz wbudowanej lampy UV (20 min)

Wszystkie niejałowe jednorazowe materiały zużywalne oraz roztwory używane w badaniach mikrobiologicznych sterylizowałem w autoklawie w 121°C przez 15 minut, pod ciśnieniem 1 atm. Pożywki płynne jak i agarowe były sterylizowałem w autoklawie mikrofalowym. Natomiast roztwory związków wrażliwych na działanie wysokiej temperatury sterylizowałem przy użyciu filtrów strzykawkowych o średnicy porów równej 0,20 µm.

1) Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego wzrost

Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków wykonałem przy użyciu metody mikrorozcieńczeń w bulionie na 96-dółkowych płytkach polistyrenowych zgodnie z zaleceniami CLSI [168]. W tym celu przygotowywałem serie rozcieńczeń badanych związków (0,5-256 µg/ml)

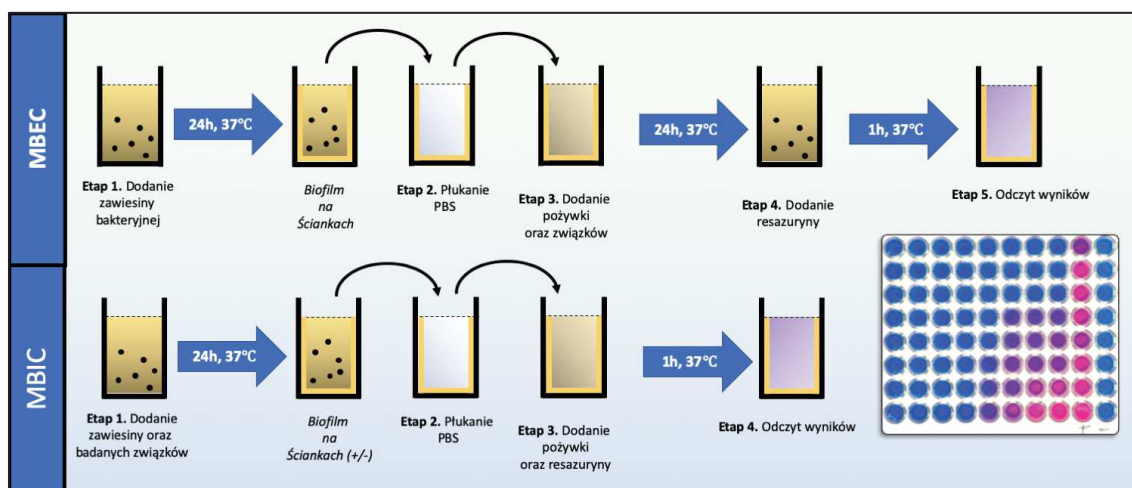
w pożywce MH o objętości 50 μ l. W przypadku oznaczania wrażliwości wobec daptomycyny podłoże płynne suplementowane było CaCl_2 , tak aby ostateczne stężenie jonów Ca^{2+} wynosiło 50 $\mu\text{g/ml}$ [243], [244]. Następnie do tak przygotowanych płytek dodawałem zawiesiny drobnoustrojów, aby wartość końcowa ich zagęszczenia wynosiła 5×10^5 CFU/ml (Rycina 5, dział 4.1 s. 37). Następnie płytki były inkubowane w 37°C przez 18 godzin. Po tym czasie dokonywałem wizualnego odczytu wyników. Za stężenie MIC określałem takie, przy którym nie obserwowany był wzrost drobnoustrojów. Wszystkie eksperymenty były przeprowadzone co najmniej w 3 powtórzeniach i obejmowały kontrolę wzrostu (dodatnią) oraz kontrolę jałowości (ujemną).

2) Wyznaczanie minimalnego stężenia eliminującego biofilm

Badania aktywności wobec biofilmu przeprowadziłem na 96-dolkowych płytkach polistyrenowych o płaskim dnie z użyciem resazuryny jako znacznika żywotności komórek (Rycina 17) [245]. W tym celu, płytki te uzupełniałem zawiesinami drobnoustrojów w MH o objętości 100 μ l i zagęszczeniu $0,5 \times 10^7$ CFU/ml. Płytki te następnie były inkubowane przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie dołki płytek były przepłukiwałem trzykrotnie przy użyciu PBS celem usunięcia wolnopływających, niezwiązanych z biofilmem komórek. Do tak przygotowanych płytek dodawałem związki w gradiencie stężeń (0,5-256 $\mu\text{g/ml}$), które następnie inkubowane były przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie wszystkie dołki uzupełnione zostały 20 μ l roztworu resazuryny o stężeniu 4 mg/ml. Płytki następnie inkubowane były przez godzinę w 37°C. Po tym czasie dokonywałem odczytu wyników. Za minimalne stężenie eliminujące biofilm (MBEC) przyjmowałem takie przy którym nie obserwowano zmiany barwy (redukcji) resazuryny ($10\% \pm 0.5\%$) w porównaniu do kontroli dodatniej (100%) oraz ujemnej (0%). Oznaczenia te wykonałem przy zastosowaniu czytnika mikropłytek Multiskan™ GO przy długości fali 570 nm.

3) Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego rozwój biofilmu

Badania zdolności badanych związków do hamowania rozwoju biofilmu przeprowadziłem na 96-dolkowych płytkach polistyrenowych o płaskim dnie z użyciem resazuryny jako znacznika żywotności komórek (Rycina 17). W tym celu, na płytkach przygotowywałem serie rozcieńczeń badanych związków (1-512 $\mu\text{g/ml}$) w objętości 50 μl . Do tak przygotowanych płytek dodawałem zawiesiny drobnoustrojów w płynnym podłożu MH o objętości 50 μl , tak aby ostateczne ich zagęszczenie wynosiło $0,5 \times 10^7$ CFU/ml. Płytki te następnie były inkubowane przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie dołki płytek były przepłukiwane trzykrotnie przy użyciu PBS. Do tak przygotowanych płytek dodana została świeża pożywka oraz 20 μl roztworu resazuryny o stężeniu 4 mg/ml. Płytki wówczas inkubowane były przez godzinę w 37°C. Po tym czasie dokonywano odczytu wyników. Za minimalne stężenie hamujące rozwój biofilmu (MBIC) przyjmowałem takie przy którym nie obserwowano zmiany barwy (redukcji) resazuryny ($10\% \pm 0.5\%$) w porównaniu do kontroli dodatniej (100%) oraz ujemnej (0%). Oznaczenia te wykonałem na czytniku mikropłytek Multiskan™ GO przy długości fali 570 nm.



Rycina 17. Schemat przedstawiający oznaczenie MBEC oraz MBIC

1.9. Dodatkowe badania mikrobiologiczne

Dla peptydów charakteryzujących się najlepszymi właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi wykonałem dodatkowe badania mające na celu potwierdzić ich potencjał przeciwegronkowcowy. Badania te zrealizowałem na modelowych szczepach: *S. aureus* ATCC 25923 oraz *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA).

1) Badanie zjawiska narastania oporności

W celu oceny zdolności szczepów *S. aureus* do rozwoju oporności wobec wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych poddałem je wielokrotnemu pasażowaniu w pożywkę MH suplementowanej badanymi związkami w stężeniu równym połowie MIC. Szczepy te inkubowano przez 24 godziny w 37°C z wytrząsaniem 120 rpm.

Po każdym pasażu (n=10), próbówki były wirowane, osady bakteryjne następnie były przemywane roztworem PBS i zaszczepiane do kolejnej próbówki z pożywką płynną i badanym związkiem. Pozostała zawiesina była wykorzystana do wykonywania oznaczeń wrażliwości wobec badanych peptydów, zgodnie z wcześniej opisanym protokołem (rozdz. 1.8.1).

2) Ocena depolaryzacji błon

Pomiary depolaryzacji błony cytoplazmatycznej wykonałem przy użyciu odczynnika fluorescencyjnego DiSC₃(5) [246], [247]. Związek ten wykazuje silne powinowactwo do błony bakteryjnej i w postaci związanej jego fluorescencja jest wygaszona. Jednakże, gdy dochodzi do depolaryzacji błony, odczynnik ten jest uwalniany do roztworu. Wówczas jego fluorescencja może być mierzona. Szczepy *S. aureus* ATCC 25923 oraz *S. aureus* ATCC 33591 inkubowano w 37°C z wytrząsaniem 120 rpm aż do momentu wejścia w logarytmiczną fazę wzrostu (3-4 godziny). Następnie próbówki z zawiesinami bakteryjnymi odwirowano (3500 rpm, 7 min) i przemywano 5 mM buforem HEPES (pH 7,2) zawierającym

20 mM glukozy. Następnie przygotowywano zawiesiny bakteryjne w roztworze zawierającym 5 mM bufor HEPES (z dodatkiem 20 mM glukozy, 100 mM KCl, pH 7,2), tak aby wartość absorbancji wynosiła 0,05 (dł. fali 600 nm). Zmiany fluorescencji spowodowane załamaniem potencjału błony cytoplazmatycznej i uwolnieniem DiSC₃(5) do roztworu monitorowano w sposób ciągły w temperaturze pokojowej przy użyciu spektrofluorymetru Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific) przy długości fali wzbudzenia 622 nm i długości fali emisji 670 nm. Gdy wychwyt barwnika był maksymalny, na co wskazuje ustabilizowanie wartości fluorescencji z powodu gaszenia nagromadzonego barwnika we wnętrzu błony, do zawiesin bakteryjnych dodano badane peptydy o stężeniu $2 \times \text{MIC}$. Uzyskane wyniki całkowitego załamania potencjału błonowego dla *S. aureus* zestawilem ze związkiem wzorcowym – melityną (64 µg/ml). Wszystkie pomiary powtórzono dwukrotnie, tak aby zapewnić powtarzalność.

1.10. Wyznaczanie cytotoksyczności badanych związków

1) Ocena toksyczności wobec linii komórkowej keratynocytów ludzkich

Badanie to wykonane zostały przez dr n. med. Sylwię Bartoszewską z Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej na linii komórkowej keratynocytów ludzkich HaCaT (ATCC), przy użyciu testu MTT, zgodnie z opisanym wcześniej protokołem [248], [249]. Test ten opiera się na kolorymetrycznej ocenie aktywności metabolicznej komórek, których enzymy mitochondrialne redukują sole tetrazolowe (MTT) do barwnego formazanu. Ilość zredukowanego odczynnika jest proporcjonalna do liczby żywych (aktywnych metabolicznie) komórek.

W tym celu, przed wykonaniem oznaczeń przygotowano hodowlę adherentną w pożywce DMEM suplementowanej penicyliną (100 j./ml), streptomycyną (100 µg/ml), FBS (10%) oraz 2mM L-glutaminą, którą następnie inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂.

Następnie, po uzyskaniu odpowiedniej konfluencji (wzrostu) hodowli, komórki oddzielono od powierzchni butelek hodowlanych przy użyciu trypsyny i przeniesiono do 96-dołkowych płytek mikrotitracyjnych w ilości 500 komórek/dołek. Przygotowane w ten sposób płytki hodowano przez 24 godziny w 37°C w atmosferze 5% CO₂.

W kolejnym etapie do dołków płytek dodano badane związki w gradiencie stężeń (0,5 – 500 µg/ml). Po 24 godzinach inkubacji w tych samych warunkach, do dołków dodano roztwór odczynnika MTT w pożywce, tak aby ostateczne jego stężenie wynosiło 0,5 mg/ml. Płytki kolejny raz inkubowano przez 4 godziny w 37°C, następnie całą pożywkę odessano i dodano DMSO w celu rozpuszczenia produktu formazanu. W końcowym etapie doświadczenia oznaczono absorbancję pozostałych roztworów przy długości fali 570 nm (maksimum absorpcji dla medium) i 630 nm (maksimum absorpcji formazanu). Dla każdego stężenia wykonano po sześć powtórzeń. Na podstawie otrzymanych wyników przy użyciu oprogramowania Graphit 7 wyznaczono

wartość IC_{50} . Jest to takie stężenie peptydu, które hamuje wzrost 50% komórek poddawanych działaniu związków.

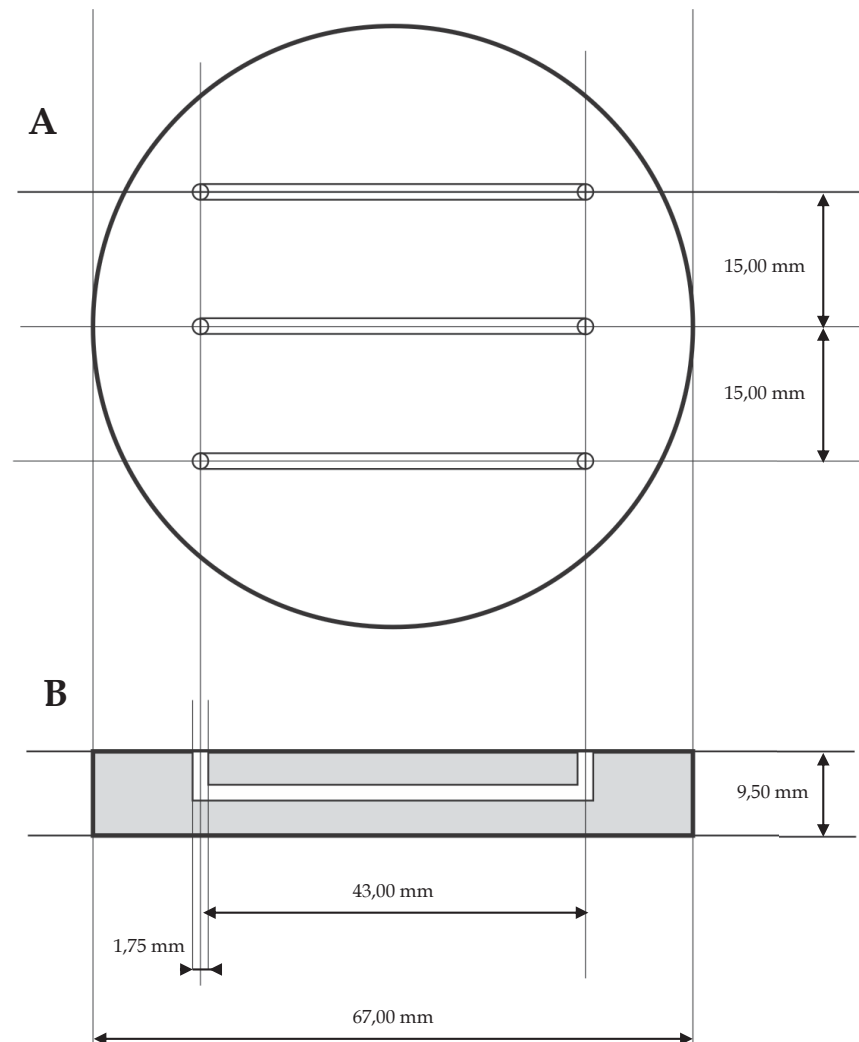
2) Ocena aktywności hemolitycznej

Oznaczenie aktywności hemolitycznej wykonałem wobec świeżo pobranych ludzkich erytrocytów (nr zgody komisji bioetycznej NKBBN/264/2019), zgodnie z wcześniej opisaną metodyką [250], [251]. Test ten opiera się na spektrofotometrycznym oznaczeniu uwolnionej hemoglobiny, co odpowiada aktywności hemolitycznej badanych związków. W tym celu krew pełną pobraną na antykoagulant (EDTA) zwirowałem ($800\times g$, 10 min), zlałem osocze, a do pozostałych krwinek czerwonych dodano taką samą objętość jałowego roztworu PBS i powtórnie zwirowałem. Czynność tę powtarzałem trzykrotnie celem uzyskania czystej zawiesiny krwinek czerwonych.

W kolejnym etapie na 96-dółkowej płytce mikrotitracyjnej V-kształtnej wykonałem serię rozcieńczeń badanych związków w PBS ($1-512\ \mu g/ml$). Do tak przygotowanych płytek dodałem roztwór krwinek czerwonych w PBS, tak aby ostateczna objętość w każdym z dołków wynosiła $100\ \mu l$, zaś stężenie erytrocytów wynosiło 4% (v/v). Płytki następnie inkubowano przez 60 min w $37^{\circ}C$. Po tym czasie płytki wirowano w wirówce uniwersalnej Sorval ST16 z odpowiednią przystawką oraz chłodzeniem ($800\times g$, 10 min, $4^{\circ}C$). Po odwirowaniu supernatant z płytek przenieśliem do nowych płytek, a ilość uwolnionej hemoglobiny zmierzyłem przy użyciu czytnika mikropłytek Multiskan™ GO przy długości fali 540 nm. Wyniki opracowałem w oparciu o kontrolę dodatnią (100% hemolizy), która zawierała 1% roztwór Triton-X 100 oraz kontrolę ujemną (0% hemolizy), która zawierała tylko PBS. Wszystkie eksperymenty wykonałem w trzech powtórzeniach.

1.11. Układy przepływowe z poli(dimetylosiloksanu)

Układy z PDMS przygotowałem poprzez zmieszanie oraz utwardzenie dwuskładnikowego zestawu Sylgard 184, zgodnie z zaleceniami producenta. Baza oraz roztwór utwardzający zmieszałem w stosunku 10:1 w stosunku wagowym oraz wylałem na wcześniej odtłuszczonej metanolem i osuszonej szklanej szalkę Petriego. Następnie na szalki te umieszczano stelaże, w których umocowane były filamenty z ABS, w taki sposób, aby po zestaleniu PDMS wypełniały przestrzeń kanałów badawczych (kształt oraz wymiary układów przedstawione są na Rycinie 12). Objętość jednego kanału wynosiła 100 μl .



Rycina 18. Schemat przygotowanych układów przepływowych z PDMS.
A - rzut czołowy B - rzut boczny

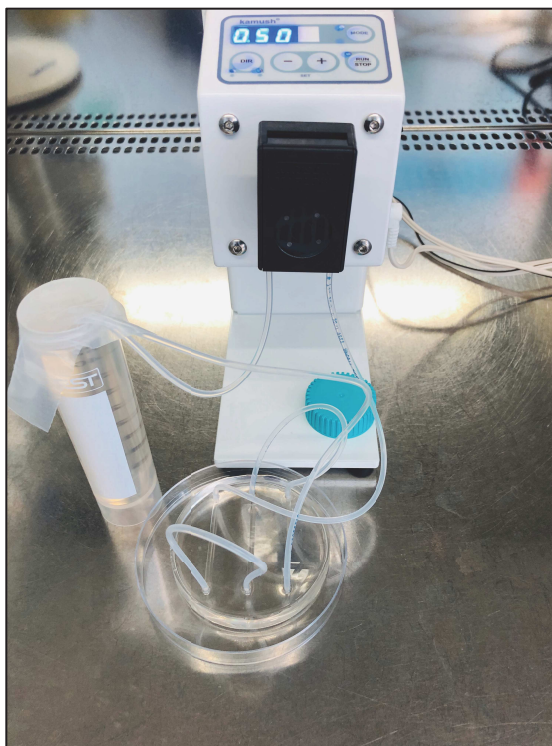
Następnie, układy te były wyjmowane i umieszczane w zlewkach z acetonem i przenoszone do łaźni ultradźwiękowej celem wypłukania i wymycia filamentów z ABS, które w przeciwieństwie do PDMS są w nim rozpuszczalne. W kolejnym etapie, układy przenosiłem do zlewek z metanolem i ponownie umieszczane w łaźni ultradźwiękowej (5 min). Po osuszeniu wszystkie płytki z PDMS pakowałem w rękaw sterylizacyjny i sterylizowałem w autoklawie przez 15 minut w 121°C przy ciśnieniu 1 atm. Tak przygotowane układy służyły do dalszych prac badawczych (Rycina 19).



Rycina 19. Układ przepływowy wykorzystywany w pracach badawczych

1.12. Ocena aktywności peptydów przeciwdrobnoustrojowych wobec biofilmu gronkowcowego w warunkach przepływowych

Badanie aktywności wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych wobec biofilmu formowanego w warunkach przepływowych zrealizowałem dla związków o najwyższym potencjale przeciwgronkowcowym przy użyciu dwóch modelowych szczepów: *S. aureus* ATCC 25923 oraz *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA). Formowanie biofilmu wewnątrz płytek z PDMS następowało przy użyciu trzech pomp perystaltycznych, wcześniej wysterylizowanych węży silikonowych Tygon®3350 (2,4×0,8×0,8 mm) o długościach 30 oraz 50 cm. Zawiesiny bakteryjne przygotowywane były w sterylnych probówkach o objętości 50 ml, które umieszczano w termobloku w temperaturze 37°C. Węże podłączane były do układów z PDMS poprzez wymrożenie w ciekłym azocie. Zmrożone węże kurczyły się i stawały się sztywne, co ułatwiało ich podłączenie. Natomiast uzyskując temperaturę pokojową rozszerzały się, tym samym zachowując szczelność połączenia. Zdjęcie przedstawiające badany układ znajduje się na Rycinie 20.



Rycina 20. Zdjęcie przedstawiające podłączony układ z PDMS do pompy perystaltycznej.

Przed rozpoczęciem prac badawczych wszystkie układy oceniałem pod względem szczelności oraz sterylizowałem przy użyciu płynu Line-Antybakteria 70 (10 min, szybkość przepływu 1ml/min). Następnie układy przepłukiwałem przy użyciu jałowego roztworu PBS (10 min, szybkość przepływu 0,1 ml/min). Po wykonaniu wszystkich tych czynności, układy przygotowywałem do realizacji dalszych prac badawczych. Formowanie biofilmu wewnątrz kanału podzielone zostało na następujące etapy:

1) Adhezja – na tym etapie zawiesiny *S. aureus* o gęstości $0,5 \times 10^7$ CFU/ml były przepuszczane przez kanał (4 godziny, 37°C, szybkość przepływu 0,1 ml/min).

2) Płukanie – wcześniej użyte dreny wymieniano na nowe, sterylne, a wewnątrz kanału płukano jałowym roztworem PBS (10 min, szybkość przepływu 0,1 ml/min).

3) Wzrost biofilmu – po przepłukaniu wnętrza kanałów, węże silikonowe były umieszczane w probówkach z pożywką MH, która tłoczona była aż do końca badania (24 godziny, 37°C, szybkość przepływu 0,1 ml/min).

Wszystkie analizy uwzględniały kontrolę wzrostu oraz kontrolę jałowości.

1) **Minimalne stężenia eliminującego biofilm w przepływie**

Pierwszym aspektem weryfikowanym w ramach prac eksperymentalnych w przepływie było zbadanie wrażliwości biofilmu uformowanego w warunkach przepływowych wobec badanych związków. Celem tych prac było wskazanie różnic pomiędzy aktywnością peptydów przeciwdrobnoustrojowych wobec biofilmu uformowanego w warunkach stacjonarnych oraz przepływowych. W pierwszym etapie formowany był biofilm wewnątrz kanału (zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 1.11). Następnie wewnątrz kanału przepłukiwałem jałowym roztworem PBS (10 min, 0,1 ml/min)

celem wypłukania niezwiązanych z biofilmem komórek. W kolejnym etapie podłączałem pożywkę suplementowaną badanym związkiem i pompowałem przez kanał przez (24 godziny, 37°C, 0,1 ml/min). Po tym czasie ponownie wewnątrz kanału przepłukiwałem jałowym roztworem PBS (10 min, 0,1 ml/min) a następnie podłączałem probówkę z dodatkiem resazuryny, w stężeniu takim jak w przypadku oznaczenia w warunkach stacjonarnych (rozdz. 1.8.2. oraz 1.8.3), która pompowana była w obiegu zamkniętym (1 godzina 37°C, 0,1 ml/min). Za minimalne stężenie eliminujące biofilm w przepływie (MBEC_f) przyjmowałem najniższe stężenie związku, przy którym nie obserwowałem zmiany barwy (redukcji) resazuryny (10% ± 0.5%) w porównaniu do kontroli dodatniej (100%) oraz ujemnej (0%). Oznaczenia te wykonałem na czytniku mikropłytek Multiskan™ GO przy długości fali 570 nm.

2) Badanie zjawiska narastania oporności w przepływowym modelu badawczym

Kolejnym aspektem ocenianym w ramach badań w niniejszej pracy doktorskiej była weryfikacja zjawiska narastania oporności w przepływie. Celem tego badania była przede wszystkim ocena wpływu długotrwałej ekspozycji biofilmu gronkowcowego na badane peptydy, nie tylko pod kątem wrażliwości na te same związki, ale również antybiotyki konwencjonalne. W pierwszym etapie formowany był biofilm wewnątrz kanału (zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 1.11). Po tym czasie wewnątrz kanału przepłukiwałem jałowym roztworem PBS (10 min, 0,1 ml/min) celem wypłukania niezwiązanych z biofilmem komórek. Następnie podłączałem pożywkę suplementowaną badanym związkiem w stężeniu równym połowie wartości MBEC, którą pompowałem przez kanał odpowiednio przez 24, 48 i 72 godziny (szybkość przepływu 0,1 ml/min). Po każdym etapie ekspozycji wewnątrz kanału przepłukiwałem jałowym roztworem PBS (10 min, 0,1 ml/min) celem wyeliminowania pozostałości związku oraz niezwiązanych z biofilmem komórek. Następnie zawartość kanału wypłukiwałem przy użyciu 10ml PBS w obiegu zamkniętym pod dużym ciśnieniem (10 min, 15 ml/min) celem oderwania biofilmu.

Skuteczność tej procedury potwierdziłem barwieniem fioletem krystalicznym oraz wizualizacją mikroskopową. Uzyskaną zawiesinę następnie posiewałem na stałe podłoże agarowe MH, które inkubowano przez 24 godziny w 37°C. W ten sposób pozyskiwałem klony szczepów *S. aureus*, których biofilm traktowany był badaniem peptydem przez 24, 48 oraz 72 godziny. Na tych szczepach następnie wykonywałem oznaczenia wrażliwości na badane związki oraz antybiotyki konwencjonalne zgodnie z procedurą opisaną w dziale 1.8.1.

3) **Badanie wpływu peptydów przeciwdrobnoustrojowych na formowanie się biofilmu w warunkach przepływowych**

Celem tych prac było wykazanie czy inkorporacja peptydów do wnętrza kanałów z PDMS może mieć wpływ na tworzenie się biofilmu *S. aureus*. Procedurę tę wykonałem przy użyciu powlekania polidopaminą (pDA) zgodnie z wcześniej opisaną metodyką, z drobnymi modyfikacjami wynikającymi z przepływowego modelu badawczego [252]. W pierwszym etapie przygotowywałem powłokę pDA poprzez przepłukiwanie wnętrza kanałów roztworem chlorowodoru dopaminy (2mg/ml) w 10mM buforze bitynowym o pH 8,5 (18 godzin, 0,3 ml/min). Po tym czasie wnętrza kanałów przepłukiwałem jałowym roztworem wody demineralizowanej. W celu dalszej funkcjonalizacji, do układów podłączałem nowe, sterylne węże silikonowe, które umieściłem w probówkach z wodnymi roztworami badanych peptydów (100 µg/ml). Następnie roztwory te tłoczyłem przez kanały w układzie zamkniętym (6 godzin, 0,3 ml/min). Ocena związania peptydów wykonałem przy wykorzystaniu chromatografii cieczowej (RP-HPLC), poprzez porównanie zawartości badanych związków w roztworze przed i po inkorporacji. Sfunkcjonalizowane układy z PDMS służyły do dalszych badań. Formowanie biofilmu przebiegało zgodnie z procedurą opisaną w 1.11. Po 24 godzinach wnętrza kanału wypłukiwałem przy użyciu 10ml PBS w obiegu zamkniętym (10 min, 15 ml/min). Zawartość probówek rozcieńczałem od 10^{-1} do 10^{-8} . Z każdego rozcieńczenia pobierałem po 100 µl zawiesiny i posiewałem przy użyciu sterylnych jednorazowych głąszczek na podłoże agarowe MH celem oszacowania ilości komórek tworzących biofilm wewnątrz kanałów.

IV. OMÓWIENIE WYNIKÓW ORAZ DISKUSJA

1. Ocena wrażliwości szczepów klinicznych na antybiotyki i AMPs

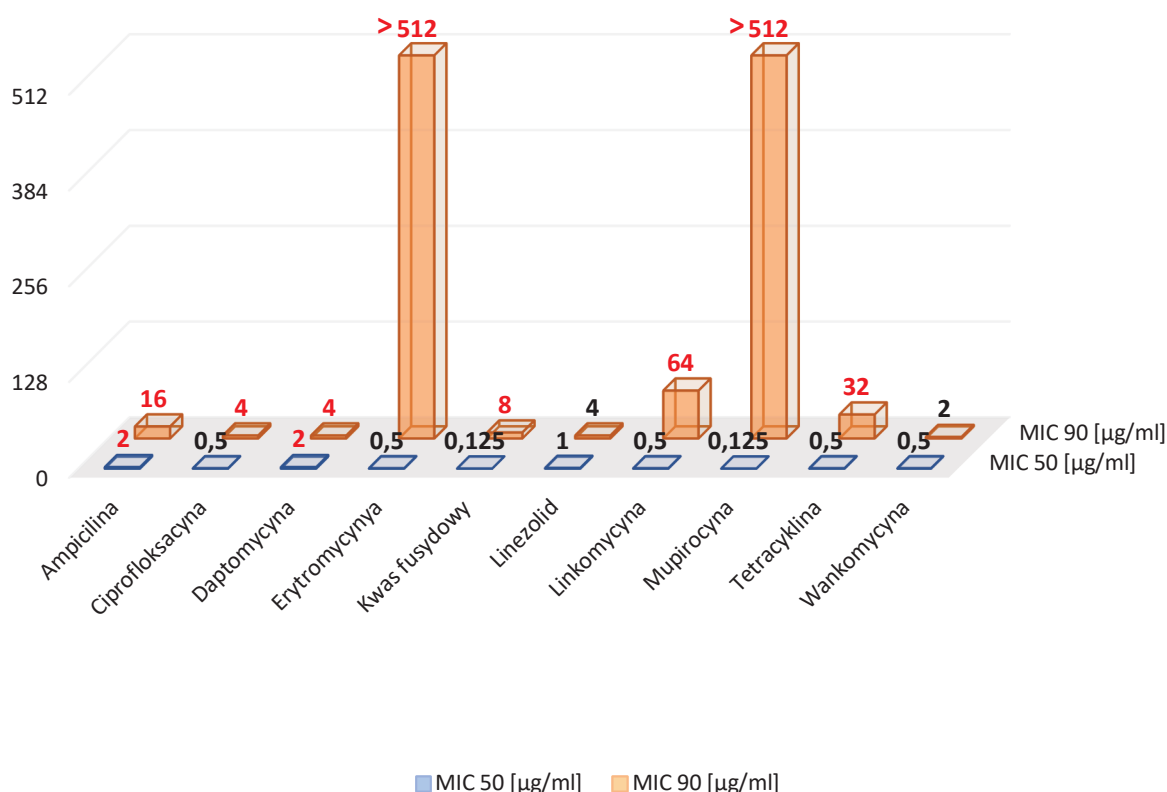
W pierwszym etapie zrealizowanych prac badawczych w ramach współpracy z Kliniką Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego realizowane były badania mające na celu scharakteryzowanie szczepów klinicznych gronkowca złocistego pod kątem wrażliwości na antybiotyki konwencjonalne oraz peptydy przeciwdrobnoustrojowe. W ramach wspólnego przedsięwzięcia udało się wyizolować 148 szczepów od pacjentów z AZS oraz 18 od grupy kontrolnej (Charakterystyka szczepów w Tabeli 4) [43]. Celem nadrzędnym tych prac było wykazanie czy aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych zależy od oporności na antybiotyki konwencjonalne.

