

**Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii**  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

*Mgr Patrycja Krystyna Ogonowska*

Metoda fotodynamiczna jako potencjalne  
narzędzie eradykacji *Staphylococcus aureus*  
kolonizującego chorych z atopowym  
zapaleniem skóry

Photodynamic method as a potential tool for eradication  
of *Staphylococcus aureus* colonizing patients with  
atopic dermatitis

Praca przedstawiona  
Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego  
celem uzyskania stopnia doktora  
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: dr hab. Joanna Nakonieczna, prof. UG  
Zakład Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej

GD AŃSK 2022

Praca naukowa powstała dzięki finansowaniu ze środków:



Grant NCN OPUS „Wpływ przeciwdrobnoustrojowej fotoinaktywacji na wirulencję szczepów *Staphylococcus aureus* kolonizujących chorych z atopowym zapaleniem skóry: badania *in vitro* oraz *in vivo*.”

Grant nr 2017/27/B/NZ7/02323



Grant uzyskany w wyniku Konkursu dla Młodych Pracowników Nauki 2018 „Wpływ stresu fotooksydacyjnego na poziom ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji produkowane przez *Staphylococcus aureus*.”

Nr projektu 538-M036-B038-18

## Podziękowania

*Składam serdeczne podziękowania **dr hab. Joannie Nakoniecznej, prof. UG** za opiekę promotorską w tej jakże niełatwej naukowej drodze, pełnej sukcesów i nieuniknionych niepowodzeń.*

***Dr hab. Mariuszowi Grinholc, prof. UG** za konstruktywne uwagi, pomoc, poświęcony czas i dobre słowo.*

*Dziękuję całej ekipie Zakładu Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej, a w szczególności **Agacie, Oli i Michałowi**, za to, że zawsze mogę na Was liczyć. Za wiele pięknych wspomnień, owocny czas spędzony w laboratorium, pomoc w każdej sytuacji, a także dzielenie sukcesów i porażek. W nauce ważne jest posiadanie wiedzy i umiejętności, ale również ludzie i atmosfera, jaką tworzą. Jestem wdzięczna, że dane mi było pracować z tak fantastycznymi ludźmi, pełnymi pasji do nauki i zarażającymi optymizmem.*

***Dr hab. Danucie Gutowskiej-Owsiak, prof. UG, dr hab. Paulinie Czaplewskiej, prof. UG, mgr Aleksandrze Boguckiej i mgr Adrianowi Kobiela** za życzliwość, owocną współpracę naukową, pomoc merytoryczną i praktyczną.*

***Dr Monice Jakubowskiej, Pani Indze Drebot oraz Pani Katarzynie Gula** za możliwość realizacji badań *in vivo* w Małopolskim Centrum Biotechnologii w Krakowie. Dziękuję za pomoc w realizacji badań, dzielenie się swoją wiedzą i doświadczeniem, miłą atmosferą i owocnie spędzony czas.*

***Ani, Monice i Marcie** za dar przyjaźni – szczerą, wzajemną i bezinteresowną. Dziękuję, że dodajecie mi otuchy, wspieracie i dopingujecie mnie. Dzięki Wam mam w sobie dość sił, by pokonywać wszelkie trudności i iść dalej naprzód. Dziękuję, że jesteście!*

***Moim Rodzicom** za miłość, wsparcie, a także nigdy niegasnącą wiarę we mnie i w moje możliwości nawet wtedy, kiedy sama w siebie wątpiłam. Dziękuję Wam za wszystko!*

***Moim Rodzicom***

## Spis treści

1. Wykaz skrótów .....	5
2. Streszczenie .....	8
3. Abstract .....	9
4. Wstęp .....	10
4.1. Atopowe zapalenie skóry .....	10
4.2. Kolonizacja skóry przez <i>S. aureus</i> u pacjentów z AZS.....	11
4.3. Czynniki sprzyjające kolonizacji <i>S. aureus</i> .....	12
4.4. Czynniki wirulencji <i>S. aureus</i> mające wpływ na zaostrzenie przebiegu AZS .....	15
4.5. Systemy regulacji toksyn gronkowcowych .....	18
4.6. Genotypowanie szczepów <i>S. aureus</i> wyizolowanych od pacjentów z AZS.....	20
4.7. Dekolonizacja skóry u pacjentów z AZS.....	23
4.8. Terapia fotodynamiczna jako skuteczna metoda eradykacji <i>S. aureus</i> .....	24
4.9. Terapia fotodynamiczna (PDT) w praktyce klinicznej.....	28
5. Cele pracy.....	30
6. Materiały .....	31
6.1. Szczepy bakteryjne.....	31
6.2. Warunki hodowli.....	32
6.3. Roztwory i bufony.....	32
6.4. Odczynniki do izolacji DNA .....	33
6.5. Startery do amplifikacji DNA w reakcji PCR .....	34
6.6. Odczynniki do amplifikacji DNA w reakcji PCR .....	34
6.7. Odczynniki do elektroforezy agarozowej kwasów nukleinowych .....	34
6.8. Odczynniki do prowadzenia hodowli komórek eukariotycznych.....	35
6.9. Odczynniki do badania foto- i cytotoksyczności związków fotouczulających .....	35
6.10. Odczynniki do monitorowania wzrostu i żywotności komórek eukariotycznych – system xCELLigence.....	36

6.11. Odczynniki do izolacji i doczyszczania RNA .....	36
6.12. Odczynniki do syntezy cDNA .....	37
6.13. Startery do amplifikacji cDNA w reakcji qPCR .....	37
6.14. Odczynniki do reakcji qPCR .....	38
6.15. Odczynniki do izolacji i rozdziału białek .....	38
6.16. Odczynniki do testu pomiaru aktywności toksyn (test proliferacji).....	41
6.17. Odczynniki do testu ELISA (pomiar IL-2) .....	41
6.18. Odczynniki do modelu <i>ex vivo</i> świńskiej skóry .....	42
6.19. Odczynniki do mysiego modelu kolonizacji skóry przez <i>S. aureus</i> .....	42
6.20. Fotouczulacze.....	43
6.21. Źródła światła .....	43
6.22. Analiza statystyczna .....	44
6.23. Sprzęt laboratoryjny .....	45
<b>7. Metody .....</b>	<b>47</b>
7.1. Izolacja genomowego DNA bakteryjnego .....	47
7.2. Amplifikacja genów toksyn .....	47
7.3. Amplifikacja regionu VNTR (zmienna liczba powtórzeń tandemowych, ang. <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> ) genu <i>spa S. aureus</i> .....	48
7.4. Przeciwbakteryjna inaktywacja fotodynamiczna (aPDI).....	49
7.5. Badanie cyto- i fototoksyczności związków fotouczulających (test MTT).....	50
7.6. Monitorowanie wzrostu i żywotności komórek eukariotycznych w systemie xCELLigence .....	51
7.7. Przeciwbakteryjna inaktywacja fotodynamiczna (aPDI) w warunkach subletalnych (badanie ekspresji genów toksyn).....	52
7.8. Izolacja całkowitego RNA bakteryjnego.....	53
7.9. Doczyszczanie RNA .....	53
7.10. Odwrotna transkrypcja .....	54
7.11. Wybór stabilnego genu referencyjnego.....	55

7.12. Reakcja qPCR .....	56
7.13. Przeciwbakteryjna inaktywacja fotodynamiczna (aPDI) w warunkach subletalnych (badanie produkcji toksyn na poziomie białka) i przygotowanie bakteryjnych lizatów białkowych .....	57
7.14. Western Blot .....	58
7.14.1. Pomiar stężenia całkowitego białka w lizatach białkowych .....	58
7.14.2. Rozdział białek metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących (SDS-PAGE, ang. <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> ) .....	58
7.14.3. Transfer i wykrywanie białka na membranie.....	58
7.15. Pomiar aktywności toksyn (test proliferacji komórek PBMC).....	59
7.16. Pomiar aktywności toksyn (test ELISA na obecność IL-2).....	60
7.17. Weryfikacja efektywności aPDI – model <i>ex vivo</i> świńskiej skóry .....	61
7.18. Weryfikacja efektywności aPDI na mysim modelu kolonizacji skóry przez <i>S. aureus</i> .....	64
8. Wyniki .....	68
8.1. Większość <i>S. aureus</i> wyizolowanych od pacjentów z AZS posiada geny badanych toksyn.....	68
8.2. Typowanie <i>spa</i> i MLST wykazało wysoką różnorodność genetyczną szczepów wyizolowanych od pacjentów z AZS.....	71
8.3. aPDI wykazuje wysoką skuteczność przeciw <i>S. aureus in vitro</i> , niezależnie od obecności genów toksyn .....	72
8.4. aPDI z użyciem RB ze światłem zielonym nie wpływa na żywotność komórek eukariotycznych.....	75
8.5. Analiza cyto- i fototoksyczności z wykorzystaniem systemu xCELLigence .....	78
8.6. Badanie stabilności genów referencyjnych w warunkach aPDI .....	81
8.7. Subletalne warunki aPDI powodują zmianę ekspresji genów kodujących toksyny .....	84
8.8. Subletalne warunki aPDI nie powodują zmian ilości białek toksyn.....	87

<b>8.9. Toksyny tracą aktywność pod wpływem działania aPDI .....</b>	<b>90</b>
<b>8.10. Model <i>ex vivo</i> kolonizacji świńskiej skóry umożliwia śledzenie zmian w ekspresji badanych genów na poziomie transkryptu i białka .....</b>	<b>95</b>
<b>8.11. aPDI prowadzi do spadku przeżywalności bakterii <i>S. aureus</i> w mysim modelu kolonizacji skóry.....</b>	<b>98</b>
<b>9. Dyskusja .....</b>	<b>105</b>
<b>9.1. Struktura genetyczna <i>S. aureus</i> w populacji polskiej pacjentów z AZS jest charakterystyczna dla ogólnej populacji szczepów MSSA w Europie .....</b>	<b>105</b>
<b>9.2. Róż bengalski jest odpowiednim fotouczulaczem do zastosowań <i>in vivo</i> .....</b>	<b>110</b>
<b>9.3. Wybór genu referencyjnego .....</b>	<b>113</b>
<b>9.4. aPDI wpływa na ekspresję genów i aktywność toksyn .....</b>	<b>115</b>
<b>9.5. Róż bengalski ze światłem zielonym może być skuteczną opcją terapeutyczną w zwalczaniu <i>S. aureus</i> bytującego na skórze pacjentów z AZS .....</b>	<b>119</b>
<b>10. Wnioski.....</b>	<b>122</b>
<b>11. Literatura .....</b>	<b>123</b>
<b>12. Suplement.....</b>	<b>154</b>
<b>13. Wykaz rycin .....</b>	<b>181</b>
<b>14. Wykaz tabel .....</b>	<b>183</b>
<b>15. Dorobek naukowy .....</b>	<b>184</b>



## 1. Wykaz skrótów

*agr* – regulator genów pomocniczych, ang. *accessory gene regulator*

AMPs – peptydy przeciwdrobnoustrojowe, ang. *antimicrobial peptides*

aPDI – przeciwbakteryjna inaktywacja fotodynamiczna, ang. *antimicrobial photodynamic inactivation*

APS – nadsiarczan amonu, ang. *ammonium persulfate*

AZS – atopowe zapalenie skóry, ang. *atopic dermatitis*

CA-MRSA – pozaszpitalny szczep gronkowca złocistego opornego na metycylinę, ang. *community acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

CC – kompleks klonalny, ang. *clonal complex*

cDNA – komplementarny DNA, ang. *complementary DNA*

CFU – jednostka tworząca kolonię, ang. *colony forming unit*

*clf* – czynnik skupiana, ang. *clumping factor*

CoNS – koagulazo-ujemne gronkowce, ang. *coagulase-negative Staphylococci*

Cp – cykl progowy, ang. *crossing point*

DEPC – pirowęglan dietylu, ang. *diethyl pyrocarbonate*

DMEM – modyfikowana pożywka Eagle'a, ang. *Dulbecco's modified Eagle medium*

DMSO – dimetylosulfotlenek, ang. *dimethyl sulfoxide*

dNTPs – trójfosforany deoksyrybonukleotydów, ang. *deoxynucleotide triphosphates*

DPBS – roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym Dulbecco, ang. *Dulbecco's phosphate buffered saline*

EASI – indeks powierzchni i nasilenia egzemy, ang. *Eczema Area and Severity Index*

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy, ang. *ethylene-diamine-tetraacetic acid*

ELISA – test immunoenzymatyczny, ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*

FBS – płodowa surowica bydlęca, ang. *fetal bovine serum*

FRSA – szczep gronkowca złocistego oporny na kwas fusydowy, ang. *fusidic acid resistant Staphylococcus aureus*

HA-MRSA – szpitalny szczep gronkowca złocistego opornego na metycylinę, ang. *hospital acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

HDPs – peptydy obronne gospodarza, ang. *host defense peptides*

HRP – peroksydaza chrzanowa, ang. *horseradish peroxidase*

IL-2 – interleukina 2, ang. *interleukin-2*

LA-MRSA – odzwierzęcy szczep gronkowca złocistego opornego na metycylinę, ang. *livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

LED – dioda emitująca światło, ang. *light-emitting diode*

MEM NEAA – pożywka minimalna z dodatkiem aminokwasów, ang. *minimum essential medium, non-essential amino-acids*

MHC – główny układ zgodności tkankowej, ang. *major histocompatibility complex*

MLST – typowanie na podstawie sekwencji wielu loci, ang. *multi-locus sequence typing*

MLVF – jednoczesna amplifikacja wielu loci o zróżnicowanej liczbie tandemowych powtórzeń, ang. *multiple-locus VNTR fingerprinting*

MRSA – gronkowiec złocisty oporny na metycylinę, ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MSSA – gronkowiec złocisty wrażliwy na metycylinę, ang. *methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*

MTT – błękit tiazolilowy bromek tetrazoliowy, ang. *methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*

NMB – nowy błękit metylenowy, ang. *new methylene blue*

NMF – naturalny czynnik nawilżający, ang. *natural moisturizing factor*

OD – gęstość optyczna, ang. *optical density*

PBMC – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, ang. *peripheral blood mononuclear cells*

PBS – roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym, ang. *phosphate-buffered saline*

PCA – kwas pirolidono-karboksyłowy, ang. *pyrrolidone carboxylic acid*

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy, ang. *polymerase chain reaction*

PFGE – analiza restrykcyjna chromosomowego DNA połączona z elektroforezą pulsową, ang. *pulse-field gel electrophoresis*

PMA – octan mirystynianu forbolu, ang. *phorbol myristate acetate*

PS – fotouczulacz, ang. *photosensitizer*

PSG – penicylina, streptomycyna, glutamina, ang. *penicillin-streptomycin-glutamine*

PVDF – polifluorek winylidenu, ang. *polyvinylidene difluoride*

pz – par zasad, ang. *base pair*

qPCR – ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy, ang. *quantitative polymerase chain reaction*

RB – róż bengalski, ang. *rose bengal*

rcf – względna siła odśrodkowa, ang. *relative centrifugal force*

ROS – reaktywne formy tlenu, ang. *reactive oxygen species*

rpm – obroty na minutę, ang. *revolutions per minute*

SaeRS – regulator produkcji egzoprotein, ang. *S. aureus exoprotein expression*

SAg – superantygen, ang. *superantigen*

SASSAD – skala atopowego zapalenia skóry w sześciu obszarach i sześciu oznakach, ang. *Six Area Six Sign Atopic Dermatitis*

SCORAD – wskaźnik oceny nasilenia atopowego zapalenia skóry, ang. *Severity Scoring Index of Atopic Dermatitis*

sdr – gen kodujący powtórzenie asparagianu seryny, ang. *Ser-Asp-rich fibrinogen-binding protein*

SDS – laurylosiarczan sodu, ang. *sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE – elektroforeza białek w warunkach denaturujących, ang. *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*

SEA – gronkowcowa enterotoksyna A, ang. *staphylococcal enterotoxin A*

SEB – gronkowcowa enterotoksyna B, ang. *staphylococcal enterotoxin B*

SEC – gronkowcowa enterotoksyna C, ang. *staphylococcal enterotoxin C*

SED – gronkowcowa enterotoksyna D, ang. *staphylococcal enterotoxin D*

SEs – enterotoksyny gronkowcowe, ang. *staphylococcal enterotoxins*

spa – gen kodujący białko A, ang. *Staphylococcus aureus protein A*

SrrAB – system gronkowcowej odpowiedzi oddechowej, ang. *staphylococcal respiratory response*

sspA – gen kodujący proteazę serynową V8, ang. *serine protease V8*

ST – typ sekwencji, ang. *sequence type*

TBE – Tris-kwas borowy-EDTA, ang. *tris-borate-EDTA*

TBS – sól fizjologiczna buforowana Tris, ang. *tris-buffered saline*

TCR – receptor limfocytów T, ang. *T cell receptor*

TEMED – N, N, N', N'-Tetrametyloetylenodiamina, ang. *N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine*

TEWL – przeznaskórkowa utrata wody, ang. *transepidermal water loss*

TSA – agar tryptozowo-sojowy, ang. *tryptic soy agar*

TSB – bulion tryptozowo-sojowy, ang. *tryptic soy broth*

TSST-1 – toksyna wstrząsu toksycznego, ang. *toxic shock syndrome toxin-1*

UCA – kwas urokanowy, ang. *urocanic acid*

VNTR – zmienna liczba powtórzeń tandemowych, ang. *variable number of tandem repeats*

## 2. Streszczenie

U zdecydowanej większości pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (AZS) zmiany skórne są skolonizowane przez *Staphylococcus aureus* (gronkowca złocistego). Bakterie te produkują szereg czynników wirulencji, w tym toksyny posiadające właściwości superantygenów. Działanie superantygenów prowadzi do nadmiernej proliferacji limfocytów, a w efekcie do masowej produkcji cytokin prozapalnych, powodując nasilenie stanu zapalnego u pacjentów z AZS. Nieleczeni pacjenci są potencjalnym rezerwuarem *S. aureus*, czego wynikiem jest rozprzestrzenianie się drobnoustroju w populacji, a w konsekwencji wzrost liczby poważnych infekcji bakteryjnych. Dekolonizacja gronkowca złocistego ze skóry pacjentów z AZS może umożliwić przywrócenie prawidłowego funkcjonowania skóry i odbudowę jej naturalnej flory bakteryjnej. W związku z tym, iż obecne metody dekolonizacji *S. aureus* wiążą się z wieloma skutkami ubocznymi, w niniejszej pracy jako alternatywę zaproponowano metodę fotodynamiczną skierowaną przeciwko drobnoustrojom (ang. *antimicrobial photodynamic inactivation*, aPDI). Metoda fotodynamiczna opiera się na działaniu (i) związku fotouczulającego, (ii) światła widzialnego o określonej długości fali oraz (iii) tlenu. W wyniku działania tych trzech czynników powstają reaktywne formy tlenu, które uszkadzają istotne komponenty komórkowe drobnoustrojów, prowadząc do ich śmierci.

Celem niniejszej rozprawy była charakterystyka genotypowa izolatów *S. aureus* pochodzących od pacjentów z AZS, weryfikacja efektywności aPDI wobec klinicznych i referencyjnych izolatów *S. aureus* oraz zbadanie wpływu aPDI na toksyny o istotnym znaczeniu dla patogenności *S. aureus*. Efektywność aPDI została zweryfikowana na modelach *ex vivo* (świńskiej skóry) i *in vivo* (mysiej skóry).

Badana grupa izolatów *S. aureus* pochodzących od pacjentów z AZS jest wysoce zróżnicowana pod kątem genetycznym. aPDI z zastosowaniem różu bengalskiego oraz światła zielonego prowadzi do eradykacji zarówno klinicznych, jak i referencyjnych szczepów *S. aureus*. Ponadto udowodniono, że aPDI w subletalnych warunkach powodowała spadek ekspresji czterech z pięciu badanych genów kodujących toksyny. Takiego efektu nie zaobserwowano na poziomie zmiany ilości białka, natomiast pod wpływem aPDI toksyny traciły swoją aktywność. Na modelu mysim wykazano, iż aPDI prowadzi do statystycznie istotnego zmniejszenia liczby *S. aureus* na powierzchni skóry. Powyższe obserwacje wskazują, że aPDI może stanowić skuteczną metodę prowadzącą do dekolonizacji skóry u pacjentów z AZS oraz obniżenia aktywności badanych toksyn, co może w istotny sposób doprowadzić do zmniejszenia stanu zapalnego u pacjentów z AZS.

### 3. Abstract

In most patients with atopic dermatitis (AD), skin lesions are colonized by *Staphylococcus aureus*. These bacteria produce several virulence factors, including toxins with superantigenic properties. The action of superantigens (SAGs) leads to massive stimulation of T cells proliferation and the release of proinflammatory cytokines, resulting in exacerbation of inflammation in AD patients. Decolonization of *Staphylococcus aureus* from the skin of AD patients is an important process that will restore the proper functioning of the skin and rebuild its bacterial flora. Moreover, untreated patients are a potential reservoir of *S. aureus*, which may facilitate transmission in the population and the development of severe bacterial infections.

As current methods of *S. aureus* decolonization are associated with many side effects and limitations, this study proposed an alternative method of antimicrobial photodynamic inactivation (aPDI) to decolonize *S. aureus* from the skin. The method is based on the action of (i) a photosensitizer, (ii) visible light with a defined wavelength and (iii) oxygen. As a result of the action of these three factors, reactive oxygen species were created that damage the bacterial cell wall and other cell components, leading to the death of microbes.

The study aimed to genotype *S. aureus* isolates from AD patients, to verify the efficacy of aPDI against clinical and reference *S. aureus* strains and the effect of aPDI on staphylococcal toxins. Finally, the possibility of skin decolonization was verified using an *ex vivo* (porcine skin) and *in vivo* (mouse skin) model.

The studied group of *S. aureus* isolates from AD patients was shown to be highly heterogeneous. aPDI using rose bengal activated with green light effectively eradicated both clinical and reference strains of *S. aureus*, and toxin genes did not affect the effectiveness of this method. The sublethal conditions of aPDI caused a marked decrease in the expression of four out of five tested toxin genes. Such an effect was not observed at the protein level, but it has been proven that staphylococcal toxins lost their biological function after aPDI treatment. In an *in vivo* mouse model, aPDI was shown to lead to a statistically significant reduction in the number of *S. aureus* on the skin surface. The following observations indicate that aPDI may be an effective method of eradication in the decolonization process in patients with AD. In addition, reducing the level of bacterial virulence factors and the loss of their biological functions under the aPDI treatment could effectively reduce inflammation in AD patients.

## 4. Wstęp

### 4.1. Atopowe zapalenie skóry

Atopowe zapalenie skóry (AZS), znane również jako wyprysk atopowy lub egzema, to przewlekła i nawracająca choroba zapalna skóry. AZS często towarzyszą inne schorzenia alergiczne, tj. astma oskrzelowa, alergiczny nieżyt nosa (katar sienny) czy alergia pokarmowa, znacząco obniżające jakość życia pacjentów. Choroba dotyka najczęściej niemowlęta oraz małe dzieci, ale może również pojawiać się dopiero w okresie dojrzewania i dorosłości (Blome *i in.*, 2016, Nutten, 2015).

AZS obserwuje się u 15-30% dzieci oraz 10-17% dorosłych światowej populacji (Bylund *i in.*, 2020, Kowalska-Olędzka *i in.*, 2019, Silverberg, 2017). Według danych Polskiego Towarzystwa Chorób Atopowych (PTCA) w naszym kraju na AZS cierpi 15% dzieci i 1,5% dorosłych polskiej populacji (Sybilski *i in.*, 2015). AZS objawia się przede wszystkim zaczerwienioną, suchą, popękaną i łuszczącą się skórą, czemu towarzyszy swędzenie (szczególnie uporczywe w nocy i prowadzące do zaburzeń snu), wysypka na policzkach (u niemowląt), szyi, skórze głowy, zgięciach łokciowych i kolanowych (dzieci i dorośli), a także skłonność do nawracających zakażeń o podłożu bakteryjnym (Bieber, 2010, Blome *i in.*, 2016). W 1980 roku, Hanifin i Rajka zaproponowali kryteria rozpoznawania AZS. Pacjenci cierpiący na AZS muszą spełnić co najmniej 3 z 4 kryteriów większych (np. świąd skóry, typowe umiejscowienie zmian skórnych, wywiad atopowy) oraz co najmniej 3 kryteria mniejsze (np. podwyższony poziom przeciwciał IgE, suchość skóry, nawracające zakażenia skórne) (Hanifin i Rajka, 1980). Dodatkowo, opracowano wskaźniki mierzące nasilenie schorzenia, takie jak: EASI (ang. *Eczema Area and Severity Index*, indeks powierzchni i nasilenia egzemy), SASSAD (ang. *Six Area Six Sign Atopic Dermatitis*, skala atopowego zapalenia skóry w sześciu obszarach i sześciu oznakach), a także SCORAD (ang. *Severity Scoring Index of Atopic Dermatitis*, wskaźnik oceny nasilenia atopowego zapalenia skóry) (Berth-Jones i Berth-Jones, 1996, Hanifin *i in.*, 2001, Housman *i in.*, 2002, Kunz *i in.*, 1997).

AZS jest wieloczynnikową chorobą, której dokładna patogenezą nie jest w pełni wyjaśniona. Na rozwój AZS mają wpływ czynniki genetyczne, immunologiczne i środowiskowe (tj. roztocza, detergenty, dym tytoniowy, konserwanty, alergeny obecne w sierści zwierząt domowych, dieta), powodujące upośledzenie bariery skórnej sprzyjające wzmożonej kolonizacji przez bakterie *S. aureus* (Bonamonte *i in.*, 2019, Ring *i in.*, 1992).

## 4.2. Kolonizacja skóry przez *S. aureus* u pacjentów z AZS

Pierwsze wzmianki na temat kolonizacji skóry przez *Staphylococcus aureus* u pacjentów z AZS pojawiły się już w latach 70. ubiegłego wieku. Zaobserwowano wówczas, iż *S. aureus* jest przeważającym gatunkiem bakteryjnym na skórze pacjentów z AZS (Leyden, 1973). Wykazano, że zagęszczenie *S. aureus* na zmienionej skórze pacjentów z AZS jest istotnie wyższe niż u zdrowych nosicieli (Hauser *i in.*, 1985).

*S. aureus* kolonizuje skórę około 5-30% zdrowych nosicieli. U pacjentów z AZS ten odsetek jest znacznie wyższy i sięga 57-100% u dzieci oraz 54-100% u dorosłych (Clausen *i in.*, 2017, 2019, Na *i in.*, 2012, Ogonowska *i in.*, 2021, Pascolini *i in.*, 2011, Rojo *i in.*, 2014). *S. aureus* kolonizujący skórę pacjentów z AZS pełni rolę czynnika nasilającego i zaostrzającego stan zapalny (Breuer *i in.*, 2002). Częstym miejscem kolonizowanym przez bakterię jest jama nosowo-gardłowa (46,1-64,1%) oraz nieuszkodzona skóra (28-39%) (Clausen *i in.*, 2017, Matsui *i in.*, 2000, Na *i in.*, 2012, Park *i in.*, 2016, Totté *i in.*, 2016). Odsetek pacjentów z AZS skolonizowanych przez *S. aureus* zarówno na skórze, jak i w jamie nosowo-gardłowej wynosi 65-77,3% (Breuer *i in.*, 2002, Na *i in.*, 2012, Tomi *i in.*, 2005). *S. aureus* zasiedlający błonę śluzową nosa jest niebezpiecznym rezerwuarem bakterii, który na drodze autotransmisji może przenosić się na skórę, a tym samym stanowić potencjalne źródło ponownej kolonizacji (Breuer *i in.*, 2002, Patel *i in.*, 2001).

Aż 55% pacjentów z AZS jest trwałymi nosicielami *S. aureus*. Ma to istotne znaczenie, ze względu na korelację pomiędzy trwałym nosicielstwem, a wyższym wskaźnikiem SCORAD (Alsterholm *i in.*, 2017, Chiu *i in.*, 2009, Jinnestål *i in.*, 2014). Pacjenci z umiarkowaną i ostrą postacią AZS są częściej kolonizowani zarówno w jamie nosowo-gardłowej, jak i na niezmiennych oraz zmienionych obszarach skóry, co przekłada się na stopień nasilenia choroby (Clausen *i in.*, 2017). Pacjentów z łagodną postacią choroby skolonizowanych *S. aureus* jest 43%, natomiast z ostrą postacią AZS, aż 83% (Totté *i in.*, 2016). Oznacza to, że nie tylko jama nosowo-gardłowa, ale również skóra stanowi u pacjentów z AZS istotny rezerwuár *S. aureus* i może przyczyniać się do zaostrzenia przebiegu choroby (Alsterholm *i in.*, 2017, Chiu *i in.*, 2009).

Opisując kolonizację *S. aureus* u pacjentów z AZS, szczególną uwagę należy poświęcić szczepom MRSA (ang. *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus*). Jest to ważna i znacząca grupa szczepów opornych na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe (cefalosporyny, karbapenemy, monobaktamy i penicyliny). Występowanie tych wielolekoopornych szczepów powoduje ograniczone możliwości leczenia infekcji wywołanych przez te bakterie, w tym infekcji

skórnych (Kowalski *i in.*, 2005, Rangel i Paller, 2018). Wykazano, iż wśród szczepów *S. aureus* kolonizujących pacjentów z AZS, odsetek szczepów MRSA jest 4-13 krotnie wyższy w porównaniu do populacji zdrowych nosicieli (Lo *i in.*, 2010, Ogonowska *i in.*, 2021, Suh *i in.*, 2008).

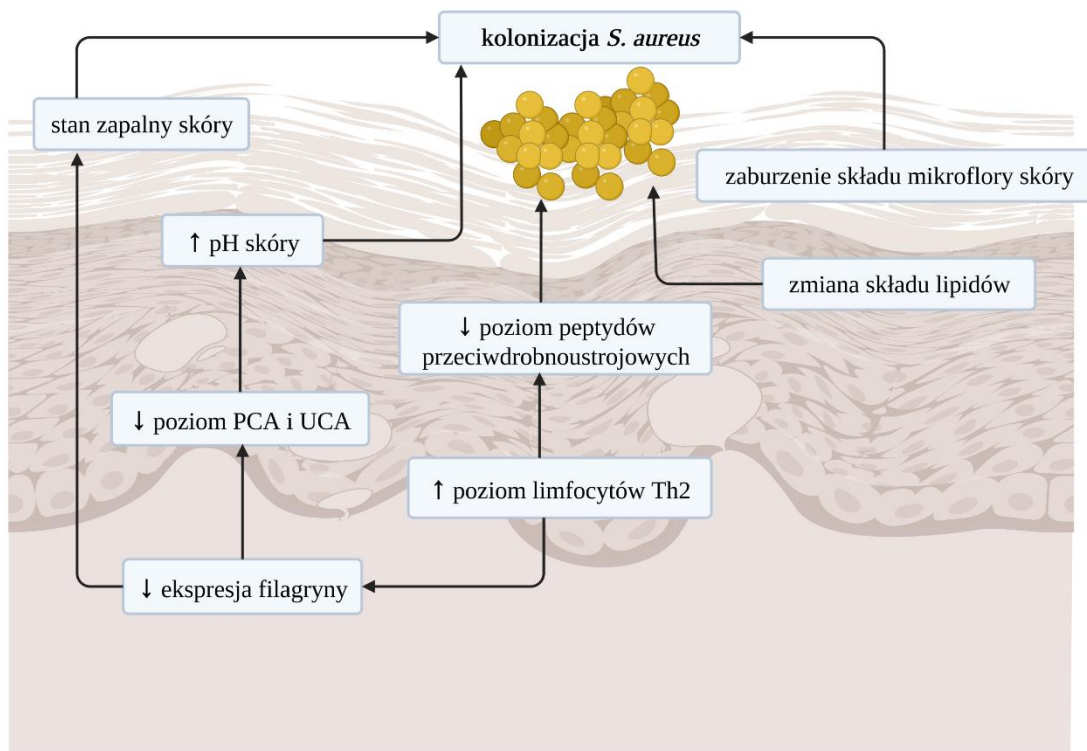
Początkowo uważano, że zakażenia MRSA dotyczą wyłącznie pacjentów przebywających w szpitalach (HA-MRSA, ang. *Hospital-Acquired MRSA*). Badania wykazały jednak, iż szczepy MRSA można również wyizolować od osób niemających styczności z opieką zdrowotną (CA-MRSA, ang. *Community-Acquired MRSA*). Zakażenia wywołane szczepami CA-MRSA są związane z infekcjami skóry oraz tkanek miękkich, przy czym skóra pacjentów z AZS stanowi znaczący ich rezerwuar (Chung *i in.*, 2008, King *i in.*, 2006). Według danych opublikowanych w 2008 roku, w Stanach Zjednoczonych, 18,3% pacjentów z AZS skolonizowanych jest szczepami CA-MRSA (Chung *i in.*, 2008). Wielolekooporne szczepy mogą w łatwy sposób przenosić się w wyniku bezpośredniego kontaktu (Conceição *i in.*, 2013, Markley *i in.*, 2012). Pacjenci z AZS są obarczeni zwiększonym ryzykiem zakażenia MRSA, z czego najbardziej narażeni są pacjenci z ciężką postacią AZS (Abad *i in.*, 2020). W 2004 roku odnotowano pierwszy przypadek nowego szczepu MRSA, którego nie udało się scharakteryzować standardową metodą genotypowania PFGE (ang. *Pulse-Field Gel Electrophoresis*). Był to pierwszy przypadek odzwierzęcego przeniesienia szczepów MRSA. W wyniku tego wyodrębniono nową grupę nazwaną LA-MRSA (ang. *Livestock-Acquired MRSA*), której główny rezerwuar stanowią zwierzęta hodowlane (Reischl *i in.*, 2009, Voss *i in.*, 2005). Szczepy LA-MRSA powodują infekcje skóry i tkanek miękkich (SSTI, ang. *Skin and Soft Tissue Infections*), a także infekcje o cięższym przebiegu, podobne do tych wywoływanych przez szczepy CA-MRSA i HA-MRSA. Z przeprowadzonych badań epidemiologicznych wynika, iż częstość występowania zakażeń wywołanych przez szczepy LA-MRSA wynosi 15% wszystkich infekcji skóry i tkanek miękkich wywołanych przez szczepy MRSA (Butaye *i in.*, 2016). Na chwilę obecną brak jest danych dotyczących infekcji szczepami LA-MRSA w populacji pacjentów z AZS.

### **4.3. Czynniki sprzyjające kolonizacji *S. aureus***

U pacjentów z AZS można wyróżnić kilka czynników, które sprzyjają kolonizacji skóry przez bakterie *S. aureus* (Ryc. 1). Jednym z nich jest zmiana składu lipidów i kwasów tłuszczowych w skórze. W naskórku, zwłaszcza w warstwie rogowej, zaobserwowano istotnie niższy poziom ceramidów i sfingozyny oraz wyższy poziom cholesterolu (Arikawa *i in.*, 2002,



Murata *i in.*, 1996, Di Nardo *i in.*, 1998). Wykazano, że *S. aureus* kolonizujący pacjentów z AZS produkuje enzym proteolityczny, ceramidazę powodujący obniżenie ilości ceramidów (Ohnishi *i in.*, 1999). Niedobór ceramidów w warstwie rogowej, objawiający się suchością skóry pacjentów z AZS, powoduje nasilenie utraty wody przez naskórek (TEWL, ang. *Transepidermal Water Loss*) (Cardona *i in.*, 2006, Imokawa *i in.*, 1991). Ułatwia to przenikanie alergenów do głębszych warstw skóry a w konsekwencji silne reakcje alergiczne oraz przewlekłe i nawracające wypryskowe zmiany skórne u pacjentów z AZS (Bos *i in.*, 1994).



**Rycina 1. Zestawienie czynników sprzyjających kolonizacji *S. aureus* na skórze pacjentów z AZS.** Na podstawie (Kim *i in.*, 2019). PCA, kwas piroolidono-karboksyłowy; UCA, kwas urokanowy. Ilustracja wykonana przy pomocy platformy BioRender (Patrycja Ogonowska, 2021).

Kolejnym czynnikiem jest znacznie obniżony poziom peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs, ang. *antimicrobial peptides*), takich jak defensyny (HBD, ang. *human beta defensin*) i katelicydyny (LL-37) oraz peptydów obronnych gospodarza (HDPs, ang. *host defense peptides*) wytwarzanych przez keratynocyty (Ong *i in.*, 2002). Cytokiny produkowane przez limfocyty Th2 - IL-4, IL-13 i IL-31 hamują ekspresję ludzkich genów  $\beta$ -defensyn (głównie HBD-2 i HBD-3) w keratynocytach (Ong *i in.*, 2002). Ponadto brak IL-1 $\beta$  i IL-22 powoduje zmniejszoną ekspresję AMPs, w szczególności HBD-2 i LL-37 (Roll *i in.*, 2004, Wolk *i in.*, 2004). Stan ten przyczynia się to do zwiększonej proliferacji *S. aureus*,

powodując zaburzenie składu mikroflory skóry, a w konsekwencji wzrostu podatności na infekcje skórne (Geoghegan *i in.*, 2018, Kanda i Watanabe, 2012).

Na zwiększoną kolonizację *S. aureus* wpływa również zaburzenie składu mikroflory skóry. Zdrowa skóra charakteryzuje się heterogenną populacją bakterii komensalnych, natomiast skóra pacjentów z AZS, zwłaszcza w zaostrzonej postaci choroby, jest skolonizowana w przeważającej większości przez bakterie *S. aureus* (Byrd *i in.*, 2017, Leung, 2019). Okazuje się, że w przypadku zdrowej skóry, głównym zadaniem bakterii komensalnych, takich jak koagulazo-ujemne gronkowce, (CoNS, ang. *Coagulase-Negative Staphylococci*) jest ochrona skóry przed *S. aureus*. Natomiast ich brak skutkuje u pacjentów z AZS wzmożoną kolonizacją skóry przez *S. aureus* (Nakatsuji *i in.*, 2017). Przeniesienie bakterii z grupy CoNS (np. *S. hominis* i *S. epidermidis*) na skórę pacjentów z AZS powoduje zahamowanie rozwoju *S. aureus* (Nakatsuji *i in.*, 2017). Rolą bakterii komensalnych jest ochrona skóry przed infekcjami poprzez produkcję peptydów przeciwbakteryjnych (AMPs), modulowanie rozwoju komórek T oraz hamowanie stanów zapalnych skóry (Kim *i in.*, 2019).

Odpowiednia wartość pH skóry odgrywa kluczową rolę w jej ochronie przed patogenami, a także w kontroli procesu złuszczenia martwego naskórka. W zdrowej skórze poziom pH jest dość niski i wynosi od 4,0 do 6,0. Za taki poziom pH odpowiadają kwasy tłuszczowe, będące produktem hydrolizy fosfolipidów w łju i pocie (Chan i Mauro, 2011). Istnieje ścisła zależność pomiędzy niższym poziomem pH, a obniżoną produkcją białek, takich jak białko A, białko wiążące fibronektynę A, czynnik skupiania, zaangażowanych w przyleganie *S. aureus* do skóry (Leung, 2013). U pacjentów z AZS kolonizację i wzrost liczby *S. aureus* mogą ułatwić zmiany poziomu pH w kierunku bardziej zasadowego (O'Regan i Irvine, 2008, Proksch *i in.*, 2008). Wykazano, że optymalna wartość pH dla adhezji *S. aureus* do ludzkich keratynocytów wynosi 7,0-8,0 (Mempel *i in.*, 1998).

Filagryna (FLG) to białko naskórkowe, będące częścią warstwy rogowej naskórka. Jego główną rolą jest nawilżenie, tworzenie bariery chemicznej i strukturalnej, a także utrzymanie homeostazy naskórka (O'Regan i Irvine, 2008). Zadaniem filagryny jest wiązanie keratynowego cytoszkieletu w procesie dojrzewania keratynocytów w warstwie skóry (Brown i McLean, 2012, Candi *i in.*, 2005). W procesach przekształcania filagryny dochodzi do jej rozpadu, w wyniku czego powstają związki wchodzące w skład naturalnego czynnika nawilżającego (NMF, ang. *Natural Moisturizing Factor*) takie jak kwas pirolidono-karboksyłowy (PCA, ang. *Pyrrolidone Carboxylic Acid*) oraz kwas urokanowy (UCA, ang. *Urocanic Acid*) (O'Regan *i in.*, 2008, Rawlings *i in.*, 1994). Czynnik NMF odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu wilgotności warstwy rogowej naskórka i odpowiedniego pH skóry (O'Regan

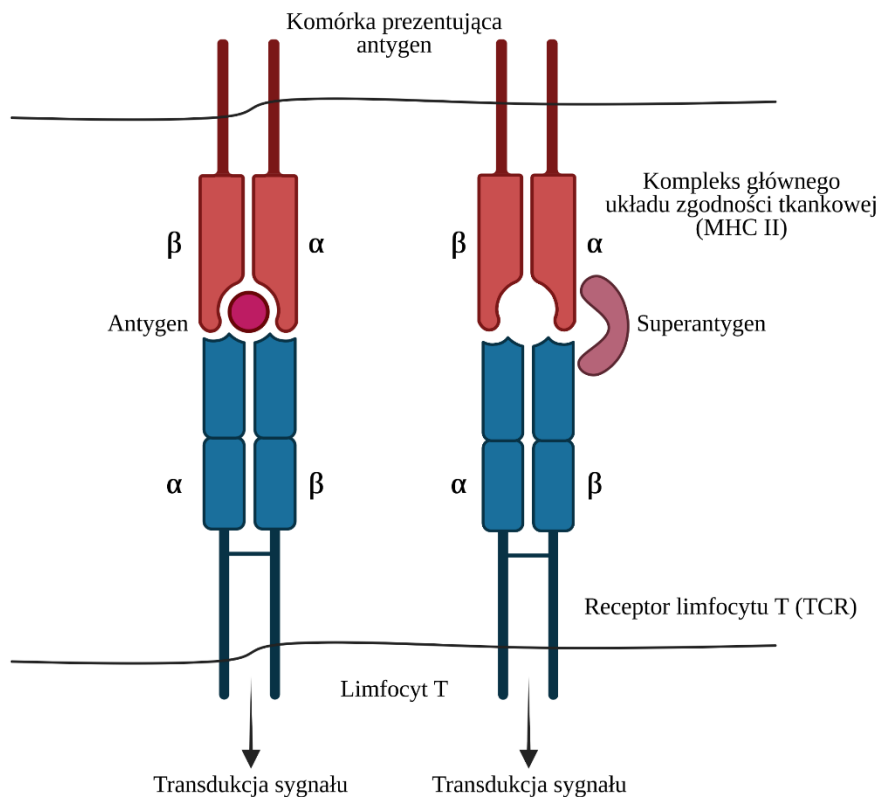
*i in.*, 2008, Rawlings *i in.*, 1994). Właściwości mikrośrodowiska, takie jak aktywność proteaz, poziom pH, wilgotność względna, determinują ekspresję FLG i jej hydrolizę do NMF (Scott i Harding, 1986). Badania *in vitro* wykazały, że produkty rozkładu FLG (PCA i UCA) wpływają na tempo wzrostu bakterii *S. aureus* (Miajlovic *i in.*, 2010). Mutacje powodujące utratę funkcji filagryny odgrywają istotną rolę w procesie zaostrzenia choroby u pacjentów z AZS, powodując nasilenie stanu zapalnego skóry, wynikającego ze zwiększonej penetracji alergenów lub substancji drażniących (Brown i McLean, 2012, Gruber *i in.*, 2011, O'Regan *i in.*, 2008). Udowodniono, iż mutacja w genie filagryny u pacjentów z AZS, przyczynia się do istotnie wyższego stopnia kolonizacji *S. aureus*, zarówno na zmienionej skórze, jak i w jamie nosowogardłowej, w porównaniu do pacjentów z AZS nie posiadających mutacji w tym genie (Clausen *i in.*, 2017).

#### **4.4. Czynniki wirulencji *S. aureus* mające wpływ na zaostrzenie przebiegu AZS**

Jedną z grup czynników wirulencji, które umożliwiają bakteriom przeżycie są wydzielane przez nie egzoenzymy (lipazy, nukleazy, proteazy) oraz egzotoksyny. Ich główną funkcją jest przekształcanie cząsteczek komórkowych gospodarza w składniki odżywcze, wykorzystywane do wzrostu bakterii (Tam i Torres, 2019). Do grupy egzotoksyn można zaliczyć cytolizyny, superantygeny (SAGs, ang. *Superantigens*) i eksfoliatyny (A i B) (Dinges *i in.*, 2000).

Cechą wyróżniającą toksyny gronkowcowe na tle innych czynników wirulencji jest posiadanie właściwości superantygenów (SAGs) (Spaulding *i in.*, 2013). Superantygeny mają masę cząsteczkową w zakresie od 19 do 30 kDa (McCormick *i in.*, 2001). Wykazują one odporność na wysoką temperaturę, wysychanie, działanie proteaz (papaina, pepsyna, podpuszczka, tripsyna), a także działanie kwasów żołądkowych (Le Loir *i in.*, 2003, McCormick *i in.*, 2001). Mechanizm działania superantygenów opiera się na wiązaniu białek głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC II, ang. *Major Histocompatibility Complex Class II*) oraz receptorów limfocyty T (TCR, ang. *T-Cell Receptor*) poza klasycznym miejscem wiązania antygeny (Ryc. 2) (Dellabona *i in.*, 1990, Fink *i in.*, 1986). Konsekwencją takiego wiązania jest nadmierna proliferacja limfocytów T, a w efekcie masowa produkcja cytokin prozapalnych, w tym IL-2, TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  (przez limfocyty T CD4+), a także IL-1  $\beta$  oraz TNF- $\alpha$  (przez makrofagi) (Harris *i in.*, 1993, Schlievert *i in.*, 2010). Badania *in vitro* wykazały, iż superantygeny są w stanie indukować oporność limfocytów T na kortykosteroidy,

czyli leki powszechnie stosowane w leczeniu AZS, co skutkuje ograniczeniem możliwości terapeutycznych w jego leczeniu (Hauk *i in.*, 2000).



**Rycina 2. Wiązanie antygeny (po lewej) i superantygeny (po prawej) z cząsteczką głównego układu zgodności tkankowej klasy II (MHC II, na czerwono) i receptorem limfocytów T (TCR, na niebiesko).**  $\alpha$  - łańcuch polipeptydowy alfa,  $\beta$  – łańcuch polipeptydowy beta. Na podstawie (Vasconcelos *i in.*, 2010). Ilustracja wykonana przy pomocy BioRender (Patrycja Ogonowska, 2021).

Do toksyn gronkowcowych o właściwościach superantygenów zaliczają się enterotoksyny (SEs, ang. *Staphylococcal Enterotoxins*; SEA, SEB, SEC, SED, SEE i SEI), enterotoksyno-podobne toksyny (SEIs, ang. *Staphylococcal Enterotoxin-like Toxins*; SEI-G, SEI-H, SEI-J do SEI-U) i toksyna wstrząsu toksycznego (TSST-1, ang. *Toxic Shock Syndrome Toxin-1*) (Spaulding *i in.*, 2013). Toksyny gronkowcowe przyczyniają się do powstawania zatruc pokarmowych, a także zespołu wstrząsu toksycznego (Balaban i Rasooly, 2000, Harris *i in.*, 1993, Ortega *i in.*, 2010, Pinchuk *i in.*, 2010). W przebiegu AZS wskazuje się na rolę toksyn gronkowcowych jako czynników nasilających i zaostrzających u pacjentów stan zapalny skóry (Bunikowski *i in.*, 2000, Taskapan i Kumar, 2000, Zollner *i in.*, 2000).

Jako pierwszą enterotoksynę gronkowcową zidentyfikowano SEA. Kolejne, tj. SEB i SEC wyizolowano niedługo po niej (Bergdoll *i in.*, 1959, 1965, Casman *i in.*, 1963). Wszystkie nowo odkryte enterotoksyny nazywano, nadając im kolejne litery alfabetu. Zmiana

nazewnictwa nastąpiła w 2004 roku, kiedy wprowadzono nową nomenklaturę, umożliwiającą odróżnienie enterotoksyn w zależności od ich aktywności. Czynnikiem odróżniającym enterotoksyny od enterotoksyno-podobnych toksyn jest zdolność do wywoływania, bądź niewywoływania wymiotów u ludzi. Enterotoksyny o aktywności wymiotnej określano jako SEs, a te które takiej aktywności nie posiadają jako SEIs (Lina *i in.*, 2004). Lokalizacja genów enterotoksyn różni się w zależności od ich rodzaju (Tab. 1). Enterotoksyna SEA, w przeciwieństwie do pozostałych enterotoksyn gronkowcowych, nie jest regulowana przez *agr* (ang. *accessory gene regulator*, regulator genów pomocniczych) (Tremaine *i in.*, 1993) (Tab. 1). Jej gen, *sea* jest przenoszony przez profaga, a produkcja SEA jest ściśle powiązana z cyklem życiowym faga i indukowana jest w wyniku wielu czynników stresowych (Borst i Betley, 1994, Cao *i in.*, 2012, Zeaki *i in.*, 2015).

**Tabela 1. Lokalizacja genów toksyn gronkowcowych i systemy ich regulacji.**

Toksyna	Masa białka (Da)	Ruchomy element kodujący gen	System regulacji
<b>SEA</b>	29,675	Profag	-
<b>SEB</b>	31,436	Chromosom, wyspy patogenności (SaPI), plazmid (pZA10)	Agr, SarA, SaeRS
<b>SEC</b>	30,637	Wyspy patogenności (SaPI)	Agr, SarA, $\sigma^B$
<b>SED</b>	29,671	Plazmid (pIB485)	Agr, SarA
<b>TSST-1</b>	26,306	Wyspy patogenności (SaPI)	Agr, $\sigma^B$ , SaeRS

Masy białek zaczerpnięto z bazy UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Dane zebrane na podstawie (Fisher *i in.*, 2018, Yarwood *i in.*, 2002, Zeaki *i in.*, 2019).

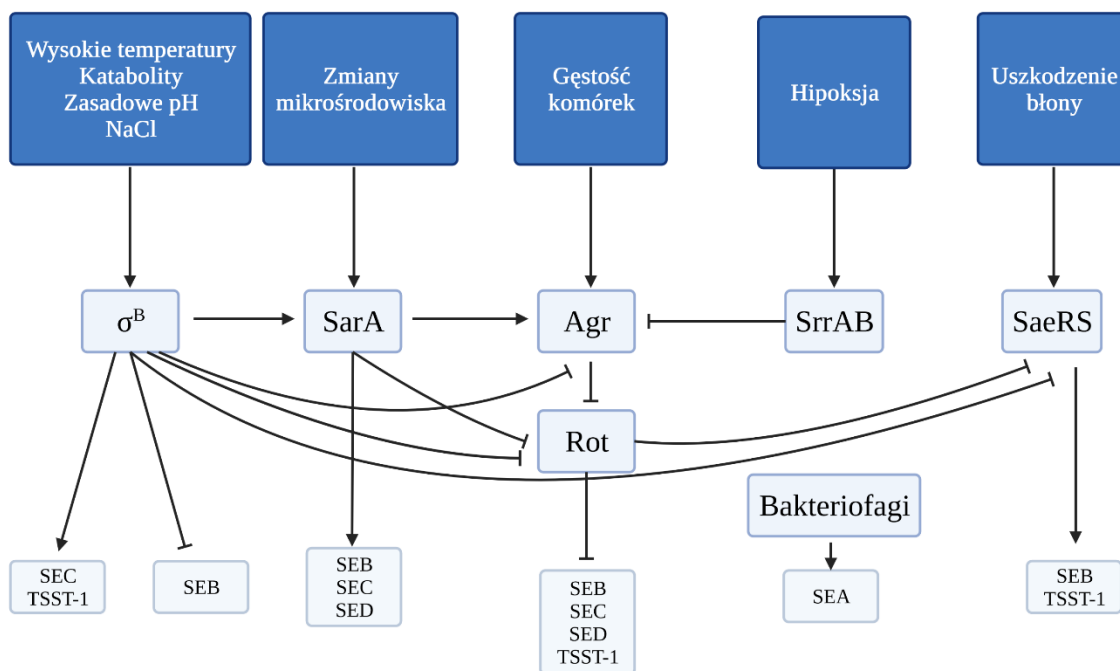
Gen enterotoksyny SEB może być zlokalizowany na chromosomie, bądź przenoszony przez plazmid lub wyspy patogenności (Shafer i Iandolo, 1978, Shalita *i in.*, 1977) (Tab. 1). Enterotoksyna SEC wyróżnia się spośród pozostałych, z uwagi na istnienie kilku wariantów, takich jak SEC1, SEC2, SEC3 (Balaban i Rasooly, 2000, Etter *i in.*, 2020). Gen enterotoksyny SED, której unikalną cechą jest tworzenie dimerów w obecności jonów cynku ( $Zn^{2+}$ ), zlokalizowany jest na plazmidzie (Balaban i Rasooly, 2000, Bayles i Iandolo, 1989) (Tab. 1). U *S. aureus* poza wyżej wymienionymi enterotoksynami gronkowcowymi, może występować także toksyna TSST-1, wykazująca brak aktywności wymiotnej, stabilność i odporność na enzymy proteolityczne (Ortega *i in.*, 2010). Brak aktywności wymiotnej spowodowana jest brakiem pętli cysteinowej w strukturze białka tej toksyny (Hovde *i in.*, 1994). Badania filogenetyczne toksyn gronkowcowych wykazały, iż można je zaklasyfikować do dwóch grup.

Pierwszej o wyższym, na poziomie 51-81% podobieństwie sekwencji (SEA, SED i SEE) oraz drugiej z niższym podobieństwem sekwencji wynoszącym 42-67% (SEB, SEC i TSST-1) (Van Den Bussche *i in.*, 1993, Pinchuk *i in.*, 2010).

W związku z tym, że toksyny gronkowcowe stanowią czynnik zaostrzający przebieg AZS, pojawia się pytanie o istnienie wzorca dystrybucji genów toksyn u *S. aureus* kolonizującego pacjentów z AZS. W oparciu o dotychczas stosowane metody genotypowania udowodniono, że uniwersalny wzorzec nie istnieje, a uzyskane obserwacje są uzależnione od doboru grupy badawczej, metody poboru prób od pacjentów, a także metody analizy (Ogonowska *i in.*, 2021). Wiadomo, że od 54 do 71,25% izolatów *S. aureus* pochodzących od pacjentów z AZS posiada geny toksyn (Mempel *i in.*, 2003, Nada *i in.*, 2012, Ogonowska *i in.*, 2021). W przypadku zaostrzonej postaci AZS, 78,7% szczepów *S. aureus* wykazuje obecność tych genów, z kolei w grupie pacjentów z umiarkowaną i łagodną postacią choroby, wykrywa się je w 83% izolatów (Yagi *i in.*, 2004). Dane te wskazują na istotną rolę toksyn w przebiegu AZS.

#### 4.5. Systemy regulacji toksyn gronkowcowych

Najlepiej zbadanym systemem regulatorowym jest regulator genów pomocniczych *agr*. Koduje on system monitorowania gęstości populacji komórek (QS, ang. *Quorum Sensing*), pełniący rolę głównego regulatora wirulencji u *S. aureus* (Ryc. 3) (Recsei *i in.*, 1986). System *agr* składa się z dwóch sąsiadujących jednostek transkrypcyjnych. Pierwsza RNAII, koduje cztery geny (*agrA*, *agrB*, *agrC* i *agrD*), natomiast druga RNAIII, pełni funkcję regulatorowego RNA, kodując jednocześnie gen delta-hemolizyny (*hld*, delta toksyna) (Novick *i in.*, 1995). Te dwie jednostki transkrypcyjne kontrolowane są przez promotor P2 dla RNAII oraz P3 dla RNAIII (Peng *i in.*, 1988). Geny operonu RNAII odpowiadają za kodowanie systemu QS, natomiast transkrypt RNAIII reguluje ekspresję genów zależnych od *agr* (Jenul i Horswill, 2019). Jednym z czynników wpływających na system *agr* jest pH, które zarówno w zakresie kwaśnym, jak i zasadowym hamuje aktywność *agr* (Jenul i Horswill, 2019). Ponadto stres oksydacyjny, w czasie którego dochodzi do indukcji reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*), skutkuje tworzeniem się wiązań dwusiarczkowych w *AgrA*, co uniemożliwia jego wiązanie do docelowych promotorów (Sun *i in.*, 2012).



**Rycina 3. Systemy regulacji toksyn gronkowcowych.** Linia zakończona grotem strzałki wskazuje na pozytywną regulację, natomiast zakończona prostopadłą kreską – negatywną regulację. Na podstawie (Fisher *i in.*, 2018, Jenul i Horswill, 2019). Ilustracja wykonana przy pomocy platformy BioRender (Patrycja Ogonowska, 2021).

Kolejnym systemem regulacji jest czynnik sigma B ( $\sigma^B$ ). Warunkuje on odpowiedź na czynniki stresowe, takie jak wysoka temperatura, zasadowe pH, czy wysokie zasolenie (Fisher *i in.*, 2018). U bakterii *S. aureus* gen *sigB* wchodzi w skład operonu złożonego z genów *rsbU*, *rsbV* i *rsbW* (Senn *i in.*, 2005). Czynnik  $\sigma^B$  w bezpośredni i pośredni sposób reguluje ekspresję około 200 genów, w tym tych odpowiadających za zjadliwość, produkcję biofilmu, transport błonowy, a także oporność na antybiotyki (Guldemann *i in.*, 2016). Czynnik sigma B jest represorem hamującym aktywność promotora P3 systemu *agr* (Jenul i Horswill, 2019). Pośrednio, przez mechanizm obejmujący dwa systemy regulacji *agr* i SarA, pod kontrolą  $\sigma^B$  znajduje się również toksyna TSST-1 (Andrey *i in.*, 2015, Kusch *i in.*, 2011). Czynnik sigma B jest również negatywnym regulatorem transkrypcji genu *seb* (Ryc. 3) (Kusch *i in.*, 2011).

Następnym systemem regulacji jest Sar (ang. *Staphylococcal Accessory Regulator*). Ekspresja genu *sarA* jest kontrolowana przez trzy promotory – P1, P2 i P3 (Bayer *i in.*, 1996). SarA pełni globalną funkcję regulacyjną oraz rolę aktywatora systemu *agr*, a poprzez związanie się z regionami promotora P2 i P3 w locus *agr*, wpływa na wzrost ekspresji toksyn (Cheung *i in.*, 2004, 1992). SarA reguluje ekspresję szeregu genów *S. aureus*, w tym genów enterotoksyn (*seb*, *sec*, *sed*) (Cheung, 2002). Kwestia regulacji przez SarA toksyny TSST-1 pozostaje niejasna. Wynika to z rozbieżnych obserwacji, wskazujących zarówno na pozytywną, jak

i negatywną regulację ekspresji (Andrey *i in.*, 2010, 2015). Oznacza to, iż regulacja TSST-1 przez SarA jest specyficzna dla szczepu (Jenul i Horswill, 2019).

SrrAB, czyli system gronkowcowej odpowiedzi oddechowej (ang. *Staphylococcal Respiratory Response*) został opisany po raz pierwszy jako globalny regulator produkcji czynników wirulencji w warunkach obniżonego poziomu tlenu (Yarwood *i in.*, 2001). System ten bierze również udział w regulacji genów odpowiedzialnych za produkcję biofilmu, programowaną śmierć komórki, detoksykację podtlenu azotu, a także metabolizm beztlenowy (Jenul i Horswill, 2019). SrrAB odpowiada za hamowanie produkcji toksyny TSST-1, białka A i RNAlII, poprzez bezpośrednie oddziaływanie z odpowiednimi promotorami, zwłaszcza w warunkach o niskiej zawartości tlenu (Pragman *i in.*, 2004, Yarwood *i in.*, 2001). Ponadto SrrAB warunkuje oporność na nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) podczas wysoce zależnego od tlenu, procesu oddychania (Mashruwala i Boyd, 2017).

SaeRS został scharakteryzowany jako regulator produkcji egzoprotein (ang. *S. aureus Exoprotein Expression*) (Giraud *i in.*, 1994). W jego skład wchodzi dwa białka – kinaza histydynowa SaeS i regulator odpowiedzi SaeR (Jenul i Horswill, 2019). Operon, który koduje system SaeRS składa się z czterech genów (*saeP*, *saeQ*, *saeR*, *saeS*) (Jenul i Horswill, 2019). SaeRS wykazuje pozytywny wpływ na ekspresję *seb* i *tst* (Baroja *i in.*, 2016).

Istnieje również system Rot (ang. *Repressor of Toxins*), który bezpośrednio wpływa na produkcję toksyn gronkowcowych (Ryc. 3) (McNamara *i in.*, 2000). System Rot jest określany jako „reprezor toksyn”, gdyż jest negatywnym regulatorem produkcji toksyn gronkowcowych, jak i niektórych proteaz (serynowych, cysteinowych) (McNamara *i in.*, 2000, Saïd-Salim *i in.*, 2003). Wyniki szeregu badań wykazały, że system Rot aktywuje 86 i hamuje, aż 60 różnych genów *S. aureus* (Saïd-Salim *i in.*, 2003). Jednostka transkrypcyjna systemu *agr*, RNAlII blokuje proces translacji genu *rot* (Geisinger *i in.*, 2006). Aktywność Rot jest również hamowana poprzez czynnik sigma B w fazie stacjonarnego wzrostu, a także przez SarA, w wyniku bezpośredniego wiązania z promotorem Rot (Hsieh *i in.*, 2008, Manna i Ray, 2007).

Przedstawione systemy regulacji ekspresji toksyn gronkowcowych są niezwykle złożone, a poszczególne szlaki sygnałowe nakładają się na siebie, komplikując tym samym obraz globalnej regulacji tych genów.

#### **4.6. Genotypowanie szczepów *S. aureus* wyizolowanych od pacjentów z AZS**

W związku z tym, iż *S. aureus* kolonizuje pacjentów z AZS, a wytwarzane przez tę bakterię toksyny gronkowcowe przyczyniają się do zaostrzenia jej przebiegu, ważne jest



precyzyjne scharakteryzowanie populacji izolatów *S. aureus* z wykorzystaniem dostępnych metod biologii molekularnej. Genotypowanie *S. aureus* opiera się na analizie chromosomowego i/lub plazmidowego DNA pod kątem podobieństwa między izolatami oraz identyfikacji określonych genów (Kasela *i in.*, 2019). Powszechnie stosowane techniki genotypowania umożliwiają badaczom monitorowanie szczepów kolonizujących dzieci i dorosłych, poszukiwanie kompleksów klonalnych ściśle powiązanych z AZS, a także poszukiwanie zależności pomiędzy produkcją toksyn gronkowcowych i nasileniem objawów choroby.

Za „złoty standard” typowania molekularnego uważana jest technika PFGE (ang. *Pulse-Field Gel Electrophoresis*, analiza restrykcyjna chromosomowego DNA połączona z elektroforezą pulsową) (Faria *i in.*, 2008, Rodriguez *i in.*, 2015). Metoda ta opiera się na fragmentacji bakteryjnego chromosomu przy użyciu enzymu restrykcyjnego rzadko tnącego DNA (np. *SmaI*, czy *CspI*) i rozdzieleniu otrzymanych fragmentów DNA na żelu agarozowym, przy zastosowaniu zmiennego pola elektrycznego. Wykorzystanie tradycyjnego rozdzielania elektroforetycznego w tym wypadku nie jest możliwe, ze względu na uzyskanie po cięciu dużych fragmentów DNA (wielkość nawet do 250 000 pz) (Kasela *i in.*, 2019, Tenover *i in.*, 1994). Uzyskany wzór prążków stanowi swego rodzaju „odcisk palca DNA”, który zostaje przypisany do konkretnego pulsotypu i jest unikatowy dla pojedynczego szczepu. Na niewielkie zmiany w genomie (delecje, mutacje punktowe, insercje) wskazuje fakt, iż do subtypów przypisywane są izolaty, w przypadku których wzór różni się od jednego do dwóch prążków. Z kolei szczepy różniące się wzorem trzech lub więcej prążków, przypisywane są do różnych typów (Golding *i in.*, 2015). Przez to, iż PFGE jest wysoce dyskryminującą metodą, stanowi doskonałe narzędzie do analizy dróg transmisji i rozpowszechniania się szczepów *S. aureus* (Crisostomo *i in.*, 2001, McDougal *i in.*, 2003). Wadami tej metody są pracochłonność, konieczność posiadania specjalistycznej i drogiej aparatury, a także wysokie koszty analizy (Mulvey *i in.*, 2001, Murchan *i in.*, 2003).

Typowanie *spa* (ang. *spa typing*) to jedna z najpopularniejszych metod genotypowania szczepów *S. aureus* (Witt *i in.*, 2010). Bazuje ona na zmienności sekwencji regionu X genu, zawierającego tandemowe powtórzenia (ang. *tandem repeats*) o długości około 24 pz i kodującego białko A (*spa*) (Frénay *i in.*, 1996). W regionie tym może dochodzić do licznych spontanicznych mutacji (delecji, duplikacji, czy mutacji punktowych) (Harmsen *i in.*, 2003). Metoda oparta jest na sekwencjonowaniu pojedynczego locus i obserwacji różnic pomiędzy sekwencjami jednego genu (Tang *i in.*, 2000). Rodzaje i liczba powtórzeń warunkują typ *spa*, który powiązany jest z wirulencją i patogennością izolatów (Frénay *i in.*, 1996, Kasela *i in.*,

2019). Typowanie *spa* stało się bardzo popularną metodą ze względu na możliwość porównania uzyskanych wyników pomiędzy laboratoriami na całym świecie, dzięki wprowadzaniu ich do międzynarodowej bazy danych Ridom Staph Type. Baza zawiera dane pozwalające na określenie typu *spa* analizowanego szczepu oraz ustalenie liczby powtarzających się sekwencji (Kasela *i in.*, 2019). Zaletami metody są niskie koszty analiz, krótki czas wykonania badań (1-2 dni), odtwarzalność oraz ujednolicona nomenklatura pozwalająca na porównanie wyników pomiędzy laboratoriami. Typowanie *spa* ma szerokie zastosowanie w badaniach epidemiologicznych. Wykorzystuje się je do krótkoterminowych badań, jak również śledzenia epidemii szpitalnych (Koreen *i in.*, 2004).

Kolejną stosowaną metodą jest MLST (ang. *Multi-Locus Sequence Typing*, sekwencjonowanie genów metabolizmu podstawowego). Opiera się na analizie porównawczej sekwencji krótkich fragmentów DNA (450-500 pz) siedmiu genów metabolizmu podstawowego, takich jak: *arcC* (kinaza karbaminianowa), *aroE* (dehydrogenaza szikimowa), *glpF* (kinaza glicerolowa), *gmk* (kinaza guanylanowa), *pta* (acetylotransferaza fosforanowa), *tpi* (izomeraza trizofosforanowa) oraz *yqiL* (acetylotransferaza acetylokoenzymu A) (Enright *i in.*, 2000). Uzyskane warianty sekwencji siedmiu genów porównywane są w bazie danych i przypisywane do odpowiedniego typu ST (ang. *Sequence Type*). Szczepy o identycznych profilach allelicznych zalicza się do tego samego klonu. Ze względu na występowanie różnych alleli w każdym z siedmiu locus, prawdopodobieństwo, aby niespokrewnione klony posiadały tę samą sekwencję, jest bardzo niskie (Maiden *i in.*, 1998, Spratt, 1999). Dzięki zastosowaniu dedykowanego oprogramowania (np. eBURST), możliwe jest śledzenie rozprzestrzeniania się oraz stworzenie modelu ewolucyjnego klonów *S. aureus* (Feil *i in.*, 2004). Stanowi ono również doskonałe narzędzie do przesiewowych badań populacyjnych oraz analizy ewolucji molekularnej szczepów *S. aureus* (Spratt, 1999). Dzięki obecności internetowych baz danych, dodatkowym atutem jest możliwość porównywania uzyskanych wyników między laboratoriami (Kasela *i in.*, 2019). Niestety metoda MLST jest kosztowna i pracochłonna, a w przypadku analizy pokrewieństwa izolatów wymagane jest zastosowanie dodatkowych metod genotypowania (np. typowanie *spa*) (Witt *i in.*, 2010).

Ostatnią opisywaną techniką jest metoda MLVF (ang. *Multiple-Locus VNTR Fingerprinting*, jednoczesna amplifikacja wielu loci o zróżnicowanej liczbie tandemowych powtórzeń) (Karynski *i in.*, 2008, Malachowa *i in.*, 2005). Analiza MLVF umożliwia wykrycie polimorfizmu fragmentów DNA w obrębie siedmiu genów, charakterystycznych dla gatunku *S. aureus*: *clfA* (ang. *clumping factor A*, czynnik skupiania A), *clfB* (ang. *clumping factor B*, czynnik skupiania B), *sdrC*, *sdrD*, *sdrE* (ang. *Ser-Asp-rich fibrynogen-binding proteins*, geny

kodujące powtórzenie asparagianinu seryny), *spa* (ang. *staphylococcal protein A*, gen kodujący białko A) i *sspA* (ang. *serine protease V8*, gen kodujący proteazę serynową V8) (Sabat *i in.*, 2003). Produkty amplifikacji, uzyskane po przeprowadzeniu reakcji PCR, poddaje się rozdzielaniu elektroforetycznemu, otrzymując charakterystyczny dla danego szczepu wzór prążków. Uzyskane dla poszczególnych prób wzory prążków pozwalają na przypisanie szczepu do typów (określone dużymi literami) oraz podtypów (wyrażonymi cyframi przy literach) (Karynski *i in.*, 2008, Malachowa *i in.*, 2005). Metoda MLVF stanowi użyteczne narzędzie do przesiewowej analizy pokrewieństwa genetycznego większej liczby szczepów, a także do krótkoterminowych badań epidemiologicznych. Głównymi zaletami metody jest duża moc dyskryminacyjna i wysoka powtarzalność (Karynski *i in.*, 2008, Malachowa *i in.*, 2005). Z uwagi na wykorzystanie do analiz reakcji PCR, metoda MLVF nie wymaga dodatkowego sprzętu, a jej przeprowadzenie jest możliwe w wielu laboratoriach (Kasela *i in.*, 2019). Wykazano, że wyniki uzyskane metodą MLVF, MLST cechują się dużą zgodnością z wynikami typowania *spa* (Pourcel *i in.*, 2009). Jednak brak międzynarodowej bazy danych zawierającej wyniki badań otrzymane przy użyciu techniki MLVF, uniemożliwia porównywanie ich pomiędzy laboratoriami (Rolo *i in.*, 2012).

Wybór odpowiedniej metody typowania molekularnego ma kluczowe znaczenie, a właściwy dobór techniki może zapewnić więcej informacji o strukturze genetycznej populacji *S. aureus* kolonizującej pacjentów z AZS.

#### **4.7. Dekolonizacja skóry u pacjentów z AZS**

Z uwagi na ścisłą korelację pomiędzy obecnością *S. aureus*, a zaostrzeniem objawów AZS, w przebiegu choroby będącej wynikiem zaburzenia równowagi mikrobiologicznej na skórze, wdrażane jest leczenie przeciwdrobnoustrojowe. Leczenie zakażeń wywołanych przez *S. aureus* stanowi ogromne wyzwanie terapeutyczne, ponieważ opiera się głównie na antybiotykoterapii (miejscowej lub systemowej) (Hung *i in.*, 2007). U pacjentów cierpiących na AZS i podatnych na rekolonizację *S. aureus*, zaobserwowano rosnący wskaźnik oporności na kwas fusydowy (z 0% na 18%). Wykazano, że miejscowe stosowanie, przez okres 6 miesięcy, kwasu fusydowego u pacjentów z AZS przyczynia się do selekcji szczepów *S. aureus* opornych na jego działanie (FRSA, ang. *Fusidic Acid Resistant Staphylococcus aureus*) (Sule *i in.*, 2007). W samej Irlandii kwas fusydowy jest szeroko stosowany w leczeniu infekcji skórnych w przebiegu AZS. Oporność na ten antybiotyk stwierdzono tam w szczepach wyizolowanych od pacjentów z AZS w ilości większej o 24%, niż w tych wyizolowanych od

pacjentów bez atopii (Harkins *i in.*, 2018). Długotrwałe stosowanie antybiotyków, szczególnie przy zakażeniach nawracających, może prowadzić do narastania oporności na leki ostatniej szansy (Kędzierska *i in.*, 2008).

Badania populacji szczepów *S. aureus*, izolowanych od amerykańskich pacjentów z AZS wykazały, iż występuje u nich zwiększona tendencja do oporności na mupirocynę. U pacjentów z AZS większość szczepów MRSA (68,2%) w porównaniu z grupą szczepów MRSA pochodzącą od pacjentów bez cech atopii (28,6%) była oporna na mupirocynę (Antonov *i in.*, 2015). Wzmoczone stosowanie antybiotyków u pacjentów z AZS jest głównym czynnikiem selekcji izolatów opornych na dany antybiotyk.

W celu zwiększenia skuteczności leczenia, stosuje się połączenie kilku rodzajów terapii przeciwbakteryjnych. Wykazano jednak, że podawanie doustne cefaleksyny oraz miejscowe stosowanie mupirocyny i chlorheksydydy, w połączeniu ze stosowaniem kąpieeli z nadmanganianem potasu, może okazać się nieskuteczne. Po zakończeniu leczenia, u 90% przebadanych pacjentów z AZS nie stwierdzono obecności *S. aureus*. Jednak po 4 tygodniach od zakończenia kuracji, 60% pacjentów zostało ponownie skolonizowanych przez bakterie *S. aureus*, a po upływie 8 tygodni wszyscy badani (Breuer *i in.*, 2002).

Alternatywnym podejściem w procesie dekolonizacji *S. aureus* są kąpiele wybielające w podchlorynie sodu (NaOCl). Udokumentowano, iż w bardzo niskich stężeniach (0,005-0,006%) tego rodzaju kąpiele są skuteczne w zwalczaniu *S. aureus*, występującego w owrzodzeniach skóry i ranach, w tym również szczepów MRSA (McKenna *i in.*, 1991). Jak dotąd nie wykazano oporności na tego rodzaju terapię (Barnes i Greive, 2013). Niestety wyniki badań z ostatnich lat dowiodły, że kąpiele wybielające są nieskuteczne w redukowaniu kolonizacji *S. aureus* u niemowląt, dzieci i młodzieży chorych na AZS (Hon *i in.*, 2016, Majewski *i in.*, 2019).

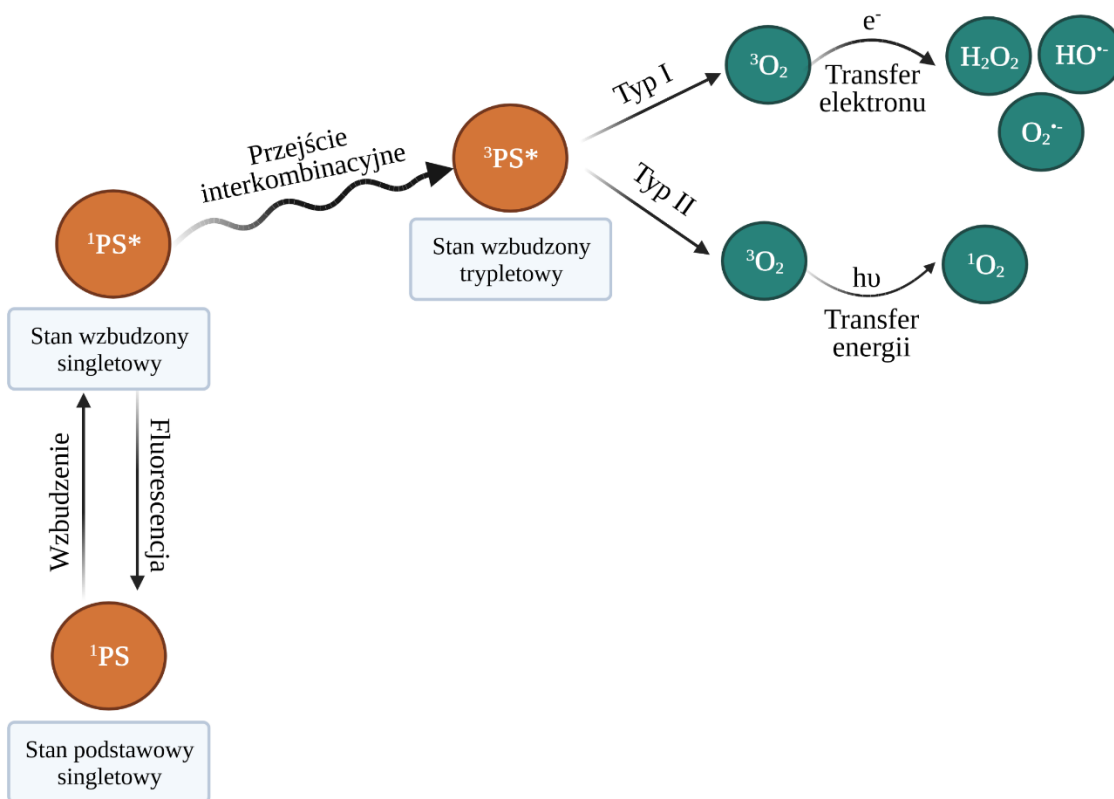
Wszystkie wymienione metody dekolonizacji *S. aureus* u pacjentów z AZS okazują się niewystarczające i mogą prowadzić do nabywania oporności przez bakterie na leki pierwszego rzutu. Dlatego ważne jest poszukiwanie innych, alternatywnych metod leczenia miejscowych zakażeń *S. aureus*.

#### **4.8. Terapia fotodynamiczna jako skuteczna metoda eradykacji *S. aureus***

Jednym z celów leczenia w AZS jest przywrócenie u pacjentów z AZS naturalnego mikrobiomu skóry. Aby to osiągnąć należy przede wszystkim dążyć do ograniczenia wzrostu *S. aureus*. Jak przedstawiono w podrozdziale 4.7., długotrwała antybiotykoterapia prowadzi do

selekcji szczepów opornych na dany rodzaj terapii. Ograniczone możliwości terapeutyczne powodują również toksyny gronkowcowe, które posiadając właściwości superantygenów mogą indukować oporność komórek T na kortykosteroidy (Hauk *i in.*, 2000). Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje, alternatywną formę leczenia skierowaną przeciwko drobnoustrojom, może stanowić terapia fotodynamiczna (PDT, ang. *Photodynamic Therapy*), określana również jako przeciwbakteryjna inaktywacja fotodynamiczna (aPDI, ang. *Antimicrobial Photodynamic Inactivation*). Zmienioną skórę pacjentów z AZS, miejscowo leczono dotychczas jedynie z zastosowaniem fototerapii (terapia samym światłem – promieniowaniem UVA lub wąskopasmowym UVB). Niestety, metoda ta posiada szereg skutków ubocznych, takich jak przedwczesne starzenie się skóry, czy ryzyko wystąpienia niebarwnikowych nowotworów skóry. Ponadto, fototerapia ze względu na możliwość wystąpienia odległych działań niepożądanych, nie jest stosowana u dzieci poniżej 10 roku życia (Rodenbeck *i in.*, 2016).

Metoda aPDI opiera się na działaniu nietoksycznego związku chemicznego zwanego fotouczulaczem (PS, ang. *Photosensitizer*), światła widzialnego o określonej długości fali oraz tlenu (Wainwright, 1998). W wyniku absorpcji fotonu dochodzi do wzbudzenia cząsteczki fotouczulacza i przejścia z podstawowego stanu singletowego ( $^1PS$ ) do wzbudzonego stanu singletowego ( $^1PS^*$ ). Następnie, na skutek przejścia interkombinacyjnego (ang. *Intersystem Crossing*), fotouczulacz przechodzi do stanu wzbudzonego trypletowego ( $^3PS^*$ ) (Ryc. 4). Na tym etapie może dojść do jednego z dwóch typów reakcji. W typie I reakcji następuje przeniesienie elektronu ze stanu trypletowego na substrat, który wytwarza reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*), takie jak nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), rodnik hydroksylowy ( $HO^\bullet$ ), czy anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ). Z kolei w II typie reakcji dochodzi do transferu energii z cząsteczki fotouczulacza, w wyniku czego tlen przechodzi z podstawowego stanu trypletowego ( $^3O_2$ ) we wzbudzoną formę singletową ( $^1O_2$ ), którą charakteryzuje wysoka cytotoksyczność (Ryc. 4) (Hamblin, 2016). Reaktywne formy tlenu uszkadzają ścianę komórkową bakterii oraz inne komponenty komórkowe (białka, DNA, lipidy), co w konsekwencji prowadzi do śmierci drobnoustrojów (Cieplik *i in.*, 2018).