Tabela 4. Charakterystyka szczepów klinicznych *S. aureus*

	Pacjenci	Grupa Kontrolna
Liczba	100	50
Obecność <i>S. aureus</i> (%)		
Skóra	75	4
Przedśionalek nosa	73	14
MRSA	11	0

Z 200 wymazów pobranych od pacjentów z AZS w 148 (74%) stwierdzono obecność *S. aureus*. Wyniki te korelują z danymi literaturowymi, które wskazują, iż ok. 80% pacjentów z AZS wykazuje kolonizację gronkowcem złocistym [44]. Natomiast spośród wszystkich wyizolowanych szczepów przy użyciu podłoża dwudzielnego chromID MRSA/*S. aureus* udało się zidentyfikować 11 szczepów MRSA. Wobec wszystkich wyizolowanych szczepów wykonano oznaczenia MIC dla antybiotyków konwencjonalnych takich jak ampicylina, cyprofloksacyna, daptomycyna, erytromycyna, kwas fusydowy, linezolid, likomycyna, mupirocyna, tetracyklina oraz wankomycyna. Peptydy

przeciwdrobnoustrojowe, które ujęte zostały w badaniach to: CAMEL, Citropina 1.1, LL-37 oraz Temporyna A. Wyniki oznaczeń MIC₅₀ (minimalnego stężenia hamującego wzrost 50% szczepów) oraz MIC₉₀ (minimalnego stężenia hamującego wzrost 90% szczepów) przedstawione zostały na Rycinach 8 oraz 9.

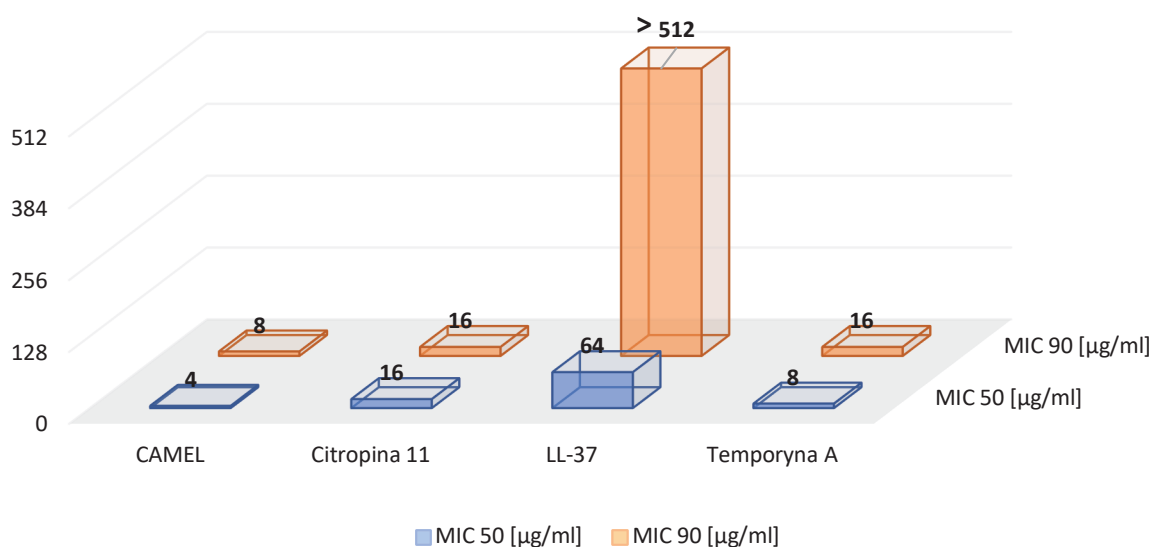


Rycina 21. Wartości MIC₅₀ oraz MIC₉₀ dla antybiotyków konwencjonalnych.

*Na czerwono zaznaczone zostały wartości MIC, które wg EUCAST definiują szczep *S. aureus* jako oporny

Oznaczenia minimalnego stężenia hamującego wzrost wskazały istotnie, że dla większości antybiotyków konwencjonalnych spotykane były szczepy odporne. Warto podkreślić, że zarówno dla ampicyliny jak i daptomycyny ilość ta stanowiła więcej niż 50% szczepów (Rycina 15). Porównując MIC₉₀ z wartością MIC₅₀ dla antybiotyków konwencjonalnych widać wyraźnie, że są one znacząco wyższe, a w przypadku erytromycyny czy mupirocyny ponad 1000-krotnie. W przypadku AMPs, takie różnice nie są obserwowalne. Tylko w przypadku Temporyny A wartość MIC₉₀ była 2 razy wyższa, natomiast dla LL-37

obserwowane były szczepy niewrażliwe na żadne z użytych stężeń w doświadczeniach. Dla drugiego z peptydów jest to typowe zjawisko, wynikające z naturalnej oporności niektórych gronkowców wobec endogennych peptydów. Wiele prac wskazuje, iż produkowane przez gronkowce enzymy proteolityczne takie jak metaloproteinaza (aureolizyna) oraz proteaza V8 prowadzą do degradacji LL-37 [253], [254]. Z kolei staphylokinaza lub inaczej fibrynolizyna, wiąże się specyficznie z LL-37, co wewnątrz ustroju prowadzi



Rycina 22. Wartości MIC₅₀ oraz MIC₉₀ dla AMPs.

do aktywacji plazminogenu i fibrynolizy, zaś samo wiązanie inaktywuje przeciwdrobnoustrojowe działanie peptydu [255], [256]. Warto również wspomnieć, że w przypadku biofilmów tworzonych przez *S. aureus* występują mechanizmy obronne oddziałujące z LL-37. Przykładem jest adhezyna wewnątrzkomórkowa PIA, której wydzielanie wpływa na wytwarzanie macierzy pozakomórkowej i jest związana ze zwiększoną opornością gronkowców na endogenne peptydy [257]–[259]. Z tego względu LL-37 nie jest związkiem z wyboru w przypadku opracowywania nowych terapii przeciwegronkowcowych. Tym nie mniej, peptyd ten stanowi doskonałą bazę do opracowywania nowych, bardziej skutecznych związków powstałych na bazie krótszych fragmentów, koniugatów lub analogów zawierających D-aminokwasy w sekwencji. Dzięki takiemu podejściu substancje te mogą nie

być podatne na działanie proteolityczne enzymów bakteryjnych lub wykazywać lepsze działanie przeciwdrobnoustrojowe [260]–[262].

2. Przeciwgronkowcowa aktywność retro analogów

Dotychczas zdefiniowano wiele podejść pozwalających na projektowanie i otrzymywanie peptydów o poprawionych właściwościach biologicznych. Wśród nich można wymienić takie jak cyklizacja, delecje i substytucje aminokwasów, dimeryzacja oraz lipidacja [230], [263], [264]. Tym nie mniej, inną ścieżką pozwalającą na otrzymanie związków o poprawionej aktywności przeciwdrobnoustrojowej jest synteza retro analogów (o odwróconej sekwencji). Wiele danych literaturowych wskazuje, że podejście to skutkuje otrzymaniem peptydów o poprawionej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Przykładowo, Subbalakshmi i wsp. w badaniach nad aktywnością syntetycznych analogów peptydu SPF (najbardziej hydrofobowego fragmentu bydlęcej seminoplazminy) udowodnili, że związek o odwróconej sekwencji wykazywał porównywalną lub nawet wyższą aktywność wobec szczepów *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *S. aureus* [265]. Dodatkowo, pomimo wzrostu zdolności bakteriobójczych, aktywność hemolityczna pozostała na tym samym poziomie. Podobne zależności zaobserwowane zostały przez Gopala i wsp., którzy porównywali aktywność 6-aminokwasowego peptydu (WK) 3. W badaniach tego zespołu, retro analog wykazywał dwukrotnie wyższą aktywność przeciwko wszystkim badanym mikroorganizmom (bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne i grzyby) i tak samo jak we wcześniej wspomnianej pracy brak było zmian w aktywności hemolitycznej [266]. Niewątpliwie rezultaty tych prac stanowiły przyczynę do weryfikacji, czy analogi o odwróconej sekwencji takich AMPs jak Aureina 1.2, CAMEL, Citropina 1.1, Omiganan, Pexiganan oraz Temporyna A będą charakteryzować się poprawioną aktywnością przeciwgronkowcową. Dane literaturowe jak również wyniki poprzednich prac, potwierdzały wysoką aktywność tych związków, co dodatkowo przemawiało za koniecznością weryfikacji hipotezy badawczej [267], [268]. Oznaczenia MIC zrealizowane zostały tylko wobec referencyjnych szczepów *S. aureus*, w związku z tym, że miały one na celu jedynie weryfikację hipotezy, czy odwrócenie sekwencji

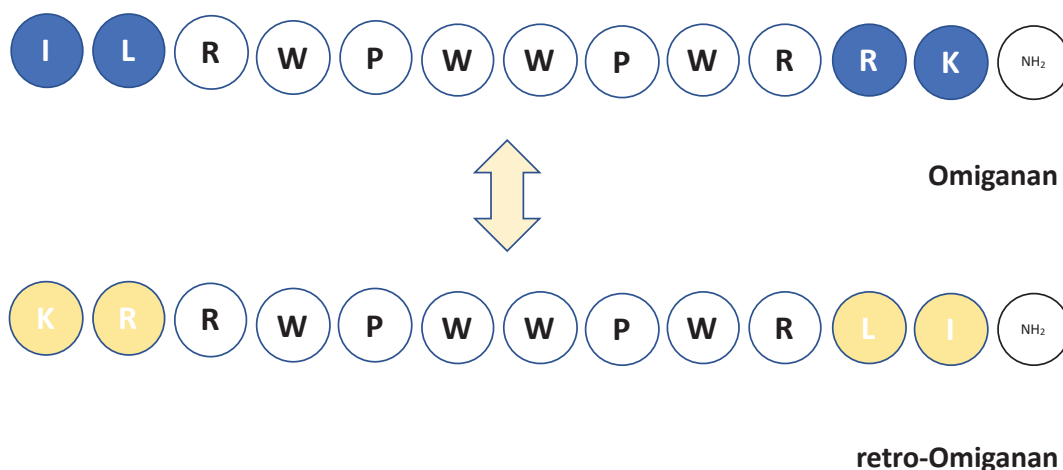
w AMPs może mieć wpływ na aktywność przeciwegronkowcową. Ze wszystkich przebadanych peptydów tylko retro analog Aureiny 1.2 nie wykazywał aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Natomiast najniższymi stężeniami MIC charakteryzowały się peptydy: CAMEL, Temporyna A oraz Pexiganan. Uzyskane wyniki pokrywają się z tymi spotykanymi w literaturze oraz wynikami wcześniejszych badań zrealizowanych na szczepach klinicznych [269]–[272]. Co istotne, dla wszystkich par peptyd-retro analog, tylko dla Omigananu zaobserwowano poprawę aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec badanych szczepów *S. aureus*. Dla pozostałych, skutkiem odwrócenia sekwencji było znaczne obniżenie aktywności przeciwegronkowcowej (Tabela 5).

Tabela 5. Wartości MIC peptydów oraz ich retro analogów wobec referencyjnych szczepów *S. aureus*.

Związek	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. aureus</i> ATCC 6538/P	<i>S. aureus</i> ATCC 9144	<i>S. aureus</i> ATCC 12598
Aureina 1.2	128	64	64	128	64
retro-Aureina 1.2	> 256	> 256	> 256	> 256	> 256
CAMEL	4	2	2	4	2
retro-CAMEL	128	16	16	64	64
Citropina 1.1	16	8	8	16	8
Retro-Citropina 1.1	64	32	32	64	32
Omiganan	<u>16</u>	<u>4</u>	<u>8</u>	<u>16</u>	<u>8</u>
retro-Omiganan	<u>8</u>	<u>4</u>	<u>8</u>	<u>8</u>	<u>8</u>
Pexiganan	8	2	4	8	8
retro-Pexiganan	128	8	32	64	64
Temporyna A	4	4	8	8	4
retro-Temporyna A	64	16	32	64	32

Warto podkreślić, iż wyniki tych analiz korespondują z innymi badaniami zrealizowanymi w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej. W pracy Neubauera i wsp. zbadano aktywność tych samych związków wobec szerokiego panelu drobnoustrojów obejmującego zarówno bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne oraz grzyby [238]. Wykazano, że retro-Omiganan charakteryzował się poprawioną aktywnością wobec nie tylko gronkowców, ale również szczepów Gram-ujemnych takich jak *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* oraz

grzybów z rodzaju *Candida*. Również dla tego związku zaobserwowano została wyższa aktywność hemolityczna, co nie miało miejsca w przypadku pozostałych retro-analogów. Dlatego też trudno jednoznacznie potwierdzić, czy odwrócenie sekwencji może skutkować pozyskaniem nowych, bardziej skutecznych AMPs i postuluje się by badania wstępne oparte były na obliczeniach obejmujących ocenę hydrofobowości. Odwrócenie sekwencji w przypadku Omigananu, w odróżnieniu do pozostałych analogów, skutkowało wzrostem hydrofobowości (Rycina 23). Ponadto to co charakteryzuje oba peptydy to konserwatywny fragment (RWPWWPWR) wewnątrz sekwencji aminokwasowej.



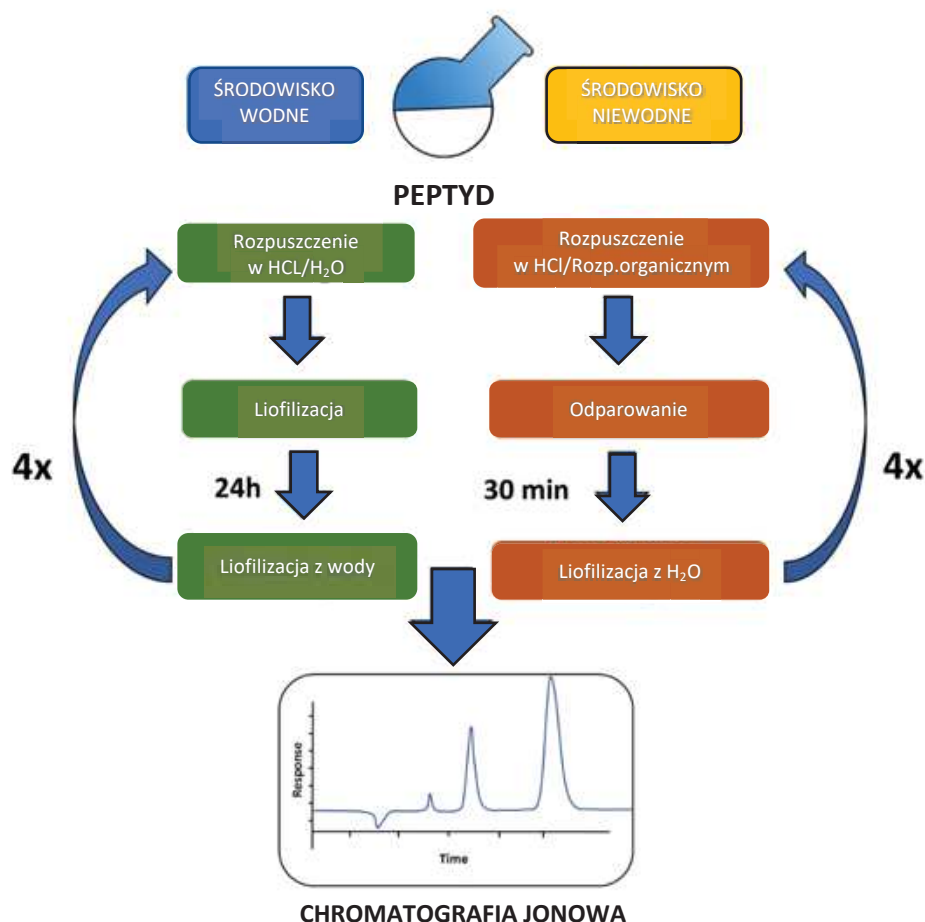
Rycina 23. Różnica zamiany sekwencji w przypadku Omigananu oraz retro-Omigananu.

Pomimo, iż żaden zespół badawczy nie przedsięwziął się zbadania takich zależności dla Omigananu, to jednak podobne badania były zrealizowane dla Indolicydyny (naturalnego AMPs, którego Omiganan jest analogiem). Przykładowo w pracy Nagpala i wsp. dla jej retro analogu zaobserwowano taką samą aktywność wobec *Salmonella typhimurium* [273]. Z drugiej strony w badaniach Ando i wsp. analog ten charakteryzowała wyższa aktywność wobec *Bacillus subtilis* oraz *E. coli* oraz niższa aktywność hemolityczna [274].

3. Wpływ przeciwjonów na aktywność przeciwegronkowcową peptydów

W przemyśle jak również w laboratoriach akademickich syntezę peptydów w większości prowadzi się na stałym nośniku polimerowym (SPPS), przy zastosowaniu chemii Fmoc. Podejście to związane jest z użyciem kwasu trifluorooctowego, który używany jest do odszczepienia peptydu z żywicy oraz jako składnik fazy ruchomej na etapie oczyszczania peptydu. W związku z tym produktem końcowym SPPS są sole trifluorooctanowe (TFA^-) [240]. Generalnie, aniony te oddziałują z kationowymi ugrupowaniami peptydowymi, takimi jak grupa aminowa (lizyna i N-koniec) oraz grupa guanidynowa (arginina, histydyna). Głównie na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych. Tym nie mniej, obecność TFA^- bezpośrednio związanego z cząsteczką peptydu lub w postaci niezwiązanej w liofilizacie może mieć wpływ na aktywność biologiczną związku. Wiele prac wskazuje na wysoką toksyczność TFA wobec komórek eukariotycznych, np. poprzez hamowanie ich proliferacji [275]. Ponadto TFA w nadmiarze może oddziaływać z cząsteczkami poprzez zmianę pH czy też konformacji peptydu [276]–[278]. Należy również wziąć pod uwagę wpływ tych anionów na wyniki analiz strukturalnych np. poprzez zakłócanie pasma amidowego w spektroskopii IR lub też wpływ na zmianę konformacji w eksperymentach dichroizmu kołowego (CD) [279]. Dlatego też wymiana przeciwjonów, w szczególności przy realizacji bardziej złożonych analiz fizykochemicznych oraz biologicznych powinna być brana pod uwagę [280]. Zazwyczaj, jony TFA^- wymieniane są na bardziej biozgodne, takie jak chlorki oraz octany, a w literaturze opisanych jest szereg procedur. Najpopularniejszym podejściem jest rozpuszczenie peptydu w wodnym roztworze kwasu chlorowodorowego (0.1 M HCl_{aq}) i dalsza liofilizacja [279]. Niekiedy również stosowane są żywice jonowymienne na etapie oczyszczania, stosowanie dodatku kwasu do fazy ruchomej, oczyszczanie peptydów na błonach dializacyjnych czy też deprotonowanie reszt aminokwasów zasadowych [281]. Jednakże, wszystkie te podejścia są czasochłonne i niekiedy wymagają użycia dużej ilości rozpuszczalników. Co nie jest zgodne z ideą zielonej chemii. W Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej opracowana została metoda wymiany jonów

TFA⁻ na jony chlorkowe z użyciem niewodnego środowiska rozpuszczalników organicznych (Schemat na Rycinie 24). Metoda ta z powodzeniem stosowana jest w różnych pracach realizowanych w Jednostce. W związku z tym również w wypadku tych prac badawczych wykorzystana została do otrzymania chlorowodorków peptydów przeciwdrobnoustrojowych.



Rycina 24. Schemat wymiany przeciwjonów w peptydach użytych w pracy [228].

W tej części prac doświadczalnych wykorzystano następujące peptydy: CAMEL, Citropina 1.1., LL-37, Pexiganan, Temporyna A, a oznaczenia MIC wykonano wobec 5 szczepów referencyjnych oraz 25 szczepów klinicznych. Wszystkie związki na początku otrzymane zostały jako sole trifluorooctanowe co potwierdzone zostało analizami oceny zawartości tych jonów przy użyciu chromatografii jonowej (IC). Poziom TFA⁻ wahał się między 150 a 320 µg na 1 mg badanej próbki i nie stwierdzono obecności innych anionów. Wymianę przeciwjonów na chlorkowe oraz octanowe przeprowadzono zgodnie

z wcześniej opisaną procedurą, a ich zawartość określona przy użyciu IC (Tabela 6 oraz 7). Zasadniczo, w przypadku wymiany na jony chlorkowe ich zawartość dla wszystkich badanych peptydów wynosiła >97%. Natomiast zawsze stwierdzana była niewielka ilość TFA⁻, których nie dało się wyeliminować mimo powtórzonych etapów wymiany i powtórnych liofilizacji. W przypadku wymiany na jony octanowe, zawartość tych jonów wynosiła dla większości związków >98%, z wyjątkiem peptydów CAMEL (96,47%) oraz Temporyna A (93,94%). Pozostałymi anionami były jony chlorkowe. Przypuszcza się, że nieznaczna ilość tych jonów związana jest z ich śladową zawartością w kolumnienkach z żywicą jonowymienną, które w tym wypadku są używane, aby pozbyć się jonów trifluorooctanowych.

Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej wskazują, że wszystkie z badanych związków hamują wzrost szczepów *S. aureus* użytych w tej części prac badawczych. Wyjątek stanowił peptyd LL-37, który nie był aktywny wobec większości badanych drobnoustrojów (Tabela 8). Jednakże poprzez uwzględnienie szczepów wrażliwych możliwa była ocena wpływu wymiany przeciwjonów na aktywność przeciwgronkowcową również dla tego peptydu. Dzięki uśrednieniu wartości MIC dla wszystkich związków udało się oszacować, które z badanych peptydów charakteryzują się najwyższą aktywnością oraz jaki jest wpływ wymiany przeciwjonów (Tabela 10). Co istotne wszystkie chlorki oraz octany wykazywały wyższy potencjał od wyjściowych trifluorooctanów. Natomiast aktywność przeciwgronkowcowa układu się zgodnie z szeregiem CAMEL>Temporyna A>Pexiganan>Citropina 1.1>LL-37. Tym nie mniej w wypadku tych badań, aby móc ocenić, który z badanych związków charakteryzował się najwyższym potencjałem średnie wartości MIC zestawiono wraz z wynikami oznaczeń cytotoksyczności wobec linii komórkowej HaCaT (Tabela 10). Wyliczony indeks selektywności, który stanowi stosunek IC₅₀ do MIC wskazuje, że związkiem o najlepszych parametrach był octan Pexigananu.

Tabela 6. Zawartość poszczególnych przeciwjonów w badanych peptydach po wymianie na jon chlorkowy.

CAMEL HCl			
	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	3,22	98,15	0,00
Zawartość [μmol/mg]	0,03	2,77	0,00
Zawartość [%]	1,02	98,98	0,00
Citropina 1.1 HCl			
	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	6,42	69,41	0,00
Zawartość [μmol/mg]	0,06	1,96	0,00
Zawartość [%]	2,82	97,18	0,00
LL-37 HCl			
	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	2,30	177,56	0,00
Zawartość [μmol/mg]	0,02	5,01	0,00
Zawartość [%]	0,40	99,60	0,00
Pexiganan HCl			
	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	5,06	114,09	0,00
Zawartość [μmol/mg]	0,09	3,22	0,00
Zawartość [%]	0,89	99,11	0,00
Temporyna A HCl			
	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	4,73	49,28	0,00
Zawartość [μmol/mg]	0,04	1,39	0,00
Zawartość [%]	2,92	97,08	0,00

Tabela 7. Zawartość poszczególnych przeciwjonów w badanych peptydach po wymianie na jon octanowy

CAMEL AcOH			
	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	0,00	3,22	146,62
Zawartość [μmol/mg]	0,00	0,09	2,48
Zawartość [%]	0,00	3,53	96,47
Citropina 1.1 AcOH			
	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	0,00	0,00	57,76
Zawartość [μmol/mg]	0,00	0,00	0,98
Zawartość [%]	0,00	0,00	100,00
LL-37 AcOH			
	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	0,00	0,00	157,52
Zawartość [μmol/mg]	0,00	0,00	2,67
Zawartość [%]	0,00	0,00	100,00
Pexiganan AcOH			
	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	0,00	2,52	282,43
Zawartość [μmol/mg]	0,00	0,70	4,78
Zawartość [%]	0,00	1,46	98,54
Temporyna A AcOH			
	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	0,00	2,47	63,80
Zawartość [μmol/mg]	0,00	0,07	1,08
Zawartość [%]	0,00	6,06	93,94

Tabela 8. Aktywność peptydów z różnymi przeciwnymi wobec referencyjnych i klinicznych szczepów *S. aureus*

		CAMEL			Citropina 1.1			LL-37		
		TFA ⁻	AcO ⁻	Cl ⁻	TFA ⁻	AcO ⁻	Cl ⁻	TFA ⁻	AcO ⁻	Cl ⁻
Szczepy referencyjne	ATCC 25923	8	8	2	32	16	16	>	>	>
	ATCC 6538	2	≤	≤	16	4	4	128	64	64
	ATCC 6538/P	4	1	1	16	8	8	>	>	>
	ATCC 9144	8	2	1	32	16	16	>	>	>
	ATCC 12598	4	2	1	16	8	8	>	>	>
Szczepy kliniczne	001N (MRSA)	4	2	2	16	16	16	>	>	>
	001S (MRSA)	4	4	2	16	16	16	>	>	>
	002N	4	4	≤	16	16	16	>	>	>
	002S	4	4	1	16	16	8	>	>	>
	004N (MRSA)	4	4	2	16	8	8	>	>	>
	005S	≤	≤	≤	2	2	2	2	2	4
	013S	≤	≤	≤	2	2	2	2	4	2
	015N (MRSA)	4	4	2	16	8	8	>	>	>
	017N (MRSA)	4	2	2	8	4	4	>	>	>
	017S (MRSA)	2	2	2	4	8	4	>	>	>
	024N (MRSA)	≤	≤	≤	2	2	2	2	4	2
	030N	4	4	4	16	16	16	>	>	>
	033N	4	4	4	16	8	16	>	>	>
	039N	4	4	4	16	8	16	>	>	>
	043SC (MRSA)	4	4	4	8	8	8	>	>	>
	045N	4	4	4	16	16	16	>	>	>
	048S	4	4	4	16	16	16	>	>	>
	051N (MRSA)	4	2	2	8	8	8	>	>	>
	051S	2	2	2	4	4	4	>	>	>
	053N	4	4	4	16	16	16	>	>	>
	060S	2	1	1	2	1	2	2	2	2
	K19N	4	2	1	16	16	16	>	>	>
	K46N	4	4	4	16	16	16	>	>	>
	K50S	1	1	1	2	1	1	4	2	4

Następnie były to trifluorooctan Temporyny A oraz chlorowodorek CAMEL. Dla tych związków wartości IC₅₀ wynosiły odpowiednio 10,60 µg/ml, 7,91 µg/ml oraz 2,49 µg/ml. Pomimo, iż najmniej toksycznym peptydem użytym w badaniach był octan LL-37, dla którego wartość IC₅₀ wynosiła 22,65 µg/ml,

Tabela 9. Aktywność peptydów z różnymi przeciwnymi wobec referencyjnych i klinicznych szczepów *S. aureus* cd.

		Pexiganan			Temporyna A		
		TFA ⁻	AcO ⁻	Cl ⁻	TFA ⁻	AcO ⁻	Cl ⁻
Szczepy referencyjne	ATCC 25923	8	8	8	4	8	4
	ATCC 6538	4	2	4	4	4	4
	ATCC 6538/P	8	4	8	8	4	8
	ATCC 9144	8	8	8	8	8	8
	ATCC 12598	16	8	8	4	4	4
Szczepy kliniczne	001N (MRSA)	16	8	8	8	4	8
	001S (MRSA)	8	8	8	4	4	4
	002N	8	16	16	4	4	4
	002S	16	16	16	4	4	4
	004N (MRSA)	8	4	8	4	4	4
	005S	1	1	1	4	4	4
	013S	1	1	1	4	4	4
	015N (MRSA)	16	4	4	8	4	8
	017N (MRSA)	4	2	2	8	4	8
	017S (MRSA)	4	2	2	8	4	8
	024N (MRSA)	1	1	1	4	4	4
	030N	16	16	8	4	4	4
	033N	16	8	16	4	2	4
	039N	8	16	8	4	2	4
	043SC (MRSA)	8	4	4	8	4	8
	045N	16	8	16	8	4	8
	048S	16	16	16	4	4	4
	051N (MRSA)	8	8	8	8	4	8
	051S	1	1	1	8	4	8
	053N	8	8	8	8	4	4
	060S	2	1	1	4	2	4
	K19N	8	16	16	8	8	8
	K46N	8	8	8	8	4	8
	K50S	1	2	1	8	4	4

to jednak brak aktywności przeciwdrobnoustrojowej dodatkowo wpłynął ujemnie na wartości indeksu selektywności. Tym samym wyniki tych doświadczeń potwierdzają, że nie można w sposób jednoznaczny ocenić, który z przeciwników jest najbardziej odpowiedni dla AMPs i wskazują na brak jest korelacji pomiędzy ich rodzajem a aktywnością biologiczną. W związku

z powyższym, wybór rodzaju soli, w jakiej dany peptyd mógłby być stosowany powinien być oparty na szczegółowych badaniach uwzględniających zarówno szeroki wachlarz szczepów oraz linii komórkowych w testach cytotoksyczności.

Tabela 10. Zestawienie wartości IC_{50} oraz indeksów selektywności dla badanych peptydów z różnymi przeciwionami

Peptyd	Przeciwjon	IC_{50}	Średnia wartość MIC	SI*
CAMEL	TFA-	3,32	$\leq 3,5$	$\geq 0,95$
	AcO-	2,72	$\leq 2,8$	$\geq 0,97$
	Cl-	2,49	$\leq 2,0$	$\geq 1,25$
Citropina 1.1	TFA-	3,02	13,0	0,23
	AcO-	4,37	10,0	0,44
	Cl-	4,12	10,0	0,41
LL-37	TFA-	11,75	>411	$<0,03$
	AcO-	22,65	>409	$<0,06$
	Cl-	4,26	>409	$<0,01$
Pexiganan	TFA-	1,05	8,4	0,13
	AcO-	10,60	7,1	1,49
	Cl-	0,14	7,4	0,02
Temporyna A	TFA-	7,91	5,9	1,34
	AcO-	0,92	4,2	0,22
	Cl-	3,43	5,7	0,60

Średni SI – indeks selektywności (IC_{50}/MIC)

Pogrubione są najlepsze wartości SI dla danego peptydu oraz przeciwjonu

4. Przeciwgronkowcowa aktywność Omigananu i retro-Omigananu

Wysoka aktywność Omigananu oraz jego retro-analogu zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych skłaniała do poszerzenia panelu badań koncentrujących się na aktywności przeciwdrobnoustrojowej tych obu związków. Przedmiotem jednej z prac realizowanych w zespole Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej była weryfikacja aktywności wybranych AMPs wobec biofilmu *Acinetobacter baumannii* tworzonego na powierzchni płytek polistyrenowych oraz fragmentów rurek tracheotomijnych [249]. Obok takich peptydów jak CAMEL, Citropina 1.1, LL-37, Pexiganan oraz Temporyna A, w badaniach ujęte zostały również Omiganan oraz retro-Omiganan. Dwa ostatnie związki, pomimo, iż nie wykazywały najwyższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, to jednak wyniki oznaczeń cytotoksyczności wobec linii HaCat jednoznacznie wskazały, że charakteryzują się one najwyższymi wartościami IC_{50} , które wynosiły odpowiednio 79,39 oraz 29,51 $\mu\text{g/ml}$. Co istotne, stężenia te znacznie przewyższają wartości IC_{50} pozostałych AMPs ujętych w poprzednich badaniach realizowanych wobec referencyjnych oraz klinicznych szczepów *S. aureus*. Dlatego też, Omiganan oraz retro-Omiganan ujęte zostały w dalszych szczegółowych pracach badawczych wobec *S. aureus*. Dodatkowo przedsięwzięto się weryfikacji wpływu wymiany przeciwjonów na aktywność biologiczną obu peptydów. Badania mikrobiologiczne obejmowały m.in. oznaczenia wobec form planktonowych (MIC oraz testy narastania oporności) oraz ocenę depolaryzacji błon. Ponadto określono aktywność wobec biofilmu zarówno w warunkach stacjonarnych oraz w modelu przepływowym. W pierwszym etapie oznaczono wpływ Omigananu oraz retro-Omigananu na tworzenie biofilmu (MBIC), jego eradykację (MBEC). W przepływowym modelu badawczym z wykorzystaniem specjalnie do tego celu zaprojektowanych układów z PDMS również określono MBEC oraz oceniono wpływ długotrwałej ekspozycji na badane peptydy na wrażliwość na te same związki jak i antybiotyki konwencjonalne. W ostatnim etapie badań określono wpływ funkcjonalizacji kanałów z PDSM peptydami na formowanie

się biofilmu w przepływie. Toksyczność Omigananu oraz jego retro analogu określona została wobec ludzkich erytrocytów oraz linii komórkowej HaCaT.

4.1. Wymiana przeciwjonów

Wymianę przeciwjonów dla obu peptydów przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisanym protokołem. W efekcie otrzymano po trzy sole każdego z peptydów, trifluorooctany, chlorowodorki oraz octany. Analizy zawartości poszczególnych przeciwjonów po wymianie zrealizowane przy użyciu chromatografii jonowej wskazały, iż zawartość jonów chlorkowych dla Omigananu i jego retro analogu wynosiła odpowiednio 97,81 oraz 100% (Tabela 11). W przypadku wymiany na octany, zawartości tych jonów wynosiła z kolei 87,31 oraz 86,26% (Tabela 12). Dodatkowo, tak jak w przypadku wcześniejszych badań stwierdzono również obecność jonów chlorkowych, co związane jest z ich śladową zawartością w kolumnienkach z żywicą jonowymienną, które w tym wypadku są używane, aby pozbyć się jonów trifluorooctanowych.

4.2. Aktywność różnych rodzajów soli

Tabela 11. Zawartość jonów chlorkowych w badanych peptydach.

Omiganan HCl

	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	2,91	77,99	0,00
Zawartość [μ mol/mg]	0,05	2,20	0,00
Zawartość [%]	2,19	97,81	0,00

retro-Omiganan HCl

	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	0,00	89,41	0,00
Zawartość [μ mol/mg]	0,00	2,52	0,00
Zawartość [%]	0,00	100,00	0,00

Tabela 12. Zawartość jonów octanowych w badanych peptydach

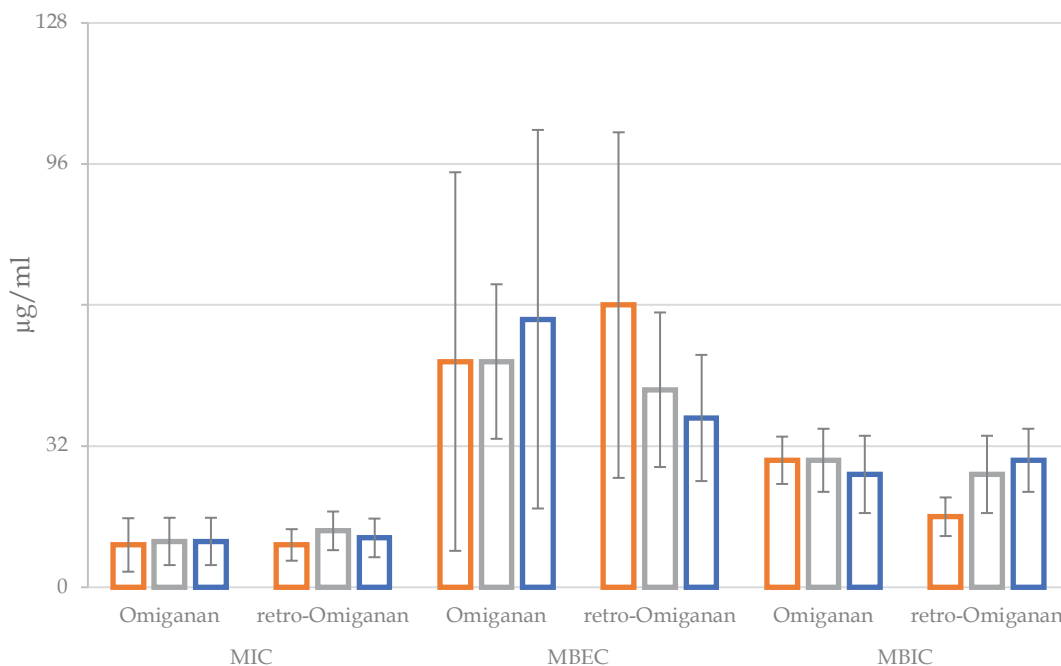
Omiganan AcOH			
	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	8,55	7,29	114,34
Zawartość [$\mu\text{mol/mg}$]	0,08	0,21	1,94
Zawartość [%]	3,41	9,28	87,31

retro-Omiganan AcOH			
	TFA-	Cl-	AcO-
Zawartość [ppm/mg]	11,78	8,16	124,05
Zawartość [$\mu\text{mol/mg}$]	0,10	0,23	2,10
Zawartość [%]	4,28	9,46	86,26

Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej zrealizowano wobec szczepów referencyjnych (5) pochodzących z kolekcji ATCC oraz klinicznych (9), wyizolowanych od pacjentów z atopowym zapaleniem skóry. Dobór szczepów do badań oparty został na wcześniejszych analizach MIC, na podstawie których wytypowane były te charakteryzujące się najwyższym stopniem oporności na antybiotyki konwencjonalne. Wyniki oznaczeń MIC wskazują, że wszystkie związki hamowały wzrost gronkowców w zakresie stężeń od 0,5 do 16 $\mu\text{g/ml}$, zaś najaktywniejszymi związkami był octan Omigananu oraz trifluoroctan retro-Omigananu, dla których średnie wartości MIC wynosiły odpowiednio 7,6 oraz 7,7 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 13). W przypadku oznaczeń hamowania rozwoju biofilmu najwyższym potencjałem charakteryzował się trifluoroctan retro-Omigananu, dla którego średnia wartość MBIC wynosiła 12,3 $\mu\text{g/ml}$, a rozrzut wyników dla wszystkich związków oscylował między 0,5 a 32 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela

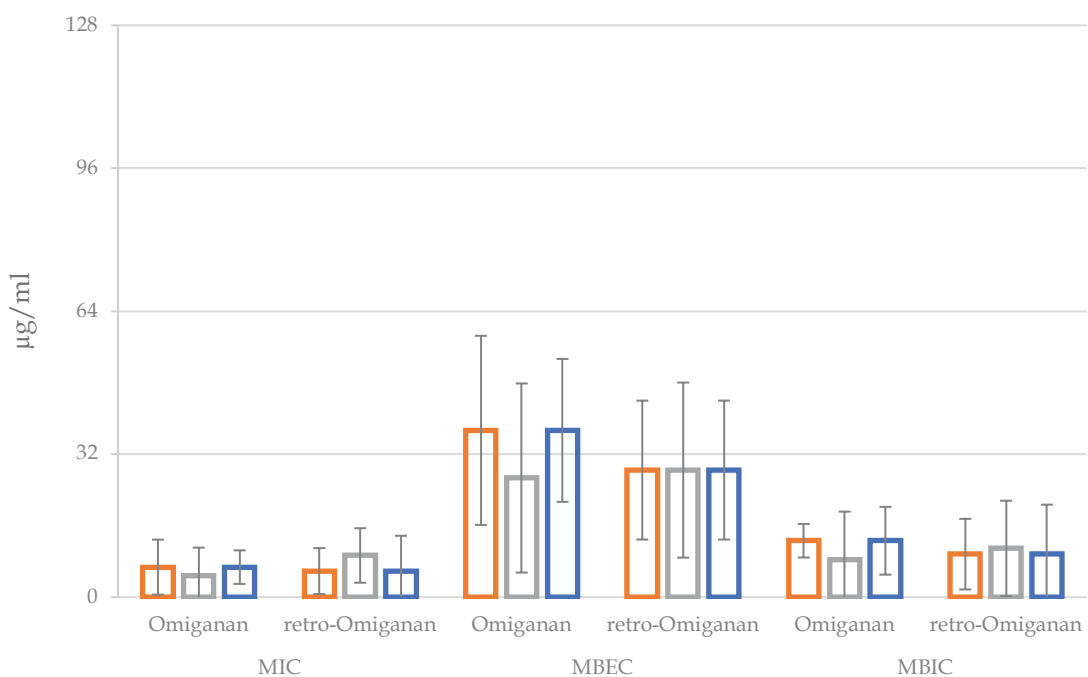
14). Eradykacja już uformowanego, 24-godzinnego biofilmu dla badanych AMPs następowała w wielokrotnie wyższych stężeniach, jednak charakteryzowała się zdecydowanie najwęższym zakresem aktywności. Najniższe zanotowane stężenia MBEC wynosiły 16 µg/ml, natomiast najwyższe 128 µg/ml. Warto zaznaczyć, że te ostatnie stwierdzone zostały tylko dla 1 szczepu referencyjnego (*S. aureus* ATCC 25923). Tym nie mniej, najniższa średnia wartość MBEC w wypadku tych badań stwierdzona została dla octanu retro-Omigananu, która wynosiła 33,4 µg/ml (Tabela 15). Uzyskane wyniki analiz mikrobiologicznych korespondują z tymi zrealizowanymi w ramach innych prac zrealizowanych w Jednostce. Przykładowo w pracy *Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm* wyniki MIC oraz MBC (minimalnego stężenia bakteriobójczego) dla Omigananu wyznaczone wobec szczepu *S. aureus* wynosiły odpowiednio 4 i 8 µg/ml [200]. Z kolei w pracy Zapotocznej i wsp. wartości MIC wyznaczone dla szczepów MRSA dla D-Omigananu (do syntezy peptydu użyto D-aminokwasów) wynosiły 8 µg/ml [282]. W tych samych badaniach, średnie wartości MBEC dla różnych szczepów po 6 godzinach traktowania związkiem wynosiły od 18,6 do 20,8 µg/ml. Natomiast w pracy Samantha Ng i wsp. Omiganan jak i D-Omiganan ujęte zostały w badaniach nad szczepami MRSA opornymi na mupirocynę [283]. Dla obu związków i wszystkich analizowanych szczepów wartości MIC wynosiły 12,5 µM co odpowiada stężeniu 22,7 µg/ml. Warto zaznaczyć, iż użycie D-aminokwasów w sekwencji zwiększa odporność peptydów na aktywność proteaz, co przekłada się dodatnio na ich potencjał aplikacyjny. We wskazanej pracy stężenie peptydów po godzinie inkubacji z ludzką proteazą serynową S9 (obecną w skórze) dochodziło do całkowitej degradacji Omigananu. Natomiast stężenie D-Omigananu wynosiło 80% i utrzymywało się na stałym poziomie przez cały okres trwania analizy. Należy zaznaczyć, że większość badań nad Omigananem dotyczy jego postaci w formie chlorowodoru (*Omiganan pentahydrochloride*). Przykładowo w pracy Sadera i wsp. Omiganan badany był na bardzo dużej liczbie szczepów klinicznych, w tym gronkowców gronkowców złocistych wrażliwych na oksacylinę (88) oraz opornych - MRSA (111) [284]. Dla obu tych grup zakres stężeń MIC mieścił się między 2 a 64 µg/ml, a MIC₉₀ wynosił 16 µg/ml.

W badaniach Fritsche i wsp. z 2008 roku nad szczepami klinicznymi MSSA, MRSA, VISA oraz VRSA (109) wartości MIC₅₀ oraz MIC₉₀ wynosiły odpowiednio 16 i 32 µg/ml [285]. Wyniki badań innych zespołów badawczych oraz tych zrealizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej są zbieżne, natomiast analizy wpływu różnych przeciwciał w tych peptydach na ich aktywność przeciwgronkowcową potwierdzają, że dobór odpowiedniego zależy od badanego peptydu, a także potencjalnej aplikacji. Przykładowo dla Omigananu nie zaobserwowano znaczących różnic wartości średnich MIC, MBIC oraz MBEC, jeśli wziąć pod uwagę badania na szczepach referencyjnych (Rycina 25). Z kolei w przypadku szczepów klinicznych jako reguła wyższa aktywność była obserwowana dla chlorowodorków (Rycina 26). Dla retro-Omigananu w przypadku szczepów referencyjnych znaczna różnica zaobserwowana była przy eradykacji biofilmu, gdzie na korzyść przemawia wymiana na jony chlorkowe i octanowe. Z drugiej strony rozwój biofilmu najlepiej hamował trifluorooctan retro-Omigananu. Dla szczepów klinicznych dla retro analogu nie zaobserwowano znaczących różnic. Tym nie mniej, zestawiając ze sobą aktywność wszystkich badanych związków wobec szczepów klinicznych oraz referencyjnych zaobserwować można wyższą aktywność wobec bakterii pozyskanych od pacjentów. Obserwacje te sugerują, jak konieczne jest uwzględnianie w swoich badaniach szczepów referencyjnych (szczepów kontrolnych). Częstą praktyką w badaniach nad nowymi związkami jest realizacja badań na szczepach klinicznych, które generalnie traktowane są jako bardziej odporne na antybiotyki [286], [287]. Jednakże istotą badań naukowych jest również umożliwienie innym zespołom badawczym nie tylko odtworzenie badań, lecz również odpowiednie zestawienie wyników swoich prac eksperymentalnych.



Rycina 25. Zestawienie (wartości średnie oraz rozrzut wyników) aktywności różnych form soli Omigananu oraz retro-Omigananu wobec referencyjnych szczepów *S. aureus*.

* ■ TFA- ■ Cl- ■ AcO-



Rycina 26. Zestawienie (wartości średnie oraz rozrzut wyników) aktywności różnych form soli Omigananu oraz retro-Omigananu wobec klinicznych szczepów *S. aureus*.

* ■ TFA- ■ Cl- ■ AcO-

Tabela 13. Wartości MIC Omigananu i retro-Omigananu z różnymi przeciwjonami wobec referencyjnych i klinicznych szczepów *S. aureus* [$\mu\text{g/ml}$].

		Omiganan			retro-Omiganan		
		TFA ⁻	AcO ⁻	Cl ⁻	TFA ⁻	AcO ⁻	Cl ⁻
Szczepy referencyjne	ATCC 25923	16	16	16	8	16	16
	ATCC 33591 (MRSA)	16	16	16	16	16	16
	ATCC 6538	4	8	8	8	8	8
	ATCC 9144	4	4	4	8	8	8
	ATCC 12598	8	8	8	8	8	16
Szczepy kliniczne	004N (MRSA)	8	8	8	8	16	16
	005S	1	1	1	0,5	1	1
	009S	0,5	0,5	0,5	1	1	1
	015N (MRSA)	16	8	16	8	16	8
	030N	8	8	16	16	16	8
	031S	1	1	1	2	1	2
	043SC (MRSA)	8	8	8	8	16	8
	051N (MRSA)	16	8	8	8	16	16
	060S	2	1	1	1	1	1
Średnia wartość MIC [$\mu\text{g/ml}$]							
Omiganan TFA		8,2					
Omiganan AcO ⁻		<u>7,6</u>					
Omiganan Cl ⁻		8,5					
retro-Omiganan TFA		7,7					
retro-Omiganan AcO ⁻		10,3					
retro-Omiganan Cl ⁻		9,8					

Tabela 14. Wartości MBIC Omigananu i retro-Omigananu z różnymi przeciwjonami wobec referencyjnych i klinicznych szczepów *S. aureus* [$\mu\text{g/ml}$]

		Omiganan			retro-Omiganan		
		TFA ⁻	AcO ⁻	Cl ⁻	TFA ⁻	AcO ⁻	Cl ⁻
Szczepy referencyjne	ATCC 25923	32	32	32	16	32	32
	ATCC 33591 (MRSA)	32	32	32	16	32	32
	ATCC 6538	32	32	32	16	32	16
	ATCC 9144	16	16	16	16	16	16
	ATCC 12598	32	16	32	16	32	32
Szczepy kliniczne	004N (MRSA)	16	8	16	16	16	16
	005S	2	1	1	2	2	2
	009S	1	1	1	2	1	1
	015N (MRSA)	16	16	16	16	16	16
	030N	16	16	16	8	16	16
	031S	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	043SC (MRSA)	16	16	16	8	16	16
	051N (MRSA)	32	16	32	32	32	16
	060S	2	1	2	1	2	2
Średnia wartość MBIC [$\mu\text{g/ml}$]							
Omiganan TFA		20,0					
Omiganan AcO ⁻		17,0					
Omiganan Cl ⁻		20,0					
retro-Omiganan TFA		<u>12,3</u>					
retro-Omiganan AcO ⁻		19,9					
retro-Omiganan Cl ⁻		18,4					

Tabela 15. Wartości MBEC Omigananu i retro-Omigananu z różnymi przeciwjonami wobec referencyjnych i klinicznych szczepów *S. aureus* [$\mu\text{g/ml}$]

		Omiganan			retro-Omiganan		
		TFA ⁻	AcO ⁻	Cl ⁻	TFA ⁻	AcO ⁻	Cl ⁻
Szczepy referencyjne	ATCC 25923	128	128	64	128	64	64
	ATCC 33591 (MRSA)	32	64	64	64	32	32
	ATCC 6538	32	64	32	64	32	64
	ATCC 9144	32	16	32	32	32	32
	ATCC 12598	32	32	64	32	32	32
Szczepy kliniczne	004N (MRSA)	64	32	64	64	32	64
	005S	16	16	32	16	16	16
	009S	32	16	32	16	16	16
	015N (MRSA)	64	32	64	32	32	32
	030N	32	32	64	32	32	32
	031S	16	16	16	16	16	16
	043SC (MRSA)	32	16	32	16	32	32
	051N (MRSA)	64	64	64	32	64	64
	060S	16	16	16	16	16	16
Średnia wartość MBEC [$\mu\text{g/ml}$]							
Omiganan TFA		44,3					
Omiganan AcO ⁻		43,7					
Omiganan Cl ⁻		46,9					
retro-Omiganan TFA		46,2					
retro-Omiganan AcO ⁻		33,4					
retro-Omiganan Cl ⁻		38,4					

4.3. Oznaczenie zawartości peptydów

W przypadku syntezy peptydów na stałym nośniku polimerowym (SPPS) otrzymujemy produkt w postaci liofilizatu, w którym oprócz samego związku obecne są m.in. przeciwjony oraz woda. Ponadto, ze względu na higroskopijny charakter peptydów ilości tych zanieczyszczeń ulegają ciągłej zmianie w trakcie przechowywania. Dlatego też podawane stężenia aktywności biologicznej mają charakter szacunkowy. Bez dokładnych analiz (np. analizy aminokwasowej lub na podstawie molowego współczynnika absorpcji tryptofanu oraz tyrozyny) nie jest możliwe wyrażenie dokładnego stężenia tych związków [288]. Szczególne znaczenie tego typu analizy odgrywają w przypadku analiz proteomicznych, gdy potrzebne jest bardzo dokładne określenie stężenia określonych białek (markerów) w próbkach pobranych od pacjentów. W przypadku procedury wymiany przeciwjonów, która związana jest z wielokrotną liofilizacją istnieje ryzyko zmiany realnej zawartości peptydu w liofilizacie. Dlatego też by móc dokładnie określić wpływ wymiany przeciwjonów na aktywność przeciwwronkowcową Omigananu i jego retro analogu oznaczono zawartość peptydów w liofilizatach. Dzięki obecności 4 reszt tryptofanu w sekwencji (ILR**W**P**W**W**P**RRK-NH₂) możliwe było określenie zawartości peptydu (Tabela 16).

Tabela 16. Wyniki oznaczeń zawartości przeciwjonów w peptydach po wymianie na jon chlorkowy oraz octanowy

Peptyd	Przeciwjon	Zawartość peptydu [mg/mg]
Omiganan	TFA-	1,00 ± 0,059
retro-Omiganan		0,96 ± 0,048
Omiganan	Cl-	0,85 ± 0,027
retro-Omiganan		0,75 ± 0,020
Omiganan	AcO-	0,85 ± 0,026
retro-Omiganan		0,79 ± 0,023

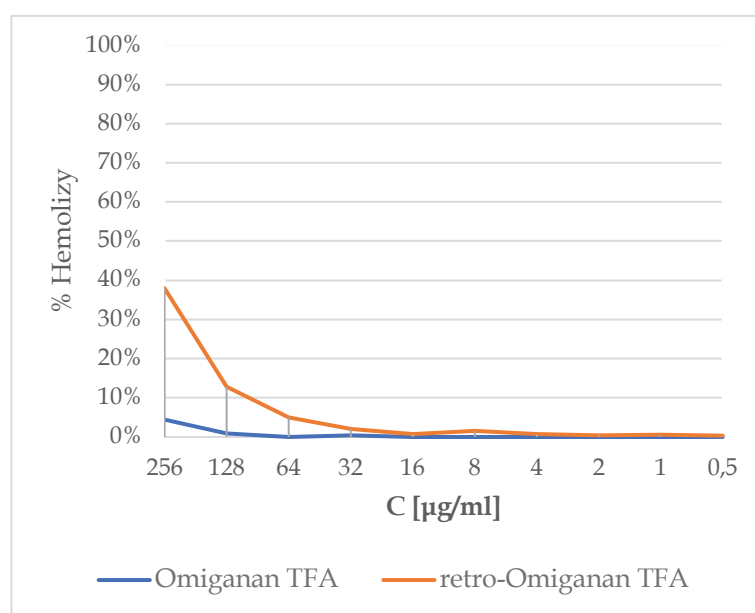
W oparciu o wyniki tych analiz określona została skorygowana wartość średnia stężeń MIC, MBIC oraz MBEC (Tabela 17). Pomimo wyraźnych różnic w stężeniu efektywnym peptydów po wymianie przeciwwjonów, nadal jednak najniższą wartość MIC wykazuje octan Omigananu, MBIC trifluorooctan retro-Omigananu, a eradykację biofilmu w najniższym stężeniu powoduje octan retro-Omigananu. Na podstawie tych analiz można domniemywać, że najkorzystniejsze własności przeciwwgronkowcowe dla obu związków zapewnia obecność przeciwwjonu octanowego, a najwyższą aktywność w stosunku do biofilmu wykazuje retro-Omiganan. Warto zaznaczyć, iż w badaniach klinicznych Omiganan ujęty został w postaci chlorowodoru [289], [290]. Pomimo to znaczenie przeciwwjonów w gotowej postaci farmaceutycznej nie jest bez znaczenia. W szczególności, gdy brany pod uwagę jest proces produkcji czy sposób dostarczenia leku. Nie bez znaczenia jest również całkowita kompozycja gotowej formulacji, która może mieć wpływ m. in. na jej stabilność czy skuteczność leku *in vivo* [291]. Dlatego też decyzja o tym, który przeciwwjon jest najbardziej odpowiedni dla aktywności Omigananu oraz jego retro analogu musi być podparta dalszymi badaniami, np. stabilności oraz cytotoksyczności.

Tabela 17. Wyniki badań mikrobiologicznych [$\mu\text{g}/\text{ml}$] po uwzględnieniu zawartości peptydów i średnich wartości MIC, MBIC oraz MBEC [$\mu\text{g}/\text{ml}$].

Peptyd	Przeciwwjon	Wartości początkowe			Wartości skorygowane		
		MIC	MBIC	MBEC	MIC	MBIC	MBEC
Omiganan	TFA ⁻	8,20	20,00	44,30	8,20	20,00	44,30
retro-Omiganan		7,70	<u>12,30</u>	46,20	7,39	<u>11,81</u>	44,35
Omiganan	Cl ⁻	8,50	20,00	46,90	7,23	17,00	39,87
retro-Omiganan		9,80	18,40	38,40	7,35	13,80	28,80
Omiganan	AcO ⁻	<u>7,60</u>	17,00	43,70	<u>6,46</u>	14,45	37,15
retro-Omiganan		10,30	19,90	<u>33,40</u>	8,14	15,72	<u>26,39</u>

4.4. Cytotoksyczność różnych rodzajów soli

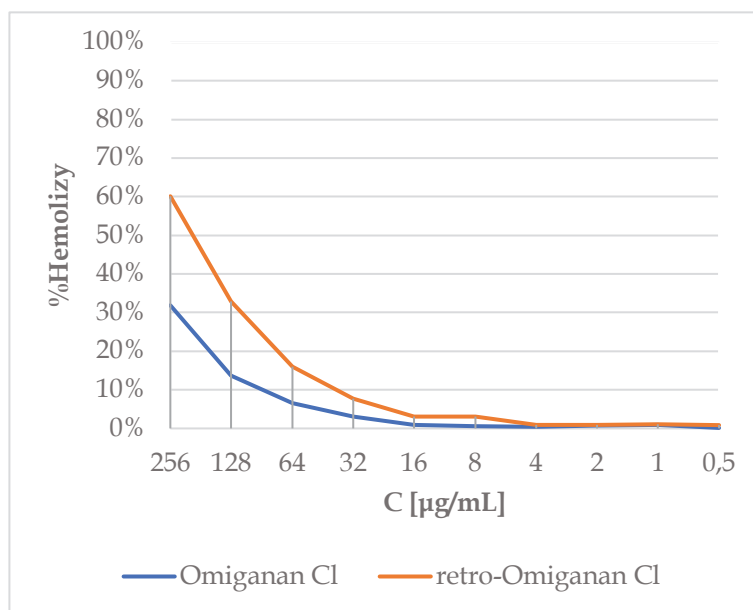
Jednym z parametrów pozwalających na wstępne określenie cytotoksyczności peptydów jest ocena aktywności hemolitycznej. Głównie ze względu na fakt, iż jednym z kryteriów determinującym zastosowanie ogólnoustrojowe AMPs jest niska toksyczność względem erytrocytów [292]. Wyniki oznaczeń zrealizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej wskazują, iż spośród wszystkich rodzajów soli najbardziej hemolityczny był retro-Omiganan (Ryciny 27-29).



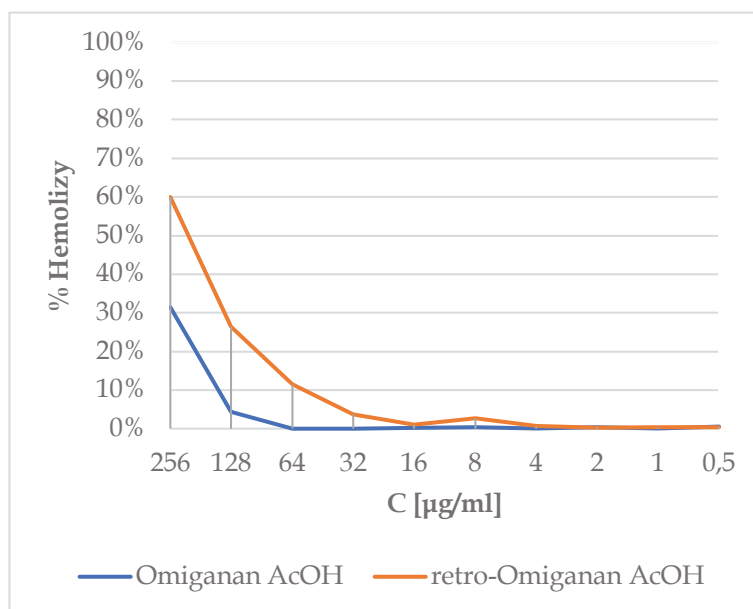
Rycina 27. Wykres aktywności hemolitycznej soli TFA- Omigananu i retro-Omigananu w gradiencie stężenia

Natomiast tylko trifluorooctan Omigananu nie powodował istotnej hemolizy erytrocytów (>10%) w całym zakresie badanych stężeń. Dla pozostałych związków obserwowane były wyższe wartości, a rezultatem wymiany przeciwjonów była wyższa aktywność hemolityczna. Najwyższy stopień hemolizy zanotowany był dla chlorku oraz octanu retro-Omigananu, które wynosiło odpowiednio 60,12 oraz 59,99% dla stężenia 256 µg/ml. Co więcej, dla tych związków wartość hemolizy >10% (16,02 oraz 11,56%) zanotowana została dla stężenia 64 µg/ml. Oznacza to, że stężenia efektywne

mikrobiologicznie, również wobec biofilmu, są dużo niższe niż te, które odpowiadają za istotny stopień hemolizy erytrocytów.



Rycina 28. Wykres aktywności hemolitycznej soli Cl⁻ Omigananu i retro-Omigananu w gradiencie stężenia.



Rycina 29. Wykres aktywności hemolitycznej soli AcO⁻ Omigananu i retro-Omigananu w gradiencie stężenia.

Uzyskane wyniki korespondują z wcześniejszymi badaniami Jednostki, które wskazują na wyższą aktywność hemolityczną retro analogu względem Omigananu [242]. Natomiast podobne zależności dla octanów zaobserwowane zostały dla peptydów CAMEL oraz Pexiganan [239]. Warto zaznaczyć, że wyznaczone stężenia pokrywają się z rezultatami badań innych zespołów. Przykładowo w pracy Faccone i wsp. Omiganan określony został jako AMPs o niskim potencjale hemolitycznym [293]. Z drugiej strony, w badaniach Won i wsp. badane były analogi peptydów pozyskanych od żaby, a Omiganan stanowił związek odniesienia [294]. W badaniach tych parametrem określanym było najniższe stężenie hemolityczne (ang. *minimal hemolytic concentration*, MHC), który wykorzystany został do obliczenia indeksu terapeutycznego (TI). Jako MHC określono najniższe stężenie powodujące hemolizę równą lub większą niż 5%. Dla Omigananu wartość ta wynosiła 100 µg/ml.

W ramach pracy doktorskiej określono również toksyczność wobec linii komórkowej keratynocytów ludzkich HaCaT. Uzyskane wyniki badań wskazują, iż najmniej toksycznym związkiem był trifluorooctan Omigananu, dla którego wartość IC_{50} wynosił 77,10 µg/ml (Tabela 18). Tym nie mniej, po uwzględnieniu średnich wartości MIC wobec badanych szczepów *S. aureus*, to najwyższy wskaźnik indeksu selektywności (SI) uzyskany został dla octanu Omigananu. Dodatkowo wyniki tych oznaczeń wskazują, że rezultatem odwrócenia sekwencji jest nawet 3-krotny wzrost cytotoksyczności.

Tabela 18. Zestawienie wartości IC_{50} dla badanych peptydów oraz wyznaczone indeksy selektywności ($SI = IC_{50}/MIC$).