**Rycina 4. Schemat działania przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej (aPDI).** Na podstawie (Alves *i in.*, 2014, Hamblin, 2016). Ilustracja wykonana przy pomocy platformy BioRender (Patrycja Ogonowska, 2021, <https://biorender.com/>).

aPDI posiada szereg udokumentowanych zalet. Jedną z nich jest lokalne działanie, nieuszkodzające okolicznych tkanek gospodarza (Wainwright *i in.*, 2017). Ponadto, w przeciwieństwie do antybiotykoterapii, bakterie poddane działaniu aPDI nie wykazują oporności na ten typ leczenia. Dotychczas zaobserwowano jedynie zjawisko tolerancji bakterii na działanie aPDI. Natomiast zwiększenie dawki światła, bądź stężenia fotouczulacza nadal prowadzi do eradykacji komórek bakteryjnych (Rapacka-Zdonczyk *i in.*, 2019). Co więcej, na skuteczność aPDI nie wpływa wzorzec lekowrażliwości, czy obecność mechanizmów oporności u bakterii (Grinholc *i in.*, 2014). Wykazano również, iż aPDI skutecznie niszczy bakteryjne czynniki wirulencji. Aktywności gronkowcowej  $\alpha$ -hemolizyny, proteazy V8 i sfingomielinazy są hamowane pod wpływem błękitu metylenowego (MB) i światła laserowego ( $\lambda_{max}=665$  nm) (Tubby *i in.*, 2009). W odróżnieniu od fototerapii z zastosowaniem światła UV, aPDI charakteryzuje się brakiem mutagenności wobec komórek eukariotycznych (Grinholc *i in.*, 2015). Wiele opublikowanych badań na modelach *in vitro* oraz *in vivo* wskazało skuteczność aPDI jako opcji terapeutycznej przeciwko infekcjom gronkowcowym

(Nakonieczna *i in.*, 2019). Wyżej wymienione cechy wskazują na duży potencjał metody i jej wysoką skuteczność wobec infekcji wywoływanych przez drobnoustroje.

Mówiąc o metodzie aPDI, nie sposób nie wspomnieć o fotouczulaczu i jego odpowiednim doborze, a także o źródle światła niezbędnym do jego wzbudzenia. Niniejsza praca skupia się na dwóch fotouczulaczach – różu bengalskim (RB, ang. *rose bengal*) wzbudzonym światłem zielonym ( $\lambda_{\max}=515$  nm) oraz nowym błękitie metylenowym (NMB, ang. *new methylene blue*), wzbudzonym światłem czerwonym ( $\lambda_{\max}=632$  nm). Przedstawione fotouczulacze reprezentują mieszany typ reakcji fotodynamicznej, z przewagą typu II (konwersja tlenu molekularnego do wysoce cytotoksycznego tlenu singletowego) (Phoenix *i in.*, 2003, Spagnol *i in.*, 2015, Wainwright *i in.*, 1998). Róż bengalski to barwnik ksantenowy, który w procesie fotosensybilizacji produkuje cytotoksyczny tlen singletowy o wydajności kwantowej bliskiej 100% (Chang *i in.*, 2008). Charakteryzuje się wysoką biokompatybilnością, co jest jednym z niezbędnych wyznaczników cechujących środek terapeutyczny (Dubey *i in.*, 2020). Z związku z tym jest powszechnie stosowany w diagnostyce brucelozы oraz miejscowo w okulistyce do identyfikacji uszkodzenia rogówki (Doughty, 2013, Ducrotay i Bardosh, 2017). Ponadto RB nie wykazuje efektu cyto- i fototoksycznego wobec ludzkich keratynocytów, nawet w wysokich stężeniach (Nakonieczna *i in.*, 2018). Róż bengalski jest wzbudzany światłem zielonym, które coraz częściej znajduje zastosowanie w leczeniu powierzchownych zmian skórnych z uwagi na penetrację wyłącznie warstwy naskórka i brak efektu drażniącego względem włókien nerwowych. Dodatkowo powierzchniowe działanie światła powoduje zmniejszenie odczuwania przez pacjentów bólu podczas terapii (Fritsch *i in.*, 1997, Osiecka *i in.*, 2018). Działanie *in vitro* różem bengalskim wzbudzonym światłem zielonym wykazuje wysoką skuteczność i spadek przeżywalności zarówno bakterii Gram-dodatnich (*Enterococcus hirae*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*), jak i Gram-ujemnych (*Escherichia coli*) (Pérez-Laguna *i in.*, 2018, Pieranski *i in.*, 2020, Silva *i in.*, 2018). Z kolei nowy błękit metylenowy jest barwnikiem fenotiazynowym, który absorbuje w obszarze światła czerwonego. Światło czerwone ze względu na głęboką penetrację tkanek znajduje zastosowanie w terapii fotodynamicznej (Pottier *i in.*, 1986). Leczenie z użyciem NMB i światła czerwonego znacząco łagodzi infekcje wywołane przez *Candida albicans* w ranach skóry (Dai *i in.*, 2011). Dodatkowo ten rodzaj leczenia powoduje spadek przeżywalności wielolekoopornych szczepów *Acinetobacter baumannii* zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* w mysim modelu infekcji ran oparzeniowych (Ragàs *i in.*, 2010). Ponadto badania *in vitro* (forma planktonowa i biofilm) wykazały wysoką skuteczność terapii wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (Misba *i in.*, 2017).

#### 4.9. Terapia fotodynamiczna (PDT) w praktyce klinicznej

Terapia fotodynamiczna (PDT, ang. *Photodynamic Therapy*) w dermatologii obejmuje miejscowe stosowanie kwasu 5-aminolewulinowego (5-ALA) i estru aminolewulinianu metylu (MAL). Zarówno 5-ALA, jak i MAL są nieaktywnymi fotodynamicznie i nietoksycznymi prekursorami fotouczulacza, protoporfiryny IX (PpIX). Prekursory te po podaniu miejscowym (bądź ogólnoustrojowym), przenikają do komórek, gdzie są metabolizowane do aktywnej fotodynamicznie PpIX, będącej endogennym fotouczulaczem. Następnie, zaaplikowanie światła czerwonego prowadzi do wzbudzenia PpIX i powstania cytotoksycznego tlenu singletowego (Collaud *i in.*, 2004). Obecnie, w Europie do stosowania miejscowego są zatwierdzone trzy prekursory fotouczulaczy wzbudzane światłem czerwonym – 5-ALA AlaCare<sup>®</sup>, 5-ALA Ameluz<sup>®</sup> oraz MAL Metvix<sup>®</sup> (Correia *i in.*, 2021). 5-ALA AlaCare<sup>®</sup> jest stosowany w leczeniu łagodnego rogowacenia słonecznego. 5-ALA Ameluz<sup>®</sup> jest zatwierdzony w leczeniu łagodnej i umiarkowanej postaci rogowacenia słonecznego, a także powierzchownego raka podstawnkomórkowego. Natomiast MAL Metvix<sup>®</sup> znajduje zastosowanie w leczeniu rogowacenia słonecznego, choroby Bowena i powierzchownego raka podstawnkomórkowego. Ponadto w Ameryce Północnej 5-ALA Levulan<sup>®</sup> wzbudzany światłem niebieskim jest zatwierdzony w leczeniu rogowacenia słonecznego (Ericson *i in.*, 2008, Morton *i in.*, 2013, 2019, Wiegell, 2014). W ostatnich latach PDT znalazło również zastosowanie w leczeniu stanów zapalnych skóry, takich jak popromienne zapalenie skóry, czy łojotokowe i okołoustne zapalenie skóry (Kwon *i in.*, 2014, Morton *i in.*, 2013). W 2010 roku opublikowano opis przypadku leczenia skóry pacjenta z AZS (zmiany na nadgarstkach) poprzez zastosowanie metody PDT. Leczenie bazowało na stosowaniu kremu z kwasem 5-ALA i naświetlaniu wąskopasmowym światłem czerwonym. Terapia obejmowała trzy sesje (w odstępach 2-tygodniowych) i już po pierwszym podejściu zaobserwowano poprawę wyglądu skóry i zmniejszenie swędzenia. Pod koniec terapii skóra zaczęła się goić, a lichenizacja wyraźnie zmniejszać (Pozzi i Asero, 2010). 10 lat później przedstawiono badania z zastosowaniem żel z kwasem 5-ALA i światła dziennego w leczeniu przewlekłej egzemy ręki, z czego połowa badanych pacjentów miała zdiagnozowane AZS. Po terapii obejmującej trzy zabiegi w dwutygodniowych odstępach zaobserwowano widoczną poprawę stanu skóry, a także jakości życia leczonych pacjentów (Kremer *i in.*, 2020).

W onkologii PDT znajduje również zastosowanie w leczeniu nowotworów przełyku, płuc i oskrzeli (fotouczulacze Photofrin<sup>®</sup>, Laserphyrin<sup>®</sup>), nowotworu pęcherza (fotouczulacz Hexvix<sup>®</sup>), nowotworów głowy i szyi (fotouczulacz Foscan<sup>®</sup>), nowotworu dróg żółciowych



(fotouczulacz Redaporhine®), jak również w zwyrodnieniu plamki żółtej (fotouczulacz Visudyne®) (Correia *i in.*, 2021).

Jeśli chodzi o leczenie przeciwbakteryjne, PDT wykorzystuje się w terapii trądziku wywołanym bakterią *Propionibacterium acnes*, łupieżu rumieniowego (*Corynebacterium minutissimum*), zapalenia okostnej (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*), a także martwicy miazgi i zmian okołowierzchołkowych (*Enterococcus faecalis*) (Darras-Vercambre *i in.*, 2006, Garcez *i in.*, 2008, de Oliveira *i in.*, 2007, Pinheiro *i in.*, 2009, Ramstad *i in.*, 2006, Wiegell i Wulf, 2006). W kontekście leczenia przeciwgrzybicznego, PDT ma zastosowanie w leczeniu zapalenia mieszków włosowych (*Malassezia furfur*), grzybicy skóry i stóp (*Candida*, *Trichophyton*) (Calzavara-Pinton *i in.*, 2004, Lee *i in.*, 2010).

Z tego powodu, że w przebiegu AZS kolonizacja skóry przez *S. aureus* jest ważnym elementem zaostrzającym objawy choroby, kluczową kwestią jest poszukiwanie metod jego eradykacji. Metoda aPDI może stanowić nową, obiecującą i bezpieczną opcję terapeutyczną, prowadzącą do skutecznego eliminowania bakterii *S. aureus* i inaktywacji czynników wirulencji, które odgrywają istotną rolę w przebiegu AZS. Dlatego też, w niniejszej pracy skupiono się na analizie efektywności aPDI i ocenie potencjału tej metody w eradykacji izolatów *S. aureus* pochodzących od pacjentów z AZS, jak również inaktywacji wybranych toksyn gronkowcowych.

## 5. Cele pracy

Niniejsza praca skupiała się wokół realizacji następujących celów badawczych:

1. Charakterystyka genotypowa klinicznych izolatów *Staphylococcus aureus* pozyskanych od pacjentów z atopowym zapaleniem skóry w populacji polskiej.
2. Analiza efektywności metody fotodynamicznej wobec izolatów klinicznych i szczepów referencyjnych *Staphylococcus aureus*.
3. Wpływ metody fotodynamicznej na ekspresję genów kodujących kluczowe toksyny gronkowcowe na poziomie transkryptu i białka.
4. Weryfikacja efektywności metody fotodynamicznej w układzie *ex vivo* na modelu świńskiej skóry oraz *in vivo* na modelu kolonizacji mysiej skóry przez bakterie *Staphylococcus aureus*.

## 6. Materiały

### 6.1. Szczepy bakteryjne

W niniejszej pracy do badań użyto następujące grupy szczepów *Staphylococcus aureus*:

- 1) Izolaty pozyskane od pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (n=139), dzięki współpracy z prof. dr hab. n. med. Wiolettą Barańską-Rybak z Katedry i Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

**Tabela 2. Charakterystyka grupy izolatów *S. aureus* od pacjentów z AZS.**

<b>Izolaty <i>Staphylococcus aureus</i> pozyskane od pacjentów z AZS (n=139)</b>		
<b>Wiek pacjenta</b>	Dorosły (n=88)	Dziecko (n=51)
<b>Miejsce izolacji</b>	Skóra (n=69)	Jama nosowo-gardłowa (n=70)
<b>Pochodzenie izolatu</b>	Szpitalne, HA (n=80)	Pozaszpitalne, CA (n=59)
<b>Oporność na metycylinę</b>	Szczepy odporne, MRSA (n=5)	Szczepy wrażliwe, MSSA (n=134)

- 2) Izolaty pozyskane od pacjentów bez cech atopii (n=39), będące grupą kontrolną, stanowiące kolekcję Zakładu Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.
- 3) Szczepy referencyjne (n=14) scharakteryzowane pod kątem obecności genów toksyn oraz tła genetycznego, pozyskane z Zakładu Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowego Instytutu Leków w Warszawie, dzięki uprzejmości dr Joanny Empel.
- 4) Szczep bioluminescencyjny Xen40 wykorzystany w badaniach *ex vivo* i *in vivo* (Perkin Elmer, USA).

Pełen wykaz szczepów klinicznych oraz referencyjnych *S. aureus* wykorzystanych w badaniach zestawiono w Tabeli 1, 2 i 3 (Suplement). Szczepy *S. aureus* przechowywano w formie bakteryjnych konserw glicerolowych z dodatkiem 25% glicerolu w temperaturze -80°C.

## 6.2. Warunki hodowli

Przed przystąpieniem do pracy, szczepy bakteryjne wysiewano na podłoże stałe TSA (ang. *Tryptic Soy Agar*, bioMérieux, Francja) i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Nocne hodowle bakteryjne prowadzono w płynnym podłożu TSB (ang. *Tryptic Soy Broth*, bioMérieux, Francja) w 37°C z wytrząsaniem (150 rpm) przez 16-20 godzin.

## 6.3. Roztwory i bufor

- **Bufor PBS 1x stężony**

PBS (Sigma-Aldrich, USA)	1 tabletka
Woda destylowana	200 ml

Tak przygotowany roztwór poddano autoklawowaniu i przechowywano w temperaturze pokojowej.

- **1 M Tris-HCl**

Tris (Sigma-Aldrich, USA)	12,11 g
Woda destylowana	80 ml

Doprowadzić przy pomocy 6 M HCl do pH 8,0.  
Dopełniono wodą destylowaną do 100 ml.

- **Bufor lizujący**

1 M Tris-HCl pH 8,0	20 mM
0,5 M EDTA (pH 8,0, Invitrogen™, USA)	2 mM
Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)	1,2%

Bufor lizujący przefiltrowano przez sterylny filtr strzykawkowy (0,2 µm, VWR, USA). Bufor rozporcjowano do jałowych probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -20°C.

- **Bufor TBE 5x stężony**

Tris (Sigma-Aldrich, USA)	54 g
Kwas borowy (Stanlab, Polska)	27,5 g
0,5 M EDTA (pH 8,0, Invitrogen™, USA)	20 ml
Woda destylowana	do 1000 ml

- **Bufor TBE 0,5x stężony**

TBE 5x	100 ml
Woda destylowana	900 ml

- **10% APS**

APS (Thermo Fisher Scientific, USA)	1 g
Woda destylowana	10 ml

Tak przygotowany roztwór rozporcjowano do jałowych probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -20°C.

- **10% SDS**

SDS (Sigma-Aldrich, USA)	1 g
Woda destylowana	10 ml

- **1,5 M Tris-HCl**

Tris (Sigma-Aldrich, USA)	27,23 g
Woda destylowana	80 ml

Doprowadzono przy pomocy 6 M HCl do pH 8,8.

Dopełniono wodą destylowaną do 150 ml.

- **0,5 M Tris-HCl**

Tris (Sigma-Aldrich, USA)	6 g
Woda destylowana	60 ml

Doprowadzono przy pomocy 6 M HCl do pH 6,8.

Dopełniono wodą destylowaną do 100 ml.

#### 6.4. Odczynniki do izolacji DNA

- **Lizostafyna** (pochodząca z *S. simulans*, 400 U, A&A Biotechnology, Polska)
- **Kulki szklane** (Glasperlen, 0,10-0,11 MM, Sartorius StadimBiotech, Niemcy)
- **RNaza** (10 mg/ml, A&A Biotechnology, Polska)
- **Zestaw Genomic Mini** (A&A Biotechnology, Polska)
  - Roztwór lizujący
  - Roztwór płuczący
  - Bufor Tris (10 mM, pH 8,5)
  - Proteinaza K

## 6.5. Startery do amplifikacji DNA w reakcji PCR

**Tabela 3. Startery stosowane do amplifikacji DNA (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Niemcy).**

Gen	Sekwencja 5'-3'	Długość amplikonu (pz)	Literatura
<i>sea</i>	GAT TCA CAA AGG ATA TTG TTG ATA AAT AT GTC CTT GAG CAC CAA ATA AAT C	400	(Salgado-Pabón <i>i in.</i> , 2014)
<i>seb</i>	GTA TGA TGA TAA TCA TGT ATC AGC AA CGT AAG ATA AAC TTC AAT CTT CAC AT	625	
<i>sec</i>	GAG TCA ACC AGA CCC TAT GCC CGC CTG GTG CAG GCA TC	650	
<i>sed</i>	GCA TTA CTC TTT TTT ACT AGT TTG GTA CCT TGC TTG TGC ATC TAA TTC	530	
<i>tst</i>	GAA ATT TTT CAT CGT AAG CCC TTT GTT G TTC ATC AAT ATT TAT AGG TGG TTT TTC A	655	
<i>spa</i>	TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT	100-422	(Aires-De-Sousa <i>i in.</i> , 2006)

## 6.6. Odczynniki do amplifikacji DNA w reakcji PCR

- **10x stężony bufor do polimerazy (zawierający 20 mM MgCl<sub>2</sub>)** (Thermo Fisher Scientific, USA)
- **Polimeraza Taq (5U/μl)** (Thermo Fisher Scientific, USA)
- **Roztwór dNTPs – dATP, dCTP, dGTP, dTTP (10 mM każdy)** (Thermo Fisher Scientific, USA)
- **Startery** (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Niemcy)
- **Woda do PCR (wolna od DNaz, RNaz)** (EURx<sup>®</sup>, Polska)

## 6.7. Odczynniki do elektroforezy agarozowej kwasów nukleinowych

- **Agaroza** (Prona, Polska)
- **Barwnik do barwienia kwasów nukleinowych SimplySafe<sup>™</sup>** (EURx<sup>®</sup>, Polska)
- **Bufor ładujący do DNA 6x stężony** (Thermo Fisher Scientific, USA)
- **Bufor ładujący do RNA 2x stężony** (Thermo Fisher Scientific, USA)
- **Marker wielkości DNA 100-3000 pz** (Thermo Fisher Scientific, USA)
- **Marker wielkości RNA 200-6000 pz** (Thermo Fisher Scientific, USA)

## 6.8. Odczynniki do prowadzenia hodowli komórek eukariotycznych

- **Komórki HaCaT** (CLS 300493)
- **Komórki HaCaT z wyciszoną ekspresją w genie filagryny** [linia zakażona cząsteczkami lentiwirusowymi zawierającymi krótkie RNA o strukturze „spinki do włosów”, *FLG* shRNA (sc-43364-V)] oraz **linia komórek HaCaT z wprowadzonym pustym wektorem na drodze transfekcji, będąca kontrolą** (Ctrl shRNA, sc-108080) (Wang *i in.*, 2017) pozyskane dzięki uprzejmości dr hab. Danuty Gutowskiej-Owsiak, prof. UG z Pracowni Immunologii Doświadczalnej i Translacyjnej, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed
- **DMEM – modyfikowana pożywka Eagle’a** (ang. *Dulbecco’s Modified Eagle Medium*) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA)
- **FBS – płodowa surowica bydlęca** (ang. *Fetal Bovine Serum*) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA)
- **PSG – penicylina, streptomycyna, glutamina** (ang. *Penicillin-Streptomycin-Glutamine*) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA)
- **MEM NEAA – pożywka minimalna z dodatkiem aminokwasów** (ang. *Minimum Essential Medium, Non-Essential Amino-Acids*) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA)
- **Medium DMEM**

Modyfikowana pożywka Eagle’a (DMEM) 44 ml

Płodowa surowica bydlęca (FBS) 5 ml

Penicylina, streptomycyna, glutamina (PSG) 500 µl

Pożywka minimalna z dodatkiem aminokwasów (NEAA) 500 µl

Przed każdym użyciem, gotową pożywkę podgrzewano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Przechowywano w temperaturze 4°C przez okres 7 dni.

## 6.9. Odczynniki do badania foto- i cytotoksyczności związków fotouczulających

- **MTT – błękit tiazolilowy bromek tetrazoliowy** (ang. *Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazolium Bromide*) (Sigma-Aldrich, USA)

12 mM roztwór przygotowano poprzez odważenie 5 mg MTT i zawieszenie w 1 ml jałowego PBS (Materiały, 6.3.). Dobrze zworteksowano do momentu całkowitego

rozpuszczenia. Tak przygotowany roztwór przechowywano w probówce typu Eppendorf przeznaczonej do światłoczułych odczynników przez okres miesiąca w temperaturze 4°C.

- **DPBS – roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym Dulbecco (ang. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA)**
- **DMSO (Sigma-Aldrich, USA)**

#### **6.10. Odczynniki do monitorowania wzrostu i żywotności komórek eukariotycznych – system xCELLigence**

- **Płytki 16-dolkowe do systemu xCELLigence – E-plate (ACEA Biosciences Inc., USA)**
- **DPBS – roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym Dulbecco (ang. *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA)**

#### **6.11. Odczynniki do izolacji i doczyszczania RNA**

- **Odczynnik stabilizujący RNA (RNAlater, Sigma-Aldrich, USA)**
- **Środek do inaktywacji RNaz (labZAP™, A&A Biotechnology, Polska)**
- **Alkohol etylowy 96%, cz.d.a. (Stanlab, Polska)**
- **Alkohol etylowy 70%**

Alkohol etylowy 70% przygotowano poprzez rozcieńczenie 96% alkoholu etylowego w sterylnej wodzie milli Q® i przechowywano w temperaturze pokojowej.

- **β-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, USA)**
- **Lizostafyna (pochodząca z *S. simulans*, 400U, A&A Biotechnology, Polska)**
- **Zestaw do trawienia DNA - RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Holandia)**

Roztwór DNazy	10 µl
Bufor RDD	70 µl

- **Zestaw do izolacji i doczyszczania RNA - Syngen Blood/Cell RNA Mini Kit (Syngen, Polska)**



## 6.12. Odczynniki do syntezy cDNA

- **Zestaw do odwrotnej transkrypcji - TranScriba Kit** (A&A Biotechnology, Polska)

Starter dN-heksamer (100  $\mu$ M)

Woda (wolna od nukleaz, traktowana DEPC)

5x bufor reakcyjny

Inhibitor RNaz (40 U/ $\mu$ l)

dNTPs Mix (10 mM)

Odwrotna transkryptaza (20 U/ $\mu$ l)

## 6.13. Startery do amplifikacji cDNA w reakcji qPCR

**Tabela 4. Startery wykorzystane w reakcji qPCR** (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Niemcy).

Gen	Sekwencja 5'-3'	Długość amplikonu (pz)	Literatura
<b>Startery dla genów badanych</b>			
<i>sea</i>	AAA ATA CAG TAC CTT TGG AAA CGG TT TTT CCT GTA AAT AAC GTC TTG CTT GA	92	(Klotz <i>i in.</i> , 2003)
<i>seb</i>	ACA CCC AAC GTT TTA GCA GAG AG CCA TCA AAC CAG TGA ATT TAC TCG	81	(Klotz <i>i in.</i> , 2003)
<i>sec</i>	AAT AAA ACG GTT GAT TCT AAA AGT GTG AA ATC AAA ATC GGA TTA ACA TTA TCC ATT C	80	(Klotz <i>i in.</i> , 2003)
<i>sed</i>	TGA TTC TTC TGA TGG GTC TAA AGT CTC GAA GGT GCT CTG TGG ATA ATG TTT T	115	(Klotz <i>i in.</i> , 2003)
<i>tst</i>	TCA TCA GCT AAC TCA AAT ACA TGG ATT TGT GGA TCC GTC ATT CAT TGT T	88	(Babić, 2018)
<b>Startery dla genów referencyjnych</b>			
<i>16S rRNA</i>	TAT GGA GGA ACA CCA GTG GCG AAG TCA TCG TTT ACG GCG TGG ACT ACC	116	(Ster <i>i in.</i> , 2005)
<i>fabD</i>	CCT TTA GCA GTA TCT CGA CC GAA ACT TAG CAT CAC GCC	102	(Theis <i>i in.</i> , 2007)
<i>ftsZ</i>	TAT TAC TGG TGG CGA GTC A AGT ATT TAC GCT TGT TCG GA	223	(Sihto <i>i in.</i> , 2014)
<i>gmk</i>	AAT CGT TTT ATC AGG ACC CTT CAC CTT CAC GCA TTT	120	(Schroder <i>i in.</i> , 2013)
<i>gyrB</i>	GTC GAA GGG GAC TCT G GCT CCA TCC ACA TCG G	242	(Sihto <i>i in.</i> , 2014)
<i>rho</i>	GAA GCT GCT GAA GTC G CGT CCA TAC GTG AAC CC	319	(Sihto <i>i in.</i> , 2014)
<i>rpoB</i>	CTA AGC ACA GAG GTC GT	298	(Sihto <i>i in.</i> , 2014)

	ACG GCA TCC TCA TAG T		
<i>proC</i>	GGC AGG TAT TCC GAT TG CTT CCG GTG ATA GCT GTT A	231	(Sihto <i>i in.</i> , 2014)
<i>pyk</i>	GCA TCT GTA CTC TTA CGT CC GGT GAC TCC AAG TGA AGA	89	(Theis <i>i in.</i> , 2007)
<i>tpiA</i>	GGT GAA ACA GAC GAA GAG TTA CCA GTT CCG ATT GCC	145	(Theis <i>i in.</i> , 2007)

#### 6.14. Odczynniki do reakcji qPCR

- **Środek do inaktywacji enzymów o aktywnościach DNaz i RNaz oraz pozostałości kwasów nukleinowych labZAP™** (A&A Biotechnology, Polska)
- **Master mix do reakcji qPCR - Fast SG qPCR Master Mix** (EURx®, Polska)  
Fast SG qPCR Master Mix (2x)  
Woda wolna od nukleaz
- **Startery** (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Niemcy)

#### 6.15. Odczynniki do izolacji i rozdziału białek

##### Odczynniki do przygotowania lizatów białkowych

2x bufor Laemmli (Bio-Rad, USA) 950 µl

β-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, USA) 50 µl

##### Odczynniki do oznaczania ilościowego białek

- **Zestaw RD DC™ Protein Assay Kit I** (Bio-Rad, USA)  
Odczynnik redukujący I  
Odczynnik redukujący II  
Alkaliczny winian miedzi  
Rozcieńczony odczynnik Folina  
Roztwór środka powierzchniowo czynnego

- **Wzorzec białkowy γ-globuliny** (Bio-Rad, USA)

##### Odczynniki do rozdziału białek metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących (SDS-PAGE, ang. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Składniki niezbędne do przygotowania żelu poliakryloamidowego zawarto w Tabeli 5.

**Tabela 5. Skład żeli poliakryloamidowych do analizy białek metodą SDS-PAGE.**

Odczynnik	Żel rozdzielający (dolny, 12%), 10 ml	Żel zagęszczający (górny, 6%), 4 ml
Woda destylowana	3,3 ml	2,08 ml
30% roztwór akrylamidu (29:1)	4,0 ml	800 µl
1,5 M Tris-HCl	2,5 ml	-
0,5 M Tris-HCl	-	1 ml
10% SDS	100 µl	40 µl
10% APS	100 µl	40 µl
TEMED	4 µl	4 µl

- **Bufor SDS-PAGE 10x stężony**

Glicyna (POCH, Polska)	144 g
Tris (Sigma-Aldrich, USA)	30 g
SDS (Sigma-Aldrich, USA)	10 g
Woda destylowana	do 1000 ml

- **Bufor SDS-PAGE 1x stężony**

Bufor SDS-PAGE 10x stężony	100 ml
Woda destylowana	900 ml

- **Marker do oznaczania wielkości białek, 10-180 kDa** (Thermo Fisher Scientific, USA)

- **Wzorce białkowe toksyn gronkowcowych** (Toxin Technology Inc., USA)

SEA	1 mg/ml
SEB	1 mg/ml
SEC	1 mg/ml
SED	1 mg/ml
TSST-1	1 mg/ml

Liofilizat (1 mg) rozpuszczono w 1 ml jałowej wody milli Q<sup>®</sup>, rozporcjowano do jałowych probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -80°C.

**Odczynniki do transferu i wykrywania białka na membranie**

- **Membrana PVDF** (Bio-Rad, USA)

- **Bibuła filtracyjna** (Bio-Rad, USA)

- **Bufor do transferu 10x stężony**

Glicyna (POCH, Polska)	144 g
Tris (Sigma-Aldrich, USA)	30 g
Woda destylowana	do 1000 ml

- **Bufor do transferu 1x stężony**

Bufor do transferu 10x stężony	100 ml
Metanol (POCH, Polska)	100 ml
Woda destylowana	800 ml

Przechowywano w temperaturze 4°C.

- **Metanol cz.d.a.** (POCH, Polska)

- **TBS**

Tris (Sigma-Aldrich, USA)	1,22 g
NaCl (MP Biomedicals LLC, USA)	8,76 g
Woda destylowana	750 ml

Doprowadzono do pH 7,5 przy pomocy 2 M HCl.

Dopełniono wodą destylowaną do 1 l.

- **TBS-T (TBS-Tween)**

TBS	500 ml
Tween-20 (Chempur, Polska)	250 µl

- **TBS-T + 1% mleko**

TBS-T	200 ml
Odtłuszczone mleko w proszku (Gostyń, Polska)	2 g

Roztwór przygotowywano bezpośrednio przed użyciem. Przechowywano w temperaturze 4°C.

- **Przeciwciała pierwszorzędowe** (Toxin Technology Inc., USA)

Anty-gronkowcowa enterotoksyna A IgG

Anty-gronkowcowa enterotoksyna B IgG

Anty-gronkowcowa enterotoksyna C IgG

Anty-gronkowcowa enterotoksyna D IgG

Anty-gronkowcowa toksyna zespołu wstrząsu toksycznego TSST-1 IgG

Liofilizat (1 mg) rozpuszczono w 1 ml jałowej wody milli Q<sup>®</sup>, rozporcjowano do jałowych probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -80°C.

- **Przeciwciała drugorzędowe anty-królicze znakowane peroksydazą chrzanową – Peroxidase-conjugated AffiniPure Alpaca Anti-Rabbit IgG** (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA)

Liofilizat (1 mg) rozpuszczono w 1 ml jałowej wody milli Q<sup>®</sup>, rozporcjowano do jałowych probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -80°C.

- **Odczynnik do chemiluminescencji – Clarity Max Western ECL Substrate** (Bio-Rad, USA)

Roztwór peroksydazy

Luminol

Bezpośrednio przed użyciem, w probówce typu Eppendorf przeznaczonej do światłoczułych odczynników, zmieszano jedną objętość roztworu peroksydazy z jedną objętością luminolu.

#### 6.16. Odczynniki do testu pomiaru aktywności toksyn (test proliferacji)

- **Toksyny gronkowcowe – SEA, SEB, SEC, SED, TSST-1** (Toxin Technology Inc., USA)
- **FBS – płodowa surowica bydłęca (ang. *Fetal Bovine Serum*)** (Biowest, USA)
- **Formaldehyd cz.d.a.** (Chempur, Polska)
- **Komórki PBMC (jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, ang. *peripheral blood mononuclear cells*)** – pozyskane dzięki uprzejmości dr hab. Danuty Gutowskiej-Owsiak, prof. UG z Pracowni Immunologii Doświadczalnej i Translacyjnej (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed)
- **Odczynnik do pomiaru proliferacji komórek – CellTrace™ Far Red** (Invitrogen™, USA)
- **Penicylina-Streptomycyna** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Pożywka RPMI-1640** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Przeciwciało CD3-PE** (BioLegend, USA)

#### 6.17. Odczynniki do testu ELISA (pomiar IL-2)

- **Toksyny gronkowcowe – SEA, SEB, SEC, SED, TSST-1** (Toxin Technology Inc., USA)
- **FBS – płodowa surowica bydłęca (ang. *Fetal Bovine Serum*)** (Biowest, USA)
- **Jonomycyna** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Komórki PBMC** - pozyskane dzięki uprzejmości dr hab. Danuty Gutowskiej-Owsiak, prof. UG z Pracowni Immunologii Doświadczalnej i Translacyjnej (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed)

- **Octan mirystynianu forbolu** (PMA, Sigma-Aldrich, USA)
- **Penicylina-Streptomycyna** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Pożywka RPMI-1640** (Sigma-Aldrich, USA)
- **Zestaw do testu ELISA – IL-2 Human Uncoated ELISA Kit** (Invitrogen™, USA)

#### 6.18. Odczynniki do modelu *ex vivo* świńskiej skóry

- **Agar Hapes**

NaCl (MP Biomedicals LLC, USA)	4 g
KCl (Stanlab, Polska)	0,15 g
Hepes (Sigma-Aldrich, USA)	1,19 g
Glukoza (Chempur, Polska)	1 g
Agar (BTL, Polska)	5 g
Woda destylowana	500 ml
- **70% etanol**
- **Bufor PBS 1x stężony (Materiały, 6.3.)**
- **Świńska skóra**
- **Woda destylowana**

#### 6.19. Odczynniki do mysiego modelu kolonizacji skóry przez *S. aureus*

- **Krem do depilacji** (Isana, Niemcy)
- **Przylepiec chirurgiczny z włókniny Omnifix® Elastic, 10 cm x 10 m** (Hartmann, Niemcy)
- **Bufor PBS 1x stężony** (Materiały, 6.3.)
- **Przezroczysty opatrunek foliowy Tegaderm™, 2 cm x 2 cm** (3M™, USA)
- **Płynne podłoże TSB** (Materiały, 6.2.)
- **10% roztwór formaliny, zbuforowany, zawierający 4% formaldehyd** (Sigma-Aldrich, USA)

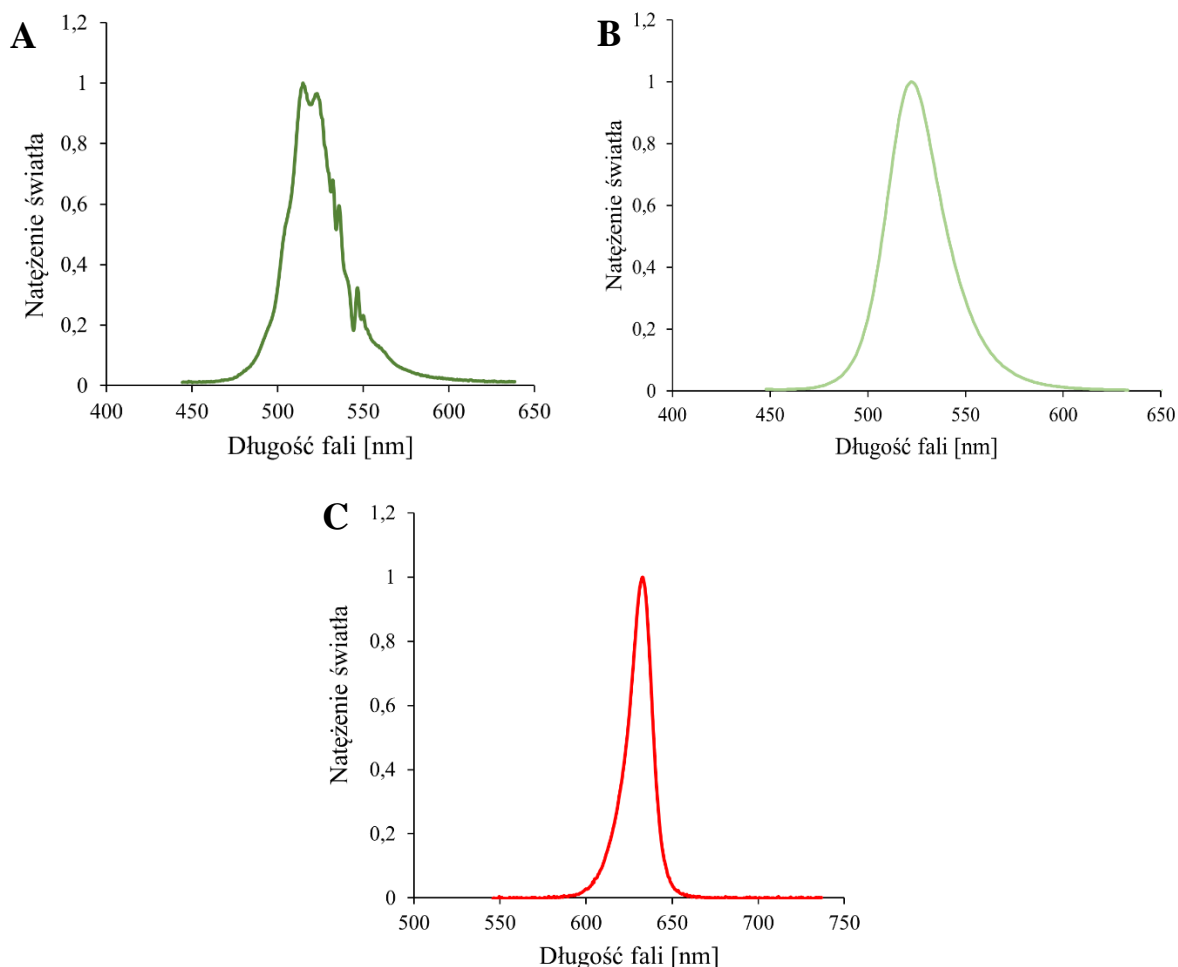
## 6.20. Fotouczulacze

1 mM roztwór wyjściowy rózu bengalskiego (RB; 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-soli disodowej tetrajodofluoresceiny; Sigma-Aldrich, USA) przygotowano w sterylnej wodzie milli Q<sup>®</sup> i przechowywano w ciemności temperaturze -20°C. Przed użyciem, roztwór wyjściowy rozcieńczano w sterylnej wodzie milli Q<sup>®</sup> do odpowiednich stężeń roboczych i przechowywano w ciemności w temperaturze 4°C przez okres do miesiąca.

Roztwór wyjściowy nowego błękitu metylenowego (NMB; chlorek etylo-[7-(etyloamino)-2,8-dimetylofenotiazyn-3-ylideno]-azaniowy; Sigma-Aldrich, USA) sporządzono w stężeniu 10 mM w sterylnej wodzie milli Q<sup>®</sup> i przechowywano w ciemności temperaturze -20°C. W związku z tendencją do tworzenia agregatów, a tym samym obniżenia efektywności przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej, roztwór wyjściowy rozcieńczono w sterylnej wodzie milli Q<sup>®</sup> do odpowiedniego stężenia, rozporcjowano i przechowywano w ciemności w temperaturze -20°C.

## 6.21. Źródła światła

Eksperymenty dotyczące przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej zostały wykonane przy użyciu diod emitujących światło (LED), przygotowanych na zamówienie dla Zakładu Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej przez firmę EMD Technology (Warszawa, Polska) oraz Cezos LED modules (Gdynia, Polska). W badaniach wykorzystano trzy źródła światła: światło zielone o maksimum emisji 515 nm (badania *in vitro*), światło zielone o maksimum emisji 530-535 nm (badania *ex vivo* i *in vivo*) oraz światło czerwone o maksimum emisji 632 nm (Ryc. 5). W przypadku światła zielonego ( $\lambda_{\max}=515$  nm) stosowano 50% mocy maksymalnej (35 mW/cm<sup>2</sup>), światła zielonego ( $\lambda_{\max}=530-535$  nm) stosowano 100% mocy (10,6 mW/cm<sup>2</sup>), a w przypadku światła czerwonego – 100% mocy (20 mW/cm<sup>2</sup>). Pełna charakterystyka lamp została zawarta w publikacji opublikowanej w czasopiśmie Lighting Research & Technology (Ogonowska *i in.*, 2019).



**Rycina 5. Widma emisji źródeł światła wykorzystanych w niniejszej pracy.** A – widmo emisji źródła światła zielonego  $\lambda_{\max}$  515 nm; B – widmo emisji światła zielonego  $\lambda_{\max}$  530-535 nm; C – widmo emisji światła czerwonego  $\lambda_{\max}$  632 nm. Pomiary wykonano we współpracy z prof. dr hab. Piotrem Kwiekiem (panel A i C, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki Uniwersytetu Gdańskiego) oraz mgr inż. Tomaszem Przytarskim (panel B, Niezależne Laboratorium Fotometryczne „ViTom Light & Energy”, Gdynia). Na widmach przedstawiono znormalizowane wartości natężenia światła w odniesieniu do 100% zastosowanej mocy.

Na podstawie uzyskanych pomiarów opublikowanych przez nasz zespół badawczy zdefiniowano obszar, w którym obserwuje się najskuteczniejszy spadek przeżywalności komórek bakteryjnych. W związku z tym, w celu uzyskania powtarzalnych i wiarygodnych wyników, próby naświetlane umieszczano zawsze w tym samym obszarze.