Peptyd	Przeciwnik	IC_{50}	MIC^a	SI
Omiganan	TFA-	77,10	8,20	9,40
retro-Omiganan	TFA-	29,51	7,70	3,83
Omiganan	Cl-	63,99	8,50	7,53
retro-Omiganan	Cl-	26,66	9,80	2,72
Omiganan	AcO-	73,72	7,60	<u>9,70</u>
retro-Omiganan	AcO-	23,66	10,30	2,30

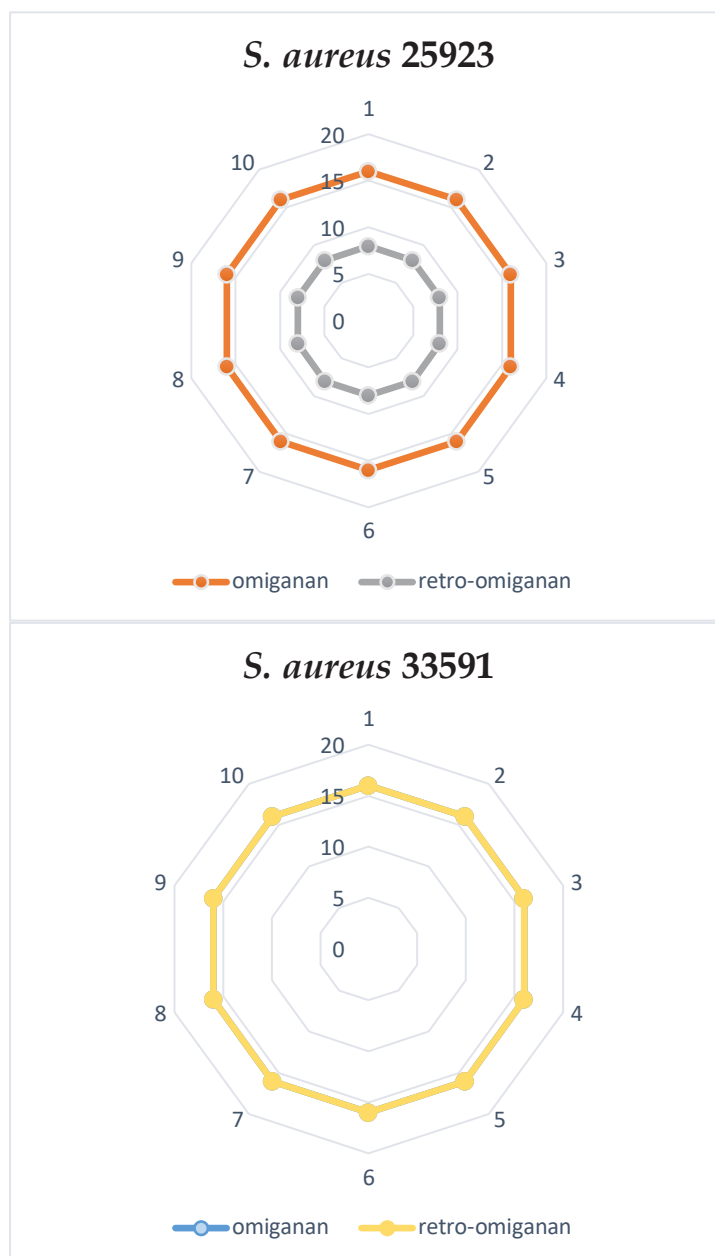
^a średnie wartości MIC

Z tego względu najbardziej toksycznym związkiem okazał się octan retro-Omigananu z wartością IC_{50} równą 23,66 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Niska toksyczność Omigananu wobec linii HaCaT potwierdzona została również w innych badaniach. Przykładowo w pracy Zapotocznej i wsp. oznaczone wartości IC_{50} dla D-Omigananu wynosiła aż 302,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [282]. W badaniach Malmstenena i wsp. nad nowymi AMPs (2001) Omiganan i LL-37 ujęte zostały jako związki kontrolne [295]. W badaniach tych oceniono przeżywalność komórek HaCaT oraz ilość uwolnionego LDH dla 4 badanych stężeń. W rezultacie Omiganan okazał się jednym z najmniej toksycznych związków, któremu towarzyszyło uwolnienie najmniejszej ilości LDH (%) w porównaniu do kontroli dla wszystkich użytych stężeń.

4.5. Badanie zjawiska narastania oporności

Jednym z aspektów pozwalających ocenić, czy dany związek wykazuje potencjał aplikacyjny w terapii zakażeń jest jego zdolność do wywoływania oporności. Tym bardziej, iż nabycie oporności na syntetyczne peptydy może skutkować wywołaniem oporności na endogenne AMPs [295]. Przykładowo Habets i Brokhurst wykazali, że szczepy *S. aureus*, u których wywołano oporność na Pexiganan, zaczęły wykazywać oporność na ludzką defensynę hNP-1 [296]. Ponadto Kubicek-Sutherland i wsp. udowodnili, iż hodowla szczepów *S. aureus* we wzrastających stężeniach LL-37 i PR-39 prowadzi do selekcji szczepów opornych na działanie układu odpornościowego, w tym endogennych AMPs [297]. W badaniach zrealizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej ujęto dwa szczepy referencyjne *S. aureus* ATCC 25923 oraz *S. aureus* 33591 (MRSA) oraz oceniono profil wrażliwości dla Omigananu oraz jego retro analogu. Po 10 pasażach w stężeniu równym $\frac{1}{2}$ MIC dla obu szczepów nie stwierdzono zmiany w stężeniu MIC oraz nie zaobserwowano wystąpienia oporności krzyżowej (Rycina 30). Tym samym należy spodziewać się, iż dla Omigananu i retro-Omigananu wywołanie oporności może być utrudnione. Warto zaznaczyć, że dla niektórych peptydów, np. Tachyplezyny I rozwój oporności wymaga nawet 89 pasażów [298]. Z drugiej strony, Pollarda i wsp. zaobserwowali wywołanie oporności i nagły wzrost stężeń MIC wobec karegeniny CSA-13

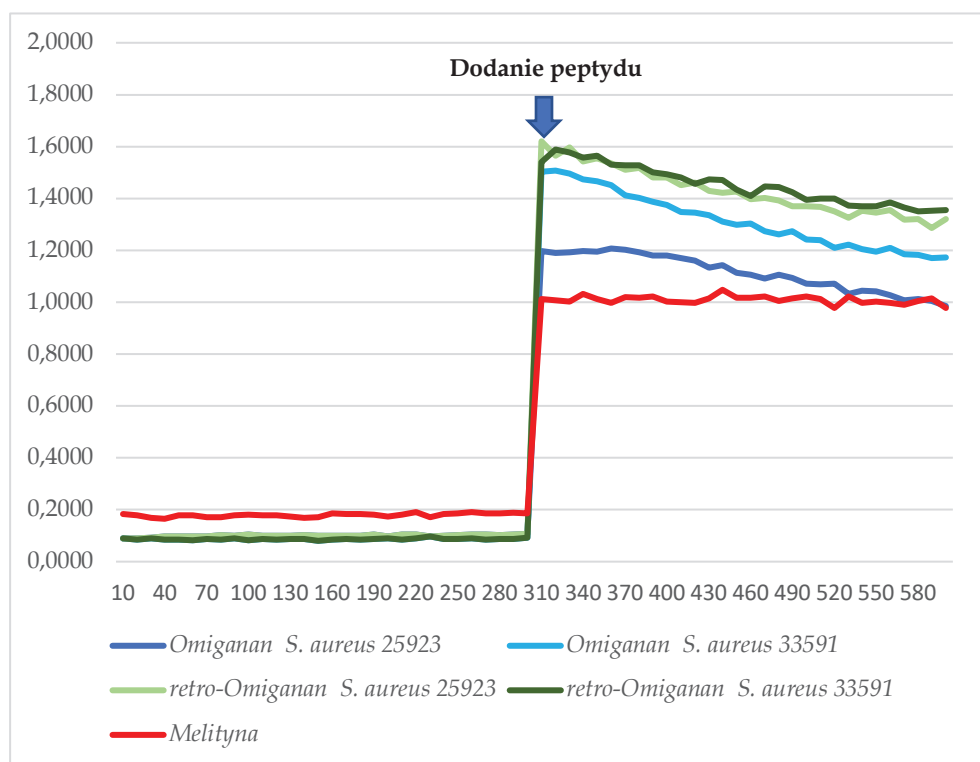
(związku steroidowego o podobnym mechanizmie działania jak AMPs) już po 7 pasażu [299]. W badaniach Samulsen i wsp. wzrost stężeń MIC na Laktoferycynę B u szczepów *S. aureus* pojawił się przed 10 pasażami [300]. Należy zaznaczyć, iż zaobserwowano krzyżową oporność na penicylinę G, a indukowana oporność na peptyd okazała się niestabilna i stosunkowo szybko spadała w trakcie pasażowania w pożywce bez dodatku Laktoferycyny.



Rycina 30. Wykres zmian stężeń MIC [µg/ml] po każdym z pasażów. Dla Omigananu i retro-Omigananu MIC wynosi, wobec *S. aureus* ATCC 25923 odpowiednio 16 µg/ml oraz 8 µg/ml; wobec *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA) dla obu peptydów 16 µg/ml.

4.6. Ocena depolaryzacji błon

Często weryfikowanym parametrem w badaniach nad nowymi AMPs jest ocena depolaryzacji błon przy użyciu jodku 3,3' dipropylotiadikarbocyaniny – DiSC₃(5) [301]–[303]. W ramach pracy doktorskiej oznaczenia te przeprowadzono przy użyciu szczepów referencyjnych *S. aureus* ATCC 25923 oraz *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA). Związkiem kontrolnym zaś była Melityna. Wyniki analiz fluorymetrycznych wskazują, iż Omiganan oraz retro-Omiganan powodują depolaryzację błon *S. aureus* bezpośrednio po dodaniu związków w stężeniu równym $2 \times \text{MIC}$. Towarzyszy temu natychmiastowy wzrost fluorescencji utrzymujący się przez cały okres trwania analizy (Rycina 31). Pomimo, że w literaturze nie opisano tego badania dla Omigananu, to jednak potencjał do depolaryzacji błon był oznaczany. Przykładowo Melo i Castanho określili interakcje tego peptydu na laboratoryjnym modelu błon i ścian komórkowych [304].



Rycina 31. Wykres obrazujący spadek potencjału błonowego u szczepów *S. aureus* ATCC 25923 oraz *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA) po dodaniu badanych peptydów.

Na podstawie szeregu analiz matematycznych oraz modelowania podpartego badaniami biologicznymi autorzy wykazali zależność pomiędzy stężeniem MIC a interakcją z błonami *S. aureus*. Ponadto zaobserwowano wysokie powinowactwo peptydu względem peptydoglikanu. Z drugiej strony Friedrich i wsp. w badaniach nad aktywnością hybrydowych peptydów CP26, CP29 oraz analogu Indolicydyny - CP11CN również ocenili stopień depolaryzacji błon [304]. Co ciekawe, w badaniach tych wykazano, iż związek CP26, który charakteryzował się najniższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową, wykazywał jedną z najlepszych zdolności do permeabilizacji błon. Natomiast CP11CN oraz Indolicydyna pomimo, że doprowadzały do depolaryzacji błon już w niskich stężeniach, powodowały to u maksymalnie 75 % komórek

4.7. Minimalne stężenie eliminujące biofilm w przepływie

Badania przy zastosowaniu modelu przepływowego zrealizowane zostały wobec dwóch modelowych szczepów referencyjnych *S. aureus* ATCC 25923 oraz *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA). Pierwszym z ocenianych parametrów było wyznaczenie MBEC_f. Niestety, żadne ze stężeń użytych do eliminacji biofilmu w przepływie nie spowodowało jego eradykacji (Tabela 19). Z tego względu zaniechano dalszych prac badawczych w tym zakresie, mając na względzie nie tylko długotrwały charakter całej analizy, lecz również duże zużycie związków.

Tabela 19. Minimalne stężenie eliminujące biofilm w przepływie

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> ATCC 33591
Omiganan	> 256	> 256
retro-Omiganan	> 256	> 256

Uzyskane wyniki korespondują z danymi literaturowymi, które wskazują, iż biofilm utworzony w warunkach przepływowych wykazuje diametralnie różną architekturę i znacznie wyższą oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe [305]–[307]. Związane jest to przede wszystkim z dostępnością do substancji odżywczych i wymywaniem metabolitów [308].

Taki model badawczy zdecydowanie lepiej odzwierciedla warunki *in vivo*. Pomimo to, metody oparte o wykorzystanie płytek mikrotitracyjnych są częściej wykorzystywane w pracach badawczych nad eradykacją oraz zapobieganiem tworzenia biofilmu. Za użyciem tych metod przemawiają przede wszystkim prostota wykonania oraz relatywnie niskie zużycie odczynników [309]. Pomimo mnogości prac traktujących o nowych podejściach dotyczących terapii infekcji gronkowcowych związanych z biofilmem, nadal nie udało się opracować skutecznej metody badawczej, a także nie udało się opracować zupełnie skutecznego związku mogącego znaleźć zastosowanie terapeutyczne. Jednakże wspólnym mianownikiem tych prac jest fakt, iż najskuteczniejszą metodą jest profilaktyka oraz łączenie różnych podejść [310], [311]. Przykładowo, Henriksen i wsp. w badaniach nad *P. aeruginosa* w przepływowym modelu badawczym weryfikowali synergizm działania cyprofloksacyny wraz z przeciwbiofilmowym działaniem bakteriofagów [312]. Aczkolwiek, zastosowanie samych wirusów lub antybiotyków oddzielnie nie było tak skuteczne, to jednak odpowiednie dozowanie obu podejść przyniosło wymierne efekty.

4.8. Badanie zjawiska narastania oporności w biofilmie w przepływie

Kolejnym podejściem ujętym w ramach niniejszej pracy doktorskiej była weryfikacja jaki wpływ na szczepy gronkowca złocistego ma długotrwała ekspozycja wobec badanych peptydów. Traktowanie biofilmu utworzonego w warunkach przepływowych Omigananem oraz jego retro analogiem wskazała, iż znacząco nie wpływa ono na zmianę wrażliwości wybranych szczepów gronkowca złocistego. Tym bardziej, iż w tym ujęciu używane były znacznie wyższe stężenia badanych związków (połowa wartości MBEC). Jednakże, zaobserwowano, iż wrażliwość szczepu *S. aureus* ATCC 25923 wobec cyprofloksacyny oraz Omigananu zwiększyła się dwukrotnie ($\frac{1}{2}$ MIC wyjściowego), zarówno po traktowaniu Omigananem i retro analogiem już po 24 godzinach traktowania biofilmu (Tabela 19). Dla tego szczepu zanotowano również dwukrotny spadek stężeń MIC dla daptomycyny.

Tabela 19. Minimalne stężenia hamujące wzrost szczepu dla szczepu *S. aureus* ATCC 25923 po traktowaniu biofilmu badanymi peptydami w przepływie

czas	0	Omiganan			Retro-Omiganan		
		24	48	72	24	48	72
Ampicylina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Cyprofloksacyna	1,0	<u>0,5</u>	<u>0,5</u>	<u>0,5</u>	<u>0,5</u>	<u>0,5</u>	<u>0,5</u>
Daptomycyna	2,0	2,0	2,0	2,0	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>
Erytromycyna	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25
Kwas fusydowy	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25
Linezolid	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Linkomycyna	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Mupirocyna	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25
Tetracyklina	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25
Wankomycyna	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Omiganan	16,0	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>
Retro-Omiganan	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0

Tabela 20. Minimalne stężenia hamujące wzrost szczepu dla szczepu *S. aureus* ATCC 33591 po traktowaniu biofilmu badanymi peptydami w przepływie.

Czas [h]	0	Omiganan			Retro-Omiganan		
		24	48	72	24	48	72
Ampicylina	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
Cyprofloksacyna	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Daptomycyna	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>
Erytromycyna	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
Kwas fusydowy	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25
Linezolid	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Linkomycyna	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128	> 128
Mupirocyna	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25
Tetracyklina	64,0	64,0	64,0	64,0	64,0	64,0	64,0
Wankomycyna	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Omiganan	16,0	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>
Retro-Omiganan	16,0	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>	<u>8,0</u>

Również biofilm tego szczepu wytworzony w przepływie traktowany Omigananem stawał się wobec niego bardziej wrażliwy. W przypadku szczepu *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA) spadek wrażliwości na daptomycynę zaobserwowany był dopiero po 48 godzinach traktowania retro-Omigananem (Tabela 20). Co ciekawe traktowanie biofilmu Omigananem i retro-Omigananem zaindukowało wzajemny, dwukrotny spadek stężeń MIC u obu szczepów.

Dotychczas żaden zespół badawczy nie przedsięwziął się zbadania wpływu ekspozycji biofilmu na różne związki przeciwdrobnoustrojowe w przepływie oraz dalszego oddziaływania na ich profil wrażliwości. Większość tego typu badań opiera się na seryjnym pasażowaniu i dalszej ocenie antybiotykowrażliwości [298], [313]. Jednakże bakterie bardzo często w swoim środowisku są ekspozowane na działanie szeregu AMPs, w szczególności tych biorących udział w reakcjach odpornościowych zainfekowanych organizmów. Ponadto oporność na AMPs może być pasywna lub indukowana. Przykładowo, wrodzona oporność na działanie AMPs występuje u bakterii z rodzaju *Burkholderia*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia* i *Serratia*, u których występuje bardziej dodatnio naładowana cząsteczka Lipidu A (składowej LPS), co wpływa na zmniejszenie interakcji z peptydami przeciwdrobnoustrojowymi [314]. U gronkowców złocistych występuje szereg mechanizmów oporności wobec AMPs obejmujący takie związki jak LL-37, ludzkie defensyny czy Laktoferycyna B. U podstaw tych mechanizmów wymienia się m. in. zdolność do produkowania szeregu enzymów proteolitycznych, obecność systemów regulatorowych, które w obecności AMPs powodują zmianę w ekspresji białek błonowych specyficznie wiążących się z cząsteczkami peptydów, wrodzona oporność kolonii typu SCV (ang. *small colony variants*) oraz tworzenie się biofilmu [315], [316]. Warto zaznaczyć, iż bakterie ekspozowane na działanie AMPs, w szczególności w formie biofilmu dużo łatwiej mogą nabyć oporność na te związki oraz w konsekwencji doprowadzić również do wystąpienia oporności krzyżowej np. na peptydy endogenne [317]. Z tego względu racjonalnym wydaje się być realizacja badań indukcji oporności w przepływowym modelu badawczym, który dużo lepiej odzwierciedla warunki spotykane *in vivo*. Odnosząc się do rezultatów prac badawczych warto

nadmienić, iż spadek wrażliwości na daptomycynę jest niespotykanym zjawiskiem. Głównie ze względu na fakt, iż coraz częściej zwracana jest uwaga na fakt występowania oporności krzyżowej na daptomycynę i endogenne peptydy przeciwdrobnoustrojowe u gronkowców złocistych [318]–[320].

4.9. Wpływ na formowanie biofilmu w przepływie

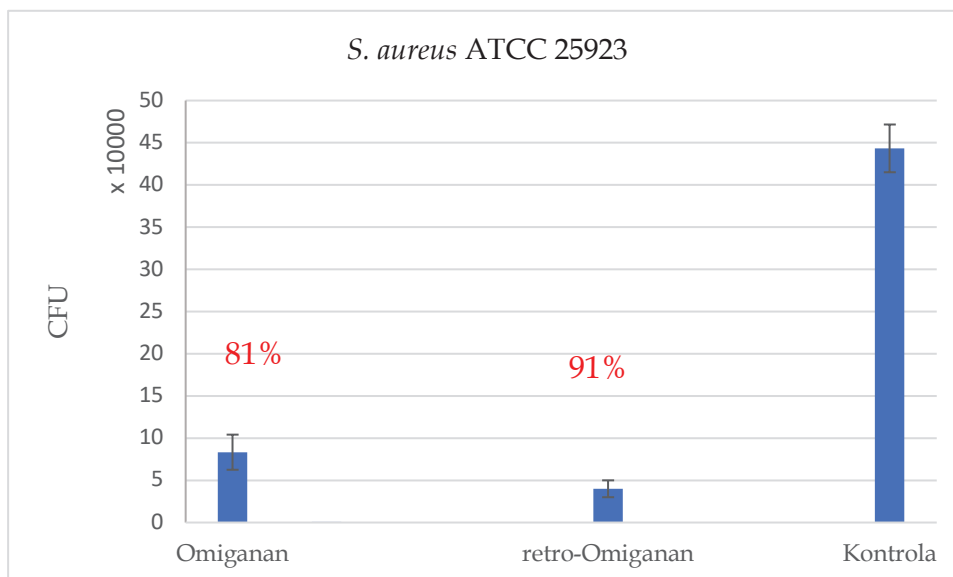
Niewątpliwie kluczowym aspektem walki z zakażeniami wywoływanymi przez wielooporne szczepy drobnoustrojów, w tym *S. aureus* jest przede wszystkim profilaktyka. W nawiązaniu do wytycznych Europejskiego Towarzystwa Mikrobiologii Klinicznej i Chorób Zakaźnych (ang. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, ESCMID) najważniejszym aspektem pozwalającym na efektywną walkę z zakażeniami szpitalnymi są działania prewencyjne oraz edukacja [321]. Wśród działań prewencyjnych wymienić należy odpowiednią politykę antybiotykową, zapewnienie adekwatnej infrastruktury, procedury zapobiegające rozprzestrzenianiu się patogenów. Jednakże, obok działań obejmujących obecnie funkcjonującą służbę zdrowia, kluczowe są również osiągnięcia zespołów naukowych mających na celu opracowywanie nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych oraz metod ich stosowania [322]–[324]. Dlatego też połączenie dwóch aspektów, tj. nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych oraz prewencji może doprowadzić do minimalizowania szerzenia się zakażeń powodowanych przez wielooporne drobnoustroje oraz zapobiegać rozwojowi oporności. Inkorporacja związków przeciwbakteryjnych do biomateriałów pozwala na zapobieganie kolonizacji oraz tworzeniu się biofilmu. W ramach badań w modelu przepływowym zbadano wpływ inkorporacji Omigananu i retro-Omigananu do wnętrza kanału z PDMS, by móc ocenić jak te związki mogą wpływać na formowanie się biofilmu w tym modelu badawczym. Ilość związanych peptydów oceniono przy zastosowaniu analiz RP-HPLC roztworu użytego do funkcjonalizacji, przed i po eksperymencie. Ilość związanych peptydów do wnętrza kanału (powierzchnia wewnętrzna ok. 100 mm²) przedstawiona została w Tabeli 21.

Tabela 21. Wyniki oznaczeń związania peptydów do powierzchni wewnątrz kanału z PDMS.

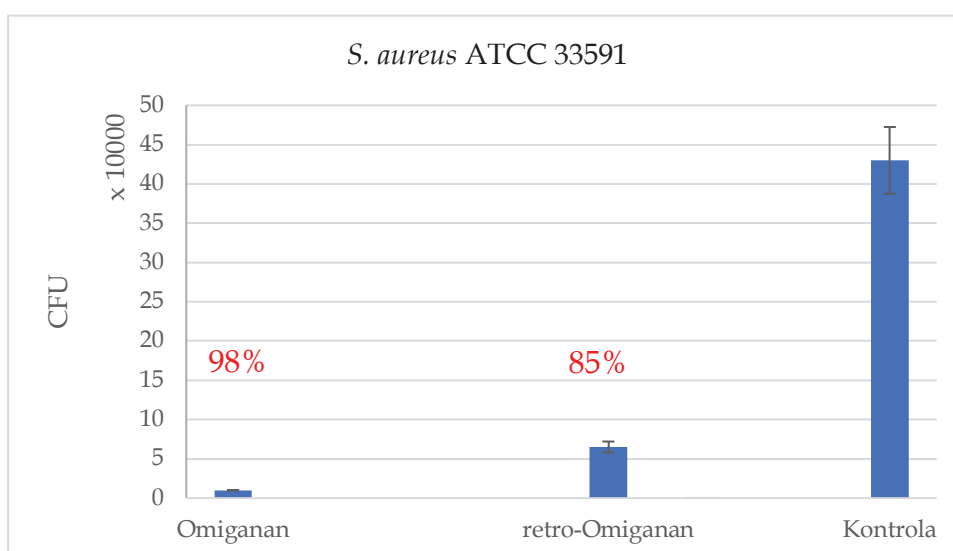
Peptyd	Ilość związanego związku [μg]
Omiganan	12,48 ± 0,22
Retro-Omiganan	12,35 ± 0,10

Przykładowo w pracy Klermunda i wsp. w badaniach nad inkorporacją 3 „kotwic peptydowych” niewykazujących jakichkolwiek aktywności przeciwdrobnoustrojowych ilość związanych peptydów do powierzchni PDMS wynosiła odpowiednio 6, 10 oraz 26% [325]. Z kolei w pracy Lima i wsp. związanie peptydu CWR11 (CWFWKWRRRRR-NH₂) poprzez powlekanie PDMS polidopaminą (tak jak w niniejszej pracy) ocenione zostało poprzez weryfikację morfologii powierzchni przy zastosowaniu mikroskopii sił atomowych oraz detekcję wiązań amidowych w badaniach spektroskopowych (ATR-FTIR) [325]. Pomimo, że oznaczenia te miały charakter jakościowy, to w badaniach tych kluczowym aspektem była ocena ilości kolonii bakteryjnych po 3 godzinach inkubacji w zawiesinach bakteryjnych *E. coli*, *P. aeruginosa* oraz *S. aureus*. W rezultacie, dla sfunkcjonalizowanych fragmentów PDMS peptydem CWR11 nie zaobserwowano wzrostu kolonii bakteryjnych w porównaniu do kontroli. Wadą wskazanego podejścia jest fakt, że ideą pracy było dalsze zastosowanie badanych peptydów do powlekania cewników donaczyniowych, a badania mikrobiologiczne zrealizowano w warunkach stacjonarnych. W badaniach zrealizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej zawiesiny bakterii *S. aureus* były przepuszczane przez kanał w sposób ciągły. Stąd też warunki badawcze dużo lepiej odwzorowywały tworzenie się biofilmu. Stopień redukcji ilości kolonii bakteryjnych dla badanych szczepów *S. aureus* oscylował między 81 a 98% (Ryciny 32 oraz 33). Wyniki analiz mikrobiologicznych wskazują zatem na wysoką skuteczność kanałów PDMS sfunkcjonalizowanych przez Omiganan i retro-Omiganan w zapobieganiu adhezji bakteryjnej. Dla szczepu *S. aureus* ATCC 25923 najskuteczniejszy okazał się retro-Omiganan, dla

którego stopień redukcji drobnoustrojów wynosił 91%. Dla szczepu *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA) najskuteczniejszy okazał się Omiganan, z redukcją drobnoustrojów równą 98%.



Rycina 32. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa powlekanych kanałów PDMS. Wykres przedstawia ilość kolonii bakterii *S. aureus* ATCC 25923 oznaczonych po inkorporacji. Nad słupkami przedstawiony został stopień redukcji (%) względem kontroli.



Rycina 33. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa powlekanych kanałów PDMS. Wykres przedstawia ilość kolonii bakterii *S. aureus* ATCC 33591 oznaczonych po inkorporacji. Nad słupkami przedstawiony został stopień redukcji (%) względem kontroli.

Uzyskane wyniki badań wskazują na wysoką skuteczność obu związków w zapobieganiu adhezji bakteryjnej. Jednocześnie nie da się wytypować związku o najwyższym potencjale. Mając na uwadze fakt, że (efektywna) ilość peptydu związana do powierzchni kanału jest wielokrotnie niższa niż ich stężenia toksyczne, decydująca może być aktywność nie tylko wobec *S. aureus*, lecz również innych drobnoustrojów. W przypadku retro-Omigananu podwyższona aktywność zaobserwowana została wobec szeregu drobnoustrojów, w tym *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, a także *Candida albicans*. Dodatkowo, dla obu związków nie zaobserwowano tendencji do rozwoju oporności wśród badanych szczepów stąd też wysoki potencjał aplikacyjny. Warto zaznaczyć, iż 1% formuła żelu chlorku Omigananu w 2009 roku zakończyła III fazę badań klinicznych mających na celu zapobieganie zakażeniom odcewnikowym [290]. Obecnie rekrutowani są pacjenci do II fazy badań klinicznych do miejscowego zastosowania 1,75% żelu Omigananu w terapii łojotokowego zapalenia skóry, których czynnikiem etiologicznym są drożdżopodobne grzyby z rodzaju *Malassezia furfur* (*Pityrosporum ovale*). Podwyższona aktywność retro-Omigananu wobec szerokiego wachlarza drobnoustrojów sugeruje, iż może mieć on jeszcze wyższy potencjał aplikacyjny od Omigananu. Jednakże dalsze, poszerzone prace powinny być dalej realizowane. Opracowany w ramach niniejszej pracy doktorskiej model przepływowego badania aktywności wobec biofilmu wydaje się być prostym i adekwatnym narzędziem do realizacji dalszych badań.

V. WNIOSKI

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przebadano szeroki panel szczepów klinicznych *S. aureus* oraz oceniono ich wrażliwość wobec antybiotyków konwencjonalnych i peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs). Dokładne poznanie aktywności oraz potencjału aplikacyjnego AMPs możliwe było dzięki realizacji szeregu badań mikrobiologicznych oraz analiz peptydów. Kluczowym aspektem badań były prace eksperymentalne w przepływowym modelu badawczym. Na podstawie wszystkich zrealizowanych prac oraz obserwacji wyciągnąć można następujące wnioski:

1. Wrażliwość szczepów *S. aureus* na AMPs jest niezależna od mechanizmów oporności na antybiotyki konwencjonalne. Tym samym w badaniach nad nowymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi istotne jest ujęcie szczepów referencyjnych.
2. Wymiana przeciwjonów w peptydach ogrywa znaczącą rolę dla ich aktywności przeciwegronkowcowej, jednakże dobór przeciwjonu w znacznej mierze zależy od badanego peptydu. Dlatego też decyzja o wymianie powinna być podparta dokładnymi analizami mikrobiologicznymi.
3. Ze wszystkich badanych AMPs najlepszymi właściwościami cechował się Omiganan oraz retro-Omiganan. Oba peptydy charakteryzowały się wysoką aktywnością wobec form planktonowych oraz biofilmu. Ponadto ze wszystkich badanych AMPs wykazywały najniższą toksyczność. Dodatkowo zweryfikowano, iż nie indukują one wystąpienia oporności po 10 pasażach.
4. Najwyższą aktywność wobec form planktonowych wykazywał octan Omigananu. Trifluorooctan retro-Omigananu najlepiej hamował rozwój biofilmu. Natomiast octan retro-Omigananu w najniższych stężeniach powodował eradykację biofilmu.
5. Retro-Omiganan jest 3-krotnie bardziej toksyczny od Omigananu w stosunku do linii komórkowej HaCaT.

6. Biofilm wytworzony w przepływie jest dużo bardziej odporny na eradykację przez Omiganan i retro-Omiganan ($MBEC_f > 256 \mu\text{g/ml}$) niż ten wytworzony w warunkach stacjonarnych.
7. Opracowano unikalny model badawczy pozwalający efektywnie badać wpływ różnych związków wobec biofilmu w warunkach przepływowych. Pozwolił on na badania eradykacji oraz wpływu długotrwałej ekspozycji na substancje przeciwdrobnoustrojowe.
8. Omiganan jak i retro-Omiganan nie wywoływały oporności przy długotrwałej ekspozycji biofilmu w przepływie.
9. Przepływowy model badawczy dodatkowo umożliwił realizację badań inkorporacji peptydów do powierzchni kanałów z PDMS. Opracowana w ten sposób metoda może z powodzeniem być stosowana przy opracowywaniu substancji do powlekania cewników.
10. Omiganan jak i retro-Omiganan inkorporowane do wnętrza kanału skutecznie hamowały rozwój biofilmu w przepływie. Dodatkowo ze względu na niską toksyczność wykazują one wysoki potencjał aplikacyjny przy opracowywaniu biomateriałów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

VI. STRESZCZENIE

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) jest gatunkiem bakterii chorobotwórczych odpowiedzialnym za szereg infekcji u ludzi i zwierząt. Częstość zakażeń *S. aureus* związany jest przede wszystkim z faktem, że ok. 30% społeczeństwa jest bezobjawowymi nosicielami tych bakterii, które w sprzyjających warunkach mogą powodować infekcje oportunistyczne. Heterogenny charakter tych zakażeń dodatkowo determinowany jest przez występowanie wielu szczepów, zróżnicowanych pod względem posiadanych czynników zjadliwości oraz mechanizmów oporności na antybiotyki. Niewątpliwie do najważniejszych z klinicznego punktu widzenia należą szczepy metycylinooporne (MRSA). Według raportów Światowej Organizacji Zdrowia bakterie te należą do szczególnej grupy patogenów, wobec których wymagane jest opracowanie nowych terapii przeciwdrobnoustrojowych.

Do najważniejszych infekcji powodowanych przez *S. aureus* należą zakażenia skóry i tkanek miękkich, zakażenia kości (*osteomyelitis*), krwi oraz infekcyjne zapalenie wsierdza (*endocarditis*). Ponadto gronkowce złociste wielokrotnie są przyczyną zakażeń szpitalnych będące powikłaniem po zabiegach lub stosowaniem biomateriałów. W ostatnim przypadku szczególną rolę odgrywa zdolność gronkowców do tworzenia biofilmu.

Biofilm jest to struktura, która może być zdefiniowana jako dobrze zorganizowana społeczność drobnoustrojów, związana z powierzchnią i otoczona macierzą pozakomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM). Bakterie związane z biofilmem, wykazują odmienny fenotyp, który zabezpiecza je przed działaniem czynników zewnętrznych takimi jak aktywność układu odpornościowego czy substancje przeciwdrobnoustrojowe. Niewątpliwie z tego względu najważniejszą i zarazem najbardziej kluczową z klinicznego punktu widzenia cechą biofilmu jest jego oporność na antybiotyki. Postuluje się, iż stężenia efektywne wobec tej struktury mogą być nawet 1000-krotnie wyższe w porównaniu do form planktonowych. Ponadto najnowsze dane epidemiologiczne wskazują, że ok. 80% przetrwałych i nawracających infekcji związanych jest z obecnością biofilmu.