## 6.22. Analiza statystyczna

Wyniki wszystkich przeprowadzonych doświadczeń zostały przedstawione jako wartości trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Obliczenia statystyczne dla danych genotypowych zlecono firmie zewnętrznej (BIO-STAT, Gdańsk) i były wykonywane przy



użyciu pakietu STATISTICA 12 (StatSoft Inc., 2014). Dla zmiennych jakościowych przeprowadzono test niezależności Chi-kwadrat (z wykorzystaniem korekcji wg Yatesa dla liczebności komórek poniżej 10, sprawdzeniem warunków Cochraana i dokładnym testem Fishera). Wykresy przedstawiające wyniki Western Blot wykonano w programie GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA, 2015). Pozostałe wykresy sporządzono z wykorzystaniem programu Microsoft Excel 365. Analiza statystyczna dla efektu cyto- i fototoksycznego, względnych wartości ekspresji, zmian na poziomie białka i zmian proliferacji została wykonana przy użyciu programu GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA, 2015). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem rzeczywiście znaczącej różnicy Dunnetta. Dla wszystkich testów statystycznych wartość  $p < 0,05$  określano jako istotną statystycznie.

### 6.23. Sprzęt laboratoryjny

- Akcesoria do mokrego transferu (Bio-Rad, USA)
- Aparat do elektroforezy pionowej Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA)
- Aparat do elektroforezy poziomej Mupid-ExU Submarine Electrophoresis System (TaKaRa Bio, Japonia)
- Cytometr przepływowy Guava easyCyte (Merck Millipore, USA)
- Czytnik płytek Victor Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer, USA)
- Densytometr Densi-La-Meter II (Erba Lachema s.r.o., Czechy)
- Inkubator B8054 (Termaks, Norwegia)
- Inkubator z kontrolowaną atmosferą CO<sub>2</sub> ICOMed (Mettler GmbH, Niemcy)
- Kołyska laboratoryjna (bioSan, Polska)
- Dioda emitująca światło LED ( $\lambda_{\max}=530-535$  nm) skonstruowana na potrzeby Zakładu Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej (Cezos LED modules, Polska)
- Diody emitujące światło LED ( $\lambda_{\max}=515$  nm,  $\lambda_{\max}=632$  nm) skonstruowane na potrzeby Zakładu Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej (EMD Technology Sp z o.o., Polska)
- Miniwirówka Rotilabo<sup>®</sup> (ROTH, Niemcy)
- Spektrofotometr NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Spektrofotometr UV-VIS SPECORD 2000 PLUS (Analytik Jena, Niemcy)
- System do dokumentacji żeli ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, USA)

- System obrazowania bioluminescencji *in vivo* IVIS (Perkin-Elmer, USA)
- System xCELLigence RTCA (ACEA Biosciences Inc., USA)
- Termoblok TB-941 T (JWE Electronic, Polska)
- Termocykler GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, USA)
- Termocykler LightCycler® 480 II (Roche, Szwajcaria)
- Wirówka Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Niemcy)
- Wirówka na mikroplątki i płytki PCR Plate-Fuge (ALCHEM, Polska)
- Wirówko-worteks FVL-2400N CombiSpin (bioSan, Polska)
- Worteks TALBOYS (Troemner, USA)
- Wytrząsarka powietrzna Innova 40 (New Brunswick Scientific, Szwecja)
- Wytrząsarka worteks V-1 plus (bioSan, Polska)
- Zasilacz do elektroforezy CS-300V (Clever Scientific Ltd., Wielka Brytania)

## 7. Metody

### 7.1. Izolacja genomowego DNA bakteryjnego

Izolację genomowego DNA bakteryjnego przeprowadzano z użyciem zestawu Genomic Mini (Materiały, 6.4., A&A Biotechnology, Polska). 1,5 ml nocnej hodowli bakteryjnej przeniesiono do jałowej probówki typu Eppendorf i zwirowano (5 min, 13 400 rcf). Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 100 µl buforu lizującego (Materiały, 6.3.) z dodatkiem 10 µl lizostafiny (Materiały, 6.4.) i 20-30 mg szklanych kulek (Materiały, 6.4.). Każdą próbkę dokładnie zworteksowano i inkubowano 40 min w temperaturze 37°C. W trakcie inkubacji, co 10-15 min krótko worteksowano każdą z prób (10-15 s). Kolejne etapy wykonywano zgodnie z instrukcją producenta. Elucję DNA przeprowadzono z zastosowaniem 100 µl buforu Tris. Pomiar spektrofotometryczny uzyskanego DNA pod kątem czystości i ilości dokonano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Wyizolowany genomowy DNA bakteryjny przechowywano w -20°C.

### 7.2. Amplifikacja genów toksyn

Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR dla genów toksyn gronkowcowych (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *tst*) zestawiono w Tabeli 6. Kontrole pozytywne i kontrole negatywne stanowią szczepy referencyjne pochodzące z Narodowego Instytutu Leków (Suplement, tab. 3).

**Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej.**

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Objętość na jedną reakcję
Bufor (zawierający 20 mM MgCl <sub>2</sub> )	10x stężony	1x stężony	2,5 µl
dNTPs	10 mM każdy	0,2 mM	0,5 µl
Primer forward	50 pmoli/µl	0,5 pmol/µl	0,25 µl
Primer reverse	50 pmoli/µl	0,5 pmol/µl	0,25 µl
Polimeraza DreamTaq	5 U/µl	0,5 U	0,1 µl
Woda do PCR	-	-	do 25 µl
DNA	[x ng/µl]	~20-30 ng	Obliczyć

Amplifikację prowadzono w termocyklerze GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, USA), w następujących warunkach reakcji:

Wstępna denaturacja 94°C	3 min		
Denaturacja 94°C	20 s	}	30 cykli
Przyłączanie starterów 54°C	20 s		
Elongacja 72°C	20 s		
Końcowa elongacja 72°C	4 min		
Schładzanie 4°C	∞		

Produkty reakcji PCR rozdzielano w 2% żelu agarozowym z dodatkiem SimplySafe™ (Materiały, 6.7., EURx®, Polska). Rozdział prowadzono w aparacie do elektroforezy poziomej Mupid-ExU (TaKaRa Bio, Japonia) w 0,5x stężonym buforze TBE (Materiały, 6.3.) przy napięciu 100V przez czas 60 min, a następnie 135V przez 30 min. Wyniki rozdziału obserwowano w systemie do dokumentacji żeli ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, USA).

### 7.3. Amplifikacja regionu VNTR (zmienna liczba powtórzeń tandemowych, ang. *Variable Number of Tandem Repeats*) genu *spa* *S. aureus*

Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 7.

**Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej.**

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Objętość na jedną reakcję
Bufor (zawierający 20 mM MgCl <sub>2</sub> )	10x stężony	1x stężony	5 µl
dNTPs	10 mM każdy	0,1 mM	0,5 µl
Primer forward	50 pmoli/µl	1 pmol/µl	1 µl
Primer reverse	50 pmoli/µl	1 pmol/µl	1 µl
Polimeraza DreamTaq	5 U/µl	0,05 U	0,5 µl
Woda do PCR	-	-	41 µl
DNA	[x ng/µl]	~20-30 ng	Obliczyć

Amplifikację prowadzono w termocyklerze GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, USA), w następujących warunkach reakcji:

Wstępna denaturacja 94°C	5 min	
Denaturacja 94°C	30 s	} 30 cykli
Przyłączanie starterów 63°C	30 s	
Elongacja 72°C	45 s	
Końcowa elongacja 72°C	3 min	
Schładzanie 20°C	∞	

Produkty reakcji PCR rozdzielano w 1% żelu agarozowym z dodatkiem zamiennika bromku etydyiny SimplySafe™ (Materiały, 6.7., EURx®, Polska). Rozdział prowadzono w aparacie do elektroforezy poziomej Mupid-ExU (TaKaRa Bio, Japonia) w 0,5x stężonym buforze TBE (Materiały, 6.3.) przy napięciu 100V przez czas 75 min. Wyniki rozdziału obserwowano w systemie do dokumentacji żeli ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, USA). Produkty amplifikacji przekazano do oczyszczania i sekwencjonowania, korzystając z usług firmy zewnętrznej (Eurofins Genomics, Niemcy). Otrzymane sekwencje przekazano do dalszej analizy przez zespół dr n. biol. Joanny Empel z Zakładu Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowego Instytutu Leków w Warszawie. Konkretny typ *spa* został zatwierdzony przez bazę RidomSpa (<https://spaserver.ridom.de/>, Ridom GmbH, Niemcy) poprzez odczyt na poziomie Excellent lub Very Good.

Uzyskane typy *spa* grupowano w kompleksy klonalne MLST (ang. *clonal complexes*) za pomocą bazy danych Ridom SpaServer (<https://spaserver.ridom.de/>) (Enright *i in.*, 2000).

#### 7.4. Przeciwbakteryjna inaktywacja fotodynamiczna (aPDI)

Nocne hodowle bakteryjne (Materiały, 6.2.) doprowadzono do gęstości optycznej 0,5 McF (ok. 10<sup>7</sup> CFU/ml). Do probówek typu Eppendorf przeznaczonych do światłoczułych odczytników przeniesiono po 200 µl zawiesiny bakteryjnej. Doświadczenie opierało się na analizie czterech grup badawczych:

- (1) L(-) PS(-) – komórki nietraktowane, przechowywane w ciemności
- (2) L(+) – komórki traktowane światłem
- (3) PS(+) – komórki traktowane fotouczulaczem i przechowywane w ciemności
- (4) aPDI – komórki traktowane fotouczulaczem i światłem

Do komórek bakteryjnych traktowanych fotouczulaczem, dodano fotouczulacz w stężeniu końcowym równym 0,5 µM i 1 µM (RB) lub 5 µM i 10 µM (NMB). Komórki z dodatkiem fotouczulacza inkubowano z wytrząsaniem przez czas 10 min (RB) lub 15 min (NMB).

Następnie, 100  $\mu$ l prób przeznaczonych do naświetlania (grupa 2 i 4) przenoszono do 96-dółkowej płytki (NEST<sup>®</sup> Biotechnology, Chiny). Komórki bakteryjne naświetlano rosnącymi dawkami światła w zakresie 10-40 J/cm<sup>2</sup> dla światła zielonego oraz 35-45 J/cm<sup>2</sup> dla światła czerwonego. Do wzbudzenia RB użyto światło zielone, natomiast do wzbudzenia NMB – światło czerwone. Każdorazowo, podczas procesu naświetlania pobierano 10  $\mu$ l naświetlanej próbki dla danej dawki światła (grupa 2 i 4). Dodatkowo po zakończonym procesie naświetlania, pobierano po 10  $\mu$ l komórek dla prób z grupy 1 i 3. Próby pobierano w celu określenia liczby jednostek tworzących kolonie (CFU/ml) oraz oceny przeżywalności komórek bakteryjnych. W tym celu 10  $\mu$ l każdej z prób przenoszono do 90  $\mu$ l jałowego buforu PBS i wykonywano 10-krotne seryjne rozcieńczenia w 96-dółkowej płytce (NEST<sup>®</sup> Biotechnology, Chiny). Na podłoże agarowe TSA wysiewano po 10  $\mu$ l każdego z rozcieńczeń (w zakresie od 10<sup>0</sup> do 10<sup>-4</sup>) i inkubowano płytki w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po inkubacji, zliczano pojedyncze kolonie bakteryjne i obliczano spadek przeżywalności komórek bakteryjnych. Doświadczenie wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych.

### 7.5. Badanie cyto- i fototoksyczności związków fotouczulających (test MTT)

Pierwszego dnia eksperymentu wykonano pasaż komórek eukariotycznych - HaCaT (CLS 300493), HaCaT z wyciszoną ekspresją w genie filagryny (*FLG* shRNA) oraz komórki HaCaT z wprowadzonym pustym wektorem na drodze transfekcji, będące kontrolą (Ctrl shRNA) (Wang *i in.*, 2017). Komórki rozporcjowano tak, aby na jeden dołek 96-dółkowych płytek przypadało 1x10<sup>4</sup> komórek (NEST<sup>®</sup> Biotechnology, Chiny). Końcowa objętość inokulum w każdym dołku wynosiła 100  $\mu$ l. Tak przygotowane komórki eukariotyczne inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> przez 24 godziny, aby umożliwić komórkom adhezję. Po upływie 24 godz. od wysiania, bezpośrednio do medium dodano fotouczulacz w odpowiednim stężeniu. Komórki inkubowano w ciemności w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> przez 10 minut (RB) lub 15 minut (NMB). Po inkubacji komórki płukano 100  $\mu$ l DPBS (Materiały, 6.9., Sigma-Aldrich, USA). Po odessaniu DPBS, do każdego dołka rozporcjowano po 100  $\mu$ l świeżego medium. Wykonano proces naświetlania według następujących warunków:

- (1) Światło zielone ( $\lambda_{\max}$ =515 nm), moc źródła światła 35 mW/cm<sup>2</sup>, dawka światła 40 J/cm<sup>2</sup>, czas naświetlania 22 min
- (2) Światło czerwone ( $\lambda_{\max}$ =632 nm), moc źródła światła 20 mW/cm<sup>2</sup>, dawka światła 32,5 J/cm<sup>2</sup>, czas naświetlania 45 min

Po zakończeniu naświetlania, komórki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Po upływie 24 godz. dodano do każdego dołka 10 µl 12 mM roztworu MTT (Materiały, 6.9., Sigma-Aldrich, USA). Inkubowano przez 4 godziny w temperaturze 37°C w cieplarni w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Następnie do każdego dołka dodano 100 µl DMSO (Materiały, 6.9., Sigma-Aldrich, USA). Komórki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> przez czas 15 minut. Absorbancję mierzono przy długości fali 550 nm w czytniku płytek Victor Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer, USA). Efekt cytotoksyczny wyrażano w następujący sposób:

$$\text{Przeżywalność (\%)} = \left( \frac{\text{OD prób traktowanych} - \text{OD blank}}{\text{OD prób kontrolnych} - \text{OD blank}} \right) \times 100$$

gdzie OD prób traktowanych – wartość absorbancji dla komórek poddanych działaniu samego światła, samego fotouczulacza, bądź światła i fotouczulacza; OD blank – wartość absorbancji roztworu DMSO; OD prób kontrolnych – wartość absorbancji dla komórek nietraktowanych.

## **7.6. Monitorowanie wzrostu i żywotności komórek eukariotycznych w systemie xCELLigence**

Komórki HaCaT (CLS 300493), HaCaT z wyciszoną ekspresją w genie filagryny (*FLG* shRNA) oraz komórki HaCaT z wprowadzonym pustym wektorem stanowiące kontrolę (Ctrl shRNA) (Wang *i in.*, 2017) przepasażowano, zawieszono w medium DMEM (Materiały, 6.8.) i rozsiano na E-płytki (ACEA Biosciences Inc., USA) do gęstości 1x10<sup>4</sup> komórek na dołek. Każdy badany warunek przetestowano w 7 powtórzeniach technicznych. Płytki umieszczono w urządzeniu xCELLigence RTCA (ACEA Biosciences Inc., USA) i inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> przez 24 godziny. Następnego dnia eksperymentu, gdy komórki znajdowały się w fazie logarytmicznego wzrostu, E-płytki wyjmowano z urządzenia, usuwano medium z dołków i dodano po 100 µl ogrzanego medium z fotouczulaczem w odpowiednim stężeniu. Płytki inkubowano w ciemności w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> przez 15 min (NMB) lub 10 min (RB). Po inkubacji, wykonano dwukrotne płukanie 100 µl DPBS (Materiały, 6.9., Gibco<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific, USA), dodano po 100 µl świeżego medium i poddano naświetlaniu. Przetestowano następujące warunki przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej:

- (1) Światło zielone ( $\lambda_{\max}=515$  nm), moc źródła światła  $35 \text{ mW/cm}^2$ , dawka światła  $40 \text{ J/cm}^2$ , stężenie końcowe RB:  $10 \text{ }\mu\text{M}$ , czas naświetlania 22 min
- (2) Światło czerwone ( $\lambda_{\max}=632$  nm), moc źródła światła  $20 \text{ mW/cm}^2$ , dawka światła  $32,5 \text{ J/cm}^2$ , stężenie końcowe NMB:  $5 \text{ }\mu\text{M}$ , czas naświetlania 45 min

Po zakończeniu procesu naświetlania, E-płytki umieszczono ponownie w urządzeniu xCELLigence RTCA (ACEA Biosciences Inc., USA) i monitorowano wzrost oraz żywotność komórek do osiągnięcia fazy plateau (przez ok. 70-120 godz.). Indeks komórkowy (CI, ang. *Cell Index*) mierzono co 10 min. Parametr ten zależy od liczby, wielkości i morfologii komórek przylegających do mikroelektrod wbudowanych w E-płytkę.

### **7.7. Przeciwbakteryjna inaktywacja fotodynamiczna (aPDI) w warunkach subletalnych (badanie ekspresji genów toksyn)**

Nocne hodowle bakteryjne (Materiały, 6.2.) odmładzano w stosunku 1:100 w 20 ml jałowego medium TSB i inkubowano do osiągnięcia fazy logarytmicznego wzrostu ( $\text{OD}_{600}\approx 0,5$ ; czas odmładzania ok. 2 godziny). Następnie do 24-dółkowej płytki (NEST<sup>®</sup> Biotechnology, Chiny) przenoszono 510  $\mu\text{l}$  hodowli bakteryjnej. Doświadczenie opierało się na analizie czterech grup eksperymentalnych:

- (1) L(-) PS(-) – komórki nietraktowane, przechowywane w ciemności
- (2) L(+) – komórki traktowane światłem
- (3) PS(+) – komórki traktowane fotouczulaczem i przechowywane w ciemności
- (4) aPDI – komórki traktowane fotouczulaczem i światłem

Do prób aPDI i PS(+) dodano fotouczulacz w stężeniu końcowym  $0,2\text{-}0,5 \text{ }\mu\text{M}$  (RB), bądź  $5 \text{ }\mu\text{M}$  (NMB). Tak przygotowane 24-dółkowe płytki przykryto folią aluminiową i inkubowano w  $37^\circ\text{C}$  z wytrząsaniem (150 rpm) 10 min (RB) lub 15 min (NMB). Następnie naświetlano odpowiednią dawką światła o energii całkowitej w zakresie  $2\text{-}10 \text{ J/cm}^2$  dla światła zielonego oraz  $17,5\text{-}30 \text{ J/cm}^2$  dla światła czerwonego. Zarówno dawka fotouczulacza, jak i dawka światła została dobrana w taki sposób, aby spadek przeżywalności bakterii nie przekraczał  $0,5 \log_{10}$  CFU/ml. Po zakończeniu procesu naświetlania, płytki przechowywano w  $37^\circ\text{C}$ . Próby pobierano w dwóch punktach czasowych – po upływie 20 min ( $t_{20}$ ) i 40 min ( $t_{40}$ ) od zakończenia procesu naświetlania. 500  $\mu\text{l}$  każdej z prób zawieszano w 1 ml odczynnika stabilizującego RNA – RNAlater (Materiały, 6.11., Sigma-Aldrich, USA). Tak przygotowane próby przechowywano w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przez 24 godziny. Ponadto, pozostałe 10  $\mu\text{l}$  zawiesiny bakteryjnej przenoszono do 90  $\mu\text{l}$  jałowego PBS (Materiały, 6.3.), celem wykonania



10-krotnych seryjnych rozcieńczeń (zakres  $10^{-1}$  do  $10^{-5}$ ). Rozcieńczenia wysiewano na podłoża TSA, które inkubowano przez 24 godziny w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Po inkubacji, zliczano kolonie bakteryjne w celu określenia przeżywalności badanych szczepów *S. aureus*. Eksperyment przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych.

### **7.8. Izolacja całkowitego RNA bakteryjnego**

Izolację całkowitego RNA bakteryjnego wykonywano przy użyciu zestawu Syngen Blood/Cell RNA Mini Kit (Materiały, 6.11., Syngen, Polska). Izolację prowadzono z 500  $\mu\text{l}$  hodowli bakteryjnej zawieszanej w 1 ml odczynnika stabilizującego RNA, RNAlater (Materiały, 6.11., Sigma-Aldrich, USA). Przed przystąpieniem do izolacji, próby zwirowano (10 min, 3 300 rcf). Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 100  $\mu\text{l}$  buforu lizującego z dodatkiem 2 U lizostafiny (5  $\mu\text{l}$ ) (Materiały, 6.11., A&A Biotechnology, Polska). Całość zworteksowano na maksymalnych obrotach przez 20 s i umieszczono w termobloku (JWE Electronic, Polska) nagrzanym do temperatury  $37^{\circ}\text{C}$  na czas 30 min. Podczas inkubacji, co 10 min krótko worteksowano każdą z prób (15-20 s). Kolejne kroki wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta. W trakcie izolacji przeprowadzono etap trawienia DNA na kolumnie. Na środek membrany naniesiono 10  $\mu\text{l}$  roztworu DNazy i 70  $\mu\text{l}$  buforu RDD (Materiały, 6.11.). Inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min. Elucję bakteryjnego RNA wykonano z użyciem 50  $\mu\text{l}$  wody wolnej od RNaz. Wyizolowany RNA rozporcjowano do wolnych od RNaz próbek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **7.9. Doczyszczanie RNA**

W związku z tym, że do reakcji qPCR wymagany jest RNA pozbawiony genomowego DNA, wykonano dodatkowy etap doczyszczania RNA. W próbce typu Eppendorf wolnej od RNaz zmieszano:

- (1) 20  $\mu\text{l}$  próbki RNA zanieczyszczonej genomowym DNA
- (2) 10  $\mu\text{l}$  buforu RDD
- (3) 10  $\mu\text{l}$  roztworu DNazy
- (4) 60  $\mu\text{l}$  wody wolnej od RNaz

Całość inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 min. Kolejne etapy wykonywano zgodnie z instrukcją producenta przy użyciu zestawu Syngen Blood/Cell RNA Mini Kit (Materiały, 6.11., Syngen, Polska). Elucję bakteryjnego RNA wykonano z użyciem 50  $\mu\text{l}$  wody

wolnej od RNaz. Wyizolowany oczyszczony RNA rozporcjowano do wolnych od RNaz próbek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Czystość i stężenie uzyskanego RNA zmierzono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem urządzenia NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Jakość RNA oceniano poprzez rozdział w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem SimplySafe™ (Materiały, 6.7., EURx®, Polska). Próbki do naniesienia na żel przygotowywano poprzez zmieszanie 5  $\mu\text{l}$  próbki RNA i 5  $\mu\text{l}$  2x stężonego buforu ładującego RNA (Materiały, 6.7., Thermo Fisher Scientific, USA). Próbki inkubowano przez 10 min w temperaturze  $70^{\circ}\text{C}$ . Po czasie inkubacji próbki schłodzono w lodzie i całość (10  $\mu\text{l}$ ) umieszczano w studzienkach. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w 0,5x stężonym buforze TBE (Materiały, 6.3.) przy napięciu 100V przez czas 20 min. Do oceny rozdziału wykorzystano system do dokumentacji żeli ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, USA), obserwując dwa charakterystyczne prążki odpowiadające podjednostkom 23S i 16S rRNA.

### 7.10. Odwrotna transkrypcja

Komplementarny cDNA uzyskano w procesie odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu TranScriba Kit (Materiały, 6.12., A&A Biotechnology, Polska). W sterylnej próbówce wolnej od RNaz umieszczono kolejno: 100 ng całkowitego bakteryjnego RNA, 1  $\mu\text{l}$  startera dN-heksamer, dopełniając wodą wolną od nukleaz do objętości 9,5  $\mu\text{l}$ . Całość dokładnie wymieszano i krótko zwirowano. Następnie próbki inkubowano w temperaturze  $65^{\circ}\text{C}$  przez 5 minut w celu denaturacji matrycowego RNA. W kolejnym kroku dodawano pozostałe odczynniki w następującej kolejności:

5x bufor reakcyjny	4 $\mu\text{l}$
Inhibitor RNaz	0,5 $\mu\text{l}$
dNTPs Mix	2 $\mu\text{l}$
TranScriba	4 $\mu\text{l}$

Próbki umieszczono w termocyklerze GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, USA)

i wybrano odpowiedni program:

Wstępna inkubacja $25^{\circ}\text{C}$	5 min
Elongacja heksamerów $42^{\circ}\text{C}$	60 min
Terminacja $70^{\circ}\text{C}$	5 min
Chłodzenie $4^{\circ}\text{C}$	

Uzyskany cDNA przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu dalszych analiz.

## 7.11. Wybór stabilnego genu referencyjnego

Wytypowano 10 genów referencyjnych w oparciu o dane literaturowe dotyczące analizy stabilności genów w różnych warunkach eksperymentalnych (Materiały, 6.13., tab. 4). W tym celu zastosowano reakcję PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. *quantitative Polymerase Chain Reaction*) z wykorzystaniem termocyklera LightCycler® 480 II (Roche, Szwajcaria). Do przeprowadzania reakcji qPCR użyto gotową mieszaninę reakcyjną Fast SG qPCR Master Mix (Materiały, 6.14., EURx®, Polska), zawierającą polimerazę Perpetual Taq, typu „hot start” oraz barwnik fluorescencyjny SYBR Green I. Wydajności amplifikacji określono dla każdej pary starterów badanych genów referencyjnych z użyciem 5-krotnych seryjnych rozcieńczeń cDNA. Wydajność reakcji qPCR ( $E$ ) została obliczona na podstawie regresji liniowej zależności wartości cykli progowych ( $C_p$ ) od logarytmu stężeń matrycy i jest wyrażana wzorem (Mackay, 2004):

$$E = 10^{(-1/a)}$$

w którym  $E$  to wydajność reakcji qPCR, natomiast  $a$  – nachylenie wykresu regresji liniowej dla danego genu. Wartości wydajności reakcji dla poszczególnych genów zostały wyrażone w procentach.

Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 8.

**Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej.**

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Objętość na jedną reakcję
2x SG qPCR Master Mix	2x stężony	1x stężony	5 $\mu$ l
Primer forward	10 $\mu$ M	0,2-0,4 $\mu$ M	0,2-0,4 $\mu$ l
Primer reverse	10 $\mu$ M	0,2-0,4 $\mu$ M	0,2-0,4 $\mu$ l
Woda do PCR	-	-	3,6-3,2 $\mu$ l
cDNA	5x rozcieńczony		1 $\mu$ l

Parametry reakcji:

Wstępna denaturacja 95°C	5 min	} 45 cykli
Denaturacja 95°C	15 s	
Przyłączanie starterów 60°C	15 s	
Elongacja 72°C	15 s	

Końcowa elongacja 72°C                      3 min  
Krzywa topnienia 65-95°C

Krzywe topnienia dla badanych genów referencyjnych zostały przeanalizowane w celu wykluczenia tworzenia się dimerów starterów, a także niespecyficznego produktu amplifikacji. Uzyskane wartości  $C_p$  z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych analizowano za pomocą oprogramowania LightCycler® 480 Software wersja 1.5. Stabilność genów referencyjnych mierzono przy użyciu programów będących dodatkami do Microsoft Excel: BestKeeper (Pfaffl *i in.*, 2004), geNorm (Vandesompele *i in.*, 2002) i NormFinder (Andersen *i in.*, 2004).

### 7.12. Reakcja qPCR

Analizę ekspresji toksyn gronkowcowych na poziomie mRNA zbadano z zastosowaniem ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. *quantitative Polymerase Chain Reaction*) i wykorzystaniem termocyklera LightCycler® 480 II (Roche, Szwajcaria). Skład i objętość mieszaniny reakcyjnej oraz warunki temperaturowe reakcji opisano w podrozdziale 7.11. W związku z tym, iż wydajności primerów genów badanych i genów referencyjnych nie były podobne, względny poziom ekspresji badanych genów analizowano z zastosowaniem modelu Pfaffla, wyrażanego wzorem (Pfaffl, 2001):

$$R = \frac{(E_{\text{gen badany}})^{\Delta C_p \text{ gen badany (kontrola-próba)}}}{(E_{\text{gen referencyjny}})^{\Delta C_p \text{ gen referencyjny (kontrola-próba)}}$$

gdzie  $R$  – poziom badanego transkryptu;  $E_{\text{gen badany}}$  – wydajność reakcji genu badanego;  $E_{\text{gen referencyjny}}$  – wydajność reakcji genu referencyjnego;  $\Delta C_p \text{ gen badany}$  – różnica cykli progowych wyznaczonych dla genu badanego w próbie kontrolnej i badanej;  $\Delta C_p \text{ gen referencyjny}$  – różnica cykli progowych dla genu referencyjnego między próbą kontrolną i badaną. Próby kontrolne stanowiły próby nietraktowane (tzn. nie poddawane działaniu światła ani fotouczulacza). Wartości względnego poziomu ekspresji zostały znormalizowane względem dwóch najbardziej stabilnych genów referencyjnych: *gmk* i *ftsZ* (RB i światło zielone) oraz *fabD* i *proC* (NMB i światło czerwone) i wyrażane w jednostkach  $\log_2$  (Ogonowska i Nakonieczna, 2020). Eksperyment przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych.

### **7.13. Przeciwbakteryjna inaktywacja fotodynamiczna (aPDI) w warunkach subletalnych (badanie produkcji toksyn na poziomie białka) i przygotowanie bakteryjnych lizatów białkowych**

Nocne hodowle bakteryjne (Materiały, 6.2.) odmładzano w stosunku 1:100 w 20 ml jałowego medium TSB i inkubowano do osiągnięcia fazy późnego logarytmicznego wzrostu ( $OD_{600} \approx 1,7-1,9$ ; czas odmładzania 6-8 godzin). Następnie do 24-dołkowej płytki (NEST<sup>®</sup> Biotechnology, Chiny) przenoszono 510  $\mu$ l hodowli bakteryjnej. Doświadczenie bazowało na analizie czterech grup eksperymentalnych:

- (1) L(-) PS(-) – komórki nietraktowane, przechowywane w ciemności
- (2) L(+) – komórki traktowane światłem
- (3) PS(+) – komórki traktowane fotouczulaczem i przechowywane w ciemności
- (4) aPDI – komórki traktowane fotouczulaczem i światłem

Do prób aPDI i PS(+) dodano fotouczulacz w stężeniu końcowym 0,5  $\mu$ M (RB) i 200  $\mu$ M (NMB). Tak przygotowane 24-dołkowe płytki przykryto folią aluminiową i inkubowano w 37°C z wytrząsaniem (150 rpm) 10 min (dla RB) lub 15 min (dla NMB). Następnie naświetlano odpowiednią dawką światła o energii całkowitej w zakresie 2-12 J/cm<sup>2</sup> dla światła zielonego oraz 27,5-32,5 J/cm<sup>2</sup> dla światła czerwonego. Po zakończeniu procesu naświetlania, płytki przechowywano w 37°C. Próby pobierano w trzech punktach czasowych – bezpośrednio po procesie naświetlania (0h), 1 godzinę (1h) i 2 godziny (2h) od zakończenia naświetlania. 200  $\mu$ l każdej z prób zawieszano w proporcji 1:1 2x stężonego buforu Laemmli (z dodatkiem  $\beta$ -merkaptoetanolu, Materiały, 6.15.), inkubowano w termobloku nagrzanym do temperatury 95°C przez czas 5 min. Po upływie czasu inkubacji próbki krótko zwirowano (1 min, 16 100 rcf). Tak przygotowane lizaty białkowe przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz. Ponadto, pozostałe 10  $\mu$ l zawiesiny bakteryjnej przenoszono do 90  $\mu$ l jałowego PBS (Materiały, 6.3.), celem wykonania 10-krotnych seryjnych rozcieńczeń (zakres 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-6</sup>). Rozcieńczenia wysiewano na podłoża TSA, które inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po czasie inkubacji, zliczano liczbę kolonii bakteryjnych w celu określenia przeżywalności badanych szczepów *S. aureus*. Eksperyment przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych.

## **7.14. Western Blot**

### **7.14.1. Pomiar stężenia całkowitego białka w lizatach białkowych**

Pomiar stężenia całkowitego białka w lizatach białkowych dokonano przy użyciu zestawu RD DC™ Protein Assay Kit (Materiały, 6.15., Bio-Rad, USA). Metoda pomiaru opiera się na zmodyfikowanej metodzie Lowry'ego (Lowry *i in.*, 1951). Test ten jest w pełni kompatybilny z odczynnikami redukującym i detergentem. Wszystkie kroki wykonano według instrukcji dołączonej przez producenta. Jako wzorzec białkowy zastosowano wzorzec  $\gamma$ -globuliny (Materiały, 6.15., Bio-Rad, USA) w trzech różnych stężeniach: 0,37 mg/ml, 0,74 mg/ml oraz 1,48 mg/ml. Ilość całkowitego białka zmierzono spektrofotometrycznie przy użyciu spektrofotometru UV-VIS SPECORD 2000 PLUS (Analytik Jena, Niemcy), przy długości fali 750 nm. Wartości absorbancji badanych prób odnoszono względem wzoru krzywej wzorca białkowego  $\gamma$ -globuliny, uzyskując wartości stężenia całkowitego białka w przygotowanych lizatach bakteryjnych.

### **7.14.2. Rozdział białek metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących (SDS-PAGE, ang. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)**

Przygotowano żele poliakryloamidowe – 12% żel rozdzielający i 6% żel zagęszczający (Materiały, 6.15., tab. 5). Czas polimeryzacji wynosił odpowiednio 45 min i 30 min. Na studzienki nanoszono w podanej kolejności – 5  $\mu$ l markera do oznaczania wielkości białek (Materiały, 6.15., Thermo Fisher Scientific, USA), 5  $\mu$ l wzorca białkowego badanej toksyny gronkowcowej w stężeniu 25  $\mu$ g/ml (Materiały, 6.15., Toxin Technology Inc., USA) oraz lizaty białkowe badanych prób w ilości 10  $\mu$ g. Elektroforezę w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE, ang. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) prowadzono w 1x stężonym buforze SDS-PAGE w aparacie do elektroforezy pionowej Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, USA) przy napięciu 180 V przez 60 min.

### **7.14.3. Transfer i wykrywanie białka na membranie**

Mokry transfer wykonywano z użyciem membrany PVDF (Materiały, 6.15., Bio-Rad, USA). Przed przystąpieniem do etapu transferu, aktywowano membranę przez 20 s w metanolu (Materiały, 6.15., Avantor Performance Materials, Polska). Następnie przemywano w wodzie

destylowanej i umieszczano wraz z pozostałymi elementami niezbędnymi do przeprowadzenia mokrego transferu w 1x stężonym buforze do transferu na czas 10 min. Kolejnym etapem było przygotowanie tzw. „kanapki”. W kasecie do transferu ułożono kolejno: gąbkę, bibułę filtracyjną, żel, membranę PVDF, bibułę filtracyjną i gąbkę. Kasetę umieszczono w aparacie Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad), wraz z wkładem chłodzącym. Transfer na membranę prowadzono na lodzie w 1x stężonym buforze do transferu przy napięciu 100 V przez 60 min. Po zakończonym transferze, membranę dwukrotnie przepłukano przy użyciu 30 ml TBS, w celu usunięcia pozostałości detergentów. Membranę PVDF blokowano 30 min w 30 ml roztworu TBS-Tween (TBST) z dodatkiem 1% mleka odtłuszczonego i wytrząsano na kołysce laboratoryjnej w temperaturze pokojowej. Dwukrotnie przepłukano membranę w 30 ml TBST, a następnie inkubowano z pierwszorzędowymi przeciwciałami w stosunku 1:10 000 (Materiały, 6.15., Toxin Technology Inc., USA) w 30 ml roztworu TBST z 1% mlekiem odtłuszczonym. Całość inkubowano przez noc w 4°C z delikatnym wytrząsaniem na kołysce laboratoryjnej. Następnego dnia przeprowadzono trzy, 5-minutowe płukania z użyciem 30 ml TBST z delikatnym wytrząsaniem na kołysce laboratoryjnej. Dodano przeciwciała drugorzędowe znakowane peroksydazą chrzanową (HRP) rozcieńczone w stosunku 1:10 000 (Materiały, 6.15., Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA) w 30 ml roztworu TBST z 1% mlekiem odtłuszczonym i inkubowano 30 min na kołysce laboratoryjnej w temperaturze pokojowej. Po tym czasie przeprowadzono trzy, 5-minutowe płukania z użyciem 30 ml TBST. Na koniec wykonano dwukrotnie przepłukanie membrany w 30 ml TBS w celu usunięcia pozostałości detergentów. Membranę pokryto substratem Clarity Max ECL Substrate (Materiały, 6.15., Bio-Rad, USA) i odczytywano sygnał chemiluminescencji w systemie do dokumentacji ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, USA). Odczyt sygnału wykonywano przy stałym czasie ekspozycji, a uzyskany obraz analizowano w programie Image Lab (wersja 6.0, Bio-Rad, USA). Uzyskane intensywności prążków dla poszczególnych prób analizowano względem krzywej standardowej wzorca białkowego toksyny.

### **7.15. Pomiar aktywności toksyn (test proliferacji komórek PBMC)**

Test został wykonany we współpracy z mgr Adrianem Kobielą i dr hab. Danutą Gutowską-Owsiak, prof. UG z Pracowni Immunologii Doświadczalnej i Translacyjnej (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed). Komórki PBMC (jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, ang. *peripheral blood mononuclear cells*) pochodzące od trzech pacjentów wybarwiono odczynnikami przeznaczonym do pomiaru proliferacji komórek –

CellTrace™ Far Red (Materiały, 6.16., Invitrogen™, USA) według instrukcji producenta. Następnie komórki wysiano na 96-dółkową okrągłodenną płytkę (Corning, USA) w gęstości  $2 \times 10^5$  komórek na dołek w 200  $\mu$ l pożywki (RPMI-1640 + 10% FBS + 100 IU/ml penicyliny + 100  $\mu$ g/ml streptomycyny; Materiały, 6.16.). W kolejnym etapie przeprowadzono naświetlanie białek toksyn (SEA, SEB, SEC, SED, TSST-1). Do 98  $\mu$ l jałowego PBS (Materiały, 6.3.) dodano 1  $\mu$ l fotouczulacza (stężenie końcowe RB – 0,5 i 5  $\mu$ M, NMB – 5  $\mu$ M) i 1  $\mu$ l toksyny w stężeniu końcowym 3,2  $\mu$ g/ml. Tak przygotowane toksyny poddano naświetlaniu światłem zielonym (warunki subletalne:  $\lambda_{\max}=515$  nm, moc 35 mW/cm<sup>2</sup>, dawka światła 12 J/cm<sup>2</sup>; warunki letalne:  $\lambda_{\max}=515$  nm, moc 35 mW/cm<sup>2</sup>, dawka światła 40 J/cm<sup>2</sup>) i światłem czerwonym ( $\lambda_{\max}=632$  nm, moc 20 mW/cm<sup>2</sup>, dawka światła 32,5 J/cm<sup>2</sup>). Uwzględniono również kontrole: toksyna + światło zielone, toksyna + światło czerwone, toksyna + RB (inkubacja w ciemności), toksyna + NMB (inkubacja w ciemności), toksyna (nie poddawana traktowaniu) oraz toksyna inaktywowana termicznie (gotowanie w temperaturze 95°C przez 60 min, próbkę co jakiś czas krótko mieszano na wortexie). Po zakończonej procedurze toksyny dodawano do komórek PBMC w objętości 5  $\mu$ l (końcowe stężenie toksyn 80 ng/ml). Negatywną kontrolę stanowiły niestymulowane komórki PBMC. Po upływie 6 dni, dwukrotnie przepłukano komórki PBS i wybarwiono przeciwciałem CD3-PE (Materiały, 6.16.) przez 30 min w 4°C. Następnie komórki dwukrotnie przepłukano PBS i zawieszono w 4% roztworze formaldehydu. Analizę przeprowadzano na cytometrze przepływowym (Merck Millipore, USA) przy użyciu programu InCyte (Merck Millipore, USA). Proliferację limfocytów T mierzono po uprzednim wybramkowaniu PBMC na populacji komórek pozytywnych względem markera CD3.