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. *antimicrobial peptides*, AMPs) należą do substancji szeroko rozpowszechnionych w naturze i stanowią kluczową składową odporności nieswoistej u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Cechą charakterystyczną tych związków jest szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, która swym zasięgiem obejmuje zarówno bakterie, grzyby, pierwotniaki oraz wirusy. Ponadto, w odróżnieniu od klasycznych antybiotyków charakteryzują się wysoką aktywnością wobec biofilmu. Na ogół związki te posiadają do 50 reszt aminokwasowych i wykazują charakter amfifilowy. Ze względu na dużą zawartość reszt zasadowych takich jak arginina czy lizyna, AMPs wykazują wypadkowy ładunek dodatni co umożliwia m.in. wiązanie się z ujemnie naładowanymi błonami mikroorganizmów, doprowadzać do ich dezintegracji, a w efekcie prowadzić do lizy komórek. Mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego AMPs jest dwukierunkowy i opiera się na bezpośrednim zabijaniu drobnoustrojów oraz stymulacji układu odpornościowego. W wypadku tego pierwszego, niszczenie i dezintegracja błon komórkowych opiera się na początkowych oddziaływaniach AMPs z ich powierzchnią. Dlatego też, postuluje się, że rozwój oporności na peptydy przeciwdrobnoustrojowe może być utrudniony. Dzięki swojej budowie i właściwościom, możliwości syntezy chemicznej oraz łatwości modyfikacji, AMPs stanowią doskonałą matrycę do opracowywania nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych.

Celem pracy doktorskiej było zbadanie aktywności wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs) wobec biofilmu gronkowcowego w warunkach przepływowych. Przewagą tego podejścia jest to, iż pozwalają na formowanie oraz badanie biofilmu w warunkach kontrolowanych. Możliwe jest regulowanie m.in. temperatury, dostępu do substancji odżywczych (pożywki) oraz szybkości przepływu. Ponadto udowodniono, że cyrkulacja cieczy indukuje powstanie sił ścinających na granicy ciecz-biofilm, co wpływa na wielkość biofilmu, jego kształt oraz ilość ECM. W rezultacie, to w jakich warunkach zostanie on uformowany może przekładać się na jego oporność na substancje przeciwdrobnoustrojowe. Modulowanie charakterystyki biofilmu poprzez

zastosowanie przepływu cieczy w znacznym stopniu pozwala na odtworzenie warunków spotykanych *in vivo*. Realizacja celu pracy poprzedzona została dokładnymi analizami mikrobiologicznymi wobec szeregu syntetycznych związków, a do badań wykorzystano referencyjne jak i kliniczne szczepy *S. aureus*.

W pierwszym etapie scharakteryzowano szeroki wachlarz szczepów klinicznych pod kątem wrażliwości na antybiotyki konwencjonalne oraz wybrane AMPs takie jak CAMEL, Citropina 1.1, LL-37, Pexiganan oraz Temporyna A. Udowodniono, że wrażliwość szczepów *S. aureus* na AMPs jest niezależna od mechanizmów oporności na antybiotyki, dzięki czemu zasadne było wytypowanie reprezentatywnej grupy szczepów, wobec których realizowane były dalsze prace. W kolejnym etapie zweryfikowano wpływ wymiany przeciwnionów w peptydach oraz oceniono aktywność analogów o odwróconej sekwencji. Na podstawie badań mikrobiologicznych oznaczeń cytotoksyczności wobec ludzkich erytrocytów (stopień hemolizy) oraz linii komórkowej keratynocytów ludzkich (HaCaT) udało się wytypować AMPs o najwyższym potencjale. Związkami wykazującymi najlepsze właściwości okazał się Omiganan, analog Indolicydyny – peptydu pozyskanego z ziarnistości neutrofilów bydlęcych oraz jego analog o odwróconej sekwencji (retro-Omiganan).

W ramach pracy doktorskiej dodatkowo opracowano unikalne układy przepływowe z poli(dimetylosiloksanu) (PDMS), które umożliwiły ocenę eradykacji biofilmu utworzonego w przepływie, realizację badań wpływu długotrwałej ekspozycji peptydów na profil wrażliwości *S. aureus* oraz weryfikację czy inkorporacja Omigananu i retro-Omigananu do wnętrza kanału zahamuje rozwój biofilmu *S. aureus* w przepływie. Wyniki badań mikrobiologicznych ostatecznie potwierdziły wysoki potencjał obu związków oraz opracowana została metodyka badawcza pozwalająca na realizację badań w przepływie dla innych związków.

VII. SUMMARY

Staphylococcus aureus is considered one of the leading pathogens responsible for a number of infections in humans and animals. The incidence of *S. aureus* is mainly related to the fact that about 30% of the population is asymptomatic carriers of these bacteria, which in favorable conditions can cause opportunistic infections. The heterogeneous nature of these infections is further determined by the occurrence of multiple strains, differentiated by several virulence factors and mechanisms of antibiotic resistance. Undoubtedly, the most important of the clinical point of view are the methicillin-resistant strains (MRSA). According to reports of the World Health Organization, the MRSA belong to a particular group of pathogens, which require the development of new antimicrobial therapies.

Skin and soft-tissue infections (SSTIs) are the most frequent ones associated with the presence of *S. aureus*. However, these bacteria can lead to osteomyelitis, bacteremia, bloodstream infections, endocarditis, or even sepsis. Moreover, *S. aureus* is responsible for several nosocomial infections which often occur as a complication of surgery or use of biomaterials. Furthermore, in the latter case, the ability to form biofilm plays a pivotal role.

Biofilm is a structure that can be defined as a well-organized microbial community, associated with the surface and surrounded by an extracellular matrix (ECM). Biofilm-associated bacteria exhibit a different phenotype that protects them from external factors such as activity of immune system or antimicrobial substances. Nevertheless, the most important and at the same time the most critical characteristic of the biofilm is enhanced resistance to antibiotics. It is indicated that the concentrations effective against this structure can be up to 1000-times higher compared to planktonic forms. In addition, the latest epidemiological data highlight that approximately 80% of persistent and recurrent infections are associated with the presence of the biofilm.

Antimicrobial peptides (*antimicrobial peptides*, AMPs) are compounds widely distributed in nature being a key component of non-specific immunity in prokaryotic and eukaryotic organisms. They are characterized by wide spectrum of antimicrobial activity, which covers both bacteria, fungi, protozoa and viruses. Moreover, they are characterized by high activity against biofilm. Naturally occurring AMPs can vary in size and most of them do not have more than 50 amino acids in sequence. The majority are cationic molecules containing about 50% of hydrophobic amino acids. Such properties allow them to electrostatically interact with a negatively charged bacterial surface, which leads to disruption of a cell membrane, and thus cell lysis. The anti-microbial mechanism of AMPs is bidirectional and is based on the direct killing of microorganisms and stimulation of the immune system. Therefore, it is postulated that the development of resistance to the AMPs may be hindered. As a matter of fact, the amino acid-based structure as well as approaches of chemical synthesis indicate that AMPs are an excellent matrix for new antimicrobials development.

The aim of the doctoral thesis was to investigate the activity of selected (AMPs) against *S. aureus* under flow conditions. The advantage of this approach is that it allows the formation and examination of the biofilm under controlled conditions. It is possible to regulate the temperature, access to nutrients (culture medium) and flow velocity. In addition, it is proved that the circulation of liquids induces the formation of shear forces at the boundary of the liquid-biofilm, which influences the size of the structure, its shape and the quantity of the ECM as well. This should be noted that above mentioned factors are critical for antimicrobial resistance. Moreover, the modulation of the biofilm characteristics by flow conditions allows to reproduce the conditions encountered *in vivo*. The objective of the work was preceded by thorough microbiological analyses of a number of synthetic compounds, and the reference as well as clinical strains of *S. aureus*.

In the first phase, a wide range of clinical strains was characterized in terms of susceptibility to conventional antibiotics and selected AMPs such as CAMEL, Citropin 1.1, LL-37, Pexiganan and Temporin A. This should be noted that the

susceptibility profile of tested strains has indicated that the bactericidal activity of AMPs is independent of mechanism of resistance. As a result, it was easier to predict a representative group of strains for which further experiments has been carried out. In the next stage, the effect of counter-ion exchange in peptides was verified and the activity of analogs with reversed-sequence was evaluated (*retro analog concept*).

Based on previous microbiological studies and the cytotoxicity determinations against human erythrocytes and cell line of keratinocytes (HaCaT), it was possible to choose the compounds AMPs with the highest potential. Among all peptides, the Omiganan, an analogue of Indolicin, a peptide derived from bovine neutrophil granules and its retro analog (retro-Omiganan) were indicated as the most potent ones.

During the experiments carried out for the doctoral thesis the unique flow systems made of polydimethylsiloxane (PDMS) were developed. These systems enabled the evaluation of biofilm eradication under flow conditions and the implementation of the effect of long-term exposure of peptides as well as its impact on susceptibility profile of *S. aureus*. Moreover, it allowed verification whether the incorporation of Omiganan and retro-Omiganan into the channels will inhibit the development of *S. aureus* biofilm under flow conditions.

The results of the microbiological tests ultimately confirmed the high potential of the Omiganan and retro-Omiganan against *S. aureus* and its biofilm. Moreover, the developed research methodology allows the implementation of the studies under flow conditions for other compounds.

VIII. LITERATURA

- [1] E. M. Szewczyk, *Diagnostyka Bakteriologiczna*, 2nd ed. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA, 2005.
- [2] A. Ogston, "Micrococcus Poisoning," *J. Anat. Physiol.*, vol. 17, no. Pt 1, pp. 24–58, Oct. 1882.
- [3] F. J. Rosenbach, *Mikro-Organismen bei den Wund-Infections-Krankheiten des Menschen*. Würzburg: Wiesbaden J.F. Bergmann, 1884.
- [4] S. T. Cowan, C. Shaw, and R. E. O. Williams, "Type Strain for *Staphylococcus aureus* Rosenbach," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 10, no. 1, pp. 174–176, Feb. 1954.
- [5] G. Licitra, "Etymologia: *Staphylococcus*," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 9, Sep. 2013.
- [6] H. Wertheim *et al.*, "The role of nasal carriage in infections," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 5, no. 12, pp. 751–762, 2005.
- [7] A. van Belkum *et al.*, "Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 9, no. 1, pp. 32–47, Jan. 2009.
- [8] J. M. Boyce, G. Potter-Bynoe, C. Chenevert, and T. King, "Environmental Contamination Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Possible Infection Control Implications," *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, vol. 18, no. 9, pp. 622–627, Sep. 1997.
- [9] L. G. Miller and B. A. Diep, "Colonization, Fomites, and Virulence: Rethinking the Pathogenesis of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 46, no. 5, pp. 752–760, Mar. 2008.
- [10] M. P. Jevons, "'Celbenin' - resistant *Staphylococci*," *BMJ*, vol. 1, no. 5219, pp. 124–125, Jan. 1961.
- [11] E. Carretto, R. Visiello, and P. Nardini, "Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*," *Pet-to-Man Travel. Staphylococci A World Prog.*, vol. 4, no. May, pp. 225–235, 2018.
- [12] H. F. Chambers and F. R. DeLeo, "Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 9, pp. 629–641, 2009.
- [13] L. Loeb, "The Influence of certain Bacteria on the Coagulation of the Blood," *J. Med. Res.*, vol. 10, no. 3, pp. 407–19, Dec. 1903.
- [14] L. Wang *et al.*, "A coagulase-negative and non-haemolytic strain of *Staphylococcus aureus* for investigating the roles of SrtA in a murine model of bloodstream infection," *Pathog. Dis.*, vol. 73, no. 6, p. ftv042, Aug. 2015.
- [15] W. Kmiecik and E. M. Szewczyk, "Gatunki koagulazododatnie rodzaju *Staphylococcus* - Taksonomia, chorobotwórczość," *Postep. Mikrobiol.*, vol. 56, no. 2, pp. 233–244, 2017.
- [16] H. Tse, H. W. Tsoi, S. P. Leung, S. K. P. Lau, P. C. Y. Woo, and K. Y. Yuen, "Complete genome sequence of *Staphylococcus lugdunensis* strain HKU09-01," *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 5, pp. 1471–1472, 2010.
- [17] S. R. Gill *et al.*, "Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant," *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 7, pp. 2426–2438, 2005.
- [18] M. Kuroda *et al.*, "Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 37, pp. 13272–13277, Sep. 2005.
- [19] T. Czekaj, M. Ciszewski, and E. M. Szewczyk, "*Staphylococcus haemolyticus* - An emerging threat in the twilight of the antibiotics age," *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 161, no. 11, pp. 2061–2068, 2015.
- [20] R. Rosenstein and F. Götz, "What Distinguishes Highly Pathogenic *Staphylococci* from Medium- and Non-pathogenic?," in *Between Pathogenicity and Commensalism*, U. Dobrindt, J. H. Hacker, and C. Svanborg, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 33–89.
- [21] E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi, D. Kattula, and F. Burkert, "Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics," 2018.
- [22] B. Krawczyk and J. Kur, *Molecular Identification and Genotyping of Staphylococci: Genus, Species, Strains, Clones, Lineages, and Interspecies Exchanges*. Elsevier Inc., 2018.

- [23] I. Sedlacek, *Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi*, no. January. 2010.
- [24] A. M. Simoons-Smit, P. H. M. Savelkoul, J. Stoof, T. M. Starink, and C. M. J. Vandenbroucke-Grauls, "Transmission of *Staphylococcus aureus* between humans and domestic animals in a household," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 2, pp. 150–152, 2000.
- [25] E. J. Choo, "Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Nosocomial Infections," *Infect. Chemother.*, vol. 49, no. 2, pp. 158–159, 2017.
- [26] B. N. Green, C. D. Johnson, J. T. Egan, M. Rosenthal, E. A. Griffith, and M. W. Evans, "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview for manual therapists().," *J. Chiropr. Med.*, vol. 11, no. 1, pp. 64–76, 2012.
- [27] V. Ki and C. Rotstein, "Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care.," *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. = J. Can. des Mal. Infect. la Microbiol. medicale*, vol. 19, no. 2, pp. 173–84, Mar. 2008.
- [28] J. J. Bartoszko, D. Mertz, L. Thabane, and M. Loeb, "Antibiotic therapy for skin and soft tissue infections: a protocol for a systematic review and network meta-analysis," *Syst. Rev.*, vol. 7, no. 1, p. 138, Dec. 2018.
- [29] S. Esposito, S. Noviello, F. De Caro, and G. Boccia, "New insights into classification, epidemiology and microbiology of SSTIs, including diabetic foot infections.," *Infez. Med.*, vol. 26, no. 1, pp. 3–14, Mar. 2018.
- [30] G. Poulakou, E. Giannitsioti, and S. Tsiodras, "What is new in the management of skin and soft tissue infections in 2016?," *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 30, no. 2, pp. 158–171, Apr. 2017.
- [31] A. Khan, B. Wilson, and I. M. Gould, "Current and future treatment options for community-associated MRSA infection," *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 19, no. 5, pp. 457–470, Mar. 2018.
- [32] F. D. Lowy, "*Staphylococcus aureus* Infections," *N. Engl. J. Med.*, vol. 339, no. 8, pp. 520–532, 1998.
- [33] S. Y. C. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, V. G. Fowler, and Jr, "Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 28, no. 3, pp. 603–61, Jul. 2015.
- [34] I.-K. Wang *et al.*, "Bacteremia in Hemodialysis and Peritoneal Dialysis Patients," *Intern. Med.*, vol. 51, no. 9, pp. 1015–1021, 2014.
- [35] A. J. Kallen *et al.*, "Health care-associated invasive MRSA infections, 2005-2008," *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, 2010.
- [36] S. J. van Hal, S. O. Jensen, V. L. Vaska, B. A. Espedido, D. L. Paterson, and I. B. Gosbell, "Predictors of mortality in staphylococcus aureus bacteremia," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 25, no. 2, pp. 362–386, 2012.
- [37] M. V. Larsen *et al.*, "Major but differential decline in the incidence of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in HIV-infected individuals from 1995 to 2007: A nationwide cohort study," *HIV Med.*, vol. 13, no. 1, pp. 45–53, 2012.
- [38] T. L. Lamagni, N. Potz, D. Powell, R. Pebody, J. Wilson, and G. Duckworth, "Mortality in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia, England 2004-2005," *J. Hosp. Infect.*, 2011.
- [39] R. M. Klevens *et al.*, "Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States," *J. Am. Med. Assoc.*, 2007.
- [40] M. D. Burkey, L. E. Wilson, R. D. Moore, G. M. Lucas, J. Francis, and K. A. Gebo, "The incidence of and risk factors for MRSA bacteraemia in an HIV-infected cohort in the HAART era," *HIV Med.*, vol. 9, no. 10, pp. 858–862, 2008.
- [41] D. Nowicka and E. Grywalska, "*Staphylococcus aureus* and Host Immunity in Recurrent Furunculosis," *Rev. Artic. Dermatology*, vol. 235, pp. 295–305, 2019.
- [42] G. K. Stasiak M., Lasek J., Witkowski Z., Marks W., "Wybrane Problemy Kliniczne," *Forum Med. Rodz.*, no. 4, pp. 191–200, 2012.
- [43] I. Błażewicz *et al.*, "Activity of antimicrobial peptides and conventional antibiotics against superantigen positive *Staphylococcus aureus* isolated from patients with atopic dermatitis," *Adv. Dermatology Allergol. Adv Dermatol Allergol*, vol. 1, no. 1, pp. 74–82, 2018.

- [44] V. Petry *et al.*, "Bacterial skin colonization and infections in patients with atopic dermatitis," *An. Bras. Dermatol.*, vol. 87, no. 5, pp. 729–734, Oct. 2012.
- [45] C. Dunyach-Remy, C. Ngba Essebe, A. Sotto, and J.-P. Lavigne, "Staphylococcus aureus Toxins and Diabetic Foot Ulcers: Role in Pathogenesis and Interest in Diagnosis," *Toxins (Basel)*, vol. 8, no. 7, p. 209, Jul. 2016.
- [46] G. Viquez-Molina, J. Aragón-Sánchez, C. Pérez-Corrales, C. Murillo-Vargas, M. E. López-Valverde, and B. A. Lipsky, "Virulence Factor Genes in Staphylococcus aureus Isolated From Diabetic Foot Soft Tissue and Bone Infections," *Int. J. Low. Extrem. Wounds*, vol. 17, no. 1, pp. 36–41, Mar. 2018.
- [47] A. K. C. Leung, B. Barankin, and K. F. Leong, "Staphylococcal-scalded skin syndrome: evaluation, diagnosis, and management," *World J. Pediatr.*, vol. 14, no. 2, pp. 116–120, Apr. 2018.
- [48] D. Jeyakumari, R. Gopal, M. Eswaran, and C. MaheshKumar, "Staphylococcal scalded skin syndrome in a newborn," *J. Glob. Infect. Dis.*, vol. 1, no. 1, p. 45, Jan. 2009.
- [49] A. K. Mishra, P. Yadav, and A. Mishra, "A Systemic Review on Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS): A Rare and Critical Disease of Neonates," *Open Microbiol. J.*, vol. 10, no. 1, pp. 150–159, Aug. 2016.
- [50] M. Z. David and R. S. Daum, "Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 23, no. 3, pp. 616–87, Jul. 2010.
- [51] M. Otto, "Community-associated MRSA: What makes them special?," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 303, no. 6–7, pp. 324–330, Aug. 2013.
- [52] F. R. DeLeo, M. Otto, B. N. Kreiswirth, and H. F. Chambers, "Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus," *Lancet*, vol. 375, no. 9725, pp. 1557–1568, 2010.
- [53] V. G. J. Fowler *et al.*, "Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress," *JAMA*, vol. 293, no. 24, pp. 3012–3021, Jun. 2005.
- [54] I. M. Tleyjeh *et al.*, "A Systematic Review of Population-Based Studies of Infective Endocarditis," *Chest*, vol. 132, no. 3, pp. 1025–1035, Sep. 2007.
- [55] P. Gajewski, *Interna Szczeklika*, 9th ed. Kraków: Medycyna Praktyczna, 2018.
- [56] A. Wang *et al.*, "Contemporary clinical profile and outcome of prosthetic valve endocarditis," *J. Am. Med. Assoc.*, 2007.
- [57] O. Murillo *et al.*, "The changing epidemiology of bacteraemic osteoarticular infections in the early 21st century," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 21, no. 3, pp. 254.e1–254.e8, Mar. 2015.
- [58] K. Tafin-Kampé and B. Kamsu-Foguem, "Acute osteomyelitis due to Staphylococcus aureus in children: What is the status of treatment today?," *Pediatr. Infect. Dis.*, vol. 5, no. 3, pp. 122–126, Jul. 2013.
- [59] J. Josse, F. Velard, and S. C. Gangloff, "Staphylococcus aureus vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 5, p. 85, Nov. 2015.
- [60] N. Kavanagh *et al.*, "Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 31, no. 2, pp. e00084–17, Apr. 2018.
- [61] M. E. Olson and A. R. Horswill, "Staphylococcus aureus Osteomyelitis: Bad to the Bone," 2013.
- [62] E. Beam and D. Osmon, "Prosthetic Joint Infection Update," *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 32, no. 4, pp. 843–859, Dec. 2018.
- [63] A. J. Tande and R. Patel, "Prosthetic joint infection," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 27, no. 2, pp. 302–45, Apr. 2014.
- [64] J. J. Ross, "Septic Arthritis of Native Joints," *Infect. Dis. Clin. North Am.*, vol. 31, no. 2, pp. 203–218, Jun. 2017.
- [65] F. A. Waldvogel, G. Medoff, and M. N. Swartz, "Osteomyelitis: A Review of Clinical Features, Therapeutic Considerations and Unusual Aspects," *N. Engl. J. Med.*, vol. 282, no. 4, pp. 198–206, Jan. 1970.
- [66] R. L. Floyed and R. W. Steele, "Culture-negative osteomyelitis," *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 22, no. 8, pp. 731–6, Aug. 2003.
- [67] K. Gutierrez, "Bone and Joint Infections in Children," *Pediatr. Clin. North Am.*, vol. 52, no. 3, pp. 779–794, Jun. 2005.

- [68] D. P. Lew and F. A. Waldvogel, "Osteomyelitis," *Lancet*, vol. 364, no. 9431, pp. 369–379, Jul. 2004.
- [69] N. S. Harik and M. S. Smeltzer, "Management of acute hematogenous osteomyelitis in children," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 8, no. 2, pp. 175–81, Feb. 2010.
- [70] S. H. Sheehy *et al.*, "The microbiology of chronic osteomyelitis: prevalence of resistance to common empirical anti-microbial regimens," *J. Infect.*, vol. 60, no. 5, pp. 338–43, May 2010.
- [71] C. J. E. Kaandorp, D. Van Schaardenburg, P. Krijnen, J. D. F. Habbema, and M. A. F. J. Van De Laar, "Risk factors for septic arthritis in patients with joint disease," *Arthritis Rheum.*, vol. 38, no. 12, pp. 1819–1825, Dec. 1995.
- [72] V. C. Weston, A. C. Jones, N. Bradbury, F. Fawthrop, and M. Doherty, "Clinical features and outcome of septic arthritis in a single UK Health District 1982-1991," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 58, no. 4, pp. 214–9, Apr. 1999.
- [73] C. J. Kaandorp, H. J. Dinant, M. A. van de Laar, H. J. Moens, A. P. Prins, and B. A. Dijkmans, "Incidence and sources of native and prosthetic joint infection: a community based prospective survey," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 56, no. 8, pp. 470–5, Aug. 1997.
- [74] M. E. Margaretten, J. Kohlwes, D. Moore, and S. Bent, "Does This Adult Patient Have Septic Arthritis?," *JAMA*, vol. 297, no. 13, pp. 1478–1488, Apr. 2007.
- [75] C. Li, N. Renz, and A. Trampuz, "Management of Periprosthetic Joint Infection," *Hip pelvis*, vol. 30, no. 3, pp. 138–146, Sep. 2018.
- [76] E. F. Berbari *et al.*, "Risk Factors for Prosthetic Joint Infection: Case-Control Study," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 27, no. 5, pp. 1247–1254, Nov. 1998.
- [77] T. N. Peel, M. M. Dowsey, J. R. Daffy, P. A. Stanley, P. F. M. Choong, and K. L. Buising, "Risk factors for prosthetic hip and knee infections according to arthroplasty site," *J. Hosp. Infect.*, vol. 79, no. 2, pp. 129–33, Oct. 2011.
- [78] E. F. Berbari *et al.*, "The Mayo Prosthetic Joint Infection Risk Score: Implication for Surgical Site Infection Reporting and Risk Stratification," *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, vol. 33, no. 8, pp. 774–781, Aug. 2012.
- [79] D. Bouras *et al.*, "Staphylococcus aureus osteoarticular infections in children: an 8-year review of molecular microbiology, antibiotic resistance and clinical characteristics," *J. Med. Microbiol.*, vol. 67, no. 12, pp. 1753–1760, Dec. 2018.
- [80] O. Alzomor, T. Alfawaz, and D. Alshahrani, "Invasive community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA) infection in children: case series and literature review," *Int. J. Pediatr. Adolesc. Med.*, vol. 4, no. 3, pp. 119–123, Sep. 2017.
- [81] S. L. Kaplan, "Recent lessons for the management of bone and joint infections," *J. Infect.*, vol. 68 Suppl 1, pp. S51–6, Jan. 2014.
- [82] H. Peltola and M. Pääkkönen, "Acute Osteomyelitis in Children," *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, no. 4, pp. 352–360, Jan. 2014.
- [83] C. F. Farver, "Foundations in Diagnostic Pathology," in *Pulmonary Pathology*, 2nd ed., Content Repository Only!, 2018, pp. 163–200.
- [84] A. Torres, R. Menéndez, and R. G. Wunderink, "Bacterial Pneumonia and Lung Abscess," *Murray Nadel's Textb. Respir. Med.*, pp. 557–582.e22, Jan. 2016.
- [85] D. E. Morris, D. W. Cleary, and S. C. Clarke, "Secondary Bacterial Infections Associated with Influenza Pandemics," *Front. Microbiol.*, vol. 8, p. 1041, 2017.
- [86] N. Safdar, C. J. Crnich, and D. G. Maki, "The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention," *Respir. Care*, vol. 50, no. 6, pp. 725–39; discussion 739–41, Jun. 2005.
- [87] J. C. Hurley, "Unusually High Incidences of Staphylococcus aureus Infection within Studies of Ventilator Associated Pneumonia Prevention Using Topical Antibiotics: Benchmarking the Evidence Base," *Microorganisms*, vol. 6, no. 1, Jan. 2018.
- [88] "Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 171, no. 4, pp. 388–416, Feb. 2005.
- [89] P. Alter, S. Waldhans, E. Plachta, R. Moosdorf, and W. Grimm, "Complications of implantable cardioverter defibrillator therapy in 440 consecutive patients," *Pacing Clin. Electrophysiol.*, vol. 28, no. 9, pp. 926–32, Sep. 2005.
- [90] C. H. Cabell *et al.*, "Increasing rates of cardiac device infections among medicare beneficiaries: 1990–1999," *Am. Heart J.*, vol. 147, no. 4, pp. 582–586, Apr. 2004.

- [91] A. J. Greenspon *et al.*, "16-Year Trends in the Infection Burden for Pacemakers and Implantable Cardioverter-Defibrillators in the United States: 1993 to 2008," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 58, no. 10, pp. 1001-1006, Aug. 2011.
- [92] S. A. Maskarinec, J. T. Thaden, D. D. Cyr, F. Ruffin, M. Souli, and V. G. Fowler, "The Risk of Cardiac Device-Related Infection in Bacteremic Patients Is Species Specific: Results of a 12-Year Prospective Cohort.," *Open forum Infect. Dis.*, vol. 4, no. 3, p. ofx132, 2017.
- [93] D. Z. Uslan *et al.*, "Cardiovascular implantable electronic device infection in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia.," *Pacing Clin. Electrophysiol.*, vol. 33, no. 4, pp. 407-13, Apr. 2010.
- [94] M. B. Salzman, H. D. Isenberg, J. F. Shapiro, P. J. Lipsitz, and L. G. Rubin, "A Prospective Study of the Catheter Hub as the Portal of Entry for Microorganisms Causing Catheter-Related Sepsis in Neonates," *J. Infect. Dis.*, vol. 167, no. 2, pp. 487-490, Feb. 1993.
- [95] M. De Cicco *et al.*, "Source and route of microbial colonisation of parenteral nutrition catheters," *Lancet*, vol. 334, no. 8674, pp. 1258-1261, Nov. 1989.
- [96] P. Zhang, J.-H. Lei, X.-J. Su, and X.-H. Wang, "Ethanol locks for the prevention of catheter-related bloodstream infection: a meta-analysis of randomized control trials," *BMC Anesthesiol.*, vol. 18, no. 1, p. 93, Dec. 2018.
- [97] E. L. Larson, D. Quiros, and S. X. Lin, "Dissemination of the CDC's Hand Hygiene Guideline and impact on infection rates.," *Am. J. Infect. Control*, vol. 35, no. 10, pp. 666-75, Dec. 2007.
- [98] J. M. Boyce, D. Pittet, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee, and HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force, "Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force.," *Am. J. Infect. Control*, vol. 30, no. 8, pp. S1-46, Dec. 2002.
- [99] F. Alby-Laurent *et al.*, "Salvage Strategy for Long-Term Central Venous Catheter-Associated *Staphylococcus aureus* Infections in Children.," *Front. Pediatr.*, vol. 6, p. 427, 2018.
- [100] K. B. Laupland, T. Ross, and D. B. Gregson, "*Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections: Risk Factors, Outcomes, and the Influence of Methicillin Resistance in Calgary, Canada, 2000-2006," *J. Infect. Dis.*, vol. 198, no. 3, pp. 336-343, Aug. 2008.
- [101] Y. Zboromyrska *et al.*, "Rapid Diagnosis of Staphylococcal Catheter-Related Bacteraemia in Direct Blood Samples by Real-Time PCR.," *PLoS One*, vol. 11, no. 8, p. e0161684, 2016.
- [102] S. J. van Hal, S. O. Jensen, V. L. Vaska, B. A. Espedido, D. L. Paterson, and I. B. Gosbell, "Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 25, no. 2, pp. 362-86, Apr. 2012.
- [103] J. H. Song *et al.*, "Salvage of Infected Breast Implants.," *Arch. Plast. Surg.*, vol. 44, no. 6, pp. 516-522, Nov. 2017.
- [104] P. Seng, S. Bayle, A. Alliez, F. Romain, D. Casanova, and A. Stein, "The microbial epidemiology of breast implant infections in a regional referral centre for plastic and reconstructive surgery in the south of France," *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 35, pp. 62-66, Jun. 2015.
- [105] S. Franchelli, M. Pesce, I. Baldelli, A. Marchese, P. Santi, and A. De Maria, "Analysis of clinical management of infected breast implants and of factors associated to successful breast pocket salvage in infections occurring after breast reconstruction," *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 71, pp. 67-72, Jun. 2018.
- [106] E. S. Ruff, T. Hirase, and M. J. Rude, "Evaluation of Antibiotic-Impregnated Mesh in Preventing the Recurrence of Capsular Contracture," *Aesthetic Surg. J.*, vol. 39, no. 5, pp. 509-515, Apr. 2019.
- [107] R. O. Darouiche, R. Meade, M. D. Mansouri, and D. T. Netscher, "In vivo efficacy of antimicrobe-impregnated saline-filled silicone implants.," *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 109, no. 4, pp. 1352-7, Apr. 2002.
- [108] A. L. Wilkins, A. C. Steer, P. R. Smeesters, and N. Curtis, "Toxic shock syndrome – the seven Rs of management and treatment," 2017.
- [109] K. Hisanaga *et al.*, "Toxic Shock Syndrome Caused by Staphylococcal Infection After Breast Implant Surgery," *Ann. Plast. Surg.*, vol. 83, no. 3, pp. 359-362, Sep. 2019.
- [110] M. Haque, M. Sartelli, J. McKimm, and M. Abu Bakar, "Health care-associated infections

- an overview.," *Infect. Drug Resist.*, vol. 11, pp. 2321–2333, 2018.
- [111] J.-L. Vincent, "Nosocomial infections in adult intensive-care units.," *Lancet (London, England)*, vol. 361, no. 9374, pp. 2068–77, Jun. 2003.
- [112] W. H. O. (WHO), "Healthcare-associated infections. Fact Sheet," 2018. [Online]. Available: http://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf.
- [113] B. Allegranzi *et al.*, "Global infection prevention and control priorities 2018-22: a call for action.," *Lancet. Glob. Heal.*, vol. 5, no. 12, pp. e1178–e1180, Dec. 2017.
- [114] A. Cassini *et al.*, "Burden of Six Healthcare-Associated Infections on European Population Health: Estimating Incidence-Based Disability-Adjusted Life Years through a Population Prevalence-Based Modelling Study," *PLOS Med.*, vol. 13, no. 10, p. e1002150, Oct. 2016.
- [115] T. Islam, K. Kubra, and M. M. Hassan Chowdhury, "Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitals in Chittagong, Bangladesh: A Threat of Nosocomial Infection.," *J. Microsc. Ultrastruct.*, vol. 6, no. 4, pp. 188–191, 2018.
- [116] R. Valaperta *et al.*, "Staphylococcus aureus nosocomial infections: the role of a rapid and low-cost characterization for the establishment of a surveillance system," 2010.
- [117] R. Valaperta *et al.*, "Staphylococcus aureus nosocomial infections: the role of a rapid and low-cost characterization for the establishment of a surveillance system.," *New Microbiol.*, vol. 33, no. 3, pp. 223–32, Jul. 2010.
- [118] S. S. Magill *et al.*, "Prevalence of Healthcare-Associated Infections in Acute Care Hospitals in Jacksonville, Florida," *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, vol. 33, no. 3, pp. 283–291, Mar. 2012.
- [119] G. P. Nikolaras *et al.*, "Changes in the rates and population structure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from bloodstream infections: A single-centre experience (2000–2015)," *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, vol. 17, pp. 117–122, Jun. 2019.
- [120] T. S. Kramer *et al.*, "Decrease of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* in nosocomial infections in Germany-a prospective analysis over 10 years.," *J. Infect.*, vol. 78, no. 3, pp. 215–219, Mar. 2019.
- [121] J. Bien, O. Sokolova, and P. Bozko, "Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response.," *J. Pathog.*, vol. 2011, p. 601905, 2011.
- [122] E. Azara, C. Longheu, G. Sanna, and S. Tola, "Biofilm formation and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* isolates collected from ovine mastitis," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 123, no. 2, pp. 372–379, Aug. 2017.
- [123] S. Perkins, E. J. Walsh, C. C. S. Deivanayagam, S. V. L. Narayana, T. J. Foster, and M. Höök, "Structural Organization of the Fibrinogen-binding Region of the Clumping Factor B MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 48, pp. 44721–44728, Nov. 2001.
- [124] R. F. Padera, "Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm," *Cardiovasc. Pathol.*, vol. 15, no. 5, pp. 264–270, Sep. 2006.
- [125] C. R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, and J. W. Costerton, "Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials," *Biomaterials*, vol. 33, no. 26, pp. 5967–5982, Sep. 2012.
- [126] J. Bien, O. Sokolova, and P. Bozko, "Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response.," *J. Pathog.*, vol. 2011, p. 601905, 2011.
- [127] E. L. Fisher, M. Otto, and G. Y. C. Cheung, "Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning," *Front. Microbiol.*, vol. 9, p. 436, Mar. 2018.
- [128] M. Otto, "Staphylococcus aureus toxins.," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 17, pp. 32–7, Feb. 2014.
- [129] M. Bukowski, B. Wladyka, and G. Dubin, "Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*," *Toxins (Basel)*, vol. 2, no. 5, pp. 1148–65, 2010.
- [130] T. J. Foster, "Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 41, no. 3, pp. 430–449, May 2017.
- [131] H. F. Chambers and F. R. Deleo, "Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the

- antibiotic era," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 9, pp. 629–41, Sep. 2009.
- [132] D. Zeng *et al.*, "Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 6, no. 12, p. a026989, Dec. 2016.
- [133] D. C. Kaur and S. S. Chate, "Study of Antibiotic Resistance Pattern in Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* with Special Reference to Newer Antibiotic," *J. Glob. Infect. Dis.*, vol. 7, no. 2, pp. 78–84, 2015.
- [134] S. Arenz and D. N. Wilson, "Bacterial Protein Synthesis as a Target for Antibiotic Inhibition," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 6, no. 9, p. a025361, Sep. 2016.
- [135] A. S. Bayer, T. Schneider, and H.-G. Sahl, "Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1277, no. 1, pp. 139–158, Jan. 2013.
- [136] S. Tsiodras *et al.*, "Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*," *Lancet*, vol. 358, no. 9277, pp. 207–208, Jul. 2001.
- [137] N. K. Archer, M. J. Mazaitis, J. W. Costerton, J. G. Leid, M. E. Powers, and M. E. Shirtliff, "Staphylococcus aureus biofilms," *Virulence*, vol. 2, no. 5, pp. 445–459, Sep. 2011.
- [138] C. W. Hall and T.-F. Mah, "Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 41, no. 3, pp. 276–301, May 2017.
- [139] H.-S. Joo and M. Otto, "Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens," *Chem. Biol.*, vol. 19, no. 12, pp. 1503–13, Dec. 2012.
- [140] Z. Khatoon, C. D. McTiernan, E. J. Suuronen, T.-F. Mah, and E. I. Alarcon, "Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention," *Heliyon*, vol. 4, no. 12, p. e01067, Dec. 2018.
- [141] D. Davies, "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 2, no. 2, pp. 114–122, Feb. 2003.
- [142] D. Sharma, L. Misba, and A. U. Khan, "Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities," *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, vol. 8, p. 76, 2019.
- [143] L. Montanaro *et al.*, "Extracellular DNA in Biofilms," *Int. J. Artif. Organs*, vol. 34, no. 9, pp. 824–831, Sep. 2011.
- [144] H. Mulcahy, L. Charron-Mazenod, and S. Lewenza, "Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms," *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 11, p. e1000213, Nov. 2008.
- [145] M. Okshevsky and R. L. Meyer, "The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 41, no. 3, pp. 341–352, 2015.
- [146] E. E. Mann *et al.*, "Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation," *PLoS One*, vol. 4, no. 6, p. e5822, Jun. 2009.
- [147] M. J. Huseby *et al.*, "Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 32, pp. 14407–12, Aug. 2010.
- [148] K. C. Rice and K. W. Bayles, "Molecular Control of Bacterial Death and Lysis," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 72, no. 1, pp. 85–109, Mar. 2008.
- [149] J. S. Webb *et al.*, "Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development," *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 15, pp. 4585–92, Aug. 2003.
- [150] K. W. Bayles, "Are the molecular strategies that control apoptosis conserved in bacteria?," *Trends Microbiol.*, vol. 11, no. 7, pp. 306–311, Jul. 2003.
- [151] Q. Jiang, J. Chen, C. Yang, Y. Yin, and K. Yao, "Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases," *Biomed Res. Int.*, vol. 2019, p. 2015978, 2019.
- [152] D. E. Moormeier and K. W. Bayles, "Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism," *Mol. Microbiol.*, vol. 104, no. 3, pp. 365–376, May 2017.
- [153] N. Łubowska and L. Piechowicz, "Staphylococcus aureus biofilm and the role of bacteriophages in its eradication," *Postepy Hig. Med. Dosw.*, vol. 72, pp. 101–107, Jan. 2018.
- [154] D. Dzierżanowska, *Antybiotykoterapia praktyczna*, 5th ed. Bielsko-Biała: alfamedica press, 2009.
- [155] M. Z. David and R. S. Daum, "Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections," in *Current topics in microbiology and immunology*, vol. 409, Springer, Cham, 2017, pp. 325–

- 383.
- [156] C. Liu *et al.*, "Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children: Executive Summary," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 52, no. 3, pp. 285–292, Feb. 2011.
 - [157] T. L. Holland, C. Arnold, V. G. Fowler, and Jr, "Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a review.," *JAMA*, vol. 312, no. 13, pp. 1330–41, Oct. 2014.
 - [158] M. Barton *et al.*, "Guidelines for the Prevention and Management of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* : A Perspective for Canadian Health Care Practitioners," *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, vol. 17, no. suppl c, pp. 4C–24C, 2006.
 - [159] A. A. Azari and N. P. Barney, "Conjunctivitis," *JAMA*, vol. 310, no. 16, p. 1721, Oct. 2013.
 - [160] N. P. Jørgensen, S. M. Skovdal, R. L. Meyer, F. Dagnæs-Hansen, K. Fuursted, and E. Petersen, "Rifampicin-containing combinations are superior to combinations of vancomycin, linezolid and daptomycin against *Staphylococcus aureus* biofilm infection *in vivo* and *in vitro*," *Pathog. Dis.*, vol. 74, no. 4, p. ftw019, Jun. 2016.
 - [161] J. N. Steenbergen, J. Alder, G. M. Thorne, and F. P. Tally, "Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 55, no. 3, pp. 283–288, Mar. 2005.
 - [162] D. Steinhilber *et al.*, *Chemia medyczna : cele leków, substancje czynne, biologia chemiczna*. MedPharm Polska, 2012.
 - [163] M. Oliynyk *et al.*, "Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338," *Nat. Biotechnol.*, vol. 25, no. 4, pp. 447–453, Apr. 2007.
 - [164] J. Zimbelman, A. Palmer, and J. Todd, "Improved outcome of clindamycin compared with beta-lactam antibiotic treatment for invasive *Streptococcus pyogenes* infection.," *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 18, no. 12, pp. 1096–100, Dec. 1999.
 - [165] H. Y. Sultan, A. A. Boyle, and N. Sheppard, "Necrotising fasciitis," *BMJ*, vol. 345, no. jul20 1, pp. e4274–e4274, Jul. 2012.
 - [166] Q. A. Hussein and D. A. Anaya, "Necrotizing Soft Tissue Infections," *Crit. Care Clin.*, vol. 29, no. 4, pp. 795–806, Oct. 2013.
 - [167] B. Solnica and K. Sztefko, *Medyczne laboratorium diagnostyczne*. PZWŁ, 2015.
 - [168] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition.*, vol. 32, no. 2. 2012.
 - [169] M. Jaśkiewicz, D. Neubauer, and W. Kamysz, "Comparative Study on Antistaphylococcal Activity of Lipopeptides in Various Culture Media," *Antibiotics*, vol. 6, no. 3, p. 15, Aug. 2017.
 - [170] W. F. Elkhatib, A. S. Khairalla, and H. M. Ashour, "Evaluation of different microtiter plate-based methods for the quantitative assessment of *Staphylococcus aureus* biofilms," *Future Microbiol.*, vol. 9, no. 6, pp. 725–735, 2014.
 - [171] H. Ceri, M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, and A. Buret, "The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, no. 6, pp. 1771–6, Jun. 1999.
 - [172] M. D. Macia, E. Rojo-Molinero, and A. Oliver, "Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 20, no. 10, pp. 981–990, Oct. 2014.
 - [173] D. A. Schneider and R. L. Gourse, "Relationship between Growth Rate and ATP Concentration in *Escherichia coli*," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 9, pp. 8262–8268, Feb. 2004.
 - [174] P. Sule, T. Wadhawan, N. J. Carr, S. M. Horne, A. J. Wolfe, and B. M. Prüß, "A combination of assays reveals biomass differences in biofilms formed by *Escherichia coli* mutants," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 49, no. 3, pp. 299–304, Sep. 2009.
 - [175] S. Croes, R. H. Deurenberg, M. L. L. Boumans, P. S. Beisser, C. Neef, and E. E. Stobberingh, "Staphylococcus aureus biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage," *BMC Microbiol.*, vol. 9, pp. 1–9, 2009.
 - [176] S. K. Shukla and T. S. Rao, "An improved crystal violet assay for biofilm quantification in 96-well microtitre plate," *bioRxiv*, p. 100214, 2017.
 - [177] L. Corte, D. Casagrande Pierantoni, C. Tascini, L. Roscini, and G. Cardinali, "Biofilm Specific Activity: A Measure to Quantify Microbial Biofilm," *Microorganisms*, vol. 7, no.

- 3, p. 73, Mar. 2019.
- [178] M. E. Skogman, P. M. Vuorela, and A. Fallarero, "Combining biofilm matrix measurements with biomass and viability assays in susceptibility assessments of antimicrobials against *Staphylococcus aureus* biofilms," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 65, no. 9, pp. 453–459, 2012.
 - [179] B. Alonso, R. Cruces, A. Pérez, C. Sánchez-Carrillo, and M. Guembe, "Comparison of the XTT and resazurin assays for quantification of the metabolic activity of *Staphylococcus aureus* biofilm," *J. Microbiol. Methods*, vol. 139, pp. 135–137, Aug. 2017.
 - [180] E. Sherman, K. Bayles, D. Moormeier, J. Endres, and T. Wei, "Observations of Shear Stress Effects on *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation," *mSphere*, vol. 4, no. 4, pp. 372–391, Jul. 2019.
 - [181] M. K. Kim, F. Ingremeau, A. Zhao, B. L. Bassler, and H. A. Stone, "Local and global consequences of flow on bacterial quorum sensing," *Nat. Microbiol.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–12, 2016.
 - [182] Y. Yawata, J. Nguyen, R. Stocker, and R. Rusconi, "Microfluidic Studies of Biofilm Formation in Dynamic Environments," *J. Bacteriol.*, vol. 198, no. 19, pp. 2589–2595, 2016.
 - [183] M. J. Franklin, C. Chang, T. Akiyama, and B. Bothner, "New Technologies for Studying Biofilms," *Microbiol. Spectr.*, vol. 3, no. 4, Aug. 2015.
 - [184] J. Azeredo *et al.*, "Critical review on biofilm methods," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 43, no. 3, pp. 313–351, 2017.
 - [185] T. Coenye, K. De Prijck, B. De Wever, and H. J. Nelis, "Use of the modified Robbins device to study the in vitro biofilm removal efficacy of NitrAdine™, a novel disinfecting formula for the maintenance of oral medical devices," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 105, no. 3, pp. 733–740, 2008.
 - [186] H. Van De Belt, D. Neut, W. Schenk, J. R. Van Horn, H. C. Van Der Mei, and H. J. Busscher, "Staphylococcus aureus biofilm formation on different gentamicin-loaded polymethylmethacrylate bone cements," *Biomaterials*, vol. 22, no. 12, pp. 1607–1611, 2001.
 - [187] D. M. Goeres *et al.*, "A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor," *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 5, pp. 783–788, May 2009.
 - [188] A. M. Agostinho, A. Hartman, C. Lipp, A. E. Parker, P. S. Stewart, and G. A. James, "An in vitro model for the growth and analysis of chronic wound MRSA biofilms," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 111, no. 5, pp. 1275–1282, 2011.
 - [189] D. L. Williams, K. L. Woodbury, B. S. Haymond, A. E. Parker, and R. D. Bloebaum, "A Modified CDC Biofilm Reactor to Produce Mature Biofilms on the Surface of PEEK Membranes for an In Vivo Animal Model Application," *Curr. Microbiol.*, vol. 62, no. 6, pp. 1657–1663, Jun. 2011.
 - [190] S. K. Satpute, N. S. Mone, P. Das, I. M. Banat, and A. G. Banpurkar, "Inhibition of pathogenic bacterial biofilms on PDMS based implants by *L. acidophilus* derived biosurfactant," *BMC Microbiol.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–15, 2019.
 - [191] Y. Xu *et al.*, "Nanoscale Plasma Coating Inhibits Formation of *Staphylococcus aureus* Biofilm," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, no. 12, pp. 7308–7315, 2015.
 - [192] M. K. Kim *et al.*, "Surface-attached molecules control *Staphylococcus aureus* quorum sensing and biofilm development," *Nat. Microbiol.*, vol. 2, no. 8, p. 17080, Aug. 2017.
 - [193] A. Andrea, N. Molchanova, and H. Jenssen, "Antibiofilm Peptides and Peptidomimetics with Focus on Surface Immobilization," *Biomolecules*, vol. 8, no. 2, 2018.
 - [194] S. M. Elsayed, S. Paschke, S. J. Rau, and K. Lienkamp, "Surface Structuring Combined with Chemical Surface Functionalization: An Effective Tool to Manipulate Cell Adhesion," *Molecules*, vol. 24, no. 5, Mar. 2019.
 - [195] A. Groza *et al.*, "Structural Properties and Antifungal Activity against *Candida albicans* Biofilm of Different Composite Layers Based on Ag/Zn Doped Hydroxyapatite-Polydimethylsiloxanes," *Polymers (Basel)*, vol. 8, no. 4, Apr. 2016.
 - [196] C. S. Ciobanu *et al.*, "Antimicrobial Activity Evaluation on Silver Doped Hydroxyapatite/Polydimethylsiloxane Composite Layer," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–13, Oct. 2015.
 - [197] R. Dhayakaran, S. Neethirajan, and X. Weng, "Investigation of the antimicrobial activity of soy peptides by developing a high throughput drug screening assay," *Biochem. Biophys. Reports*, vol. 6, pp. 149–157, Jul. 2016.

- [198] S. C. Mansour, O. M. Pena, and R. E. Hancock, "Host defense peptides: front-line immunomodulators," *Trends Immunol.*, vol. 35, no. 9, pp. 443–450, 2014.
- [199] M. Zasloff, "Antimicrobial peptides of multicellular organisms," *Nature*, vol. 415, no. 6870, pp. 389–395, 2002.
- [200] M. Dawgul, M. Maciejewska, M. Jaśkiewicz, A. Karafova, and W. Kamysz, "Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm," *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.*, vol. 71, no. 1, pp. 39–47, 2014.
- [201] M. Hassan, M. Kjos, I. F. Nes, D. B. Diep, and F. Lotfipour, "Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 113, no. 4, pp. 723–736, Oct. 2012.
- [202] H. K. Kang, H. H. Lee, C. H. Seo, and Y. Park, "Antimicrobial and Immunomodulatory Properties and Applications of Marine-Derived Proteins and Peptides," *Mar. Drugs*, vol. 17, no. 6, Jun. 2019.
- [203] R. E. Hancock and R. Lehrer, "Cationic peptides: a new source of antibiotics," *Trends Biotechnol.*, vol. 16, no. 2, pp. 82–88, 1998.
- [204] Z. Wang and G. Wang, "APD: the Antimicrobial Peptide Database," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 90001, pp. 590D – 592, Jan. 2004.
- [205] J. P. Tam, S. Wang, K. H. Wong, and W. L. Tan, "Antimicrobial Peptides from Plants," *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 8, no. 4, pp. 711–57, Nov. 2015.
- [206] Q. Wu, J. Patočka, and K. Kuča, "Insect Antimicrobial Peptides, a Mini Review," *Toxins (Basel)*, vol. 10, no. 11, Nov. 2018.
- [207] A. C. Rinaldi, "Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario: Commentary," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 6, no. 6, pp. 799–804, 2002.
- [208] A. Giacometti *et al.*, "In vitro activity of aurein 1.2 alone and in combination with antibiotics against gram-positive nosocomial cocci," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 51, no. 4, pp. 1494–6, Apr. 2007.
- [209] E. N. Lorenzón, J. P. Piccoli, and E. M. Cilli, "Interaction between the antimicrobial peptide Aurein 1.2 dimer and mannans," *Amino Acids*, vol. 46, no. 11, pp. 2627–2631, 2014.
- [210] S. R. Dennison, F. Harris, and D. A. Phoenix, "The interactions of aurein 1.2 with cancer cell membranes," *Biophys. Chem.*, vol. 127, no. 1, pp. 78–83, 2007.
- [211] A. Giacometti *et al.*, "In vitro activity of citropin 1.1 alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Rhodococcus equi*," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 56, no. 2, pp. 410–2, Aug. 2005.
- [212] A. Giacometti *et al.*, "In vitro activity and killing effect of citropin 1.1 against gram-positive pathogens causing skin and soft tissue infections," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, no. 6, pp. 2507–9, Jun. 2005.
- [213] P. A. Wabnitz, J. H. Bowie, J. C. Wallace, and M. J. Tyler, "The citropin peptides from the skin glands of the Australian Blue Mountains tree frog *Litoria citropa*. Part 2: Sequence determination using electrospray mass spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 13, no. 17, pp. 1724–1732, Sep. 1999.
- [214] M. A. Apponyi *et al.*, "Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance," *Peptides*, vol. 25, no. 6, pp. 1035–1054, 2004.
- [215] M. Dawgul, W. Barańska-Rybak, S. Bielińska, R. Nowicki, and W. Kamysz, "The influence of antimicrobial peptides on *Candida* biofilm," *Alerg. Astma Immunol.*, vol. 15, no. 4, pp. 220–225, 2010.
- [216] E. E. Avila, "Functions of Antimicrobial Peptides in Vertebrates," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 18, no. 11, pp. 1098–1119, Aug. 2017.
- [217] K. Majewski, E. Kozłowska, P. Żelechowska, and E. Brzezińska-Błaszczyk, "Serum concentrations of antimicrobial peptide cathelicidin LL-37 in patients with bacterial lung infections," *Cent. J. Immunol.*, vol. 43, no. 4, p. 453, 2018.
- [218] M. R. Scheenstra *et al.*, "Cathelicidins PMAP-36, LL-37 and CATH-2 are similar peptides with different modes of action," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 4780, Dec. 2019.
- [219] J. Wang *et al.*, "Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era," *Med. Res. Rev.*, vol. 39, no. 3, pp. 831–859, May 2019.
- [220] K. A. Brogden, "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 3, pp. 238–250, Mar. 2005.

- [221] Y. Shai, "Mode of action of membrane active antimicrobial peptides," *Biopolymers*, vol. 66, no. 4, pp. 236–248, 2002.
- [222] E. Sikorska, K. Greber, S. Rodziejewicz-Motowidło, Ł. Szultka, J. Łukasiak, and W. Kamysz, "Synthesis and antimicrobial activity of truncated fragments and analogs of citropin 1.1: The solution structure of the SDS micelle-bound citropin-like peptides," *J. Struct. Biol.*, vol. 168, no. 2, pp. 250–258, Nov. 2009.
- [223] R. E. W. Hancock, E. F. Haney, and E. E. Gill, "The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, no. 5, pp. 321–334, May 2016.
- [224] C. B. Park, H. S. Kim, and S. C. Kim, "Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 244, no. 1, pp. 253–257, Mar. 1998.
- [225] E. M. Kościuczek *et al.*, "Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 39, no. 12, pp. 10957–10970, Dec. 2012.
- [226] T.-H. Lee, K. N. Hall, and M.-I. Aguilar, "Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 16, no. 1, pp. 25–39, Sep. 2015.
- [227] C. L. Wilson *et al.*, "Regulation of Intestinal -Defensin Activation by the Metalloproteinase Matrilysin in Innate Host Defense," *Science (80-.)*, vol. 286, no. 5437, pp. 113–117, Oct. 1999.
- [228] N. H. Salzman, D. Ghosh, K. M. Huttner, Y. Paterson, and C. L. Bevins, "Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin," *Nature*, vol. 422, no. 6931, pp. 522–526, Apr. 2003.
- [229] N. Uematsu and K. Matsuzaki, "Polar Angle as a Determinant of Amphipathic α -Helix-Lipid Interactions: A Model Peptide Study," *Biophys. J.*, vol. 79, no. 4, pp. 2075–2083, Oct. 2000.
- [230] P. Kumar, J. N. Kizhakkedathu, and S. K. Straus, "Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo," *Biomolecules*, vol. 8, no. 1, 2018.
- [231] R. B. Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, no. 14, pp. 2149–2154, Jul. 1963.
- [232] H. Oh, M. Hedberg, D. Wade, and C. Edlund, "Activities of Synthetic Hybrid Peptides against Anaerobic Bacteria: Aspects of Methodology and Stability," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, no. 1, pp. 68–72, Jan. 2000.
- [233] R. Smolarczyk *et al.*, "Anticancer effects of CAMEL peptide," *Lab. Investig.*, vol. 90, no. 6, pp. 940–952, Jun. 2010.
- [234] K. Bogucka, A. Królicka, W. Kamysz, T. Ossowski, J. Lukasiak, and E. Lojkowska, "Activities of synthetic peptides against human pathogenic bacteria," *Polish J. Microbiol.*, vol. 53, no. 1, pp. 41–4, 2004.
- [235] J. Rai, "Peptide and protein mimetics by retro and retroinverso analogs," *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 93, no. 5, pp. 724–736, May 2019.
- [236] W. Mroziński, A. Markowska, Ł. Guzik, B. Kraska, and W. Kamysz, "Determination of counter-ions in synthetic peptides by ion chromatography, capillary isotachopheresis and capillary electrophoresis," *J. Pept. Sci.*, vol. 18, no. 3, pp. 192–198, Mar. 2012.
- [237] K. E. Greber and M. Dawgul, "Antimicrobial Peptides Under Clinical Trials," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 17, no. 5, pp. 620–628, Dec. 2016.
- [238] G. B. Fields and R. L. Noble, "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 35, no. 3, pp. 161–214, Mar. 1990.
- [239] F. Rizzolo *et al.*, "Conventional and microwave-assisted SPPS approach: a comparative synthesis of PTHrP(1-34)NH₂," *J. Pept. Sci.*, vol. 17, no. 10, pp. 708–714, Oct. 2011.
- [240] K. Sikora, D. Neubauer, M. Jaśkiewicz, and W. Kamysz, "Citropin 1.1 Trifluoroacetate to Chloride Counter-Ion Exchange in HCl-Saturated Organic Solutions: An Alternative Approach," *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2017.
- [241] ICH, "Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2 (R1),." 2005.
- [242] S. C. Gill and P. H. von Hippel, "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data," *Anal. Biochem.*, vol. 182, no. 2, pp. 319–326, Nov. 1989.

- [243] P. C. Fuchs, A. L. Barry, and S. D. Brown, "Daptomycin susceptibility tests: interpretive criteria, quality control, and effect of calcium on in vitro tests," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 38, no. 1, pp. 51–58, Sep. 2000.
- [244] D. G. Allison and P. A. Lambert, "Modes of Action of Antibacterial Agents," *Mol. Med. Microbiol.*, pp. 583–598, Jan. 2015.
- [245] D. Migoń *et al.*, "Alanine Scanning Studies of the Antimicrobial Peptide Aurein 1.2," *Probiotics Antimicrob. Proteins*, pp. 1–13, Dec. 2018.
- [246] C. S. Brian Chia, Y. Gong, J. H. Bowie, J. Zuegg, and M. A. Cooper, "Membrane binding and perturbation studies of the antimicrobial peptides caerin, citropin, and maculatin," *Biopolymers*, vol. 96, no. 2, pp. 147–157, 2011.
- [247] M. Cheng, J. X. Huang, S. Ramu, M. S. Butler, and M. A. Cooper, "Ramoplanin at bactericidal concentrations induces bacterial membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, no. 11, pp. 6819–27, Nov. 2014.
- [248] K. Sikora *et al.*, "Counter-ion effect on antistaphylococcal activity and cytotoxicity of selected antimicrobial peptides," *Amino Acids*, vol. 50, no. 5, pp. 609–619, May 2018.
- [249] M. Jaśkiewicz, D. Neubauer, K. Kazor, S. Bartoszewska, and W. Kamysz, "Antimicrobial Activity of Selected Antimicrobial Peptides Against Planktonic Culture and Biofilm of *Acinetobacter baumannii*," *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol. 11, no. 1, pp. 317–324, Mar. 2019.
- [250] D. Avrahami and Y. Shai, "A New Group of Antifungal and Antibacterial Lipopeptides Derived from Non-membrane Active Peptides Conjugated to Palmitic Acid," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 13, pp. 12277–12285, Mar. 2004.
- [251] D. Neubauer *et al.*, "Retro analog concept: comparative study on physico-chemical and biological properties of selected antimicrobial peptides," *Amino Acids*, 2017.
- [252] D. Alves, A. Magalhães, D. Grzywacz, D. Neubauer, W. Kamysz, and M. O. Pereira, "Co-immobilization of Palm and DNase I for the development of an effective anti-infective coating for catheter surfaces," *Acta Biomater.*, vol. 44, pp. 313–322, Oct. 2016.
- [253] H.-S. Joo and M. Otto, "Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1848, no. 11 Pt B, pp. 3055–61, Nov. 2015.
- [254] M. Sieprawska-Lupa *et al.*, "Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, no. 12, pp. 4673–9, Dec. 2004.
- [255] L. T. Nguyen and H. J. Vogel, "Staphylokinase has distinct modes of interaction with antimicrobial peptides, modulating its plasminogen-activation properties," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 31817, 2016.
- [256] M. H. Braff, A. L. Jones, S. J. Skerrett, and C. E. Rubens, "*Staphylococcus aureus* Exploits Cathelicidin Antimicrobial Peptides Produced during Early Pneumonia to Promote Staphylokinase-Dependent Fibrinolysis," *J. Infect. Dis.*, vol. 195, no. 9, pp. 1365–1372, May 2007.
- [257] C. Vuong *et al.*, "Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system," *Cell. Microbiol.*, vol. 6, no. 3, pp. 269–275, Mar. 2004.
- [258] H.-S. Joo and M. Otto, "Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1848, no. 11, pp. 3055–3061, Nov. 2015.
- [259] C. Vuong *et al.*, "A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 52, pp. 54881–6, Dec. 2004.
- [260] I. S. Radzishewsky, S. Rotem, F. Zaknoon, L. Gaidukov, A. Dagan, and A. Mor, "Effects of acyl versus aminoacyl conjugation on the properties of antimicrobial peptides," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, no. 6, pp. 2412–20, Jun. 2005.
- [261] E. Y. Kim, G. Rajasekaran, and S. Y. Shin, "LL-37-derived short antimicrobial peptide KR-12-a5 and its d -amino acid substituted analogs with cell selectivity, anti-biofilm activity, synergistic effect with conventional antibiotics, and anti-inflammatory activity," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 136, pp. 428–441, Aug. 2017.
- [262] J. F. Shurko, R. S. Galega, C. Li, and G. C. Lee, "Evaluation of LL-37 antimicrobial peptide derivatives alone and in combination with vancomycin against *S. aureus*," *J.*