#### **7.16. Pomiar aktywności toksyn (test ELISA na obecność IL-2)**

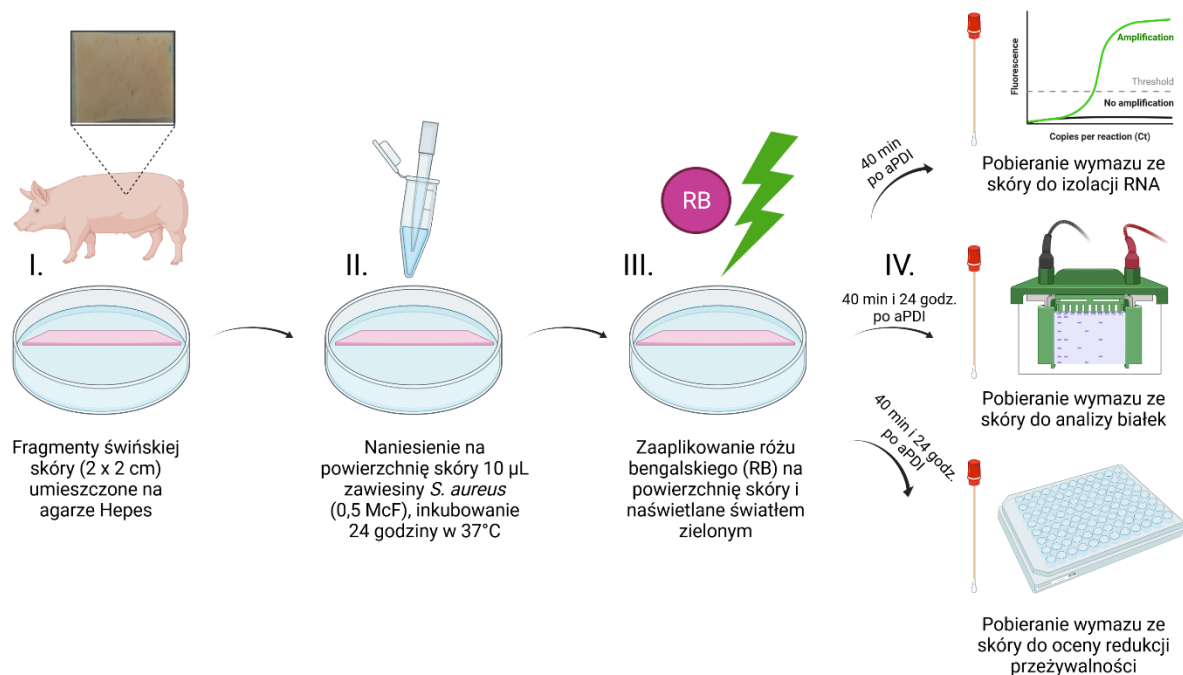
Eksperyment przeprowadzono we współpracy z mgr Klaudią Michalską z Laboratorium Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed). Frakcje PBMC pochodzące od zdrowych dawców zliczono, rozcieńczono w pożywce RPMI (RPMI-1640 + 10% FBS + 100 IU/ml penicyliny + 100  $\mu$ g/ml streptomycyny; Materiały, 6.16.) i wysiano w liczbie  $1 \times 10^5$  komórek na studzienkę 96-dółkowej okrągłodennej płytki (Corning, USA). Całkowita objętość inokulum w każdym dołku wynosiła 200  $\mu$ l. Następnie toksyny o stężeniu końcowym 3,2  $\mu$ g/ml (SEA, SEB, SEC, SED, TSST-1, Toxin Technology Inc., USA) poddano działaniu aPDI (warunki naświetlania opisano w Metodach, 7.15.). Do komórek PBMC dodano toksyny traktowane aPDI, jak i nie poddane



traktowaniu (stężenie końcowe toksyn 80 ng/ml) i inkubowano przez 24 godz. w 37°C w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Następnie płytkę zwirowano (300 g, 5 min, 4°C), zebrano supernatanty i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz. Pomiar wytwarzania IL-2 w poszczególnych warunkach określono przy pomocy zestawu IL-2 Human Uncoated ELISA Kit (Invitrogen<sup>TM</sup>, USA) zgodnie z protokołem producenta. Każdy eksperyment przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych komórek PBMC pochodzących od trzech różnych zdrowych dawców. Dla każdego powtórzenia biologicznego wykonano trzy powtórzenia techniczne na tej samej płytce testu ELISA z tą samą krzywą standardową dla ludzkiej IL-2. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki PBMC traktowane PMA (150 ng/ml, Sigma-Aldrich, USA) i jonomycyną (75 ng/ml, Sigma-Aldrich, USA). Kontrolą negatywną określano nietraktowane komórki PBMC, jako kontrolę zastosowano również PBMC traktowane toksyną inaktywowaną termicznie (poddaną inaktywacji termicznej w 95°C przez 60 min z kilkukrotnym worteksowaniem co 10-15 minut).

#### **7.17. Weryfikacja efektywności aPDI – model *ex vivo* świńskiej skóry**

Pierwszym etapem było przygotowanie świńskiej skóry. Na początku usunięto warstwę tkanki tłuszczowej. Następnie przy pomocy maszynki do golenia, usunięto włosy z powierzchni skóry. Tak przygotowaną skórę pocięto na fragmenty o wymiarach 2 x 2 cm i dokładnie opłukano wodą destylowaną. W celu pozbycia się pozostałości bakterii z powierzchni skóry, fragmenty skóry inkubowano w 70% roztworze etanolu przez 10 minut. Po upływie czasu inkubacji, skórę przeniesiono do jałowego PBS (Materiały, 6.3.), aby wypłukać pozostałości etanolu. Przygotowane fragmenty przeniesiono na agar Hepes (Materiały, 6.18.).



**Rycina 6. Schemat doświadczenia – aPDI na modelu *ex vivo* świńskiej skóry.** Ilustracja wykonana przy pomocy platformy BioRender (Patrycja Ogonowska, 2021, <https://biorender.com/>).

Kolejnym krokiem była kolonizacja skóry szczepem *S. aureus* Xen40 (Materiały, 6.1.). Nocną hodowlę bakteryjną doprowadzono do gęstości optycznej 0,5 McF (ok.  $10^7$  CFU/ml). Do jałowych probówek typu Eppendorf przeniesiono po 1 ml hodowli bakteryjnej 0,5 McF i zwirowano (5 min, 14 000 rcf). Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 10 µl jałowego PBS (Materiały, 6.3.). Całość (10 µl) naniesiono na skórę i dokładnie rozprowadzono po całej powierzchni. Płytki ze skórą umieszczono w inkubatorze (37°C) na 24 godziny.

Po dobie inkubacji, zaobserwowano zabarwienie powierzchni skóry, świadczące o jej skolonizowaniu przez bakterię *S. aureus*. Na świńskim modelu skóry testowano cztery warunki eksperymentalne:

- (1) L(-) PS(-) – komórki nietraktowane, przechowywane w ciemności
- (2) L(+) – komórki traktowane światłem
- (3) PS(+) – komórki traktowane fotouczulaczem i przechowywane w ciemności
- (4) aPDI – komórki traktowane fotouczulaczem i światłem

Na skórę zaaplikowano 10 µl rózu bengalskiego w stężeniu 35 µM (grupa 3 i 4). Płytki przykryto folią aluminiową i umieszczono w inkubatorze (37°C) na czas 30 min. Po upływie czasu inkubacji, fragmenty skóry przeznaczone do naświetlania (grupa 2 i 4) umieszczono pod zieloną lampą ( $\lambda_{\max}=530-535$  nm) i wykonano naświetlanie (moc lampy 10,6 mW/cm<sup>2</sup>, dawka

światła  $6,36 \text{ J/cm}^2$ , czas naświetlania 10 min). Następnie płytki ponownie umieszczono w inkubatorze ( $37^\circ\text{C}$ ) na 40 min.

**Izolacja RNA** Przy pomocy jałowej wymazówki uprzednio zwilżonej w odczynniku stabilizującym RNA (RNAlater, Sigma-Aldrich, USA, Materiały, 6.11.) pobrano wymaz z powierzchni świńskiej skóry (40 min po aPDI) (Ryc. 6). Następnie wymazówkę umieszczono w 100  $\mu\text{l}$  buforu lizującego (Materiały, 6.3.) z dodatkiem 2 U lizostafiny (5  $\mu\text{l}$ , Materiały, 6.11.) i zworteksowano przez 1 min na maksymalnych obrotach. Wymazówkę odrzucono, a próbki umieszczono w termobloku uprzednio nagrzanego do temperatury  $37^\circ\text{C}$ . Lizę prowadzono przez czas 40 min, uwzględniając kilkukrotne worteksowanie próbek (10-15 s). Po zakończonym etapie lizy, całkowity RNA bakteryjny izolowano zgodnie z krokami opisanymi w Metodach, 7.8. Etap doczyszczania RNA, odwrotnej transkrypcji i qPCR przeprowadzono analogicznie, jak opisano w Metodach, 7.9., 7.10. i 7.12.

**Bakteryjne lizaty białkowe** Przy pomocy jałowej wymazówki uprzednio zwilżonej w jałowym roztworze PBS pobrano wymaz z powierzchni świńskiej skóry (40 min i 24 godz. po aPDI) (Ryc. 6). Wymazówkę umieszczono w probówce z 300  $\mu\text{l}$  jałowego PBS. Próbki zworteksowano na maksymalnych obrotach przez 1 min. Wymazówkę odrzucono, a próbki zwirowano (5 min, 14 000 rcf). Supernatant przeniesiono do jałowych probówek typu Eppendorf i zawieszono w 2x stężonym buforze Laemli (Materiały, 6.15.), osad odrzucono. Tak przygotowane próbki inkubowano w  $95^\circ\text{C}$ , po czym zwirowano (1 min, 16 100 rcf). Próbki przechowywano w temperaturze  $-20^\circ\text{C}$  do czasu dalszych analiz. Kolejne etapy (pomiar stężenia białka całkowitego, Western Blot) przeprowadzano bez zmian, opisano w Metodach, 7.14.

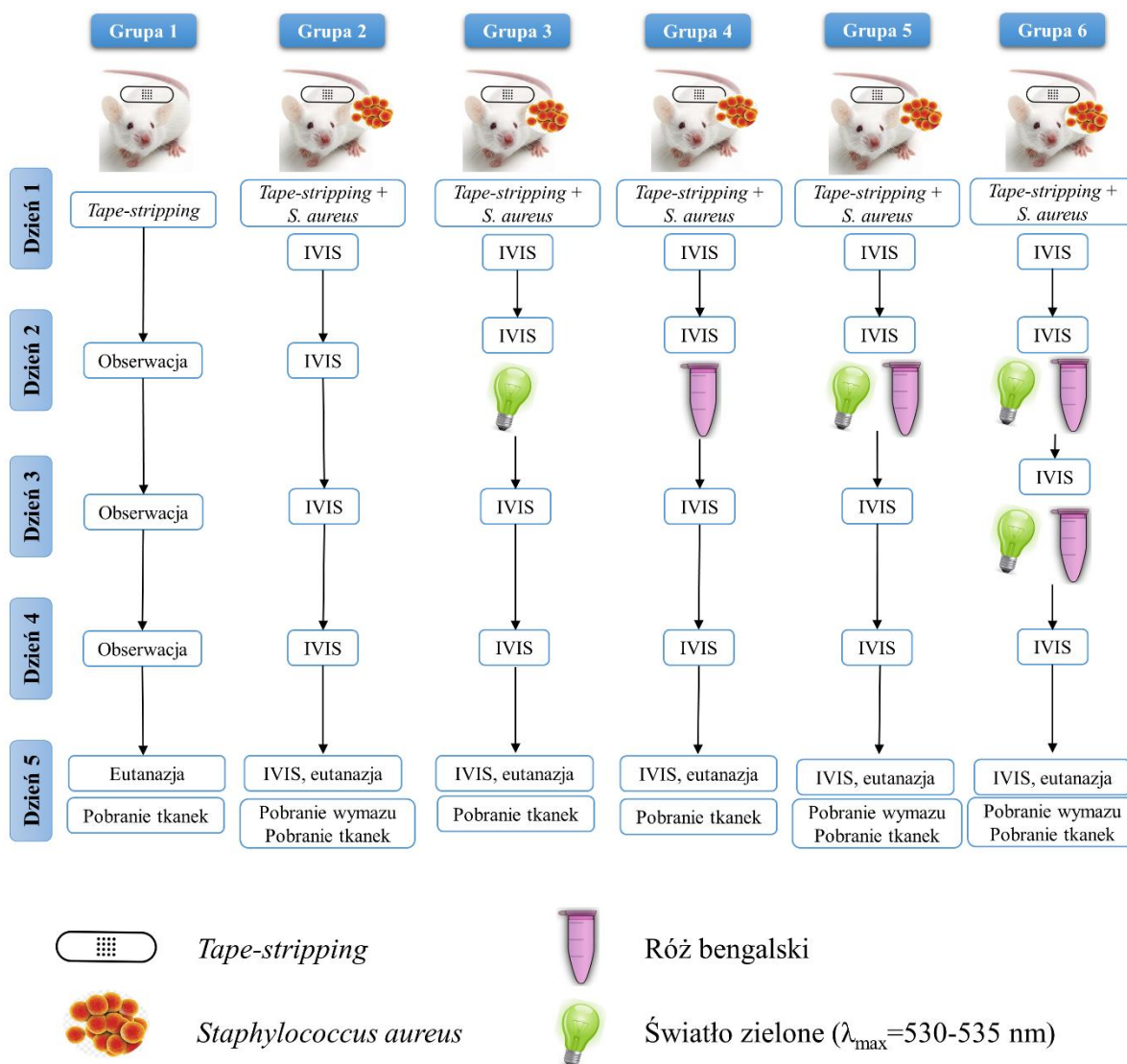
**Ocena przeżywalności komórek bakteryjnych.** Sterylną wymazówkę uprzednio zwilżono w jałowym buforze PBS i pobrano wymaz ze skóry (40 min i 24 godz. po aPDI) (Ryc. 6). Wymazówkę umieszczono w jałowej probówce typu Eppendorf, zawierającej 300  $\mu\text{l}$  jałowego bufora PBS. Następnie próbki intensywnie worteksowano przez 1 min. Wymazówkę odrzucono, a próbki zwirowano (5 min, 14 000 rcf). Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 100  $\mu\text{l}$  jałowego PBS i dokładnie rozpipetowano. Pobrano po 10  $\mu\text{l}$  każdej z prób i przenoszono do 90  $\mu\text{l}$  jałowego bufora PBS, wykonując 10-krotne seryjne rozcieńczenia w 96-dołkowej płytce (NEST<sup>®</sup> Biotechnology, Chiny). Na podłoże TSA wysiewano po 10  $\mu\text{l}$  każdego z rozcieńczeń (w zakresie od  $10^{-1}$  do  $10^{-8}$ ). Płytki umieszczono w inkubatorze ( $37^\circ\text{C}$ ) na czas 24 godzin. Po upływie czasu inkubacji, zliczano pojedyncze kolonie bakteryjne i obliczano spadek przeżywalności komórek bakteryjnych.

Cykl doświadczeń przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych.

#### **7.18. Weryfikacja efektywności aPDI na mysim modelu kolonizacji skóry przez *S. aureus***

Doświadczenie zostało przeprowadzone w Małopolskim Centrum Biotechnologii w Krakowie w ramach uchwały II Lokalnej Komisji Etycznej w Krakowie nr 101/2021 z dnia 8.04.2021. W eksperymencie brały udział 8-tygodniowe samice szczepu BALB/c (Charles River Laboratories, Niemcy). Przed rozpoczęciem doświadczenia, zwierzęta zostały poddane 5-dniowej kwarantannie. Następnie, myszy poddano badaniom lekarsko-weterynaryjnym. Zarówno podczas kwarantanny, jak i doświadczenia myszy przebywały w pomieszczeniach o kontrolowanych parametrach: temperatura  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , wilgotność  $55\% \pm 5\%$ , oświetlenie sztuczne, fotoperiod 12 godz. światła/12 godz. ciemności. W doświadczeniu brało udział 36 myszy, podzielonych na następujące grupy badawcze (w każdej grupie znajdowało się po 6 myszy):

1. Myszy poddane procedurze *tape-stripping*
2. Myszy poddane procedurze *tape-stripping*, skolonizowane *S. aureus*
3. Myszy poddane procedurze *tape-stripping*, skolonizowane *S. aureus*, poddane działaniu światła zielonego ( $\lambda_{\text{max}}=530\text{-}535\text{ nm}$ )
4. Myszy poddane procedurze *tape-stripping*, skolonizowane *S. aureus*, poddane działaniu rózu bengalskiego zaaplikowanego bezpośrednio na skórę w stężeniu  $50\ \mu\text{M}$
5. Myszy poddane procedurze *tape-stripping*, skolonizowane *S. aureus*, poddane działaniu przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej (jednokrotne traktowanie)
6. Myszy poddane procedurze *tape-stripping*, skolonizowane *S. aureus*, poddane działaniu przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej (podwójne traktowanie) (Ryc. 7).



**Rycina 7. Schemat doświadczenia i podział na grupy badawcze – weryfikacja efektywności aPDI na mysim modelu kolonizacji skóry przez *S. aureus*.** Ilustracja wykonana przy pomocy programu Microsoft PowerPoint (Patrycja Ogonowska, 2022).

Pierwszego dnia eksperymentu, grzbiety wszystkich myszy zostały ogolone (obszar 2 cm<sup>2</sup>), a na wygolony obszar zaaplikowano krem do depilacji, który usunięto ze skóry po upływie 5 min. Następnie skórę grzbietu u wszystkich badanych myszy poddano procedurze *tape-stripping*, która opiera się na kilkunastokrotnym przyklejaniu i odklejaniu przylepca chirurgicznego z włókniny (Omnifix<sup>®</sup> Elastic; ok. 10-12 razy). Każdorazowo następuje zmiana przylepca na nowy. Technika ma na celu mechaniczne usunięcie powierzchniowych warstw naskórka, a samą procedurę przeprowadza się do momentu zaobserwowania zaczerwienienia i błyszczenia się skóry, bez oznak regularnego krwawienia. Kolejnym etapem było zaaplikowanie bioluminescencyjnego szczepu *S. aureus* Xen40, w celu skolonizowania uszkodzonej skóry (grupy badawcze 2-6) (Ryc. 7). Nocną hodowlę bakteryjną doprowadzono

do gęstości optycznej 0,5 McF (ok.  $10^7$  CFU/ml). Z hodowli bakteryjnej o gęstości 0,5 McF pobrano po 1 ml, przeniesiono do jałowych probówek typu Eppendorf i zwirowano (5 min, 14 000 rcf). Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 10  $\mu$ l jałowego PBS. Całość (10  $\mu$ l) zaaplikowano bezpośrednio na skórę myszy. W celu uniknięcia rozlania i późniejszego wyschnięcia bakterii, na skórę myszy przyklejano przezroczysty opatrunek foliowy (Tegaderm<sup>TM</sup>). Opatrunku nie odklejano, ani nie zmieniano na nowy przez cały okres trwania eksperymentu. W celu sprawdzenia sygnału bioluminescencyjnego u szczepu *S. aureus* Xen40, myszy poddano uśpieniu z zastosowaniem izofluranu w stężeniu 3-4% (indukcja znieczulenia ogólnego) oraz 1,5-3% (znieczulenie podtrzymujące) i wykonano pomiar sygnału bioluminescencji z wykorzystaniem systemu obrazowania IVIS (Perkin-Elmer, USA).

W przypadku grupy 1, codziennie dokonywano obserwacji i wykonywano dokumentację fotograficzną mysiej skóry poddanej procedurze *tape-stripping*. W przypadku grup 2-6, każdego dnia wykonywano pomiar bioluminescencji (Perkin-Elmer, USA). Podczas obrazowania, myszy poddano uśpieniu z zastosowaniem izofluranu w stężeniu 3-4% (indukcja znieczulenia ogólnego) oraz 1,5-3% (znieczulenie podtrzymujące). Grupa 3 w drugim dniu eksperymentu została naświetlana wyłącznie światłem zielonym ( $\lambda_{\text{max}}=530-535$  nm) przez czas 10 min. W trakcie naświetlania myszy poddano uśpieniu z zastosowaniem izofluranu w stężeniu 3-4% (indukcja znieczulenia ogólnego) oraz 1,5-3% (znieczulenie podtrzymujące). Z kolei w grupie 4 badano wpływ aplikacji związku fotouczulającego – różu bengalskiego na skórę. Róż bengalski w stężeniu 50  $\mu$ M podawano w objętości 10  $\mu$ l bezpośrednio pod foliowy opatrunek (Tegaderm<sup>TM</sup>). Po zaaplikowaniu związku, myszy przeniesiono do ciemnego pomieszczenia na czas 30 min, w celu umożliwienia penetracji i wiązania cząsteczek fotouczulacza. Fotouczulacz nie został w żaden sposób usunięty, ani wypłukany przez cały okres trwania doświadczenia. Grupa 5 i 6 została poddana przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej (grupa 5 – pojedyncze naświetlanie w drugi dzień eksperymentu; grupa 6 – jedno traktowanie w drugi dzień doświadczenia i jedno traktowanie w trzeci dzień doświadczenia) (Ryc. 7). Bezpośrednio pod foliowy opatrunek zaaplikowano 10  $\mu$ l różu bengalskiego w stężeniu 50  $\mu$ M. Następnie przeniesiono myszy na 30 min do ciemnego pomieszczenia (penetracja i wiązanie cząsteczek fotouczulacza). Po inkubacji, myszy poddano naświetlaniu przez 10 min w całkowitym uśpieniu z zastosowaniem izofluranu w stężeniu 3-4% (indukcja znieczulenia ogólnego) oraz 1,5-3% (znieczulenie podtrzymujące). W przypadku grupy 6, całość procedury powtórzono kolejnego dnia.

W piątym dniu doświadczeń, po zakończeniu procedury pomiaru bioluminescencji, myszy poddano eutanazji z wykorzystaniem CO<sub>2</sub>, a następnie przeprowadzono dyslokację

kręgów szyjnych. W przypadku grupy 2, 5 i 6 przy pomocy jałowej wymazówki uprzednio zwilżonej w jałowym roztworze PBS pobrano wymazy z powierzchni mysiej skóry. Przygotowanie bakteryjnych lizatów białkowych oraz analizę Western Blot wykonywano zgodnie z procedurami opisanymi w Metodach, 7.17. i 7.14.

Po eutanazji przeprowadzono nekropsję i pobrano tkanki do badań histologicznych. Fragmenty skóry umieszczono w pojemnikach z 10% roztworem formaliny (Sigma-Aldrich, USA) i przekazano do dalszej analizy zespołowi dr n. med. Joanny Szpor z Zakładu Patomorfologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. W uzyskanych obrazach histologicznych wybarwionych hematoksyliną i eozyną skupiono się na ocenie następujących parametrów:

- stan zapalny (w skórze właściwej, warstwie podskórnej, tkance mięśniowej),
- obecność neutrofilii,
- obecność bakterii.

## 8. Wyniki

### 8.1. Większość *S. aureus* wyizolowanych od pacjentów z AZS posiada geny badanych toksyn

Szereg danych literaturowych wskazuje na rolę toksyn gronkowcowych w przebiegu AZS poprzez działanie zaostrzające i nasilające stan zapalny skóry. W pracy skupiono się na analizie wybranych czynników wirulencji *S. aureus*, czyli gronkowcowych enterotoksyn A (SEA), B (SEB), C (SEC), D (SED) oraz toksyny wstrząsu toksycznego (TSST-1). Przedmiotem zainteresowania była dystrybucja i częstość występowania genów badanych toksyn w populacji *S. aureus* u chorych na AZS. Do analiz włączono dwie grupy izolatów *S. aureus*:

- (1) kolekcję 139 izolatów pobranych z jamy nosowo-gardłowej i zmian skórnych pacjentów z AZS. Kolekcja została zgromadzona dzięki współpracy z prof. dr hab. Wiolettą Barańską-Rybak (Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii, Gdański Uniwersytet Medyczny),
- (2) kolekcję 39 izolatów klinicznych pochodzących od pacjentów bez cech atopii (Zakład Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG&GUMed).

Obydwie kolekcje przeanalizowano pod kątem obecności czterech genów enterotoksyn: *sea*, *seb*, *sec*, *sed* i genu *tst* kodującego toksynę TSST-1 (Metody, 7.2.). Głównym celem przeprowadzonej analizy było porównanie dystrybucji genów toksyn w grupie badanej i kontrolnej, a także określenie, które geny dominują w poszczególnych grupach. Ponadto w przypadku grupy izolatów od pacjentów z AZS analizowano dystrybucję genów toksyn w zależności od miejsca izolacji (skóra i jama nosowo-gardłowa), wieku pacjentów (dorośli i dzieci), pochodzenia szczepu (szpitalny i pozaszpitalny), a także oporności na metycylinę (MRSA i MSSA).

Wśród 139 izolatów pochodzących od pacjentów z AZS, 90 (64,7%) posiadało przynajmniej jeden gen toksyny, spośród pięciu badanych. Co więcej, w grupie izolatów pozytywnych pod kątem obecności badanych genów, u ponad połowy (62,2%) wykryto obecność więcej niż jednego z badanych genów. Genami dominującymi wśród izolatów od pacjentów AZS były *sec* i *sea* (Tab. 9). Z kolei w grupie kontrolnej, 18 z 39 (46,2%) izolatów posiadało przynajmniej jeden gen toksyny. W przeciwieństwie do izolatów pochodzących od



pacjentów AZS, w grupie kontrolnej nie zidentyfikowano takich, które posiadały więcej niż jeden badany gen (Suplement, tab. 5). Dominującym genem w grupie kontrolnej był gen *sea* (Tab. 9). Odsetek pozostałych genów kodujących enterotoksyny (*seb*, *sec* i *sed*) w grupie kontrolnej był zbliżony. Pośród izolatów grupy kontrolnej nie wykryto genu *tst* (Tab. 9). Z kolei tylko u 8 izolatów od pacjentów z AZS wykryto gen *tst*. Warto zauważyć, że odsetek wykrycia badanych genów w grupie izolatów pochodzących od pacjentów z AZS był zdecydowanie wyższy, wyjątek stanowił gen *seb*.

**Tabela 9. Częstotliwość wykrywania genów toksyn gronkowcowych w izolatach *S. aureus* pochodzących od pacjentów z AZS oraz grupy kontrolnej bez cech atopii.**

	Geny toksyn gronkowcowych				
	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>tst</i>
<b>Pacjenci z AZS (n=139)</b>	60 (43,2%)	2 (1,4%)	65 (46,7%)	24 (17,3%)	8 (5,8%)
<b>Grupa kontrolna (n=39)</b>	7 (17,9%)	4 (10,3%)	4 (10,3%)	3 (7,7%)	0 (0%)

Analiza częstości występowania genów badanych toksyn w grupie pacjentów AZS podzielonych względem wieku wykazała kilka istotnych różnic. Przede wszystkim częstość występowania genów *sea*, *sec* i *sed* różniła się znacząco pomiędzy grupami i była wyższa w grupie dorosłych (ponad dwukrotnie). Gen *seb* zidentyfikowano wyłącznie w grupie dzieci, natomiast gen *sed* wykryto w znacznej większości w grupie dorosłych, co może wskazywać, iż jest charakterystyczny dla populacji dorosłych (Tab. 10). Z kolei dystrybucja genów w odniesieniu do miejsca izolacji jest bardzo do siebie zbliżona, w próbach pobranych ze skóry i z jamy nosowo-gardłowej liczebność zidentyfikowanych genów jest niemal identyczna (skóra – 79 genów, jama nosowo-gardłowa – 80 genów). Wyjątek stanowi gen *seb*, który zaobserwowano w dwóch izolatach pochodzących wyłącznie ze skóry (Tab. 10). Test niezależności Chi-kwadrat nie wykazał istotnych statystycznie zależności pomiędzy częstością występowania konkretnych genów toksyn, a miejscem pochodzenia izolatów (skóra/jama nosowo-gardłowa). W przypadku pochodzenia szczepów, ponad połowa izolatów szpitalnych niesie gen *sec*, a ponad połowa pozaszpitalnych gen *sea*. W szczepach wrażliwych na metycylinę (MSSA) wykryto obecność każdego z pięciu analizowanych genów toksyn. W przypadku grupy MRSA, nie wykryto obecności genu *sed* i *tst*, a gen *sea* został zidentyfikowany w 60% izolatów (Tab. 10). Natomiast należy tutaj podkreślić fakt, iż w grupie MRSA było zaledwie pięć izolatów.

**Tabela 10. Częstość wykrywania genów toksyn gronkowcowych w izolatach *S. aureus* pochodzących od pacjentów z AZS z podziałem na odpowiednie grupy.**

		Geny toksyn gronkowcowych				
		<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>tst</i>
<b>Wiek pacjenta</b>	Dorosły (n=88)	50 (56,8%)	0 (0%)	52 (59,1%)	23 (26,1%)	6 (6,8%)
	Dziecko (n=51)	10 (19,6%)	2 (3,9%)	13 (25,5%)	1 (1,96%)	2 (3,9%)
<b>Miejsce izolacji</b>	Skóra (n=69)	28 (40,6%)	2 (2,9%)	32 (46,4%)	13 (18,8%)	4 (5,8%)
	Jama nosowo-gardłowa (n=70)	32 (45,7%)	0 (0%)	33 (47,1%)	11 (15,7%)	4 (5,7%)
<b>Pochodzenie izolatu</b>	Szpitalne, HA (n=80)	28 (35%)	0 (0%)	41 (51,3%)	10 (12,5%)	4 (5%)
	Pozaszpitalne, CA (n=59)	32 (54,2%)	2 (3,4%)	24 (40,7%)	14 (23,7%)	4 (6,8%)
<b>Oporność na metycylinę</b>	MRSA (n=5)	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
	MSSA (n=134)	57 (42,5%)	1 (0,7%)	64 (47,8%)	24 (17,9%)	8 (6%)

HA – szczep szpitalny (ang. *Hospital-Acquired*); CA – szczep pozaszpitalny (ang. *Community-Acquired*); MRSA – szczep gronkowca złocistego oporny na metycylinę (ang. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*); MSSA – szczep gronkowca złocistego wrażliwy na metycylinę (ang. *Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus*)

Podsumowując, w grupie izolatów pochodzących od pacjentów z AZS zidentyfikowano więcej izolatów posiadających geny toksyn gronkowcowych niż w grupie kontrolnej. Zaobserwowano wyższą częstość wykrywania badanych genów w grupie izolatów pochodzących od dorosłych w porównaniu z grupą dzieci, a także wyższą częstość detekcji badanych genów w izolatach pozaszpitalnych (wyjątek stanowił gen *sec*) w porównaniu ze szpitalnymi. Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy miejscem pobrania izolatu, a występowaniem badanych genów toksyn.

## 8.2. Typowanie *spa* i MLST wykazało wysoką różnorodność genetyczną szczepów wyizolowanych od pacjentów z AZS

Analizy molekularne prowadzone w oparciu o metodę typowania genu *spa* i/lub MLST umożliwiają poznanie struktury klonalnej badanej populacji *S. aureus* i wyznaczenie kompleksów klonalnych w jej obrębie. W skład takiego kompleksu wchodzi konkretny genotyp dominujący i inne najbardziej do niego podobne. Poznanie struktury klonalnej populacji w oparciu o metody molekularne ma ogromne znaczenie naukowe, ponieważ umożliwia badanie zróżnicowania danej populacji oraz identyfikację klonów o szczególnym znaczeniu klinicznym. Stąd w ramach przedstawionej pracy zbadano za pomocą wyżej wymienionych metod strukturę populacji 139 izolatów pochodzących od pacjentów z AZS. Zastosowano typowanie *spa* jako metodę, która jest powszechnie wykorzystywana w analizach genotypowych *S. aureus* i cechuje ją wysoka powtarzalność oraz potencjał różnicujący. Ponadto, międzynarodowa baza danych Ridom StaphType (<https://spaserver.ridom.de/>, Ridom GmbH, Niemcy) umożliwia ustalenie uzyskanych w analizie typów *spa* i ich porównanie.

Typowanie *spa* ujawniło, że badana populacja izolatów pochodzących od pacjentów z AZS jest wysoce różnorodna. Łącznie w badanej populacji 139 izolatów zidentyfikowano 43 typy *spa* (Tab. 11). W przypadku izolatu 065N, analiza identyfikacyjna wykazała, iż z powyższej próby wyizolowano nie jeden, a trzy różne izolaty należące do dwóch gatunków – *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus aureus* (typ *spa* t091 i typ *spa* t537).

**Tabela 11. Typy *spa* zidentyfikowane w grupie izolatów od pacjentów z AZS.**

Lp	Typ <i>spa</i> (liczba izolatów, %)	Lp	Typ <i>spa</i> (liczba izolatów, %)	Lp	Typ <i>spa</i> (liczba izolatów, %)
1	t091 (32; 23%)	16	t267 (2; 1,4%)	31	t021 (1; 0,7%)
2	t084 (13; 9,4%)	17	t282 (2; 1,4%)	32	t037 (1; 0,7%)
3	t015 (9; 6,5%)	18	t359 (2; 1,4%)	33	t056 (1; 0,7%)
4	t12375 (7; 5%)	19	t437 (2; 1,4%)	34	t160 (1; 0,7%)
5	t537 (6; 4,3%)	20	t521 (2; 1,4%)	35	t209 (1; 0,7%)
6	t156 (5; 3,6%)	21	t692 (2; 1,4%)	36	t230 (1; 0,7%)
7	t005 (4; 2,9%)	22	t693 (2; 1,4%)	37	t309 (1; 0,7%)
8	t2301 (4; 2,9%)	23	t880 (2; 1,4%)	38	t864 (1; 0,7%)
9	t012 (3; 2,2%)	24	t1255 (2; 1,4%)	39	t867 (1; 0,7%)
10	t024 (3; 2,2%)	25	t1312 (2; 1,4%)	40	t1442 (1; 0,7%)
11	t050 (3; 2,2%)	26	t1743 (2; 1,4%)	41	t1685 (1; 0,7%)
12	t008 (2; 1,4%)	27	t2223 (2; 1,4%)	42	t1814 (1; 0,7%)
13	t018 (2; 1,4%)	28	t5995 (2; 1,4%)	43	t20244 (1; 0,7%)
14	t095 (2; 1,4%)	29	t18582 (2; 1,4%)		
15	t127 (2; 1,4%)	30	t010 (1; 0,7%)		

Dominującymi typami w analizowanej populacji szczepów były typy: t091, t084, t015, t12375 (Tab. 11). Warty podkreślenia jest fakt, że w analizowanej grupie szczepów zidentyfikowano nowy typ *spa* – t20244 (szczep 079N), który został zdeponowany w międzynarodowej bazie danych Ridom StaphType (<https://spaserver.ridom.de/>, Ridom GmbH, Niemcy) (Suplement, tab. 4).

Zidentyfikowane typy *spa* przypisano do 18 kompleksów klonalnych (MLST): CC7 (36 izolatów), CC45 (25 izolatów), CC97 i CC15 (po 13 izolatów każdy), CC30 (9 izolatów), CC22 (7 izolatów), CC12 i CC72 (każdy po 6 izolatów) i CC8 (5 izolatów). Pozostałe kompleksy klonalne były reprezentowane przez 1-4 izolatów. Cztery najliczniejsze kompleksy klonalne: CC7, CC45, CC97 i CC15 stanowiły 62,5% wszystkich izolatów. Izolaty scharakteryzowane jako typy *spa*: t1312 i t20244 zaliczono odpowiednio do ST7425 i ST1027. W tych dwóch przypadkach nie było możliwe przypisanie ich do określonych kompleksów klonalnych. Najbardziej zróżnicowanym kompleksem pod kątem typów *spa*, był CC45, w skład którego wchodziło 8 typów *spa* (t015, t050, t095, t230, t282, t880, t2223, t2301). Ponadto wyróżniono 5 kompleksów klonalnych, w skład których wchodził tylko jeden szczep, reprezentujący jeden typ *spa* (CC5, CC9, CC10, CC101, CC718) (Suplement, tab. 4).

Unikalną cechą badanej populacji *S. aureus* jest to, że od 58 pacjentów wyizolowano 58 par izolatów (116 izolatów). Od tego samego pacjenta wyizolowano: *S. aureus* z jamy nosowo-gardłowej - N i *S. aureus* ze skóry - S. Spośród tej grupy, 35 par S/N należało do tego samego typu *spa* w parze, natomiast pozostałe 23 pary charakteryzowały się odmiennym typem *spa*. Oznacza to, że w tym drugim przypadku pacjent był skolonizowany dwoma różnymi izolatami *S. aureus*. Okazuje się, że w grupie dzieci odsetek różnych izolatów bytujących na skórze i w jamie nosowo-gardłowej jest wyższy (48%) w porównaniu z grupą dorosłych (28,5%). Ponadto stwierdzono, iż izolaty o takim samym typie *spa* w parze (35 par) charakteryzują się występowaniem takich samych genów toksyn (Suplement, tab. 4).

Powyższe analizy i obserwacje grupy izolatów pochodzących od pacjentów z AZS wskazują na wysokie zróżnicowanie genetyczne badanej populacji.

### **8.3. aPDI wykazuje wysoką skuteczność przeciw *S. aureus in vitro*, niezależnie od obecności genów toksyn**

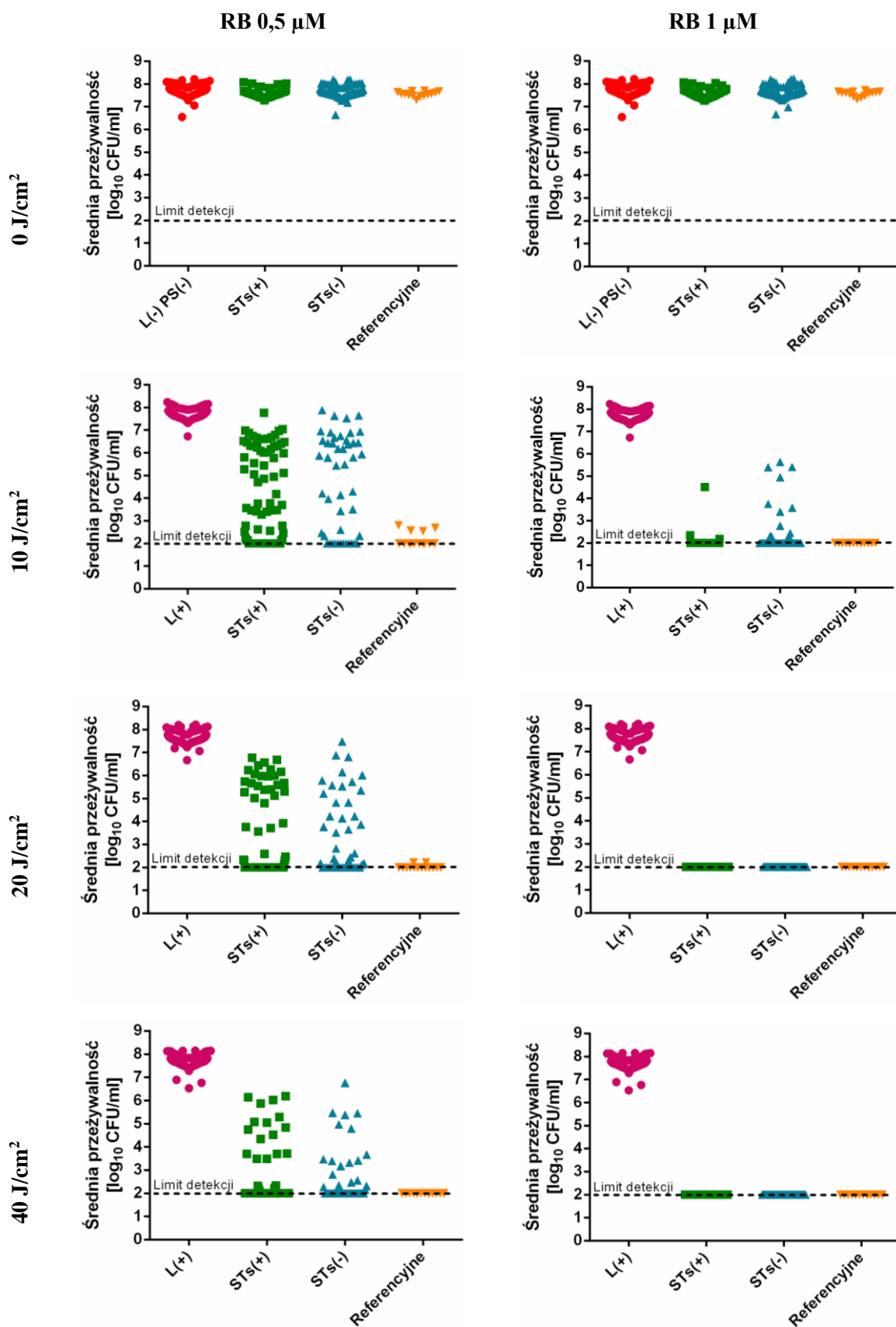
W kolejnym etapie pracy badaną populację izolatów scharakteryzowano pod kątem podatności na działanie metody fotodynamicznej. Mając do czynienia z różnorodną pod względem genetycznym populacją możemy mieć względną pewność, że efektywność

zastosowanej metody nie będzie obciążona efektem tła genetycznego. Stosując metodę fotodynamiczną zależy nam, aby była ona skuteczna wobec najszerszej populacji szczepów. Z tego powodu efektywność aPDI zweryfikowano wobec dwóch grup izolatów – (i) wyizolowanych od pacjentów z AZS (n=139) i (ii) szczepów referencyjnych (n=14). Zastosowano połączenie związku fotouczulającego - rózu bengalskiego (RB) ze światłem zielonym ( $\lambda_{\max}=515$  nm) lub nowego błękitu metylenowego (NMB) ze światłem czerwonym ( $\lambda_{\max}=632$  nm) (Metody, 7.4.).