- Antibiot. (Tokyo)*, vol. 71, no. 11, pp. 971–974, Nov. 2018.
- [263] B. Albada, "Tuning Activity of Antimicrobial Peptides by Lipidation," in *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 1–18.
 - [264] A. Thamri *et al.*, "Peptide modification results in the formation of a dimer with a 60-fold enhanced antimicrobial activity," *PLoS One*, vol. 12, no. 3, p. e0173783, Mar. 2017.
 - [265] C. Subbalakshmi, R. Nagaraj, and N. Sitaram, "Biological activities of retro and diastereo analogs of a 13-residue peptide with antimicrobial and hemolytic activities," *J. Pept. Res.*, vol. 57, no. 1, pp. 59–67, Jan. 2001.
 - [266] R. Gopal, Y. J. Kim, C. H. Seo, K. S. Hahm, and Y. Park, "Reversed sequence enhances antimicrobial activity of a synthetic peptide," *J. Pept. Sci.*, vol. 17, no. 5, pp. 329–334, 2011.
 - [267] A. Giacometti *et al.*, "In vitro activity of aurein 1.2 alone and in combination with antibiotics against gram-positive nosocomial cocci," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 51, no. 4, pp. 1494–6, Apr. 2007.
 - [268] K. Garbacz, W. Kamysz, and L. Piechowicz, "Activity of antimicrobial peptides, alone or combined with conventional antibiotics, against *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients," *Virulence*, vol. 8, no. 1, pp. 94–100, 2017.
 - [269] A. Giacometti *et al.*, "In vitro activity and killing effect of the synthetic hybrid cecropin A-melittin peptide CA(1–7)M(2–9)NH₂ on methicillin-resistant nosocomial isolates of *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 49, no. 3, pp. 197–200, Jul. 2004.
 - [270] T. MANTYLA *et al.*, "Effect of temporin A modifications on its cytotoxicity and antimicrobial activity," *APMIS*, vol. 113, no. 7–8, pp. 497–505, Aug. 2005.
 - [271] R. K. Flamm, P. R. Rhomberg, K. M. Simpson, D. J. Farrell, H. S. Sader, and R. N. Jones, "In vitro spectrum of pexiganan activity when tested against pathogens from diabetic foot infections and with selected resistance mechanisms," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, no. 3, pp. 1751–4, Mar. 2015.
 - [272] D. Wade *et al.*, "Antibacterial activities of temporin A analogs," *FEBS Lett.*, vol. 479, no. 1–2, pp. 6–9, Aug. 2000.
 - [273] S. Nagpal, K. J. Kaur, D. Jain, and D. M. Salunke, "Plasticity in structure and interactions is critical for the action of indolicidin, an antibacterial peptide of innate immune origin," *Protein Sci.*, vol. 11, no. 9, pp. 2158–67, Sep. 2002.
 - [274] S. Ando *et al.*, "Structure-activity relationship of indolicidin, a Trp-rich antibacterial peptide," *J. Pept. Sci.*, p. n/a-n/a, 2010.
 - [275] J. Cornish *et al.*, "Trifluoroacetate, a contaminant in purified proteins, inhibits proliferation of osteoblasts and chondrocytes," *Am. J. Physiol.*, vol. 277, no. 5 Pt 1, pp. E779–E783, 1999.
 - [276] K. Wada, T. Mizuno, J.-I. Oku, and T. Tanaka, "pH-induced conformational change in an alpha-helical coiled-coil is controlled by His residues in the hydrophobic core," *Protein Pept. Lett.*, vol. 10, no. 1, pp. 27–33, 2003.
 - [277] C. N. Pace, S. Treviñ, E. Prabhakaran, and J. M. Scholtz, "Protein structure, stability and solubility in water and other solvents," 2004.
 - [278] C.-L. Shen, M. C. Fitzgerald, and R. M. Murphy, "Effect of acid predissolution on fibril size and fibril flexibility of synthetic beta-amyloid peptide," *Biophys. J.*, vol. 67, no. 3, pp. 1238–1246, Sep. 1994.
 - [279] V. V. Andrushchenko, H. J. Vogel, and E. J. Prenner, "Optimization of the hydrochloric acid concentration used for trifluoroacetate removal from synthetic peptides," *J. Pept. Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 37–43, Jan. 2007.
 - [280] A. Pini *et al.*, "Efficacy and toxicity of the antimicrobial peptide M33 produced with different counter-ions," *Amino Acids*, vol. 43, no. 1, pp. 467–473, 2012.
 - [281] S. Roux, E. Zékri, B. Rousseau, M. Paternostre, J.-C. Cintrat, and N. Fay, "Elimination and exchange of trifluoroacetate counter-ion from cationic peptides: a critical evaluation of different approaches," *J. Pept. Sci.*, vol. 14, no. 3, pp. 354–359, Mar. 2008.
 - [282] M. Zapotoczna *et al.*, "Eradication of *Staphylococcus aureus* Biofilm Infections Using Synthetic Antimicrobial Peptides," *J. Infect. Dis.*, vol. 215, no. 6, pp. 975–983, Mar. 2017.
 - [283] S. M. S. Ng *et al.*, "Preliminary investigations into developing all- D Omiganan for treating Mupirocin-resistant MRSA skin infections," *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 90, no. 6,

- pp. 1155–1160, Dec. 2017.
- [284] H. S. Sader, K. A. Fedler, R. P. Rennie, S. Stevens, and R. N. Jones, "Omiganan pentahydrochloride (MBI 226), a topical 12-amino-acid cationic peptide: spectrum of antimicrobial activity and measurements of bactericidal activity.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, no. 8, pp. 3112–8, Aug. 2004.
 - [285] T. R. Fritsche, P. R. Rhomberg, H. S. Sader, and R. N. Jones, "In vitro activity of omiganan pentahydrochloride tested against vancomycin-tolerant, -intermediate, and -resistant *Staphylococcus aureus*," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 60, no. 4, pp. 399–403, Apr. 2008.
 - [286] V. P. Narayanaswamy *et al.*, "In Vitro activity of novel glycopolymer against clinical isolates of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*," *PLoS One*, vol. 13, no. 1, p. e0191522, Jan. 2018.
 - [287] T. L. Bannerman, D. L. Wadiak, and W. E. Kloos, "Susceptibility of *Staphylococcus* species and subspecies to teicoplanin.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 35, no. 9, pp. 1919–22, Sep. 1991.
 - [288] N. K. Bordeerat *et al.*, "Accurate quantitation of standard peptides used for quantitative proteomics.," *Proteomics*, vol. 9, no. 15, pp. 3939–44, Aug. 2009.
 - [289] F. Costa, C. Teixeira, P. Gomes, and M. C. L. Martins, "Clinical Application of AMPs," pp. 281–298, 2019.
 - [290] U.S. National Library of Medicine., "ClinicalTrials." [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov>.
 - [291] A. Shireesh, "The counter ion: expanding excipient functionality," *J. Excipients Food Chem.*, vol. 2, no. 2, pp. 26–27, 2011.
 - [292] A. Oddo and P. R. Hansen, "Hemolytic Activity of Antimicrobial Peptides," in *Antimicrobial Peptides. Methods in Molecular Biology*, vol 1548, Humana Press, New York, NY, 2017, pp. 427–435.
 - [293] D. Faccone *et al.*, "Antimicrobial activity of de novo designed cationic peptides against multi-resistant clinical isolates," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 71, pp. 31–35, 2014.
 - [294] H.-S. Won, S.-J. Kang, W.-S. Choi, and B.-J. Lee, "Activity optimization of an undecapeptide analogue derived from a frog-skin antimicrobial peptide.," *Mol. Cells*, vol. 31, no. 1, pp. 49–54, Jan. 2011.
 - [295] M. Malmsten, G. Kasetty, M. Pasupuleti, J. Alenfall, and A. Schmidtchen, "Highly Selective End-Tagged Antimicrobial Peptides Derived from PRELP," *PLoS One*, vol. 6, no. 1, p. e16400, Jan. 2011.
 - [296] M. G. J. L. Habets and M. A. Brockhurst, "Therapeutic antimicrobial peptides may compromise natural immunity," *Biol. Lett.*, vol. 8, no. 3, pp. 416–418, Jun. 2012.
 - [297] J. Z. Kubicek-Sutherland, H. Lofton, M. Vestergaard, K. Hjort, H. Ingmer, and D. I. Andersson, "Antimicrobial peptide exposure selects for *Staphylococcus aureus* resistance to human defence peptides," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 72, no. 1, pp. 115–127, Jan. 2017.
 - [298] J. Hong, J. Hu, and F. Ke, "Experimental Induction of Bacterial Resistance to the Antimicrobial Peptide Tachyplesin I and Investigation of the Resistance Mechanisms.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, no. 10, pp. 6067–75, 2016.
 - [299] J. E. Pollard *et al.*, "In vitro evaluation of the potential for resistance development to ceragenin CSA-13.," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 67, no. 11, pp. 2665–72, Nov. 2012.
 - [300] Ø. Samuelsen *et al.*, "Induced resistance to the antimicrobial peptide lactoferricin B in *Staphylococcus aureus*," *FEBS Lett.*, vol. 579, no. 16, pp. 3421–3426, Jun. 2005.
 - [301] M. Yasir, D. Dutta, and M. D. P. Willcox, "Comparative mode of action of the antimicrobial peptide melimine and its derivative Mel4 against *Pseudomonas aeruginosa*," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 7063, Dec. 2019.
 - [302] M. Yasir, D. Dutta, and M. D. P. Willcox, "Mode of action of the antimicrobial peptide Mel4 is independent of *Staphylococcus aureus* cell membrane permeability.," *PLoS One*, vol. 14, no. 7, p. e0215703, 2019.
 - [303] S. Omardien *et al.*, "Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1860, no. 11, pp. 2404–2415, Nov. 2018.
 - [304] M. N. Melo and M. A. R. B. Castanho, "Omiganan interaction with bacterial membranes and cell wall models. Assigning a biological role to saturation," *Biochim. Biophys. Acta -*

- Biomembr.*, vol. 1768, no. 5, pp. 1277–1290, May 2007.
- [305] S. Manner, D. M. Goeres, M. Skogman, P. Vuorela, and A. Fallarero, "Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation by antibiotics in 96-Microtiter Well Plates and Drip Flow Reactors: critical factors influencing outcomes," *Sci. Rep.*, vol. 7, 2017.
 - [306] M. Simões, M. O. Pereira, and M. J. Vieira, "Action of a cationic surfactant on the activity and removal of bacterial biofilms formed under different flow regimes," *Water Res.*, vol. 39, no. 2–3, pp. 478–486, Jan. 2005.
 - [307] M. Simões, M. O. Pereira, and M. J. Vieira, "Effect of Different Concentrations of *Ortho*-phthalaldehyde on Biofilms Formed by *Pseudomonas fluorescens* Under Different Flow Conditions," *Biofouling*, vol. 19, no. 5, pp. 287–295, Oct. 2003.
 - [308] D. M. Goeres *et al.*, "A method for growing a biofilm under low shear at the air-liquid interface using the drip flow biofilm reactor," *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 5, pp. 783–788, May 2009.
 - [309] T. Coenye and H. J. Nelis, "In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation," *J. Microbiol. Methods*, vol. 83, no. 2, pp. 89–105, Nov. 2010.
 - [310] M. Bhattacharya, D. J. Wozniak, P. Stoodley, and L. Hall-Stoodley, "Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 13, no. 12, pp. 1499–516, 2015.
 - [311] M. K. Suresh, R. Biswas, and L. Biswas, "An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 309, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2019.
 - [312] K. Henriksen *et al.*, "*P. aeruginosa* flow-cell biofilms are enhanced by repeated phage treatments but can be eradicated by phage-ciprofloxacin combination," *Pathog. Dis.*, vol. 77, no. 2, Mar. 2019.
 - [313] O. Fleitas and O. L. Franco, "Induced Bacterial Cross-Resistance toward Host Antimicrobial Peptides: A Worrying Phenomenon," *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 381, 2016.
 - [314] D. I. Andersson, D. Hughes, and J. Z. Kubicek-Sutherland, "Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides," *Drug Resist. Updat.*, vol. 26, pp. 43–57, May 2016.
 - [315] H.-S. Joo and M. Otto, "Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1848, no. 11, pp. 3055–3061, Nov. 2015.
 - [316] R. Gläser, K. Becker, C. Von Eiff, U. Meyer-Hoffert, and J. Harder, "Decreased Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants toward Human Antimicrobial Peptides," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 134, pp. 2347–2350, 2014.
 - [317] A. Peschel and H.-G. Sahl, "The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 4, no. 7, pp. 529–536, Jul. 2006.
 - [318] I. Błazewicz *et al.*, "Increasing rate of daptomycin non-susceptible strains of *Staphylococcus aureus* in patients with atopic dermatitis," *Postep. Dermatologii i Alergol.*, 2017.
 - [319] N. N. Mishra, A. S. Bayer, P. A. Moise, M. R. Yeaman, and G. Sakoulas, "Reduced susceptibility to host-defense cationic peptides and daptomycin coemerge in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from daptomycin-naïve bacteremic patients," *J. Infect. Dis.*, vol. 206, no. 8, pp. 1160–7, Oct. 2012.
 - [320] N. N. Mishra *et al.*, "Emergence of daptomycin resistance in daptomycin-naïve rabbits with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection is associated with resistance to host defense cationic peptides and *mprF* polymorphisms," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e71151, 2013.
 - [321] E. Tacconelli *et al.*, "ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 20, pp. 1–55, Jan. 2014.
 - [322] W. P. Caron and S. A. Mousa, "Prevention strategies for antimicrobial resistance: a systematic review of the literature," *Infect. Drug Resist.*, vol. 3, pp. 25–33, 2010.
 - [323] F. Mattner, F.-C. Bange, E. Meyer, H. Seifert, T. A. Wichelhaus, and I. F. Chaberny, "Preventing the spread of multidrug-resistant gram-negative pathogens: recommendations of an expert panel of the German Society For Hygiene and Microbiology," *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 109, no. 3, pp. 39–45, Jan. 2012.
 - [324] N. Teerawattanapong, K. Kengkla, P. Dilokthornsakul, S. Saokaew, A. Apisarnthanarak,

- and N. Chaiyakunapruk, "Prevention and Control of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria in Adult Intensive Care Units: A Systematic Review and Network Meta-analysis," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 64, no. suppl_2, pp. S51–S60, May 2017.
- [325] L. Klermund, S. T. Poschenrieder, and K. Castiglione, "Simple surface functionalization of polymersomes using non-antibacterial peptide anchors," *J. Nanobiotechnology*, vol. 14, no. 1, p. 48, Dec. 2016.

IX. APPENDIX

Wyniki analiz HPLC i MS.

Chromatogramy zostały zarejestrowane przy użyciu chromatografu:

Waters Alliance e2695 z detektorami Waters 2998 PDA oraz Acquity QDa.

Kolumna: Waters XBridge™ Shield RP-18 (3,5 μm , 4,6 $\times$ 150 mm, 130 Å).

Objętość dozowanej próbki 10 μl .

Faza ruchoma: A – woda + 0,1% kwas mrówkowy; B – acetonitryl + 0,1 kwas mrówkowy.

Metoda: Elucja gradientowa: 10–90% ACN, czas analizy: 10 minut, przepływ fazy ruchomej: 0,5 ml/min.

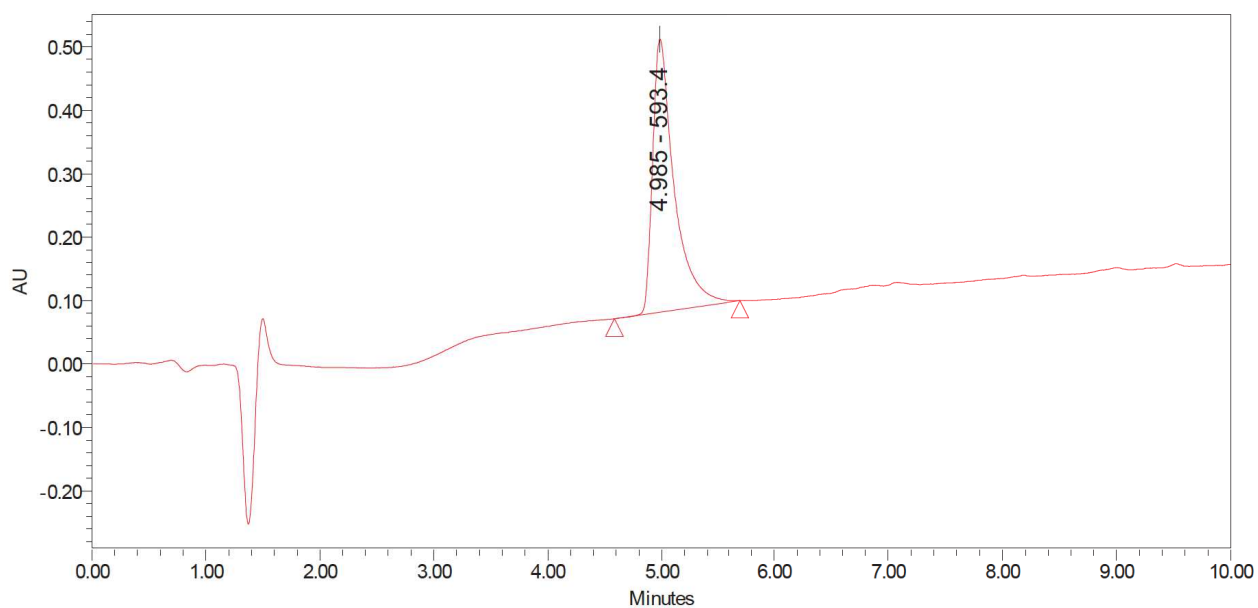
Rejestracja przy długości fali 214 nm oraz widma MS w jonizacji pozytywnej.

Wyniki oznaczeń MIC na szczepach klinicznych *S. aureus*

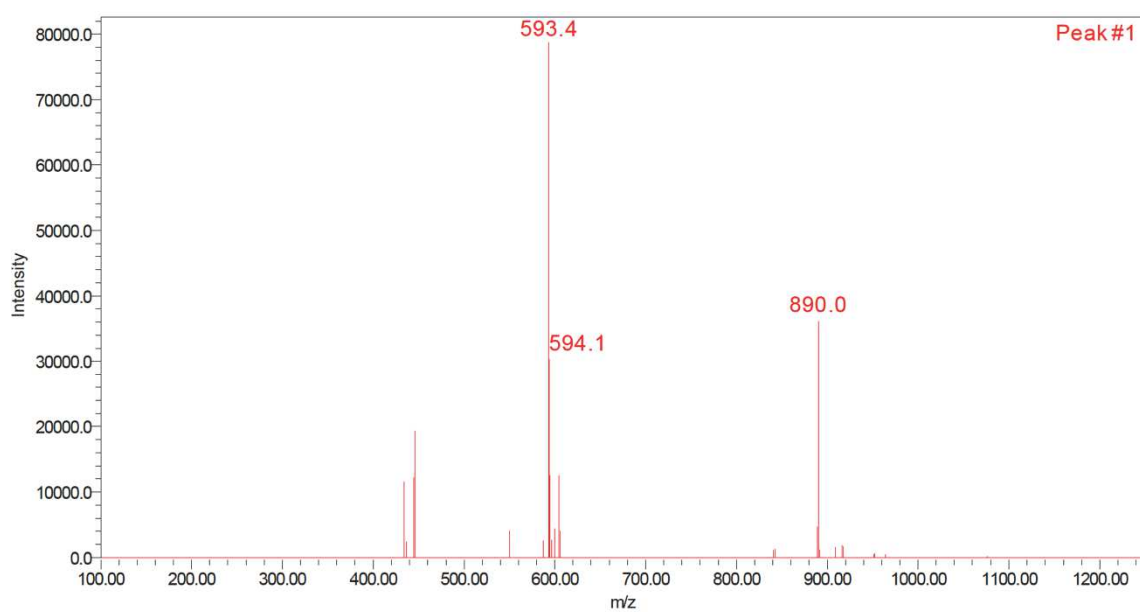
Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej przeprowadzone przy użyciu metody mikrorozcieńczeń w bulionie na 96-dołkowych płytkach polistyrenowych zgodnie z zaleceniami CLSI.

Inkubacja w gradiencie stężeń związków (0,5–256 $\mu\text{g/ml}$) przez 18 godzin w 37°C. W przypadku oznaczania wrażliwości wobec daptomycyny podłoże płynne suplementowane było CaCl_2 , tak aby ostateczne stężenie jonów Ca^{2+} wynosiło 50 $\mu\text{g/ml}$.

1. Omiganan TFA

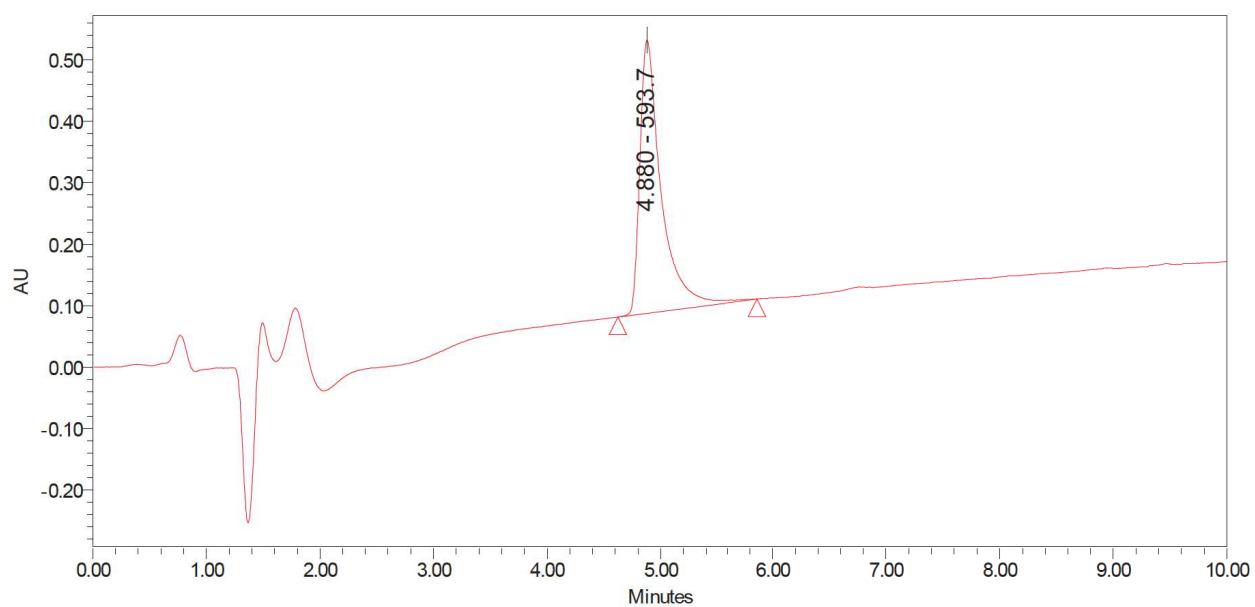


Rycina 34. Chromatogram trifluorooctanu Omigananu.

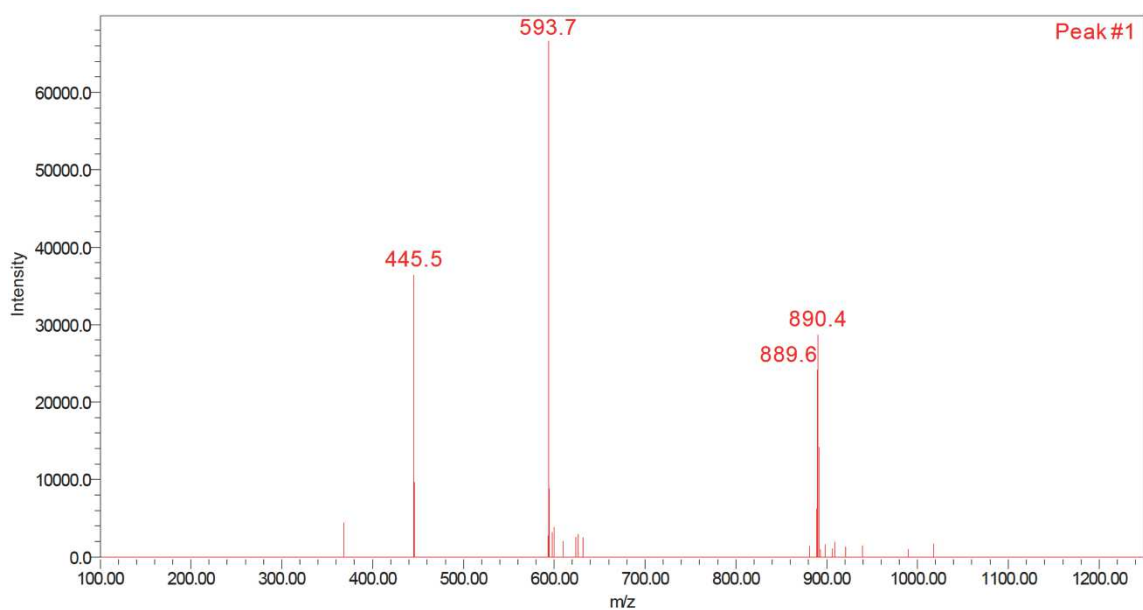


Rycina 35. Widmo masowe trifluorooctanu Omigananu.

2. retro-Omiganan TFA

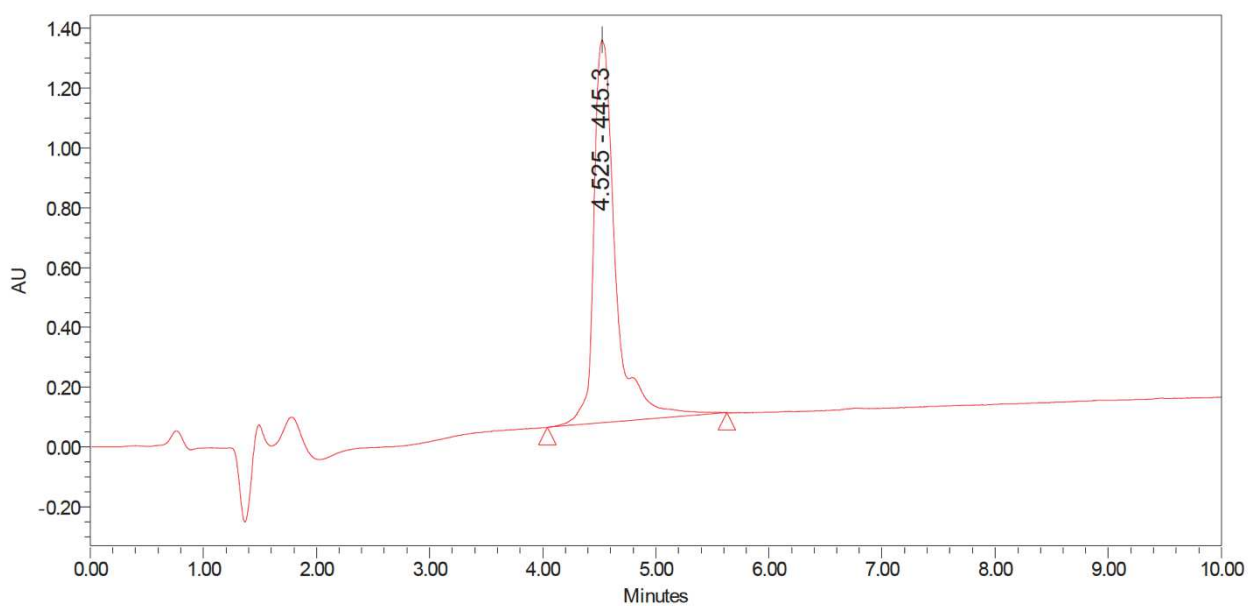


Rycina 36. Chromatogram trifluorooctanu retro-Omigananu.

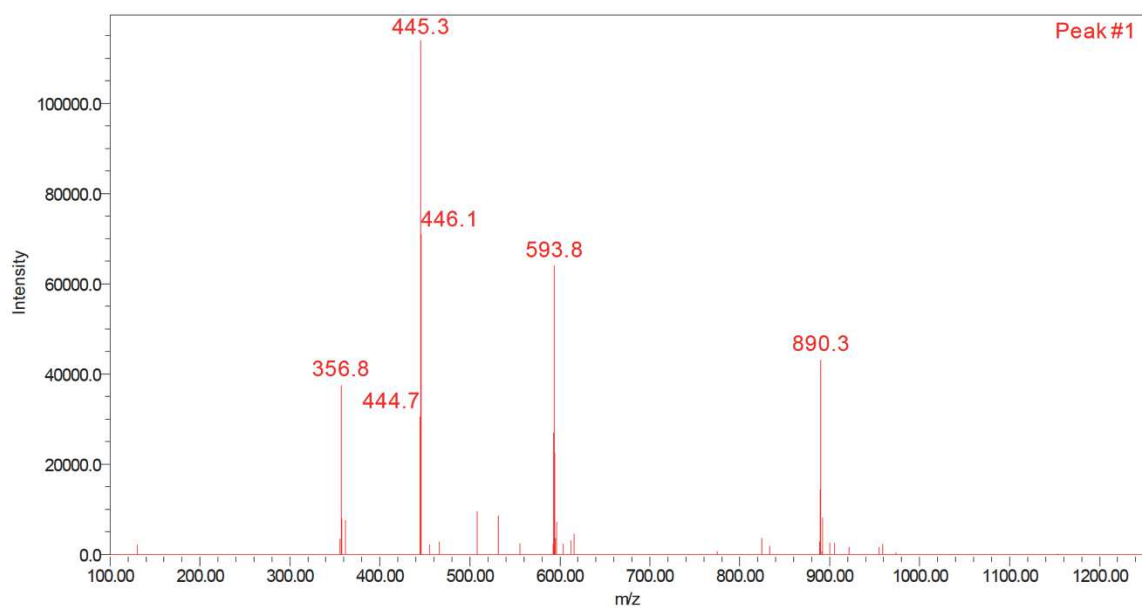


Rycina 37. Widmo masowe trifluorooctanu retro-Omigananu.

3. Omiganan HCl

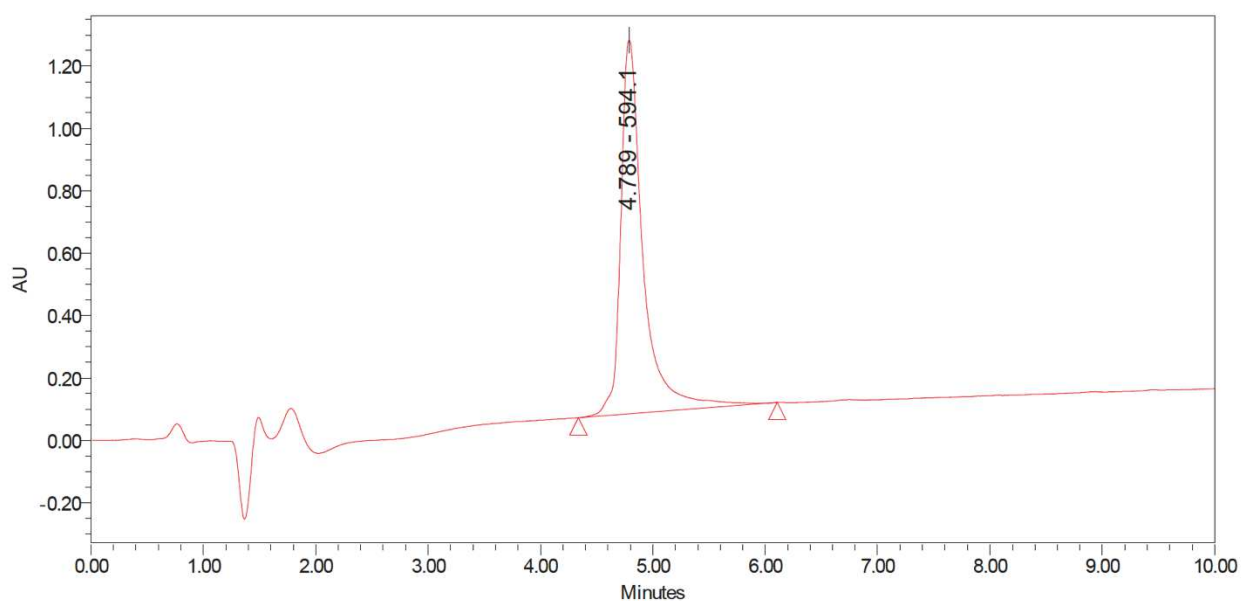


Rycina 38. Chromatogram chlorowodorku Omigananu.