Średnią przeżywalność izolatów pochodzących od pacjentów z AZS oraz szczepów referencyjnych (wyrażoną w jednostkach  $\log_{10}$  CFU/ml  $\pm$  SD) przedstawiono na Ryc. 8. Wartości obliczano w stosunku do prób nietraktowanych aPDI (nie poddawanych działaniu światła ani fotouczulacza). Szczegółowe wyniki dla każdego analizowanego izolatu zestawiono w suplemencie (Tab. 6 i 7).

Wraz ze wzrostem dawki światła i stężenia fotouczulacza zaobserwowano znaczący spadek liczby komórek bakteryjnych. aPDI z zastosowaniem RB i światła zielonego jest wysoce efektywna i prowadzi do eradykacji badanych szczepów (zarówno klinicznych, jak i referencyjnych; spadek przeżywalności o min. 5  $\log_{10}$  CFU/ml). Większość (55%) izolatów klinicznych pochodzących od pacjentów z AZS (75 ze 139 badanych) i wszystkie badane szczepy referencyjne wykazały ponad 99,9% spadek przeżywalności przy najniższych testowanych warunkach aPDI (10 J/cm<sup>2</sup>; 0,5  $\mu$ M RB). Podwojenie dawki światła i stężenia RB (20 J/cm<sup>2</sup>, 1  $\mu$ M) doprowadziło do eradykacji wszystkich analizowanych izolatów klinicznych (Ryc. 8). Traktowanie komórek samym światłem zielonym w dawce 40 J/cm<sup>2</sup>, jak również traktowanie samym RB w stężeniu 1  $\mu$ M nie miało wpływu na przeżywalność komórek bakteryjnych *S. aureus*.

RB + światło zielone ( $\lambda_{\max}=515 \text{ nm}$ )



Rycina 8. Skuteczność metody fotodynamicznej (aPDI) względem izolatów klinicznych posiadających i nieposiadających geny toksyn. Każdy punkt reprezentuje średnią wartość log<sub>10</sub>

CFU/ml z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych dla badanego izolatu. Testowano dwa stężenia RB (0,5  $\mu$ M i 1  $\mu$ M) i trzy dawki światła zielonego (10 J/cm<sup>2</sup>, 20 J/cm<sup>2</sup>, 40 J/cm<sup>2</sup>). L(-) PS(-) – komórki bakteryjne niepoddawane działaniu światła i fotouczulacza; L(+) – komórki bakteryjne traktowane wyłącznie światłem; STs(+) – izolaty poddane działaniu aPDI, u których zidentyfikowano obecność genów toksyn (STs, ang. *Staphylococcal Toxins*); STs(-) – izolaty poddane działaniu aPDI, u których nie wykryto genów toksyn (SEs, ang. *Staphylococcal Toxins*); Referencyjne – szczepy pozyskane z Narodowego Instytutu Leków w Warszawie, scharakteryzowane pod kątem obecności genów badanych toksyn.

Dla wszystkich analizowanych szczepów, niezależnie od obecności genów kodujących badane toksyny, w wyniku zastosowania dawki światła 20 J/cm<sup>2</sup> i stężenia 1  $\mu$ M RB osiągnięto redukcję liczby komórek bakteryjnych poniżej limitu detekcji (2 log<sub>10</sub> CFU/ml) (Ryc. 8). Oznacza to, że obecność genów toksyn nie ma wpływu na efektywność metody fotodynamicznej.

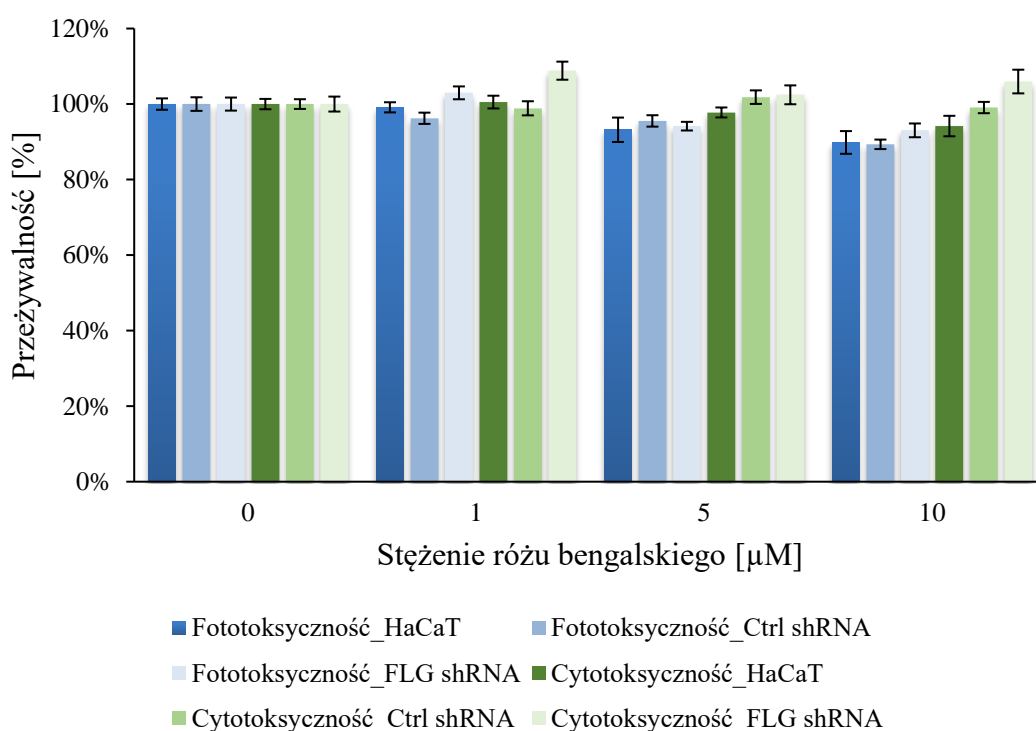
Z kolei zastosowanie metody fotodynamicznej z użyciem nowego błękitu metylenowego ze światłem czerwonym wykazała, iż do istotnego spadku przeżywalności komórek bakteryjnych (3 log<sub>10</sub>, czyli ponad 99,9%) niezbędna była dawka światła 40 J/cm<sup>2</sup> i 5  $\mu$ M NMB. Analiza cyto- i fototoksyczności wobec komórek eukariotycznych ujawniła, że dawka 20 J/cm<sup>2</sup> i 5  $\mu$ M NMB powoduje silny efekt fototoksyczny względem komórek eukariotycznych (przeżywalność komórek eukariotycznych w granicach 6,8-12,4%; Wyniki, 8.4., ryc. 10). Ze względu na wysoką toksyczność względem komórek eukariotycznych wykluczono NMB z badań weryfikujących efektywność aPDI wobec szczepów izolowanych od pacjentów AZS i referencyjnych, badań *ex vivo* i *in vivo* (wyjątek stanowiły badania wpływu subletalnych warunków aPDI na ekspresję toksyn gronkowcowych).

#### **8.4. aPDI z użyciem RB ze światłem zielonym nie wpływa na żywotność komórek eukariotycznych**

W kolejnym etapie pracy zbadano efekt aPDI wobec ludzkich komórek naskórka – keratynocytów (HaCaT). Do analiz, oprócz szeroko stosowanej immortalizowanej linii HaCaT, włączono komórki HaCaT z wyciszoną ekspresją genu *FLG* kodującego filagrynę. Filagryna jest jednym z kluczowych białek warunkujących prawidłową strukturę naskórka, a jej nieprawidłowe funkcjonowanie prowadzi do zaburzeń bariery naskórkowej. Wykorzystana w badaniach linia z wyciszoną ekspresją *FLG* (*FLG* shRNA) stanowiła uproszczony model AZS. Jako kontrolę zastosowano również linię HaCaT z wprowadzonym pustym wektorem kontrolnym (Ctrl shRNA) (Materiały, 6.8.). Zastosowany układ eksperymentalny miał na celu

zbadanie, czy wyciszenie ekspresji w genie filagryny spowoduje istotną zmianę w przeżywalności komórek eukariotycznych poddanych działaniu aPDI (Metody, 7.5.).

Na podstawie wyników testu MTT stwierdzono, że połączenie różu bengalskiego ze światłem zielonym ( $\lambda_{\max}=515$  nm) jest w pełni bezpieczne dla wszystkich testowanych linii komórkowych. Przy najwyższym stężeniu RB (10  $\mu\text{M}$ ), przeżywalność dla komórek HaCaT wynosiła 89,8%, HaCaT Ctrl shRNA – 89,3%, HaCaT *FLG* shRNA – 93%. Zastosowanie samego związku fotouczulającego RB w ciemności nie wpływało negatywnie na przeżywalność komórek eukariotycznych (przeżywalność dla 10  $\mu\text{M}$  RB: HaCaT 94,2%, HaCaT Ctrl shRNA – 99,1%, HaCaT *FLG* shRNA – 106%) (Ryc. 9).

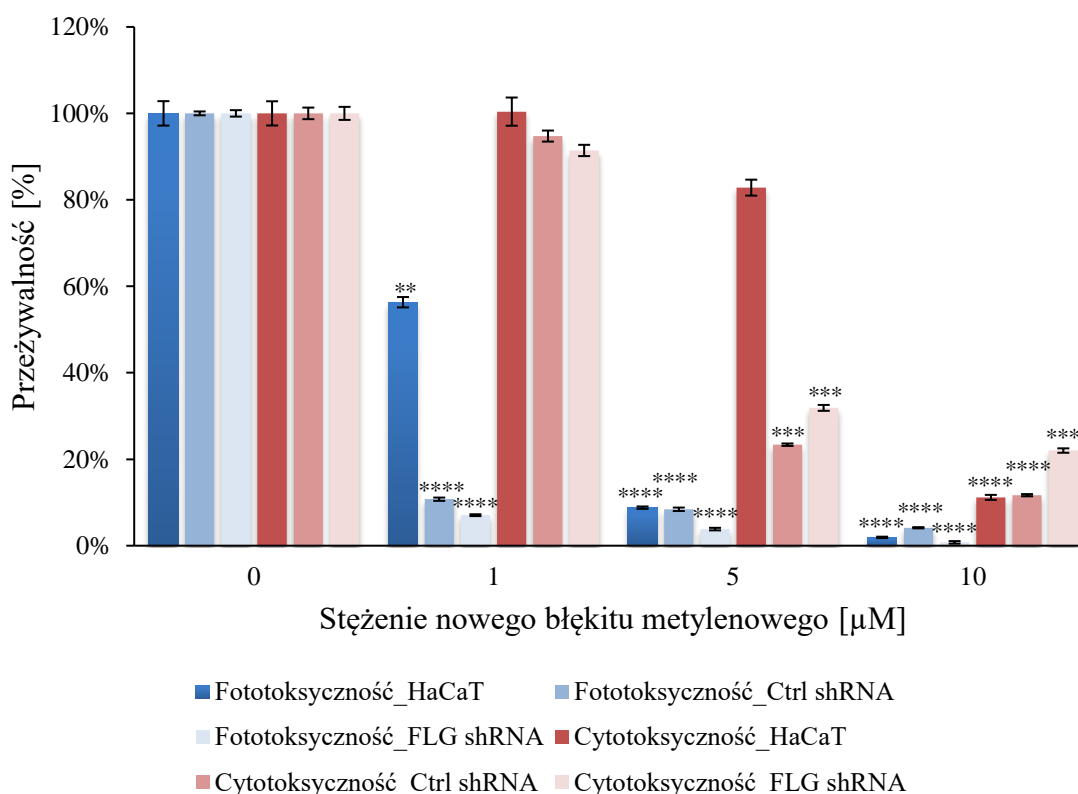


**Rycina 9. Analiza cyto- i fototoksyczności aPDI (róż bengalski ze światłem zielonym) względem komórek HaCaT, komórek HaCaT z wyciszoną ekspresją w genie filagryny (*FLG* shRNA) i komórek linii kontrolnej (Ctrl shRNA).** Liczba komórek na jeden dołek –  $1 \times 10^4$ . Komórki (0  $\mu\text{M}$ ) - nie poddawane działaniu fotouczulacza, ani światła. Po czasie inkubacji z rosnącym stężeniem RB, komórki zostały poddane naświetlaniu światłem zielonym ( $\lambda_{\max}=515$  nm, 35 mW/cm<sup>2</sup>, 40 J/cm<sup>2</sup>) (Fototoksyczność), bądź przechowywane w ciemności przez ten sam czas (Cytotoksyczność). Każdy słupek przedstawia wartość średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Słupki błędów reprezentują wartości odchyłek standardowych. Poziom istotności statystycznej w odniesieniu do nietraktowanych komórek (0  $\mu\text{M}$ ) \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Odmianą sytuację zaobserwowano w przypadku połączenia NMB ze światłem czerwonym ( $\lambda_{\max}=632$  nm). Zastosowanie niskiego stężenia, 1  $\mu\text{M}$  NMB ze światłem czerwonym powoduje, że 43,7% (HaCaT), 89,3% (HaCaT Ctrl shRNA), 92,9% (HaCaT *FLG*



shRNA) komórek nie przeżywa. Takie samo stężenie NMB, bez wzbudzenia światłem, nie wykazuje efektu cytotoksycznego (HaCaT – 100,4%, HaCaT Ctrl shRNA – 94,8%, HaCaT *FLG* shRNA – 91,4%). Silny efekt foto- i cytotoksyczny zaobserwowano natomiast dla 5  $\mu$ M NMB (fototoksyczność – przeżywalność na poziomie 3,8-8,8%, cytotoksyczność – przeżywalność na poziomie 23,4-82,8%). Silniejszy efekt cytotoksyczny wykazano dla linii HaCaT Ctrl shRNA – 23,4% oraz HaCaT *FLG* shRNA – 31,9% (Ryc. 10).



**Rycina 10. Analiza cyto- i fototoksyczności aPDI (nowy błękit metylenowy ze światłem czerwonym) względem komórek HaCaT, komórek HaCaT z wyciszoną ekspresją w genie filagryny (*FLG* shRNA) i komórek linii kontrolnej (Ctrl shRNA).** Liczba komórek na jeden dołek –  $10^4$ . Komórki kontrolne (0  $\mu$ M) - nie poddawane działaniu ani fotouczulacza, ani światła. Po czasie inkubacji z rosnącym stężeniem NMB, komórki zostały poddane naświetlaniu światłem czerwonym ( $\lambda_{max}=632$  nm, 20 mW/cm<sup>2</sup>, 32,5 J/cm<sup>2</sup>) (Fototoksyczność), bądź przechowywane w ciemności przez ten sam czas (Cytotoksyczność). Każdy słupek przedstawia wartość średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Słupki błędów reprezentują wartości odchyłeń standardowych. Poziom istotności statystycznej w odniesieniu do nietraktowanych komórek (0  $\mu$ M) \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$ .

Wyniki testu MTT wskazały, że połączenie RB ze światłem zielonym nie jest cyto- i fototoksyczne względem badanych linii komórek eukariotycznych, nawet w stężeniu 10  $\mu$ M, co znacząco przewyższa stężenie wykorzystywane do fotoinaktywacji komórek bakteryjnych.

Natomiast NMB aktywowany światłem czerwonym powodował silny efekt fototoksyczny względem wszystkich przebadanych linii komórkowych już przy stężeniu 1  $\mu\text{M}$ .

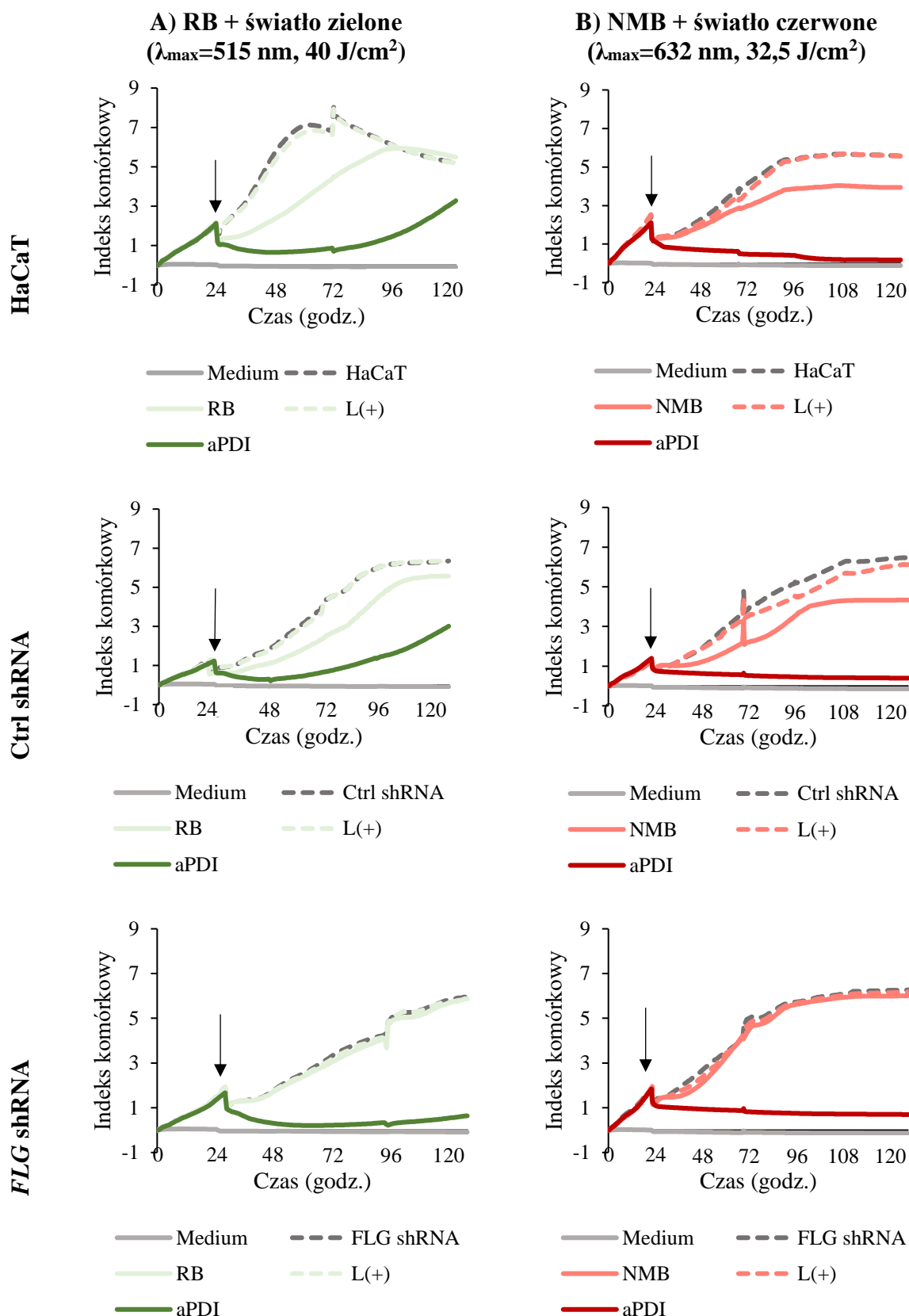
### 8.5. Analiza cyto- i fototoksyczności z wykorzystaniem systemu xCELLigence

W związku z tym, iż test cyto- i fototoksyczności oparty na metodzie MTT (Wyniki, 8.4.) weryfikuje bezpieczeństwo ustalonych warunków aPDI zaledwie w jednym punkcie czasowym, do badań włączono również monitorowanie wzrostu i żywotności komórek eukariotycznych w czasie rzeczywistym za pomocą systemu xCELLigence (Metody, 7.6.). System ten oparty jest na pomiarze impedancji poprzez rejestrowanie zmian przepływu elektronów na granicy faz między elektrodami opłaszczającymi dno studzienek płytki, a roztworem. Gdy w dołkach znajduje się wyłącznie pożywka, elektrony swobodnie migrują z ujemnego do dodatniego bieguna. Adhezja komórek do powierzchni utrudnia przepływ elektronów, co rejestrowane jest jako sygnał. Mierzalna w czasie rzeczywistym wartość impedancji elektrody zależy od liczby przylegających komórek, ich wielkości i kształtu, a także stopnia adhezji. Wzrost impedancji zachodzi wówczas, gdy komórki rosną na powierzchni, zmieniając tym samym środowisko jonowe. Zmiana impedancji będzie tym wyższa, im więcej komórek pokryje elektrody. Miara względnej impedancji elektrody jest indeks komórkowy (CI, ang. *Cellular Index*), który odzwierciedla liczbę komórek przylegających do elektrod. Im wyższa wartość CI, tym większa liczba komórek adherentnych na płycie. Spadek wartości CI w trakcie hodowli komórkowej informuje o spadku liczby komórek i ich przeżywalności, jeśli po okresowym spadku wartości CI, dochodzi do wznowienia proliferacji. Możliwość monitorowania zmian w dynamice wzrostu i przeżywalności komórek pozwoliło na ocenę foto- i cytotoxyczności aPDI w czasie rzeczywistym.

Komórki nietraktowane linii HaCaT osiągają fazę stacjonarnego wzrostu w ok. 50-tej godzinie hodowli, a komórki pozostałych dwóch badanych linii: Ctrl shRNA, *FLG* shRNA, w ok. 90-tej godzinie hodowli, uzyskując maksymalną wartość CI  $\sim 6,0 - 7,0$ . Zaobserwowano, że samo światło nie zmienia dynamiki wzrostu badanych linii, natomiast proliferacja komórek eukariotycznych poddanych działaniu samego RB (10  $\mu\text{M}$ ) ulega obniżeniu w przypadku linii HaCaT i Ctrl shRNA. Trzecia z badanych linii – *FLG* shRNA pozostaje niewrażliwa na działanie RB bez dostępu światła, co manifestuje się taką samą wartością indeksu komórkowego jak w przypadku nietraktowanych komórek (Ryc. 11 panel A). Natomiast traktowanie komórek aPDI (10  $\mu\text{M}$  RB, 40  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) powoduje wyraźny spadek przeżywalności wszystkich testowanych linii komórkowych, objawiający się znacznym spadkiem wartości CI.

Efekt fotouszkodzenia wynikający z działania aPDI, obserwuje się w zahamowaniu dynamiki wzrostu, która znacząco różni się od tej obserwowanej dla nietraktowanych komórek (Ryc. 11 panel A). Warto zauważyć, że w przypadku linii HaCaT oraz Ctrl shRNA, komórki które nie uległy znacznemu fotouszkodzeniu, z opóźnieniem wchodzą jednak w fazę wzrostu logarytmicznego, co można zaobserwować około 100-tej godziny hodowli. Efekt ten jest najmniej widoczny w przypadku trzeciej badanej linii, *FLG* shRNA, w której dopiero około 120-tej godziny hodowli można zaobserwować ponowny wzrost proliferacji komórek. Przedstawione wyniki wyraźnie pokazują, że linia *FLG* shRNA zachowuje się odmiennie od pozostałych. Wyjaśnienie mechanizmu leżącego u podstaw tej obserwacji wymagałoby dalszych analiz.

W podobny sposób za pomocą systemu xCELLigence zbadano efekt aPDI w oparciu o NMB i światło czerwone wobec trzech wyżej wymienionych linii komórkowych. Inkubacja komórek z NMB powoduje znaczny spadek przeżywalności komórek HaCaT, jak również keratynocytów kontrolnych (Ctrl shRNA) w stosunku do komórek nietraktowanych (Ryc. 11 panel B). Pomimo tego komórki są w stanie osiągnąć fazę plateau, jednakże dynamika ich wzrostu znacznie różni się od dynamiki wzrostu komórek nietraktowanych. Podobnie jak w przypadku traktowania RB, w komórkach z wyciszoną ekspresją w genie filagryny, NMB (5  $\mu$ M) jest dobrze tolerowany przez komórki, co widoczne jest w stabilnej dynamice ich wzrostu. Dawka 32,5 J/cm<sup>2</sup> światła czerwonego nie wpływa na dynamikę wzrostu ludzkich keratynocytów (indeks komórkowy dla komórek poddanych działaniu światła HaCaT – 5,6, Ctrl shRNA – 6,1, *FLG* shRNA - 6,2; dla komórek nietraktowanych wynosi odpowiednio 5,6, 6,5 oraz 6,3). Traktowanie NMB ze światłem czerwonym powoduje wyraźny spadek przeżywalności keratynocytów wszystkich badanych linii (HaCaT, Ctrl shRNA i *FLG* shRNA) i stanowi dla komórek eukariotycznych wysoce fototoksyczną dawkę. W takich warunkach traktowania, komórki nie są w stanie kontynuować wzrostu (Ryc. 11 panel B). Wyniki uzyskane dla NMB ze światłem czerwonym są zbieżne z wynikami analiz cyto- i fototoksyczności uzyskanych w oparciu o test MTT (Wyniki, 8.4.).



**Rycina 11. Dynamika wzrostu ludzkich keratynocytów: komórek HaCaT, HaCaT kontrolnych z wprowadzonym pustym wektorem (Ctrl shRNA) i HaCaT z wyciszoną ekspresją w genie filagryny (FLG shRNA) poddanych traktowaniu aPDI – różem bengalskim ze światłem zielonym (A) lub nowym błękitem metylenowym ze światłem czerwonym (B). Komórki wysiano w gęstości  $1 \times 10^4$  na jeden dołek. Indeks komórkowy mierzono co 10 min. Komórki poddano działaniu aPDI w 24**

h eksperymentu (strzałka). Przedstawione wartości są średnią z siedmiu powtórzeń. HaCaT, Ctrl shRNA, *FLG* shRNA – komórki hodowane bez żadnego traktowania. W fazie logarytmicznego wzrostu komórki poddawano traktowaniu różem bengalskim (RB, 10  $\mu$ M) lub nowym błękitem metylenowym (NMB, 5  $\mu$ M) [PS(+)], samym światłem zielonym (dawka światła 40 J/cm<sup>2</sup>) lub czerwonym (dawka światła 32,5 J/cm<sup>2</sup>) [L(+)], bądź połączeniem RB ze światłem zielonym/NMB ze światłem czerwonym (aPDI).

Podsumowując, traktowanie różem bengalskim ze światłem zielonym wpływa na dynamikę wzrostu analizowanych linii komórkowych. Jednakże, pomimo fotouszkodzeń spowodowanych działaniem metody fotodynamicznej (aPDI), komórki są w stanie dalej dzielić się i proliferować. Obserwuje się jednak różnicę związaną z obecnością genu filagryny w linii z wyciszoną ekspresją filagryny. Natomiast połączenie NMB ze światłem czerwonym wywołuje na tyle silny efekt cyto- i fototoksyczny wobec ludzkich komórek skóry, że komórki żadnej z badanych linii komórkowych nie są w stanie prawidłowo podjąć ponownego wzrostu i podziałów.

## 8.6. Badanie stabilności genów referencyjnych w warunkach aPDI

Po zbadaniu działania aPDI na komórki bakteryjne i na komórki eukariotyczne, w kolejnym etapie sprawdzono, w jaki sposób metoda fotodynamiczna wpływa na produkowane przez *S. aureus* czynniki wirulencji. Zbadano ekspresję genów kodujących wybrane toksyny w komórkach *S. aureus* poddanych subletalnym warunkom aPDI z wykorzystaniem ilościowej techniki PCR (qPCR). Jednak, aby uzyskać wiarygodne wyniki badania ekspresji genów, ważny jest staranny dobór genów referencyjnych. W dostępnych danych literaturowych brakuje informacji na temat stabilnych genów referencyjnych, które mogłyby być wykorzystywane w badaniu z użyciem metody fotodynamicznej. Dlatego w pierwszym etapie pracy wytypowano najbardziej stabilne geny referencyjne w stosowanych warunkach eksperymentalnych (subletalne aPDI). Przetestowano 10 genów referencyjnych: *16S rRNA*, *fabD*, *ftsZ*, *gmk*, *gyrB*, *proC*, *pyk*, *rho*, *rpoB* oraz *tpiA*. Specyficzność amplifikacji zweryfikowano za pomocą krzywych topnienia i rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym. Wydajności reakcji dla poszczególnych par starterów zostały obliczone według wzoru (Metody, 7.11.), wyrażone w procentach, i dla ośmiu z nich wynosiły 93-110%, spełniając rekomendowany zakres. Z uwagi na tworzenie dimerów starterów i niskie wydajności reakcji, geny *16S rRNA* i *pyk* zostały wyłączone z dalszej analizy.

Do określenia stabilności badanych genów referencyjnych zastosowano trzy programy – BestKeeper (Pfaffl *i in.*, 2004), geNorm (Vandesompele *i in.*, 2002) i NormFinder (Andersen

*i in.*, 2004). Pierwszy z nich bazuje na wartościach Cp, natomiast geNorm i NormFinder – na znormalizowanych wartościach Cp. W przypadku programu BestKeeper, za stabilny uważa się taki gen, który spełnia następujące kryteria:

- (1) Odchylenie standardowe wartości cykli progowych (Cp) powinno być mniejsze niż 1
- (2) Wartość odchylenia standardowego bezwzględnych współczynników regulacji powinna być niższa niż 2
- (3) Współczynnik korelacji (r) powinien być zbliżony do 1.

W programie geNorm miarą stabilności genu jest wartość M, która powinna być niższa niż 1,5, natomiast wartość stabilności wyrażona w programie NormFinder powinna być możliwie jak najniższa.

Biorąc pod uwagę powyższe kryteria, analiza przy użyciu programu BestKeeper wykazała, iż najbardziej stabilnymi genami referencyjnymi w subletalnym traktowaniu z różem bengalskim i światłem zielonym są geny *ftsZ* i *gmk*. Oba te geny spełniają trzy niezbędne kryteria dotyczące stabilności i charakteryzują się odchyleniem standardowym wartości cykli progowych poniżej 1 (odpowiednio 0,87 i 0,88). Wysoka stabilność jest również wyrażana poprzez wartość odchylenia standardowego bezwzględnych współczynników regulacji poniżej 2 (1,89 i 1,91) i współczynnik korelacji bliski 1 (0,92 i 0,86) (Tab. 12). Analiza w programie geNorm i NormFinder wykazała, że najbardziej stabilne geny to *ftsZ*, *gyrB*, i *gmk* (Tab. 13). Podsumowując wyniki uzyskane przy pomocy trzech programów, najbardziej stabilnymi genami referencyjnymi w warunkach traktowania różem bengalskim ze światłem zielonym są *ftsZ* i *gmk*.

**Tabela 12. Ocena stabilności genów referencyjnych poddanych traktowaniu różem bengalskim ze światłem zielonym na podstawie analiz w programie BestKeeper.**

Gen	RB + światło zielone							
	<i>ftsZ</i>	<i>gmk</i>	<i>rho</i>	<i>tpiA</i>	<i>gyrB</i>	<i>fabD</i>	<i>rpoB</i>	<i>proC</i>
Odch std [ $\pm$ Cp]	<b>0,87</b>	<b>0,88</b>	1,63	2,09	1,27	1,43	1,31	1,20
Odch std [ $\pm$ x-fold]	<b>1,89</b>	<b>1,91</b>	3,29	4,62	2,53	2,86	2,62	2,41
Współczynnik korelacji [r]	<b>0,92</b>	<b>0,86</b>	<b>0,92</b>	<b>0,92</b>	<b>0,90</b>	0,78	0,76	0,69

Odch std [ $\pm$ Cp] – odchylenie standardowe wartości cykli progowych (Cp); Odch std [ $\pm$ x-fold] – odchylenie standardowe bezwzględnych współczynników regulacji; Współczynnik korelacji [r] – współczynnik korelacji między każdym testowanym genem referencyjnym i indeksem BestKeeper. Wartości pogrubione oznaczają wyniki spełniające kryteria.

**Tabela 13. Wartości stabilności ekspresji ośmiu testowanych genów referencyjnych przy użyciu programów BestKeeper, geNorm i NormFinder dla różu bengalskiego ze światłem zielonym.**

RB + światło zielone					
BestKeeper		geNorm		NormFinder	
Gen	Wartość r	Gen	Wartość M	Gen	Wartość stabilności
<i>ftsZ</i>	0,92	<i>ftsZ</i>	1,236	<i>ftsZ</i>	0,092
<i>rho</i>	0,92	<i>gyrB</i>	1,300	<i>gyrB</i>	0,135
<i>tpiA</i>	0,92	<i>gmk</i>	1,318	<i>gmk</i>	0,146
<i>gyrB</i>	0,90	<i>rho</i>	1,522	<i>rho</i>	0,191
<i>gmk</i>	0,86	<i>rpoB</i>	1,575	<i>proC</i>	0,213
<i>fabD</i>	0,78	<i>fabD</i>	1,614	<i>fabD</i>	0,229
<i>rpoB</i>	0,76	<i>proC</i>	1,616	<i>rpoB</i>	0,236
<i>proC</i>	0,69	<i>tpiA</i>	1,916	<i>tpiA</i>	0,336

Wartość r – współczynnik korelacji Pearsona; wartość M – wartość stabilności genu

Z kolei dla subletalnego traktowania z użyciem nowego błękitu metylenowego ze światłem czerwonym, analiza za pomocą BestKeeper wskazała geny *fabD*, *ftsZ* i *proC* jako najbardziej stabilne i spełniające kryteria. Wartości odchylenia standardowego cykli progowych wynoszą odpowiednio 0,79, 0,92 i 0,78 (poniżej 1). Dla wyżej wymienionych genów, wartości odchylenia standardowego bezwzględnych współczynników regulacji wynoszą 1,79, 1,96 i 1,77 (poniżej 2), a współczynnik korelacji 0,76, 0,90 i 0,80 (bliski 1) (Tab. 14). Te same geny zostały uznane za najstabilniejsze w analizie z wykorzystaniem programu geNorm i NormFinder. Na podstawie przeprowadzonych analiz wytypowano geny *fabD*, *ftsZ* i *proC* jako najbardziej stabilne w warunkach traktowania z użyciem nowego błękitu metylenowego i światła czerwonego (Tab. 15).

**Tabela 14. Ocena stabilności genów referencyjnych poddanych traktowaniu nowym błękitem metylenowym ze światłem czerwonym na podstawie analiz w programie BestKeeper.**

Gen	NMB + światło czerwone							
	<i>ftsZ</i>	<i>proC</i>	<i>fabD</i>	<i>gyrB</i>	<i>rho</i>	<i>tpiA</i>	<i>rpoB</i>	<i>gmk</i>
Odch std [ $\pm$ Cp]	<b>0,92</b>	<b>0,78</b>	<b>0,79</b>	<b>0,86</b>	1,17	1,63	1,12	1,03
Odch std [ $\pm$ x-fold]	<b>1,96</b>	<b>1,77</b>	<b>1,79</b>	<b>1,87</b>	2,35	3,31	2,27	2,13
Współczynnik korelacji [r]	<b>0,90</b>	<b>0,80</b>	<b>0,76</b>	0,63	<b>0,84</b>	<b>0,82</b>	<b>0,75</b>	0,72

Odch std [ $\pm$ Cp] – odchylenie standardowe wartości cykli progowych (Cp); Odch std [ $\pm$ x-fold] – odchylenie standardowe bezwzględnych współczynników regulacji; Współczynnik korelacji [r] – współczynnik korelacji między każdym testowanym genem referencyjnym i indeksem BestKeeper. Wartości pogrubione oznaczają wyniki spełniające kryteria.

**Tabela 15. Wartości stabilności ekspresji ośmiu testowanych genów referencyjnych przy użyciu programów BestKeeper, geNorm i NormFinder dla nowego błękitu metylenowego ze światłem czerwonym.**

NMB + światło czerwone					
BestKeeper		geNorm		NormFinder	
Gen	Wartość r	Gen	Wartość M	Gen	Wartość stabilności
<i>ftsZ</i>	0,90	<i>ftsZ</i>	1,056	<i>ftsZ</i>	0,085
<i>rho</i>	0,84	<i>proC</i>	1,143	<i>proC</i>	0,135
<i>tpiA</i>	0,82	<i>fabD</i>	1,230	<i>fabD</i>	0,149
<i>proC</i>	0,80	<i>rho</i>	1,269	<i>rho</i>	0,180
<i>fabD</i>	0,76	<i>gyrB</i>	1,324	<i>gyrB</i>	0,201
<i>rpoB</i>	0,75	<i>gmk</i>	1,366	<i>gmk</i>	0,206
<i>gmk</i>	0,72	<i>rpoB</i>	1,396	<i>rpoB</i>	0,216
<i>gyrB</i>	0,63	<i>tpiA</i>	1,699	<i>tpiA</i>	0,290

Wartość r – współczynnik korelacji Pearsona; wartość M – wartość stabilności genu

### 8.7. Subletalne warunki aPDI powodują zmianę ekspresji genów kodujących toksyny

Metoda fotodynamiczna wykazuje wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową względem wielu gatunków mikroorganizmów, w tym *S. aureus* (Wyniki, 8.3.). Niewiele natomiast wiadomo o wpływie aPDI na ekspresję genów kodujących toksyny gronkowcowe. Dlatego też kolejnym celem badań było sprawdzenie efektu aPDI w warunkach subletalnych z zastosowaniem różu bengalskiego i światła zielonego oraz nowego błękitu metylenowego i światła czerwonego na aktywność genów kodujących wybrane toksyny *S. aureus*. Do analizy wybrano geny kodujące enterotoksyny: A, B, C, D oraz gen toksyny szoku toksycznego TSST-1. Wybór tych genów podyktowany był ich częstą obecnością w izolatach pochodzących od pacjentów z AZS.