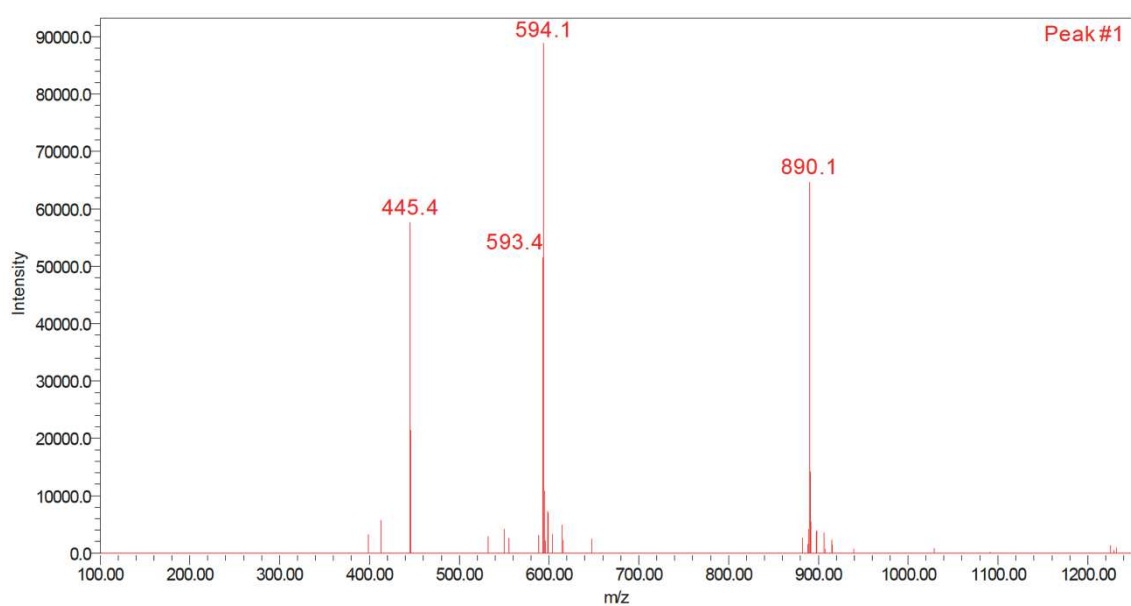


Rycina 39. Widmo masowe chlorowodorku Omigananu.

4. Retro-Omiganan HCl

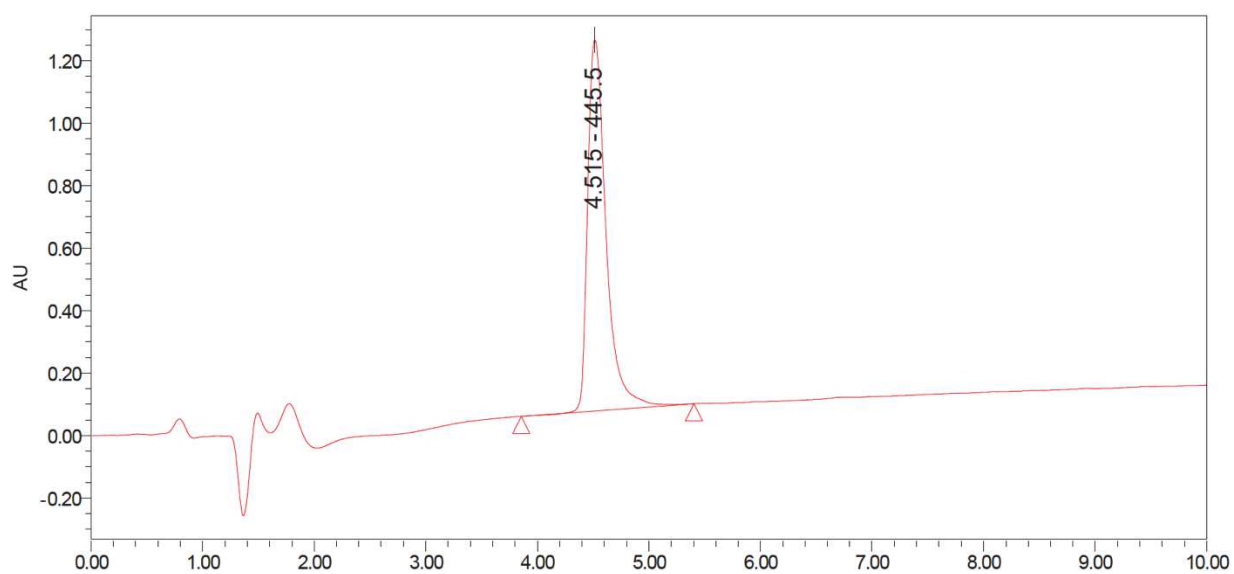


Rycina 40. Chromatogram chlorowodorku retro-Omigananu

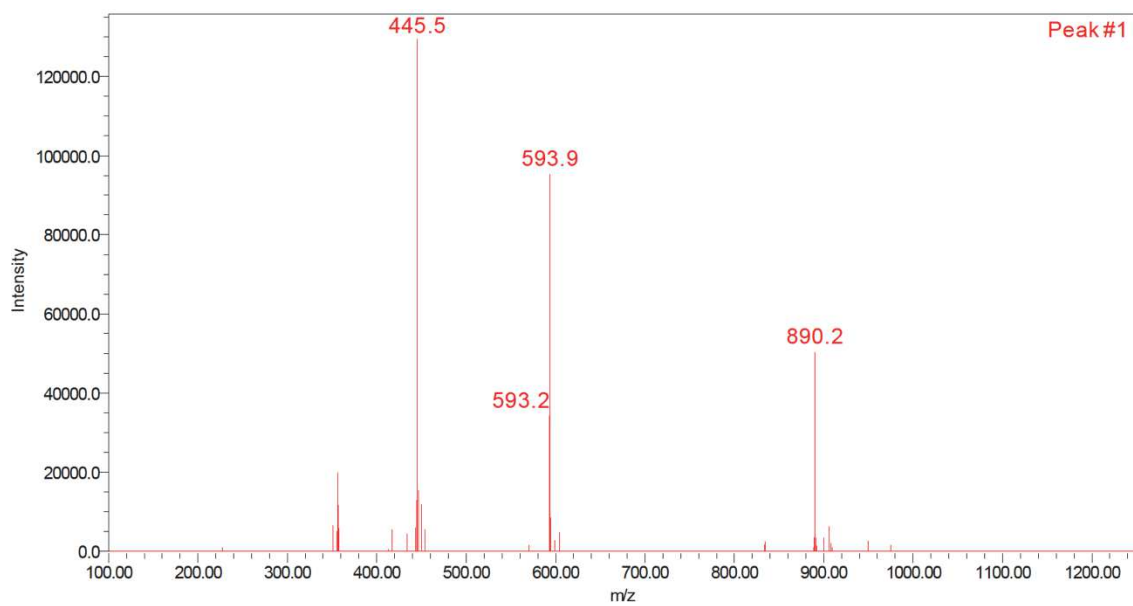


Rycina 41. Widmo masowe chlorowodorku retro-Omigananu

5. Omiganan AcOH

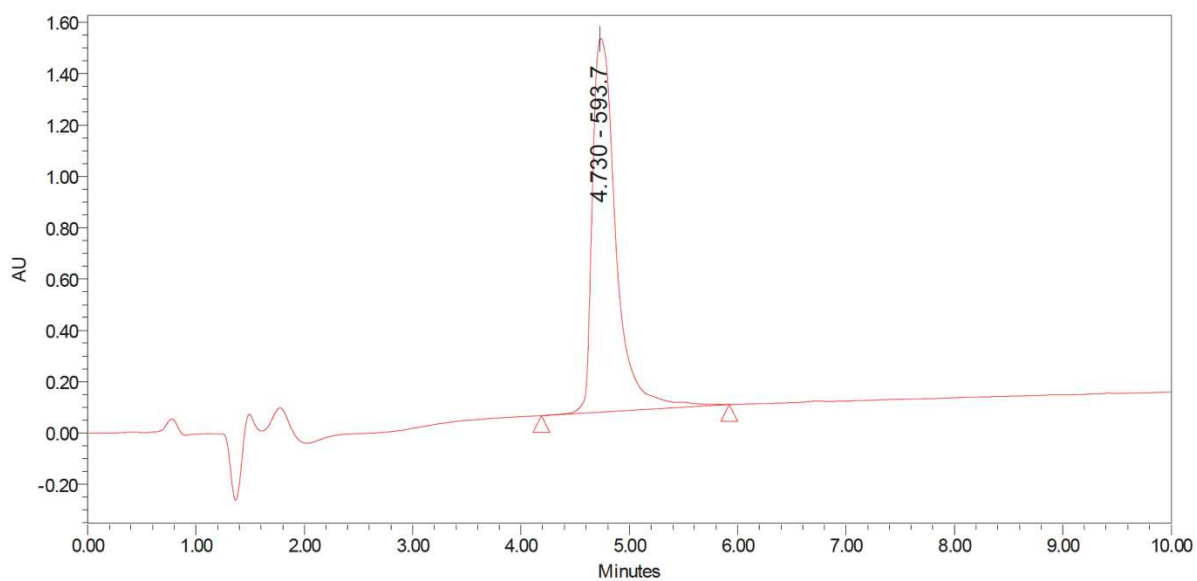


Rycina 42. Chromatogram octanu retro-Omigananu.

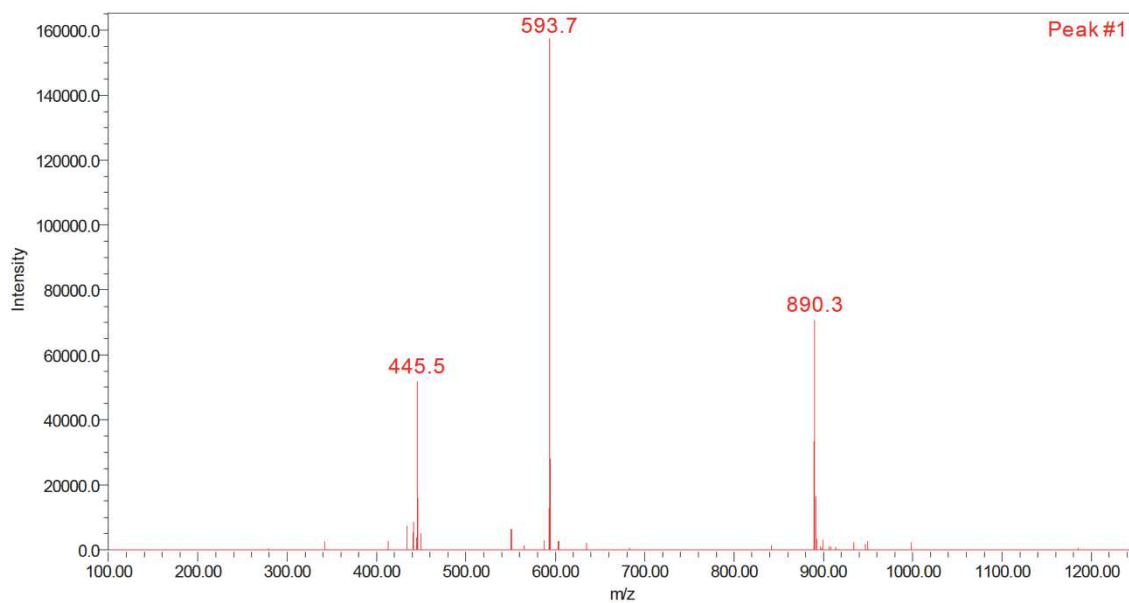


Rycina 43. Widmo masowe octanu retro-Omigananu.

6. Retro-Omiganan AcOH



Rycina 44. Chromatogram octanu retro-Omigananu.



Rycina 45. Widmo masowe octanu retro-Omigananu.

Tabela 1. Wartości MIC dla antybiotyków konwencjonalnych i AMPs wobec szczepów klinicznych *S. aureus*.

Szczep	MIC [$\mu\text{g/ml}$]						
	Ampicylina	Cyprofloksacyna	Daptomycyna	Erytromycyna	Kwas fusydowy	Linezolid	Linkomycyna
001N (MRSA)	8	16	4	512	4	0,5	>512
001S (MRSA)	32	>512	2	256	8	0,5	>512
002N	0,5	0,25	2	256	0,0625	1	1
002S	0,5	0,25	2	256	0,0625	1	1
003N	16	0,25	4	8	0,0625	1	512
003S	16	0,125	2	0,0625	0,0625	1	1
004N (MRSA)	0,5	0,25	2	256	0,0625	1	1
004S	0,5	0,125	4	512	0,0625	1	1
005S	0,25	1	0,25	0,5	0,0625	0,5	1
005N	8	0,125	4	0,125	0,0625	0,5	1
006N	0,25	0,25	2	0,5	0,5	1	0,5
006S	0,25	0,125	2	0,5	8	1	0,5
007S	0,5	0,5	1	0,5	0,125	1	1
007N	0,5	0,5	2	0,5	0,125	1	1
008N	4	0,25	1	0,25	0,125	1	1
009S	0,125	2	0,5	0,125	2	0,25	0,25
010N	4	0,25	2	0,25	0,125	1	0,5
010S	8	0,25	2	0,5	0,125	1	0,5
011N	0,5	0,25	2	0,5	0,125	1	16
011S	1	0,25	2	0,5	0,125	1	16
012N	4	0,25	4	32	0,0625	2	1
012S	4	1	4	8	8	2	16
013S	0,5	1	0,25	16	0,125	0,5	0,5
014N	0,5	0,125	2	0,125	0,125	1	16
014S	1	0,125	2	0,25	0,125	2	2
015N (MRSA)	16	0,25	2	32	0,125	2	1
016S	4	0,125	1	32	0,125	2	4
016N	0,5	0,125	2	0,5	0,125	2	0,5
017N (MRSA)	4	0,125	1	32	0,125	0,25	128

Tabela 2. Wartości MIC dla antybiotyków konwencjonalnych i AMPs wobec szczepów klinicznych *S. aureus* c.d.

Szczep	MIC [$\mu\text{g/ml}$]						
	Mupirocyna	Tetracyklina	Wankomycyna	CAMEL	Citropina 1.1	LL-37	Temporyna A
001N (MRSA)	0,125	4	0,5	2	16	128	8
001S (MRSA)	0,125	8	0,5	4	16	128	8
002N	0,25	0,5	0,5	4	16	128	8
002S	0,125	0,5	0,5	4	16	128	8
003N	256	0,125	0,5	4	16	256	8
003S	0,25	0,125	0,5	4	16	256	16
004N (MRSA)	0,125	0,5	0,5	4	16	>512	8
004S	0,125	0,5	0,5	4	16	>512	8
005S	>512	0,5	0,125	1	2	4	8
005N	0,125	0,5	0,125	4	16	>512	16
006N	0,25	0,25	0,5	4	16	256	16
006S	16	0,5	0,5	4	16	256	16
007S	0,25	0,5	0,5	4	8	256	8
007N	0,25	0,5	0,5	4	8	>512	8
008N	0,0625	0,125	0,25	2	8	256	2
009S	>512	1	0,25	1	16	2	4
010N	0,125	0,5	0,5	2	16	256	16
010S	0,125	1	0,5	2	16	256	16
011N	0,125	0,5	0,5	4	16	256	8
011S	0,125	1	1	4	16	256	8
012N	128	32	2	4	32	>512	32
012S	>512	32	1	4	32	>512	32
013S	8	0,125	0,25	1	2	4	16
014N	0,125	0,0625	1	4	16	>512	32
014S	0,25	0,125	0,5	4	16	>512	16
015N (MRSA)	0,25	0,5	1	4	16	>512	32
016S	0,25	0,5	1	4	32	128	16
016N	0,5	0,25	0,5	2	8	512	16
017N (MRSA)	0,0625	0,0625	2	2	16	128	32

Tabela 3. Wartości MIC dla antybiotyków konwencjonalnych i AMPs wobec szczepów klinicznych *S. aureus* c.d.

Szczep	MIC [µg/ml]						
	Ampicylina	Cyprofloksacyna	Daptomycyna	Erytromycyna	Kwas fusydowy	Linezolid	Linkomycyna
017S (MRSA)	8	0,25	2	32	0,0625	1	128
018N	2	0,5	1	32	0,0625	1	1
018S	4	0,5	1	32	0,0625	1	1
019N	0,125	1	1	0,5	0,0625	0,5	0,5
019S	0,125	1	1	0,5	0,0625	0,5	0,5
020N	0,5	1	2	0,5	0,25	2	1
020S	0,25	0,5	2	0,125	0,0625	2	0,5
021S	1	0,25	2	>512	4	1	>512
022N	2	4	4	0,5	4	0,25	0,5
023S	8	0,5	2	0,25	4	1	32
023N	16	0,5	4	0,5	8	2	32
024N	1	2	0,5	32	0,0625	0,5	0,5
024S	0,5	0,25	2	0,5	0,0625	2	0,5
025S	0,125	1	0,125	0,5	0,25	1	0,5
025N	16	0,125	1	0,5	0,125	2	0,5
026N	4	0,5	1	32	0,0625	2	1
027N	16	1	1	0,5	0,0625	2	0,5
027S	16	0,5	1	0,25	0,0625	1	0,5
028S	0,5	1	0,0625	0,125	0,125	0,5	0,5
029S	0,125	1	0,25	0,5	0,0625	0,5	0,5
029N	8	0,125	1	32	0,0625	1	0,25
030N	0,5	2	0,125	0,25	0,25	0,5	0,5
030S	32	0,125	2	0,5	0,25	2	0,5
031S	0,5	2	0,125	0,125	0,25	2	0,5
031N	16	0,25	4	0,25	16	4	16
032S	0,5	2	0,25	0,5	0,0312	1	1
032N	16	0,25	2	0,5	0,25	2	0,5
033S	1	2	0,5	16	0,25	1	1
033N	0,5	0,5	0,25	16	0,0625	1	0,5

Tabela 4. Wartości MIC dla antybiotyków konwencjonalnych i AMPs wobec szczepów klinicznych *S. aureus* c.d.

Szczep	MIC [$\mu\text{g/ml}$]						
	Mupirocyna	Tetracyklina	Wankomycyna	CAMEL	Citropina 1.1	LL-37	Temporyna A
017S (MRSA)	0,125	0,126	2	2	16	128	32
018N	0,5	0,25	1	4	16	128	16
018S	0,125	0,125	1	4	32	128	16
019N	0,0625	0,125	1	4	16	128	16
019S	0,125	0,125	1	4	32	128	16
020N	0,25	0,25	2	4	16	128	8
020S	0,25	0,25	1	4	16	128	16
021S	0,25	32	2	4	16	>512	16
022N	0,25	0,125	2	4	16	>512	8
023S	0,25	32	1	4	16	128	8
023N	0,25	32	1	4	16	>512	16
024N	256	0,25	0,25	1	2	2	16
024S	0,25	0,25	2	4	16	128	16
025S	>512	0,25	1	2	2	4	16
025N	0,25	0,25	1	4	16	>512	16
026N	0,5	0,5	0,5	4	16	>512	16
027N	0,125	0,5	1	4	16	128	16
027S	0,125	0,5	1	4	16	128	16
028S	256	0,5	0,25	2	2	4	8
029S	512	0,25	0,25	2	2	4	8
029N	0,125	32	1	2	8	512	16
030N	0,25	0,5	2	2	1	2	8
030S	0,25	0,5	2	4	16	64	16
031S	32	0,25	0,25	2	2	2	8
031N	8	0,5	1	4	16	64	16
032S	>512	0,25	0,125	2	2	4	8
032N	0,25	0,25	2	4	8	128	16
033S	512	0,125	0,25	2	2	2	8
033N	512	0,25	0,25	2	2	4	8

Tabela 5. Wartości MIC dla antybiotyków konwencjonalnych i AMPs wobec szczepów klinicznych *S. aureus* c.d.

Szczep	MIC [µg/ml]						
	Ampicylina	Cyprofloksacyna	Daptomycyna	Erytromycyna	Kwas fusydowy	Linezolid	Linkomycyna
034S	0,5	1	0,125	0,25	0,25	2	0,5
034N	4	1	4	2	8	4	64
035N	0,25	0,25	1	0,5	0,25	2	1
035S	0,25	0,25	1	0,25	0,25	2	2
036S	16	0,25	2	>512	0,25	4	16
036N	16	0,25	2	>512	0,25	4	1
037N	4	0,25	1	0,25	0,125	2	0,5
037S	16	0,5	2	0,25	0,125	4	0,5
038N	32	0,25	2	0,25	0,25	4	0,5
038S	8	0,25	2	0,25	0,125	4	0,5
039N	0,25	0,25	0,5	16	0,125	2	1
039S	32	0,25	2	0,25	0,125	4	0,5
040N	16	0,25	2	0,25	0,125	4	32
040S	16	1	2	0,25	0,125	4	16
041S	0,5	0,5	0,25	16	0,125	0,5	0,5
042N	0,5	0,125	2	0,25	2	1	0,5
043SC (MRSA)	32	0,25	1	>512	0,125	2	>512
044N	32	0,125	2	32	0,125	1	>512
045N	8	0,125	1	64	0,125	1	1
045S	16	0,125	2	>512	0,125	2	1
046N	4	0,0625	1	32	0,125	1	1
046S	0,25	0,25	2	32	0,125	1	0,5
048N	8	0,5	1	16	0,125	1	0,5
048S	8	0,25	1	0,125	0,25	1	0,5
049S	0,25	0,25	2	0,125	0,125	2	1
051N (MRSA)	0,25	0,25	2	0,125	0,125	2	1
051S	4	0,25	1	>512	0,125	1	0,5
052S (MRSA)	16	2	2	>512	0,0625	1	0,5
052N	0,5	0,125	1	0,0625	0,0625	1	0,5

Tabela 6. Wartości MIC dla antybiotyków konwencjonalnych i AMPs wobec szczepów klinicznych *S. aureus* c.d.

Szczep	MIC [$\mu\text{g/ml}$]						
	Mupirocyna	Tetracyklina	Wankomycyna	CAMEL	Citropina 1.1	LL-37	Temporyna A
034S	64	0,5	0,25	1	1	2	2
034N	64	0,5	2	128	128	128	32
035N	0,25	0,25	1	8	8	64	16
035S	0,25	0,25	0,5	8	8	64	8
036S	>512	1	1	4	16	64	4
036N	>512	0,125	1	4	8	128	4
037N	64	0,25	0,5	4	16	64	4
037S	>512	0,125	1	4	16	64	8
038N	>512	0,25	1	4	16	64	8
038S	512	0,125	0,5	4	16	64	4
039N	512	0,25	0,25	8	2	4	4
039S	512	0,25	1	4	16	64	8
040N	0,25	32	0,5	4	16	64	8
040S	0,25	32	0,5	4	16	64	8
041S	512	0,5	0,25	1	2	2	4
042N	>512	0,25	0,5	4	16	64	8
043SC (MRSA)	0,5	32	0,5	4	16	128	8
044N	512	32	1	4	16	64	8
045N	>512	32	0,5	4	8	64	8
045S	>512	32	0,5	4	16	64	4
046N	0,125	16	0,5	4	8	32	8
046S	0,125	0,5	0,5	2	16	64	4
048N	0,25	0,5	0,5	4	16	64	8
048S	0,125	0,25	0,5	4	16	64	8
049S	0,25	0,25	1	4	8	64	8
051N (MRSA)	0,25	0,25	0,5	4	8	64	4
051S	>512	1	1	2	8	64	8
052S (MRSA)	0,25	2	1	4	16	128	16
052N	0,0625	0,25	2	4	8	64	8

Tabela 7. Wartości MIC dla antybiotyków konwencjonalnych i AMPs wobec szczepów klinicznych *S. aureus* c.d.

Szczep	MIC [$\mu\text{g/ml}$]						
	Ampicylina	Cyprofloksacyna	Daptomycyna	Erytromycyna	Kwas fusydowy	Linezolid	Linkomycyna
053N	16	0,25	1	0,125	0,125	1	0,5
053S	16	0,25	1	>512	0,0625	1	0,5
055S	2	2	2	0,25	0,25	1	1
055N	0,25	2	2	0,25	0,0625	2	1
056N	4	0,5	4	>512	8	2	64
056S	2	0,5	2	>512	8	2	32
057N	8	4	4	0,25	0,125	2	0,5
057S	4	0,25	4	0,25	1	2	0,5
058N	4	0,125	2	0,125	0,125	2	0,5
058S	8	0,125	4	0,25	0,125	2	0,5
059S	0,25	2	4	0,125	0,25	2	0,5
059N	8	0,25	2	0,25	0,125	2	0,5
060S	0,25	1	0,125	0,125	0,125	1	0,5
060N	4	0,0625	2	>512	0,125	2	0,5
061S	4	0,5	1	2	0,125	1	1
061N	4	0,5	2	0,25	0,125	2	0,5
062N (MRSA)	32	>512	4	>512	0,0625	1	64
062S (MRSA)	32	8	2	>512	0,25	1	64
063N	4	0,5	2	0,5	1	8	0,25
063S	2	0,5	2	16	4	1	1
064S	2	0,5	2	0,25	0,0625	1	1
065S	0,125	0,5	2	0,25	8	1	0,25
065N	32	>512	1	16	16	0,5	2
068N	2	1	2	16	32	1	4
068S	4	32	4	16	16	1	16
070N	0,25	0,5	2	16	0,125	1	0,5
070S	0,25	0,5	1	>512	0,0625	1	0,5
071N	2	0,5	1	16	4	4	8
071S	0,25	2	1	32	1	1	2

Tabela 8. Wartości MIC dla antybiotyków konwencjonalnych i AMPs wobec szczepów klinicznych *S. aureus* c.d.

Szczep	MIC [$\mu\text{g/ml}$]						
	Mupirocyna	Tetracyklina	Wankomycyna	CAMEL	Citropina 1.1	LL-37	Temporyna A
053N	0,25	0,5	0,5	4	16	64	8
053S	0,25	0,5	0,5	4	16	64	8
055S	0,25	0,25	0,5	4	16	64	8
055N	0,5	0,25	0,5	4	16	128	4
056N	>512	0,125	2	4	16	128	8
056S	>512	0,125	1	4	16	128	16
057N	1	0,125	1	4	16	128	8
057S	1	4	1	4	16	128	16
058N	0,5	8	1	4	16	128	8
058S	1	0,25	0,5	4	16	128	8
059S	1	0,5	2	2	8	64	8
059N	0,5	0,25	1	4	16	128	8
060S	>512	0,125	0,5	2	2	4	8
060N	1	0,125	1	8	32	64	8
061S	>512	0,125	1	4	8	64	8
061N	>512	0,25	1	4	16	128	8
062N (MRSA)	0,25	32	1	2	16	64	8
062S (MRSA)	0,25	32	1	2	16	64	8
063N	0,25	0,5	0,5	4	8	64	4
063S	0,35	0,5	1	2	16	64	8
064S	0,25	1	1	2	8	64	8
065S	0,5	0,5	0,5	2	8	64	4
065N	0,25	8	1	2	8	128	8
068N	32	0,5	2	2	8	64	8
068S	32	32	1	4	8	128	8
070N	0,0625	32	0,5	2	8	32	4
070S	>512	32	0,5	2	16	64	8
071N	>512	0,0625	0,5	4	16	64	8
071S	>512	0,5	0,5	2	4	64	8

Tabela 9. Wartości MIC dla antybiotyków konwencjonalnych i AMPs wobec szczepów klinicznych *S. aureus* c.d.

Szczep	MIC [µg/ml]						
	Ampicylina	Cyprofloksacyna	Daptomycyna	Erytromycyna	Kwas fusydowy	Linezolid	Linkomycyna
072N	4	0,125	2	0,125	0,0625	1	0,25
072S	4	0,5	1	0,25	0,5	1	0,25
073N	2	0,25	1	4	0,125	0,5	0,25
073S	4	0,5	1	0,5	0,0625	2	0,25
074N	0,125	0,5	1	0,125	0,5	2	1.
074S	0,125	0,5	1	0,5	4	2	>512
075S	4	0,5	2	2	0,5	1	0,25
077N	0,125	0,5	1	0,25	0,0625	2	0,25
077S	0,5	0,5	1	0,25	2	2	0,5
079N	2	1	1	8	8	2	1
079S	2	1	2	0,25	0,5	2	0,25
080N	1	1	2	8	0,0625	1	0,25
080S	0,25	0,5	1	32	0,125	2	0,25
081N	1	1	2	2	0,125	2	0,25
081S	2	2	2	>512	32	1	128
083N	0,25	0,25	1	0,125	0,0625	2	0,25
083S	0,5	0,25	2	0,25	0,0625	2	0,25
086N	4	0,25	2	32	0,25	16	0,5
086S	4	32	4	64	4	1	0,5
087N	2	0,5	1	32	0,25	2	128
088N	0,5	0,5	2	8	0,25	4	16
089N	0,125	1	1	0,25	0,5	2	1
089S	1	0,25	1	0,25	2	2	2
090S	0,25	0,5	1	2	8	2	0,5
092N	2	0,5	1	0,25	0,5	2	0,5
093N	0,25	4	1	0,25	0,25	2	0,5
093S	0,25	2	1	32	8	16	0,5
094S	4	0,5	1	>512	8	2	1
094N	4	0,5	1	0,25	0,125	32	0,5

Tabela 10. Wartości MIC dla antybiotyków konwencjonalnych i AMPs wobec szczepów klinicznych *S. aureus* c.d.

Szczep	MIC [$\mu\text{g/ml}$]						
	Mupirocyna	Tetracyklina	Wankomycyna	CAMEL	Citropina 1.1	LL-37	Temporyna A
072N	0,25	0,125	0,5	4	8	64	8
072S	0,25	0,125	0,5	4	16	64	8
073N	0,25	0,0625	0,5	4	16	64	8
073S	0,5	0,0625	0,5	4	16	64	8
074N	0,5	0,25	0,5	4	16	32	8
074S	1	2.	4	4	16	64	8
075S	1	0,0625	0,5	4	16	64	8
077N	0,5	0,25	0,5	2	8	32	4
077S	0,25	0,25	0,5	2	8	64	4
079N	>512	0,25	1	4	16	64	4
079S	32	0,125	0,5	4	16	64	4
080N	4	0,125	0,5	4	16	64	4
080S	>512	0,25	0,5	2	8	64	4
081N	>512	0,125	1	2	8	128	4
081S	>512	32	1	8	32	128	64
083N	0,25	0,125	1	2	8	32	4
083S	0,25	0,25	0,5	4	16.	64	8
086N	2	0,6	1	8	32	128	8
086S	2	1	0,5	8	64	128	8
087N	0,25	1	4	8	32	128	16
088N	32	4	2	4	32	128	8
089N	512	1	8	4	16	128	8
089S	512	4	2	4	16	128	8
090S	0,5	4	2	16	16	128	8
092N	32	1	4	4	16	128	8
093N	0,125	2	1	8	8	64	8
093S	0,25	4	2	8	16	64	8
094S	4	0,5	0,5	4	8	64	16
094N	0,5	1	1	8	16	128	32

Tabela 11. Wartości MIC dla antybiotyków konwencjonalnych i AMPs wobec szczepów klinicznych *S. aureus* oraz wyizolowanych od zdrowych ochotników (grupa kontrolna).

Szczep	MIC [$\mu\text{g/ml}$]						
	Ampicylina	Cyprofloksacyna	Daptomycyna	Erytromycyna	Kwas fusydowy	Linezolid	Linkomycyna
095S	2	0,5	1	32	0,125	2	2
096N	4	4	1	0,5	0,125	4	4
096S	4	2	2	0,5	0,125	2	128
098S	4	2	1	128	4	2	16
K10N	32	0,5	2	>512	16	2	256
K17N	16	0,25	2	1	0,125	4	1
K19N	0,5	0,25	2	0,5	0,5	2	0,5
K30S	2	0,5	2	>512	0,125	2	>512
K43N	0,25	0,25	2	0,25	1	1	0,5
K46N	16	0,25	1	0,125	1	2	0,25
K48N	32	0,25	2	0,125	1	4	0,25
K50N	16	0,125	1	512	1	2	0,25
K50S	0,5	1	1	16	1	1	0,5

Tabela 12. Wartości MIC dla antybiotyków konwencjonalnych i AMPs wobec szczepów klinicznych *S. aureus* oraz wyizolowanych od zdrowych ochotników (grupa kontrolna) c.d.

Szczep	MIC [µg/ml]						
	Mupirocyna	Tetracyklina	Wankomycyna	CAMEL	Citropina 1.1	LL-37	Temporyna A
095S	16	64	0,5	16	16	128	16
096N	8	32	2	4	16	64	32
096S	2	4	1	8	32	128	8
098S	2	2	0,5	16	16	128	32
K10N	0,5	32	1	4	16	>512	8
K17N	32	0,5	1	4	16	>512	8
K19N	0,5	0,5	1	4	16	128	8
K30S	0,25	0,25	1	4	16	64	8
K43N	0,125	0,5	1	8	4	>512	8
K46N	0,25	0,125	0,5	4	16	64	8
K48N	0,25	0,5	0,5	4	16	>512	8
K50N	0,25	16	1	1	8	128	8
K50S	0,5	0,125	0,25	2	16	2	8