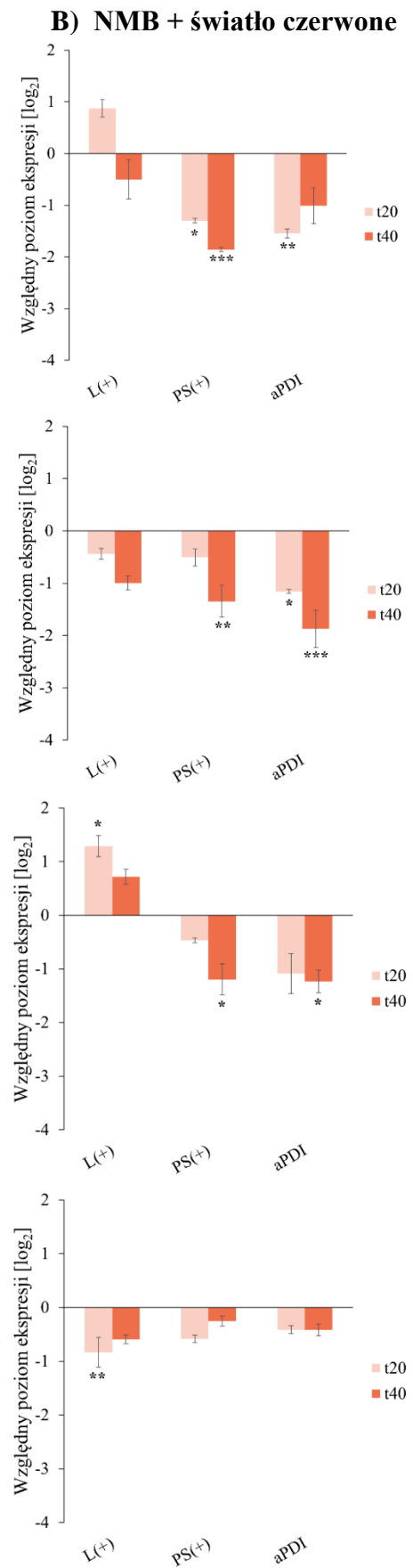
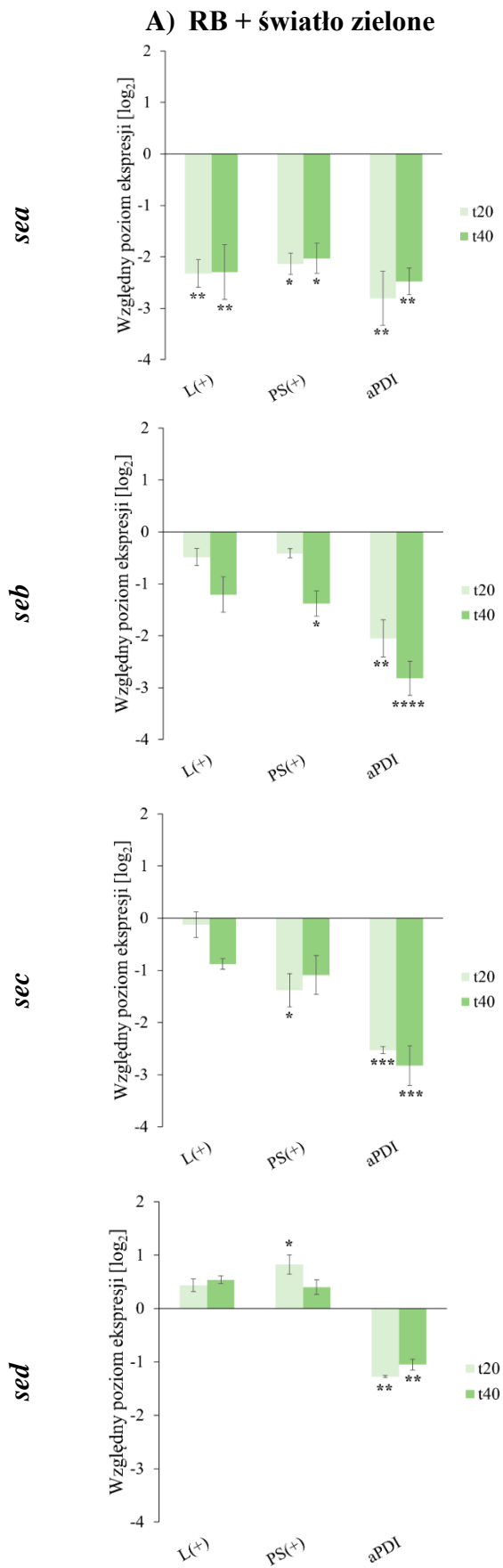
Badanie zmian ekspresji genów pod wpływem działania aPDI przeprowadzono w oparciu o 4 szczepy referencyjne *S. aureus*, posiadające geny badanych toksyn gronkowcowych: 10798/11 (*sea*), 140/05 (*seb*), 1947/05 (*sec*), 1005/05 (*sed* i *tst*) (Suplement, tab. 3). Zastosowano dwie procedury eksperymentalne: (i) aPDI przy użyciu RB i światła 515 nm (zielonego) oraz (ii) aPDI przy użyciu NMB i światła 632 nm (czerwonego). Takie podejście, czyli wykorzystanie aPDI w oparciu o różne związki fotouczulające pozwoli ocenić, czy i na ile potencjalnie obserwowany efekt będzie zależny od zastosowanych warunków eksperymentalnych, tj. związku fotouczulającego i/lub światła, a na ile z fotogenerowanego stresu oksydacyjnego. Komórki bakteryjne poddano działaniu subletalnych warunków aPDI (Metody, 7.7.). W wyniku takiego traktowania część bakteryjnej populacji przeżywa, co

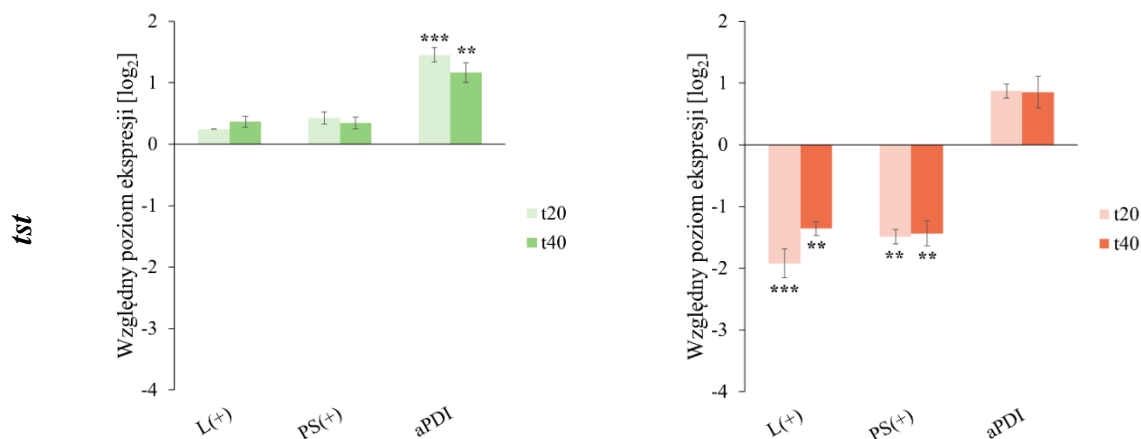


stwarza możliwość przyżyciowej analizy ekspresji. Poziom ekspresji genów oceniano przy pomocy ilościowej reakcji PCR (Metody, 7.12.). W celu uzyskania wiarygodnych wyników, zastosowano najbardziej stabilne w badanych warunkach geny referencyjne: *ftsZ* i *gmk* (RB + światło zielone), a także *fabD* i *proC* (NMB + światło czerwone) (Wyniki, 8.6.) (Ogonowska i Nakonieczna, 2020).

Traktowanie komórek *S. aureus* RB i światłem zielonym, jak również NMB i światłem czerwonym w warunkach subletalnych prowadzi do spadku ekspresji czterech spośród pięciu badanych genów toksyn gronkowcowych (*sea*, *seb*, *sec* i *sed*) (Ryc. 12, panel A i B). Dogłębna analiza uzyskanego wzoru ekspresji wskazuje na różnice dotyczące poszczególnych genów. W przypadku RB i światła zielonego zaobserwowano spadek ekspresji genów *sea*, *seb* i *sec* nie tylko pod wpływem aPDI, ale również w wyniku działania samego światła, a także samego związku fotouczulającego. Istotność statystyczną dla wszystkich punktów pomiarowych osiągnięto wyłącznie w przypadku genu *sea*. Odmienny efekt jest widoczny w przypadku traktowania aPDI w oparciu o NMB i światło czerwone. Nowy błękit metylenowy prowadzi do istotnego obniżenia poziomu ekspresji genów *sea*, *seb* i *sec*, natomiast efekt działania samego światła czerwonego jest niejednoznaczny – wzrost (*sec*), spadek (*seb*, *sed*), wzrost i spadek (*sea*) ekspresji badanych genów (Ryc. 12).

Z kolei odmienny wzór ekspresji od tych prezentowanych przez geny *sea*, *seb*, *sec* i *sed* zaobserwowano dla genu *tst*. Pod wpływem subletalnych warunków aPDI dochodzi do wzrostu ekspresji genu *tst* zarówno dla RB i światła zielonego, jak również NMB i światła czerwonego. Przy czym obserwowany wzrost jest ściśle związany z efektem fotodynamicznym, a nie z działaniem samego światła, czy związku fotouczulającego. Działanie samym zielonym światłem bądź RB nie wpływa na zmianę ekspresji genu, natomiast traktowanie samym czerwonym światłem lub NMB powoduje istotny spadek ekspresji genu *tst* (Ryc. 12).





**Rycina 12. Względny poziom ekspresji genów toksyny SEA, SEB, SEC, SED i TSST-1 pod wpływem subletalnego traktowania aPDI.** Eksperyment przeprowadzono z zastosowaniem różu bengalskiego (RB) ze światłem zielonym (A) lub nowego błękitu metylenowego (NMB) ze światłem czerwonym (B). W celu normalizacji danych względnej ilości transkryptu, zastosowano wartości średniej geometrycznej dla dwóch najbardziej stabilnych genów referencyjnych w testowanych warunkach: *ftsZ* i *gmk* (RB ze światłem zielonym) oraz *fabD* i *proC* (NMB ze światłem czerwonym). Wartości przedstawiono w odniesieniu do kontroli – komórek nietraktowanych (0 J/cm<sup>2</sup>, 0 μM). Słupki błędów pokazują średni błąd standardowy (SEM). Poziom istotności statystycznej w odniesieniu do kontroli \**p*<0,05; \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001; \*\*\*\**p*<0,0001. L(+) – komórki bakteryjne traktowane wyłącznie światłem; PS(+) – komórki bakteryjne traktowane wyłącznie fotouczulaczem i inkubowane w ciemności; aPDI – komórki traktowane światłem i fotouczulaczem; Próby analizowano po upływie 20 min (t20) i 40 min (t40) po zakończeniu procesu naświetlania.

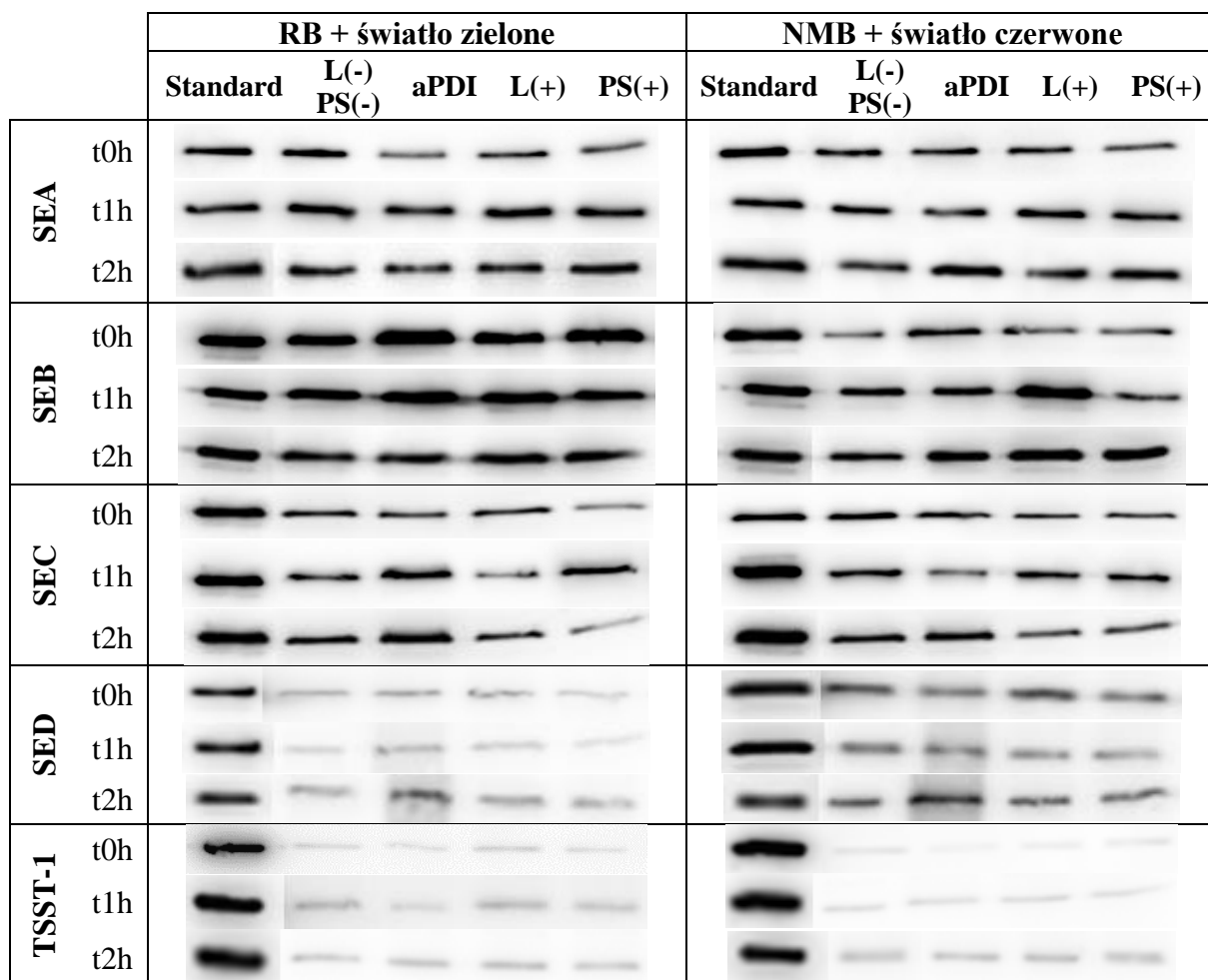
Uzyskane wyniki wskazują, iż zastosowane warunki aPDI wywołują znaczący efekt na ekspresję badanych genów toksyn. Obserwowany efekt jest zależny od analizowanego genu, a w mniejszym stopniu od warunków aPDI. Wskazuje to na fakt, że obserwuje się tu efekt fotogenerowanego stresu oksydacyjnego, który w odmienny sposób może wpływać na badane geny. Natomiast mechanizmy leżące u podstaw obserwowanych różnic w odpowiedzi na stres fotooksydacyjny generowany przez aPDI (uzyskany przez zastosowanie dwóch odmiennych warunków) wymaga dalszych analiz.

### 8.8. Subletalne warunki aPDI nie powodują zmian ilości białek toksyn

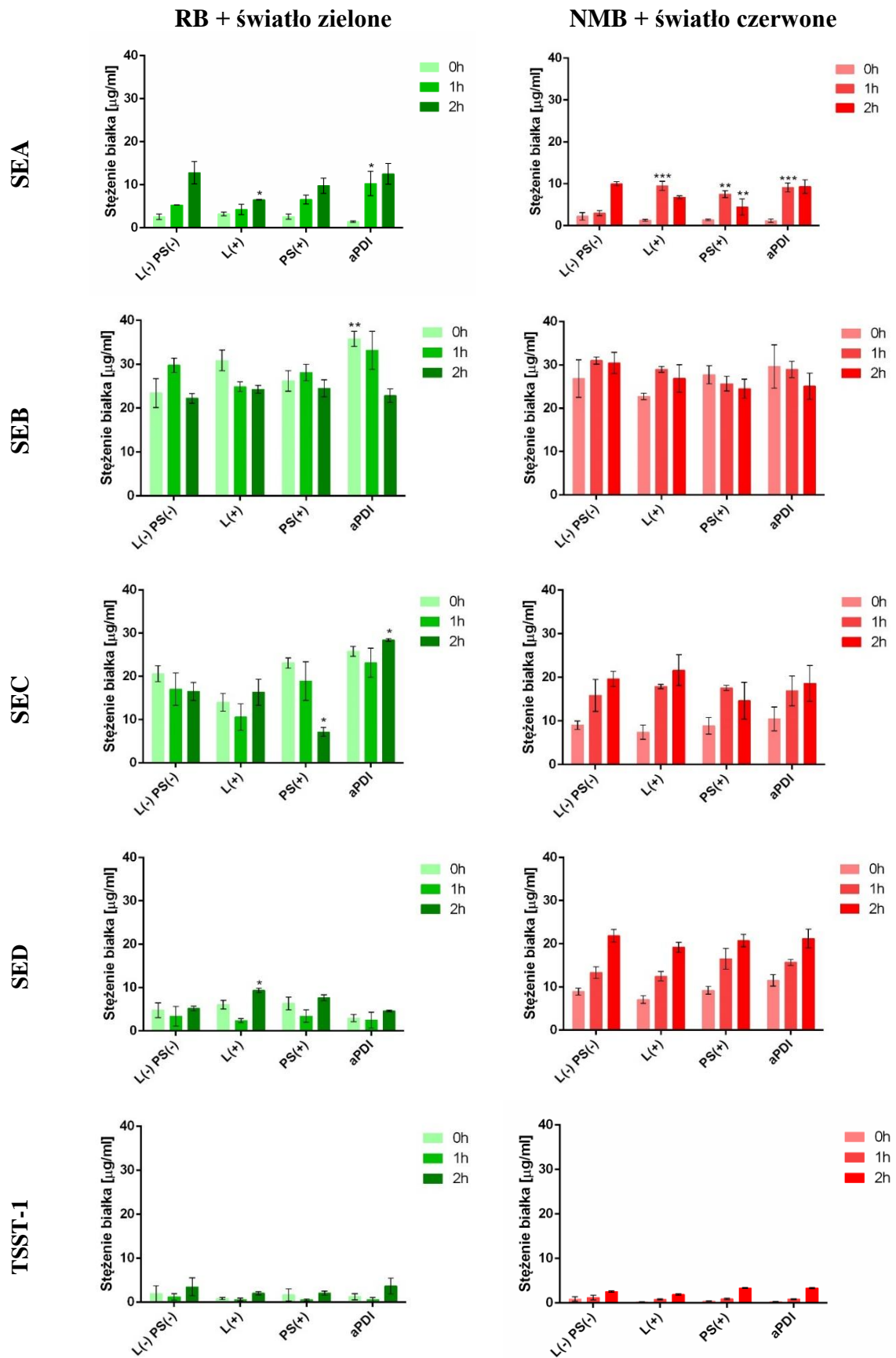
Wpływ subletalnych warunków aPDI na badane toksyny zweryfikowano również na poziomie białka przy pomocy techniki Western Blot (Metody, 7.14.). W badaniu wykorzystano 4 szczepy referencyjne *S. aureus*, które uprzednio zweryfikowano pod kątem produkcji białek badanych toksyn: 10798/11 (SEA), 140/05 (SEB), 1947/05 (SEC) i 1005/05 (SED i TSST-1) (Suplement, tab. 3).

Intensywność prążków uzyskanych poprzez immunodetekcję poszczególnych białek (Ryc. 13) mierzono w programie Image Lab i odnoszono do krzywej standardowej uzyskując

wartości stężeń białek toksyn wyrażone w  $\mu\text{g/ml}$ . Doświadczenie wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych (Ryc. 14).



**Rycina 13. Obraz immunodetekcji toksyn gronkowcowych poddanych działaniu aPDI w warunkach subletalnych.** W tabeli zestawiono wzory uzyskanych prążków techniką Western Blot dla jednego z trzech powtórzeń biologicznych. Wyniki przedstawiono dla dwóch warunków traktowania: różu bengalskiego (RB) ze światłem zielonym (po lewej) i nowego błękitu metylenowego (NMB) ze światłem czerwonym (po prawej). Standard stanowią wzorce białkowe czystych toksyn w stężeniu  $25 \mu\text{g/ml}$  (na studzienkę nanoszono  $5 \mu\text{l}$ ). Próby były pobierane w trzech punktach czasowych: bezpośrednio po naświetlaniu (t0h), po upływie jednej (t1h) lub dwóch (t2h) godzin od naświetlania. L(-) PS(-) – komórki bakteryjne nie poddawane działaniu światła ani fotouczulacza; aPDI – komórki traktowane światłem i fotouczulaczem; L(+) – komórki poddawane działaniu światła; PS(+) – komórki inkubowane w ciemności z fotouczulaczem.



Rycina 14. Zestawienie stężeń białek toksyn uzyskanych techniką Western Blot po traktowaniu aPDI w subletalnych warunkach. Każdy słupek reprezentuje wartość średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, a słupki błędów przedstawiają średni błąd standardowy (SEM). Poziom

istotności statystycznej w odniesieniu do nietraktowanych komórek z poszczególnych punktów czasowych L(-) PS(-) \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Próby były pobierane w trzech punktach czasowych: t0h – bezpośrednio po zakończeniu procesu naświetlania; t1h – komórki bakteryjne pobierane po upływie 1 godziny od naświetlania; t2h – komórki pobierane po upływie 2 godzin od zakończenia naświetlania. L(-) PS(-) – komórki bakteryjne nie poddawane działaniu światła ani fotouczulacza; aPDI – komórki traktowane światłem i fotouczulaczem; L(+) – komórki poddawane działaniu światła; PS(+) – komórki inkubowane w ciemności z fotouczulaczem.

Analizując zarówno obrazy prążków (Ryc. 13), jak i wykresy przedstawiające półilościową analizę intensywności uzyskanych prążków (Ryc. 14) stwierdzono, iż w testowanych warunkach eksperymentalnych białka enterotoksyny SEB i SEC są produkowane w największej ilości (maksymalnie do 35,85  $\mu\text{g/ml}$  w przypadku enterotoksyny SEB i 28  $\mu\text{g/ml}$  w przypadku SEC). Z kolei białko toksyny TSST-1 produkowane było w niewielkiej ilości (poniżej 5  $\mu\text{g/ml}$ ), dochodzącej do limitu detekcji metody. Ponadto zaobserwowano wyraźny przyrost stężenia białek w czasie.

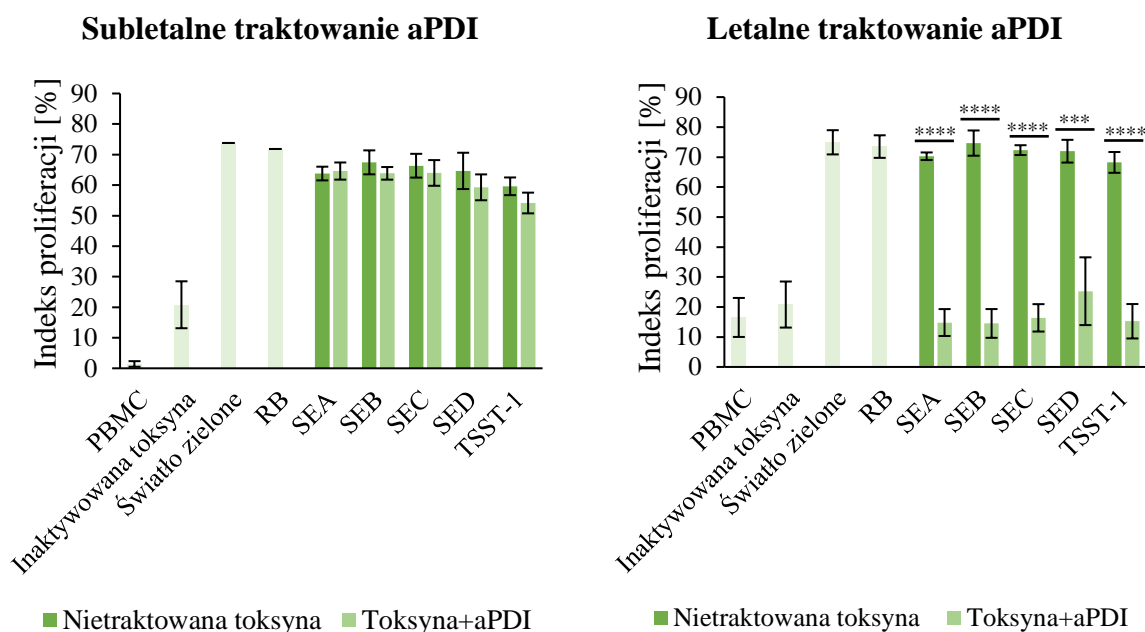
Na podstawie przeprowadzonych analiz (Ryc. 14) stwierdzono, że ilość białek nie ulega znaczącym zmianom pod wpływem działania aPDI. Brak efektu na poziomie białka jest obserwowany we wszystkich punktach czasowych (t0h, t1h, t2h), jak również w obu testowanych warunkach eksperymentalnych (róż bengalski ze światłem zielonym oraz nowy błękit metylenowy ze światłem czerwonym).

## **8.9. Toksyny tracą aktywność pod wpływem działania aPDI**

Z tego powodu, że nie zaobserwowano zmian w ilości produkowanych przez *S. aureus* toksyn w próbach poddanych działaniu fotodynamicznemu, wykonano test aktywności badanych toksyn. Toksyny gronkowcowe posiadają aktywność superantygenów (SAGs), czyli stymulują proces proliferacji limfocytów T i uwalnianie cytokin prozapalnych przez te komórki.

Biorąc pod uwagę wyżej wspomniane właściwości biologiczne toksyn, sprawdzono efekt aPDI na ich aktywność, za pomocą dwóch testów: testu proliferacji komórek PBMC (Metody, 7.15.) i testu ELISA (Metody, 7.16.). W tym celu białka toksyn poddano działaniu aPDI stosując RB i światło zielone w dawkach subletalnych (0,5  $\mu\text{M}$ , 12  $\text{J/cm}^2$ ) lub letalnych (5  $\mu\text{M}$ , 40  $\text{J/cm}^2$ ), a następnie inkubowano z komórkami eukariotycznymi w celu zmierzenia tempa ich proliferacji (Wyniki, 8.7.). Subletalne traktowanie aPDI z zastosowaniem RB i światła zielonego nie wykazało istotnego wpływu na funkcjonalność białek toksyn (Ryc. 15), dopiero włączenie wyższej dawki letalnej aPDI spowodowało znaczący spadek aktywności

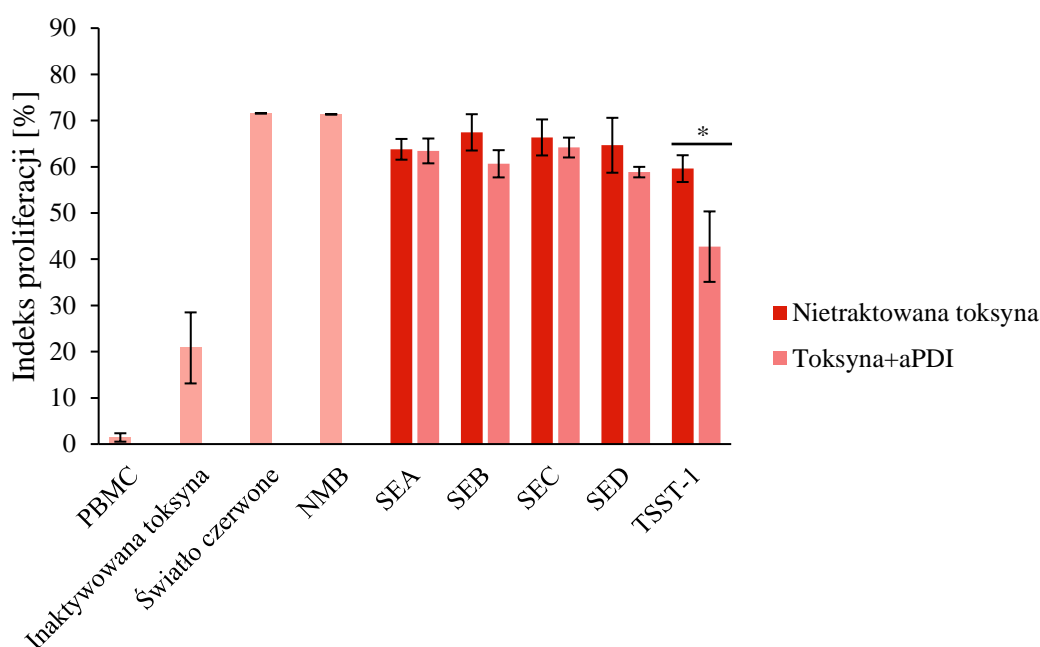
badanych toksyn. Warto w tym miejscu wspomnieć, że zastosowana dawka letalna prowadziła do eradykacji szczepów *S. aureus*, a jednocześnie była bezpieczna dla ludzkich keratynocytów (Wyniki, 8.4., ryc. 9).



**Rycina 15. Wpływ toksyn traktowanych aPDI (ród bengalski ze światłem zielonym, warunki subletalne i letalne) na proliferację komórek PBMC.** Białka toksyn w stężeniu 3,2  $\mu\text{g/ml}$  poddano traktowaniu różem bengalskim (0,5  $\mu\text{M}$  i 5  $\mu\text{M}$ ) ze światłem zielonym (warunki subletalne:  $\lambda_{\text{max}}=515$  nm, 35 mW/cm<sup>2</sup>, 12 J/cm<sup>2</sup>; warunki letalne:  $\lambda_{\text{max}}=515$  nm, 35 mW/cm<sup>2</sup>, 40 J/cm<sup>2</sup>). Każdy słupek reprezentuje wartość średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, a słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe (SD). Poziom istotności statystycznej przedstawiono w odniesieniu do nietraktowanych toksyn \*\*\* $p<0,001$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$ . PBMC – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej; inaktywowana toksyna – toksyna inkubowana w temperaturze 95°C przez 60 min; światło zielone – toksyna poddana działaniu światła zielonego (warunki subletalne:  $\lambda_{\text{max}}=515$  nm, 35 mW/cm<sup>2</sup>, 12 J/cm<sup>2</sup>; warunki letalne:  $\lambda_{\text{max}}=515$  nm, 35 mW/cm<sup>2</sup>, 40 J/cm<sup>2</sup>); RB – toksyna poddana działaniu różu bengalskiego (0,5  $\mu\text{M}$  lub 5  $\mu\text{M}$ ); SEA – gronkowcowa enterotoksyna A; SEB – gronkowcowa enterotoksyna B; SEC – gronkowcowa enterotoksyna C; SED – gronkowcowa enterotoksyna D; TSST-1 – toksyna wstrząsu toksycznego.

W przypadku zastosowania letalnych warunków aPDI z różem bengalskim i światłem zielonym, wszystkie analizowane toksyny w znacznym stopniu utraciły swoją biologiczną funkcję, co przełożyło się na spadek indeksu proliferacji komórek PBMC. Indeks proliferacji wynosił odpowiednio dla poszczególnych toksyn poddanych aPDI: SEA - 14,8%, SEB - 14,5%, SEC - 16,4%, SED - 25,3%, TSST-1 - 15,2% i był na porównywalnym poziomie do obserwowanego dla komórek PBMC kontrolnych, nie poddanych żadnej stymulacji (16,5%) (Ryc. 15). Naświetlanie toksyny samym światłem zielonym (40 J/cm<sup>2</sup>), jak również jej inkubacja z samym różem bengalskim (5  $\mu\text{M}$ ) w ciemności nie ma wpływu na aktywność toksyny (Ryc. 15).

Analogicznie przeprowadzono badanie aktywności toksyn po aPDI w oparciu o połączenie nowego błękitu metylenowego i światła czerwonego. W badaniu zastosowano jedynie subletalne dawki aPDI ( $5 \mu\text{M}$  NMB,  $\lambda_{\text{max}}=632 \text{ nm}$ ,  $20 \text{ mW/cm}^2$ ,  $32,5 \text{ J/cm}^2$ ). W wyniku przeprowadzonej analizy okazało się, że dawki te są niewystarczające do pozabawienia toksyn ich biologicznej funkcji (Ryc. 16). Jedynie w przypadku toksyny TSST-1 poddanej działaniu aPDI zaobserwowano statystycznie istotny spadek proliferacji komórek PBMC (42,7%). Brak zaobserwowanego efektu w przypadku pozostałych badanych białek może być spowodowany zastosowaniem zbyt łagodnych warunków aPDI. Toksyna poddana działaniu światła czerwonego ( $32,5 \text{ J/cm}^2$ ) oraz inkubacji w ciemności z nowym błękitem metylenowym ( $5 \mu\text{M}$ ) nie prowadzi do spadku jej aktywności (Ryc. 16).



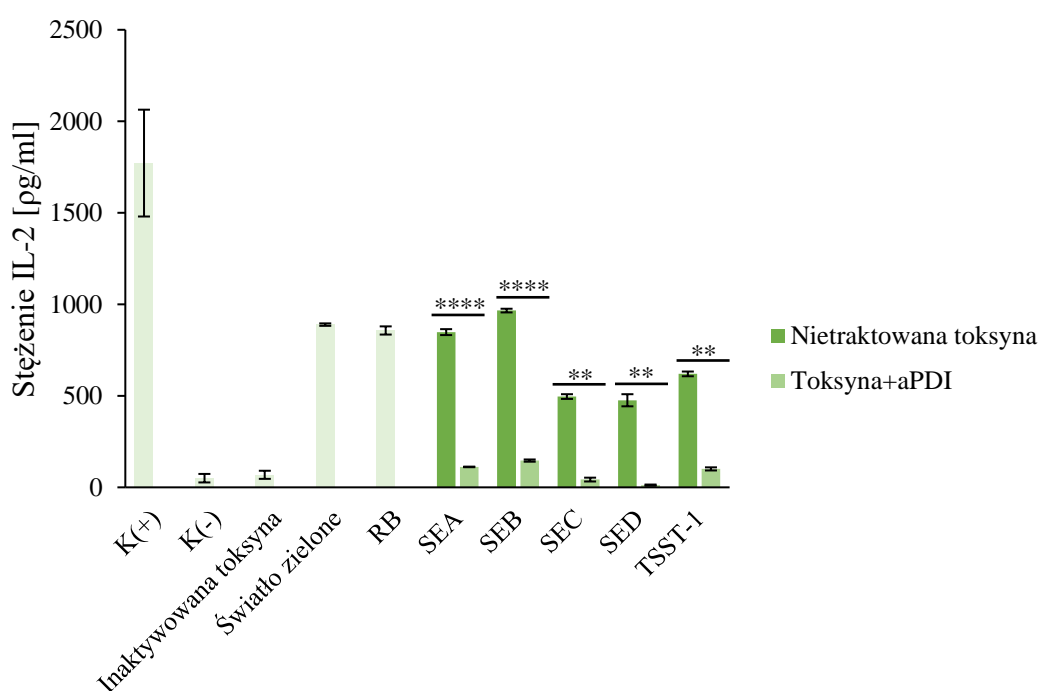
**Rycina 16. Wpływ toksyn traktowanych aPDI (nowy błękit metylenowy ze światłem czerwonym) na proliferację komórek PBMC.** Białka toksyn w stężeniu  $3,2 \mu\text{g/ml}$  poddano traktowaniu nowym błękitem metylenowym ( $5 \mu\text{M}$ ) ze światłem czerwonym ( $\lambda_{\text{max}}=632 \text{ nm}$ ,  $20 \text{ mW/cm}^2$ ,  $32,5 \text{ J/cm}^2$ ). Każdy słupek reprezentuje wartość średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, a słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe (SD). Poziom istotności statystycznej w odniesieniu do nietraktowanych toksyn  $*p < 0,05$ . PBMC – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej; inaktywowana toksyna – toksyna inkubowana w temperaturze  $95^\circ\text{C}$  przez 60 min; światło czerwone – toksyna poddana działaniu światła czerwonego ( $\lambda_{\text{max}}=632 \text{ nm}$ ,  $20 \text{ mW/cm}^2$ ,  $32,5 \text{ J/cm}^2$ ); NMB – toksyna poddana działaniu nowego błękitu metylenowego ( $5 \mu\text{M}$ ); SEA – gronkowcowa enterotoksyna A; SEB – gronkowcowa enterotoksyna B; SEC – gronkowcowa enterotoksyna C; SED – gronkowcowa enterotoksyna D; TSST-1 – toksyna wstrząsu toksycznego.

Wpływ aPDI na aktywność enterotoksyn A, B, C, D i toksyny TSST-1 zbadano również za pomocą testu immunoenzymatycznego, w którym ilościowo mierzono poziom wydzielanej przez komórki PBMC cytokiny IL-2.



W doświadczeniu zastosowano test immunoenzymatyczny ELISA (Metody, 7.16.). Charakteryzuje się on wysoką czułością (poziom detekcji IL-2 -  $\mu\text{g/ml}$ ). Niestymulowane limfocyty T krwi obwodowej wytwarzają niewiele, bądź nie wytwarzają wcale cytokin. W związku z tym do indukcji cytokin niezbędna jest stymulacja *in vitro*. W przedstawionym doświadczeniu jako stymulanty zastosowano octan mirystynianu forbolu (PMA) i jonomycynę (kontrola pozytywna) (Metody, 7.16.). W przypadku tego doświadczenie zastosowano warunki aPDI takie jak w teście proliferacji limfocytów, białka toksyn poddano działaniu RB ze światłem zielonym w warunkach letalnych (Metody, 7.16.; Wyniki, 8.9.), natomiast NMB ze światłem czerwonym w warunkach subletalnych (Metody, 7.16.).

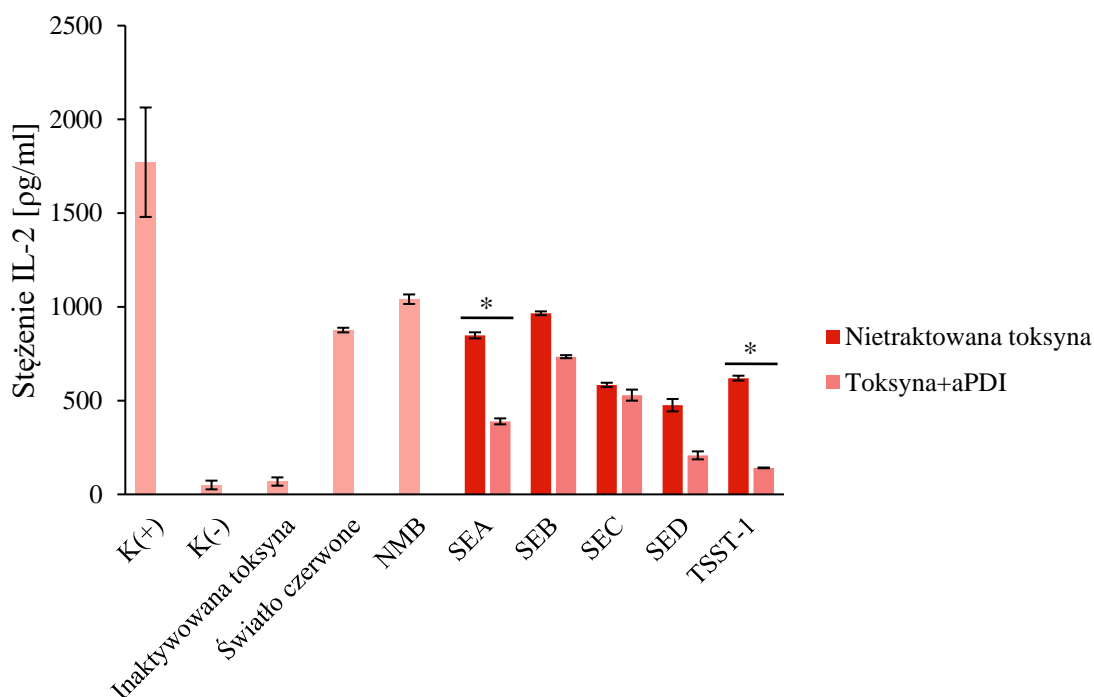
Traktowanie różem bengalskim ze światłem zielonym powoduje istotny statystycznie spadek ilości IL-2 (Ryc. 17). Oznacza to, iż białka toksyn pod wpływem aPDI utraciły zdolność do aktywacji limfocytów T, a tym samym do uwolnienia badanej IL-2. Dodatkowo, traktowanie samym światłem zielonym ( $40 \text{ J/cm}^2$ ), lub różem bengalskim ( $5 \mu\text{M}$ ) nie wpływa na utratę aktywności toksyn. Uzyskane obserwacje w pełni korelują z wynikami uzyskanymi w teście proliferacji.



**Rycina 17. Wpływ aPDI (róż bengalski ze światłem zielonym) na aktywność białek toksyn – pomiar ilości interleukiny 2 (IL-2).** Białka toksyn w stężeniu  $3,2 \mu\text{g/ml}$  poddano traktowaniu różem bengalskim ( $5 \mu\text{M}$ ) ze światłem zielonym ( $\lambda_{\text{max}}=515 \text{ nm}$ ,  $35 \text{ mW/cm}^2$ ,  $40 \text{ J/cm}^2$ ). Każdy słupek reprezentuje wartość średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, a słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe (SD). Poziom istotności statystycznej w odniesieniu do nietraktowanych toksyn \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$ . K(+)  
– kontrola pozytywna (komórki PBMC traktowane octanem mirystynianu forbolu i jonomycyną); K(-)  
– kontrola negatywna

(nietraktowane komórki PBMC); Inaktywowana toksyna – toksyna poddana procesowi gotowania w temperaturze 95°C przez 60 min. RB – róż bengalski; SEA – gronkowcowa enterotoksyna A; SEB – gronkowcowa enterotoksyna B; SEC – gronkowcowa enterotoksyna C; SED – gronkowcowa enterotoksyna D; TSST-1 – toksyna wstrząsu toksycznego.

Z kolei traktowanie toksyn nowym błękitem metylenowym ze światłem czerwonym pozbawia biologicznej funkcji wyłącznie toksynę SEA i TSST-1 (Ryc. 18). Tylko dla tych toksyn obserwuje się istotny statystycznie spadek ilości IL-2. W przypadku enterotoksyny SEB, SEC i SED zastosowana dawka naświetlania nie pozbawia ich biologicznej funkcji, co przekłada się na niewielki spadek ilości wydzielanej IL-2 (Ryc. 18). Zaobserwowany efekt jest podobny do efektu wykazanego w teście proliferacji, wynikający ze zbyt niskiej dawki naświetlania. W tym przypadku zastosowanie wyższej dawki skutkuje efektem toksycznym wobec linii komórkowych, co może dyskwalifikować ten fotouczulacz w ewentualnych zastosowaniach klinicznych. Podobnie jak w przypadku traktowania samym światłem zielonym i samym różem bengalskim, również zastosowanie samego światła czerwonego (32,5 J/cm<sup>2</sup>), bądź nowego błękitu metylenowego (5 μM) nie wpływa negatywnie na aktywność toksyn.



**Rycina 18. Wpływ aPDI (nowy błękit metylenowy ze światłem czerwonym) na aktywność białek toksyn – pomiar ilości interleukiny 2 (IL-2).** Białka toksyn w stężeniu 3,2 μg/ml poddano traktowaniu nowym błękitem metylenowym (5 μM) ze światłem czerwonym ( $\lambda_{\max}$ =632 nm, 20 mW/cm<sup>2</sup>, 32,5 J/cm<sup>2</sup>). Wyniki są średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, a słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe (SD). Poziom istotności statystycznej w odniesieniu do nietraktowanych toksyn \* $p$ <0,05. K(+)<sup>+</sup> – kontrola pozytywna (komórki PBMC traktowane octanem mirystynianu forbolu i jonomycyną); K(-)<sup>-</sup> – kontrola negatywna (nietraktowane komórki PBMC); Inaktywowana toksyna – toksyna inkubowana w temperaturze 95°C przez 60 min. NMB – nowy błękit

metylenowy; SEA – gronkowcowa enterotoksyna A; SEB – gronkowcowa enterotoksyna B; SEC – gronkowcowa enterotoksyna C; SED – gronkowcowa enterotoksyna D; TSST-1 – toksyna wstrząsu toksycznego.

Na podstawie opisanych wyników można stwierdzić, że aPDI wpływa na utratę (RB + światło zielone) lub obniżenie (NMB + światło czerwone) aktywności biologicznych badanych toksyn *in vitro*.

### **8.10. Model *ex vivo* kolonizacji świńskiej skóry umożliwia śledzenie zmian w ekspresji badanych genów na poziomie transkryptu i białka**

Jako model weryfikujący efektywność aPDI w dalszych etapach pracy wykorzystano model *ex vivo* świńskiej skóry. Skóra świńska jest dobrym modelem do badań *ex vivo*, gdyż jest stosunkowo łatwa do pozyskania, a ponadto wykazuje podobieństwo w budowie, obrazie histologicznym, czy właściwościach fizjologicznych do skóry ludzkiej.

Celem analiz była (i) weryfikacja efektywności aPDI na bardziej złożonym modelu badawczym, (ii) sprawdzenie produkcji toksyn na poziomie genu i białka w modelu *ex vivo* oraz (iii) wpływ aPDI na poziom produkowanych *ex vivo* toksyn.

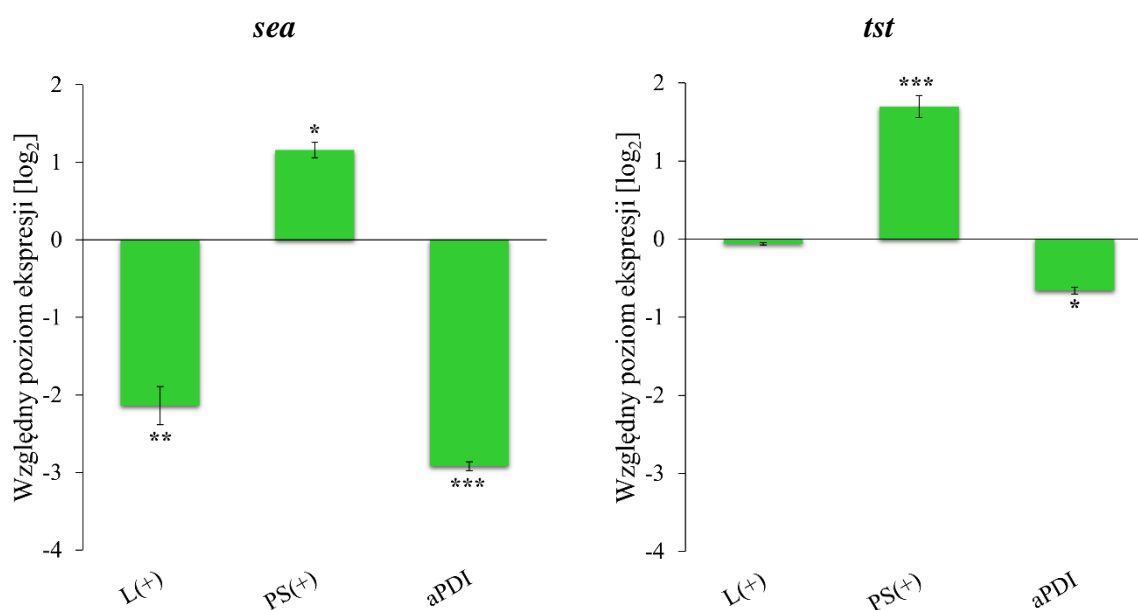
Stężenie rózu bengalskiego wykorzystane w badaniach *ex vivo* wynosiło 35  $\mu\text{M}$  i było wyższe od tego stosowanego w badaniach *in vitro*. Spowodowane jest to faktem, iż w warunkach *in vitro* etap inkubacji bakterii z fotouczulaczem odbywa się w roztworze, co umożliwia łatwiejsze przyłączenie się cząsteczek fotouczulacza do powierzchni bakterii. W przypadku badań *ex vivo*, penetracja fotouczulacza jest znacznie ograniczona, ponieważ bakterie tworzą na powierzchni skóry strukturę biofilmu. Dlatego też zalecane jest stosowanie wyższego stężenia fotouczulacza, połączone z wydłużonym czasem inkubacji.

Doświadczenie opierało się na skolonizowaniu świńskiej skóry szczepem *S. aureus* Xen40 (Metody, 7.17.), zaaplikowaniu RB w stężeniu 35  $\mu\text{M}$  i inkubacji trwającej 30 min. Po tym czasie skórę naświetlono światłem zielonym ( $\lambda_{\text{max}}=530\text{-}535\text{ nm}$ , 6,36 J/cm<sup>2</sup>, 10 min). Szczepem wykorzystanym w badaniach był szczep *S. aureus* Xen40, który posiada geny kodujące dwie toksyny – SEA i TSST-1, co zostało potwierdzone metodą PCR i Western Blot (Materiały, 6.1.).

Pierwszym etapem eksperymentu było określenie przeżywalności szczepu *S. aureus* Xen40, którą mierzono w dwóch punktach czasowych – 40 min po aPDI i 24 godz. po aPDI

(Metody, 7.17.). Uzyskane wyniki wykazały, iż spadek przeżywalności wynosi odpowiednio 0,56 log<sub>10</sub> CFU/ml i 1,22 log<sub>10</sub> CFU/ml.

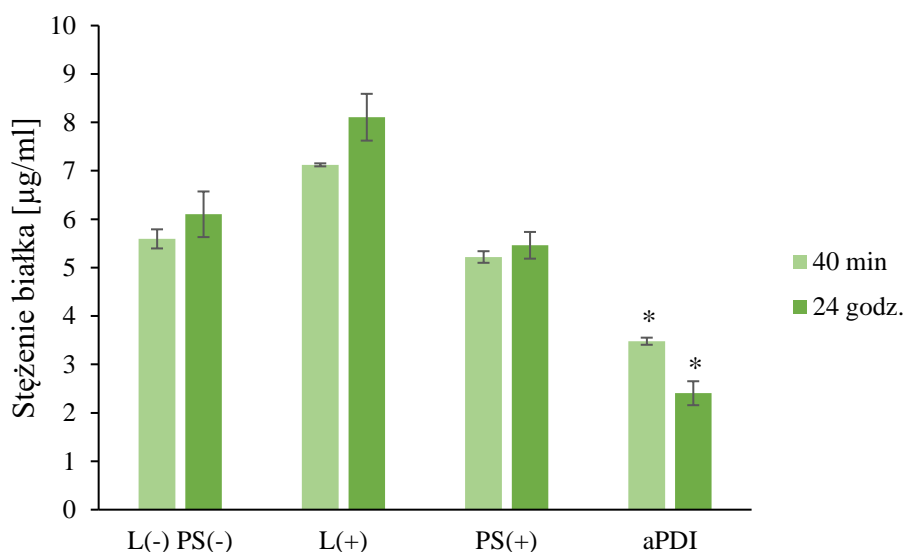
W dalszym etapie pracy zbadano, czy w opracowanym modelu kolonizacji świńskiej skóry przez bakterie *S. aureus* możliwe jest śledzenie zmian ekspresji genów po aPDI zarówno na poziomie transkryptu, jak i białka. W tym celu pobierano wymaz z powierzchni świńskiej skóry po upływie 40 min od aPDI. Uzyskany materiał analizowano za pomocą metody qPCR (Metody, 7.17.). Zaobserwowano istotny statystycznie spadek ekspresji badanych genów toksyn pod wpływem aPDI (*sea* spadek ekspresji 2,92 log<sub>2</sub>; *tst* spadek ekspresji 0,66 log<sub>2</sub>) (Ryc. 19). W przypadku genu enterotoksyny *sea* wykazano również istotny wpływ samego światła zielonego na spadek ekspresji tego genu (2,14 log<sub>2</sub>). Natomiast w przypadku obu badanych genów *sea* i *tst* zaobserwowano znacznie podwyższony poziom ekspresji genu po traktowaniu samym różem bengalskim. Na uwagę zasługuje obserwacja, że poziom ekspresji genu *tst* po aPDI jest odmienny w warunkach *ex vivo* (spadek ekspresji 0,66 log<sub>2</sub>) i *in vitro* (wzrost ekspresji 1,16-1,45 log<sub>2</sub>) (Wyniki, 8.7.) (Ryc. 19, Ryc. 12).



**Rycina 19. Względny poziom ekspresji genów *sea* i *tst* pod wpływem traktowania aPDI (róż bengalski ze światłem zielonym).** Świńską skórę skolonizowaną bakteriami *S. aureus* poddano działaniu aPDI z zastosowaniem RB (35 μM) i światła zielonego ( $\lambda_{\max}=530-535$  nm, 10,6 mW/cm<sup>2</sup>, 6,36 J/cm<sup>2</sup>). W celu normalizacji danych względnej ilości transkryptu, zastosowano wartości średniej geometrycznej dla dwóch najbardziej stabilnych genów referencyjnych w testowanych warunkach: *ftsZ* i *gmk*. Wartości przedstawiono w odniesieniu do kontroli – komórek nietraktowanych (0 J/cm<sup>2</sup>, 0 μM RB). Słupki błędów pokazują średni błąd standardowy (SEM). Poziom istotności statystycznej w odniesieniu do kontroli \**p*<0,05; \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001. L(+) – komórki bakteryjne traktowane wyłącznie światłem; PS(+) – komórki bakteryjne traktowane wyłącznie fotouczulaczem i przechowywane w ciemności; aPDI – komórki traktowane światłem i fotouczulaczem.

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono analizę poziomu białek SEA i TSST-1 w zastosowanym modelu *ex vivo*. Materiał pobierano w dwóch punktach czasowych – po upływie 40 min i po 24 godz. od zakończenia procesu naświetlania. Pobrane próby analizowano techniką Western Blot (Metody, 7.17.).

Zaobserwowano, iż enterotoksyna A jest produkowana w porównywalnej ilości w warunkach *in vitro* (Wyniki, 8.8., Ryc. 14), jak i *ex vivo*, co oznacza, że możliwe jest analizowanie tego białka w bardziej złożonych modelach eksperymentalnych. Po upływie 40 min, i po 24 godz. po traktowaniu aPDI dochodzi do statystycznie istotnego spadku w ilości białka SEA w porównaniu do prób nietraktowanych [40 min L(-)PS(-) 5,59 µg/ml, aPDI 3,48 µg/ml; 24 godz. L(-)PS(-) 6,10 µg/ml, aPDI 2,41 µg/ml] (Ryc. 20). Wykazano, że działanie różu bengalskiego, jak również działanie wyłącznie światłem zielonym nie prowadzi do istotnego spadku ilości białka enterotoksyny A w porównaniu do komórek nie poddanych działaniu aPDI. Analiza białka TSST-1 nie była możliwa ze względu na niski poziom produkcji białka w zastosowanych warunkach eksperymentalnych.



**Rycina 20. Zmiana stężeń białka enterotoksyny A (SEA) po traktowaniu aPDI (róż bengalski ze światłem zielonym) w modelu *ex vivo* kolonizacji *S. aureus* świńskiej skóry.** Bakterie *S. aureus* kolonizujące świńską skórę poddano działaniu aPDI z zastosowaniem różu bengalskiego (35 µM) i światła zielonego ( $\lambda_{max}=530-535$  nm, 10,6 mW/cm<sup>2</sup>, 6,36 J/cm<sup>2</sup>). Każdy słupek reprezentuje wartość średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, a słupki błędów przedstawiają średni błąd standardowy (SEM). Poziom istotności statystycznej w odniesieniu do nietraktowanych komórek z poszczególnych punktów czasowych L(-) PS(-) \* $p < 0,05$ . Próby były pobierane w dwóch punktach czasowych: 40 min – komórki bakteryjne pobierane po upływie 40 min od naświetlania; 24 godz. – komórki pobierane po upływie 24 godz. od zakończenia naświetlania. L(-) PS(-) – komórki bakteryjne nie poddawane działaniu światła ani fotouczulacza; aPDI – komórki traktowane światłem i fotouczulaczem; L(+)) – komórki poddawane działaniu światła; PS(+)) – komórki inkubowane w ciemności z fotouczulaczem.

Uzyskane wyniki wskazują, że model *ex vivo* jest odpowiedni do śledzenia zmian w ekspresji genów i poziomie białek toksyn gronkowcowych poddanych działaniu aPDI. Dodatkowo traktowanie aPDI prowadzi do istotnego obniżenia poziomu ekspresji genu *sea* i *tst*, a także spadku ilości białka enterotoksyny A (SEA), co więcej obniżenie ilości SEA jest obserwowane już po 40 min i utrzymuje się do 24 godz. po działaniu aPDI.

### **8.11. aPDI prowadzi do spadku przeżywalności bakterii *S. aureus* w mysim modelu kolonizacji skóry**

W celu dalszego badania efektywności aPDI zastosowano model *in vivo*, czyli mysiej skóry skolonizowanej *S. aureus*. Przedmiotem tych badań była również weryfikacja wpływu samego światła zielonego, bądź samego różu bengalskiego na obraz histologiczny mysiej skóry. Dodatkowo zbadano wpływ aPDI na poziom białka enterotoksyny A.

W modelu *in vivo* zastosowano procedurę *tape-stripping*, która prowadzi do mechanicznego uszkodzenia skóry myszy (Metody, 7.18.). Ogromną zaletą tego modelu jest wywołanie lokalnego stanu zapalnego przypominającego ten pojawiający się w skórze atopowej poprzez uszkodzenie bariery ochronnej skóry (Bitschar *i in.*, 2020, Wanke *i in.*, 2013). Do kolonizacji mysiej skóry użyto szczep bioluminescencyjny *S. aureus* Xen40, który posiada kopię operonu *lux* z bakterii *Photorhabdus luminescens* w chromosomie (Francis *i in.*, 2000). Bioluminescencja emitowana przez bakterie *S. aureus* pozwoliła na nieinwazyjne monitorowanie procesu kolonizacji i analizę efektywności aPDI u myszy w czasie rzeczywistym za pomocą systemu IVIS. W związku z tym, iż w modelu *ex vivo* dawka RB w stężeniu 35  $\mu\text{M}$  nie prowadziła do eradykacji komórek bakteryjnych, w modelu *in vivo* zwiększono stężenie fotouczulacza do 50  $\mu\text{M}$ .

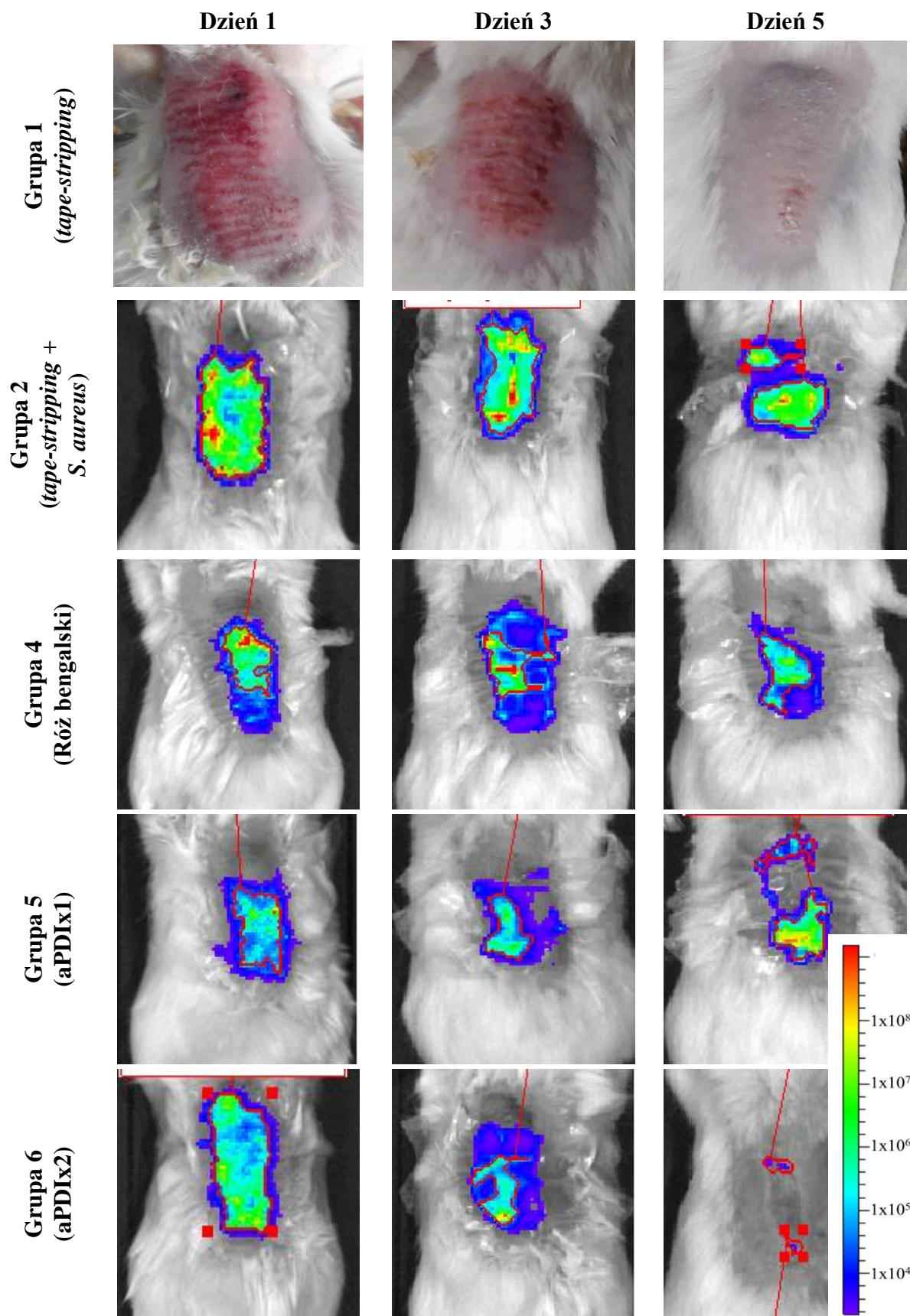
Analizie poddano następujące grupy badawcze:

1. Myszy poddane procedurze *tape-stripping*
2. Myszy poddane procedurze *tape-stripping*, skolonizowane *S. aureus*
3. Myszy poddane procedurze *tape-stripping*, skolonizowane *S. aureus*, poddane działaniu światła zielonego ( $\lambda_{\text{max}}=530\text{-}535\text{ nm}$ ,  $10,6\text{ mW/cm}^2$ ,  $6,36\text{ J/cm}^2$ )
4. Myszy poddane procedurze *tape-stripping*, skolonizowane *S. aureus*, poddane działaniu różu bengalskiego zaaplikowanego bezpośrednio na skórę w stężeniu 50  $\mu\text{M}$
5. Myszy poddane procedurze *tape-stripping*, skolonizowane *S. aureus*, poddane działaniu przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej (jednokrotne traktowanie)

6. Myszy poddane procedurze *tape-stripping*, skolonizowane *S. aureus*, poddane działaniu przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej (dwukrotne traktowanie) (Metody, 7.18.).

Zarówno jednokrotne działanie aPDI, (grupa 5), jak i dwukrotne traktowanie aPDI (grupa 6) prowadzi do statystycznie istotnego zmniejszenia kolonizacji *S. aureus*, co obserwowano poprzez zmniejszenie sygnału bioluminescencji (Ryc. 21, 22). Ponadto, wykazano, iż działanie samym różem bengalskim (50  $\mu$ M, grupa 4) nie wpływa na przeżywalność bakterii *S. aureus* a poziom sygnału bioluminescencji jest porównywalny do tego w grupie kontrolnej (grupa 2, *tape stripping* + *S. aureus*). W przypadku grupy 1, poddanej procedurze *tape-stripping* w pierwszym dniu eksperymentu zaobserwowano, że skóra jest intensywnie zaczerwieniona i podrażniona. W trzecim dniu widać pierwsze oznaki gojenia się skóry i zmniejszenie zaczerwienienia. Z kolei w ostatnim dniu eksperymentu skóra całkowicie się zagoiła, a zaczerwienienie ustąpiło (Ryc. 21). Takiego efektu nie wykazano dla grupy poddanej procedurze *tape-stripping* i skolonizowanej bakteriami *S. aureus* (grupa 2). Oznacza to, że bakterie *S. aureus* po kolonizacji skóry wpływają negatywnie na jej stan, a proces kolonizacji utrudnia gojenie wytworzonych ran.

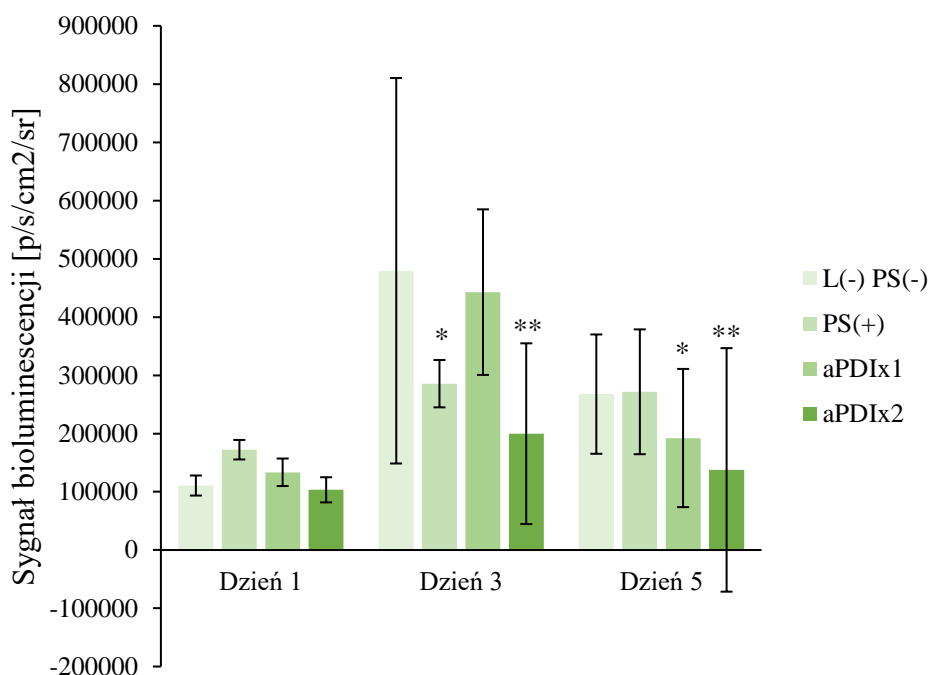
Podsumowując, traktowanie różem bengalskim ze światłem zielonym może stanowić skuteczną opcję terapeutyczną dla pacjentów z uszkodzeniami skóry, która jest kolonizowana bakteriami *S. aureus*. W przypadku pacjentów z AZS zmniejszenie stopnia kolonizacji umożliwi odbudowanie się warstwy naskórka i przywrócenie prawidłowego funkcjonowania skóry.



**Rycina 21. Monitorowanie sygnału bioluminescencyjnego w procesie kolonizacji mysiej skóry bakteriami *S. aureus*.** Przedstawiono reprezentatywne fotografie pomiaru bioluminescencji dla myszy z każdej badanej grupy doświadczalnej. Sygnał jest wyrażony jako foton/sekunde/cm<sup>2</sup>/steradian (p/s/cm<sup>2</sup>/sr). Grupa 1 przedstawia wizualny wygląd mysiej skóry poddanej wyłącznie procedurze *tape-*



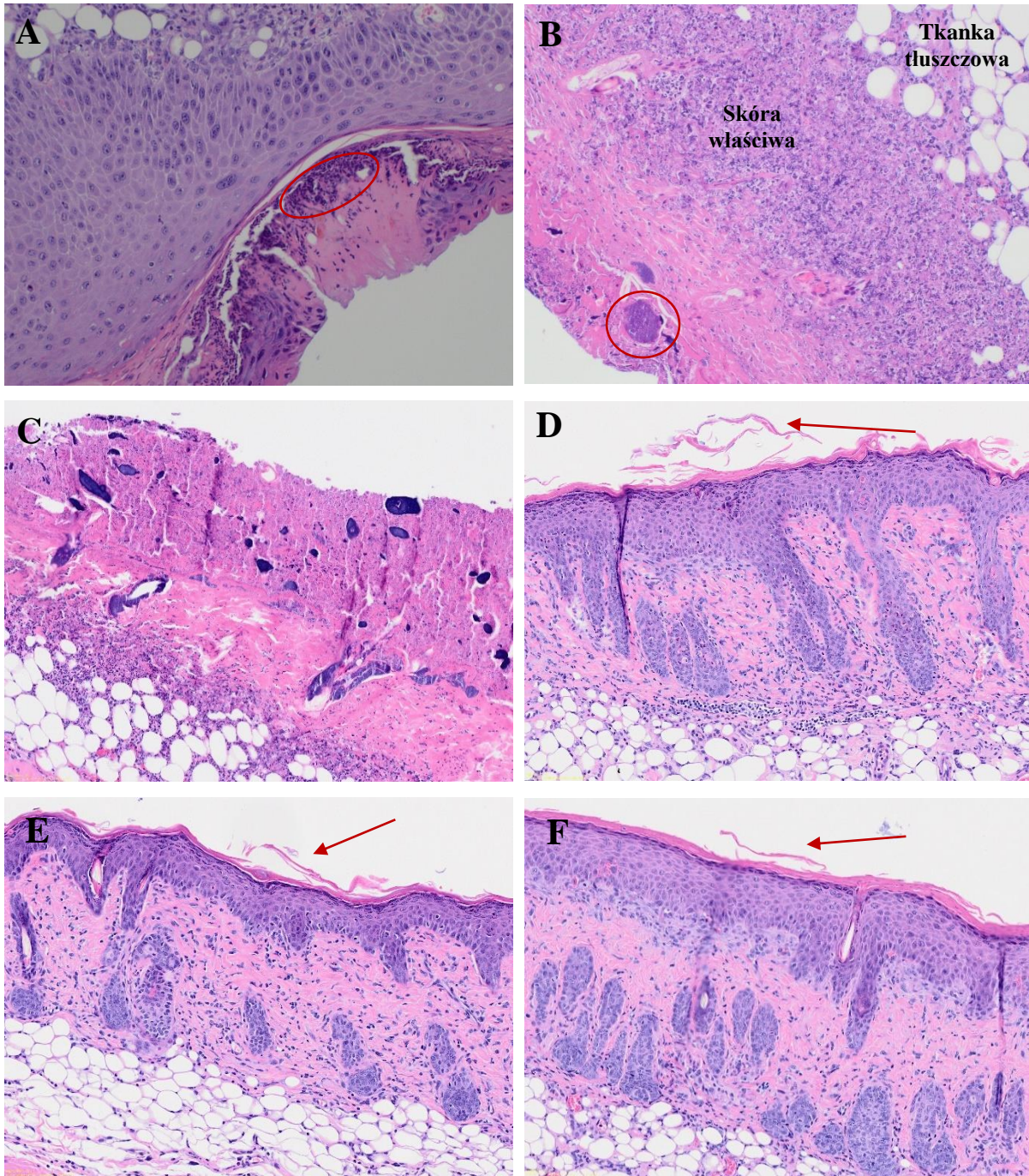
*stripping*. Grupa 2 – myszy poddane procedurze *tape-stripping* i skolonizowane *S. aureus*. Grupa 4 – myszy poddane procedurze *tape-stripping* i skolonizowane *S. aureus*, z zaaplikowanym na skórę różem bengalskim w stężeniu 50  $\mu\text{M}$ . Grupa 5 – myszy poddane procedurze *tape-stripping* i skolonizowane *S. aureus*, traktowane jednokrotnie aPDI ( $\lambda_{\text{max}}=530\text{-}535\text{ nm}$ ,  $10,6\text{ mW/cm}^2$ ,  $6,36\text{ J/cm}^2$ ,  $50\text{ }\mu\text{M RB}$ ). Grupa 6 – myszy poddane procedurze *tape-stripping* i skolonizowane *S. aureus*, podwójnie traktowane aPDI ( $\lambda_{\text{max}}=530\text{-}535\text{ nm}$ ,  $10,6\text{ mW/cm}^2$ ,  $6,36\text{ J/cm}^2$ ,  $50\text{ }\mu\text{M RB}$ ).



**Rycina 22. Sygnał bioluminescencyjny uzyskany z obszarów ROI (ang. *Region Of Interest*) skóry skolonizowanej przez *S. aureus*.** Sygnał jest wyrażony jako foton/sekundę/cm<sup>2</sup>/steradian (p/s/cm<sup>2</sup>/sr). Każdy słupek reprezentuje wartość średnią dla obszarów ROI w poszczególnych grupach myszy (n = 5). Słupki błędów pokazują średni błąd standardowy (SEM). Poziom istotności statystycznej w odniesieniu do kontroli (myszy poddane procedurze *tape-stripping* i skolonizowane *S. aureus*) \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . L(-) PS(-) – myszy poddane procedurze *tape-stripping* i skolonizowane *S. aureus*; PS(+) – myszy poddane procedurze *tape-stripping* i skolonizowane *S. aureus*, poddane działaniu różu bengalskiego (50  $\mu\text{M}$ ) zaaplikowanego bezpośrednio na skórę; aPDIx1 - myszy poddane procedurze *tape-stripping* i skolonizowane *S. aureus*, poddane pojedynczemu traktowaniu aPDI (50  $\mu\text{M}$ ,  $10,6\text{ mW/cm}^2$ ,  $6,36\text{ J/cm}^2$ ); aPDIx2 - myszy poddane procedurze *tape-stripping* i skolonizowane *S. aureus*, poddane sekwencyjnemu działaniu aPDI (50  $\mu\text{M}$ ,  $10,6\text{ mW/cm}^2$ ,  $6,36\text{ J/cm}^2$ ).

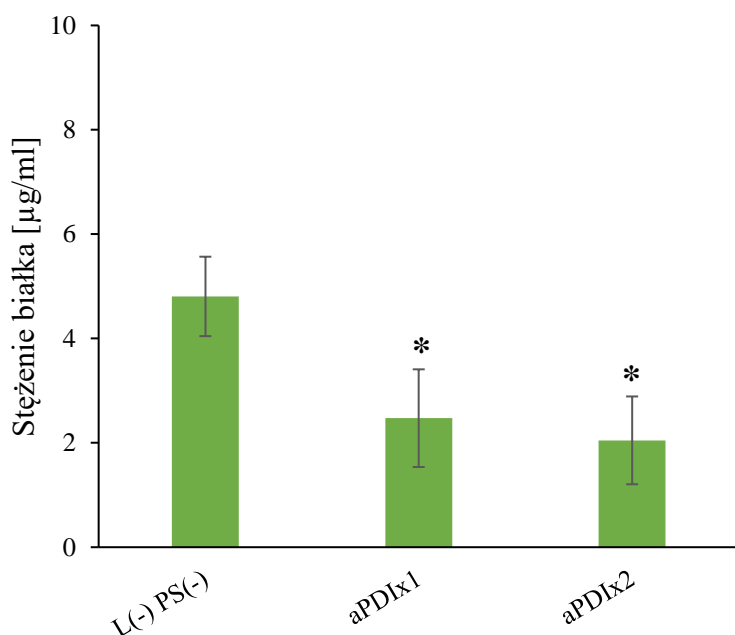
W obrazie histopatologicznym skóry w grupie myszy poddanych wyłącznie procedurze *tape-stripping* (Ryc. 23A) zaobserwowano stan zapalny w postaci wysięku ze znaczną liczbą neutrofilów na powierzchni naskórka. Obecność naskórka w obrazie histopatologicznym potwierdza wcześniejsze obserwacje wizualne mysiej skóry, iż doszło do procesu gojenia i odbudowy warstwy naskórka. Z kolei w grupie poddanej procedurze *tape-stripping* i skolonizowanej bakteriami *S. aureus* (Ryc. 23B) widać wyraźnie negatywny wpływ bakteryjnej kolonizacji na skórę. Obserwuje się duże skupiska bakterii i całkowity brak naskórka (usunięty przez procedurę *tape-stripping*). Ponadto stan zapalny jest bardzo

zaostrzony, naciek z neutrofilów prowadzi do zniszczenia znacznej części skóry właściwej. Naciek obserwowany jest również w warstwie tkanki tłuszczowej. Działanie samym światłem zielonym, czy podanie rózu bengalskiego na skórę w wysokim stężeniu (50  $\mu$ M) nie prowadzi do powstania dodatkowych zmian patologicznych. Oznacza to, że zastosowana dawka światła, czy wysokie stężenie fotouczulacza są bezpieczne dla skóry i nie pogłębiają istniejącego już procesu zapalnego (Ryc. 23C i D). Natomiast u myszy poddanych pojedynczemu (Ryc. 23E) i podwójnemu traktowaniu aPDI (Ryc. 23F) nie zaobserwowano oddzielenia naskórka od skóry właściwej, powierzchniowa warstwa naskórka jest wyraźnie uszkodzona, natomiast brak jest nacieku zapalnego. Oba obrazy histopatologiczne są bardzo podobne, natomiast zauważono, że podwójne traktowanie aPDI prowadzi do zmniejszenia liczby neutrofilów w skórze właściwej w porównaniu do grupy poddanej pojedynczemu traktowaniu aPDI (Ryc. 23E). Pomimo tego, liczba neutrofilów jest nadal na tyle liczna, by skutecznie neutralizować bakterie *S. aureus*. Zarówno pojedyncze, jak i podwójne traktowanie aPDI jest bezpieczne dla mysiej skóry i nie pogłębia istniejących zmian patologicznych.



**Rycina 23. Obraz histologiczny mysiej skóry poddanej procedurze *tape-stripping* i skolonizowanej *S. aureus*.** Próby do badań zostały pobrane w 5-tym dniu doświadczenia (po zakończeniu procesu obrazowania w systemie IVIS), utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie. Próbkę wybarwiono hematoxyliną i eozyną, a w celu zobrazowania obecności komórek bakteryjnych, roztworem fioletu krystalicznego. A – skóra poddanej procedurze *tape-stripping* (pow. 20x) (kolorem zaznaczono obecność neutrofilów); B – skóra poddanej procedurze *tape-stripping* i skolonizowana przez *S. aureus* (pow. 10x) (na fotografii zaznaczono skupisko bakterii *S. aureus*, a także warstwę skóry właściwej z naciekiem z neutrofilów i warstwę tkanki tłuszczowej); C – skóra poddanej procedurze *tape-stripping*, skolonizowana przez *S. aureus*, naświetlana światłem zielonym (pow. 10x); D – skóra poddanej procedurze *tape-stripping*, skolonizowana przez *S. aureus*, z zaaplikowanym bezpośrednio na skórę różem bengalskim (pow. 10x); strzałką zaznaczono uszkodzoną powierzchniową warstwę naskórka; E i F – skóra poddanej procedurze *tape-stripping*, skolonizowana przez *S. aureus*, poddana jednokrotnemu traktowaniu aPDI (E), bądź dwukrotnemu traktowaniu aPDI (F) (pow. 10x); strzałką zaznaczono uszkodzoną powierzchniową warstwę naskórka.

Ostatnim etapem badań *in vivo* był pomiar ilości białka enterotoksyny A (SEA) z wymazów pobranych ze skóry myszy. Celem doświadczenia było zbadanie wpływu aPDI na poziom białka enterotoksyny A w modelu *in vivo*. Z pobranych od myszy wymazów ze skóry wykonano lizaty, w których analizowano obecność enterotoksyny SEA przy pomocy techniki Western Blot (Metody, 7.18.). Wyniki przedstawiono w postaci wartości średniej ilości białka z prób pozyskanych od pięciu myszy (Ryc. 24).



**Rycina 24. Zestawienie stężeń białka enterotoksyny A (SEA) po traktowaniu aPDI (róż bengalski ze światłem zielonym) na mysim modelu kolonizacji skóry przez *S. aureus*.** Przedstawione wyniki są wartością średnią  $\pm$  błąd standardowy z wymazów pobranych ze skóry myszy ( $n = 5$ ). Wymazy pobierano od myszy skolonizowanych *S. aureus* i nie poddanych działaniu aPDI [L(-)PS(-)], myszy poddanych pojedynczemu traktowaniu aPDI (aPDIx1, 50  $\mu$ M RB, 10,6 mW/cm<sup>2</sup>, 6,36 J/cm<sup>2</sup>) oraz od myszy poddanych sekwencyjnemu działaniu aPDI (aPDIx2, 50  $\mu$ M RB, 10,6 mW/cm<sup>2</sup>, 6,36 J/cm<sup>2</sup>). Poziom istotności statystycznej w odniesieniu do prób pobranych od myszy skolonizowanych *S. aureus* i nie poddanych działaniu aPDI \* $p < 0,05$ .

Do analizy włączono 3 grupy: grupę kontrolną (myszy poddane procedurze *tape-stripping* i skolonizowane *S. aureus*), myszy poddane pojedynczemu traktowaniu aPDI i myszy poddane podwójnemu traktowaniu aPDI. Zaobserwowano, iż w grupie kontrolnej ilość białka jest produkowana na porównywalnym poziomie, jak w przypadku badań *in vitro* oraz *ex vivo*. Wykazano, że kolejne traktowania aPDI prowadzą do statystycznie istotnego obniżenia ilości białka enterotoksyny A (SEA) [L(-) PS(-): 4,8  $\mu$ g/ml; aPDIx1: 2,47  $\mu$ g/ml; aPDIx2: 2,05  $\mu$ g/ml] (Ryc. 24). Oznacza to, że metoda aPDI jest w stanie skutecznie obniżać ilość białka SEA produkowanego przez *S. aureus* w zastosowanym modelu *in vivo*.

## 9. Dyskusja

### 9.1. Struktura genetyczna *S. aureus* w populacji polskiej pacjentów z AZS jest charakterystyczna dla ogólnej populacji szczepów MSSA w Europie

Wielu badaczy zwraca uwagę na toksyny gronkowcowe (ang. *staphylococcal enterotoxins*) jako czynniki, które nasilają i zaostrzają stan zapalny skóry u pacjentów z AZS (Bunikowski *i in.*, 2000, Taskapan i Kumar, 2000, Yarwood *i in.*, 2000, Zollner *i in.*, 2000). Z danych literaturowych wynika, że 53-71% szczepów *S. aureus* wyizolowanych od pacjentów z AZS posiada geny toksyn z grupy gronkowcowych enterotoksyn (SEs) i ten odsetek jest znacznie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną zdrowych nosicieli (20-33%) (Bunikowski *i in.*, 2000, Mempel *i in.*, 2003, Nada *i in.*, 2012, Zollner *i in.*, 2000). Powyższa obserwacja jest zgodna z danymi uzyskanymi w ramach przedstawianej rozprawy doktorskiej. W badanej kolekcji szczepów od pacjentów z AZS, 64,7% posiadało geny 5 badanych toksyn (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *tst*), podczas gdy w grupie kontrolnej szczepów pochodzących od pacjentów bez cech atopii odsetek ten wynosił 46,2% (Wyniki, 8.1.). Niestety nie wszystkie opublikowane dotąd prace włączają do analizy grupę kontrolną, przez co nie uzyskujemy danych dotyczących dystrybucji genów toksyn w izolatach pochodzących od zdrowych nosicieli bez cech atopii, zbieranych w tym samym czasie. Z danych literaturowych wynika, że szczepy *S. aureus* pochodzące od pacjentów z AZS mogą posiadać więcej niż jeden gen toksyny (Na *i in.*, 2012, Schlievert *i in.*, 2008). Podobną tendencję zaobserwowano w analizowanej, w ramach przedstawianej rozprawy, kolekcji szczepów (Wyniki, 8.1.). Zjawisko to nadal nie zostało w pełni wyjaśnione. Wiadomo, że obecność więcej niż jednego genu toksyny przekłada się na zwiększoną wirulencję szczepu. Skutkuje to tym, iż połączenie wielu czynników zjadliwości definiuje zdolność *S. aureus* do wywoływania choroby i jej przebiegu. Potwierdzają to badania grupy izolatów od pacjentów ze steroidooporną postacią AZS, gdzie obecność dużej liczby genów toksyn w szczepach *S. aureus* prowadzi do braku odpowiedzi na immunosupresyjne działania kortykosteroidów ze strony organizmu pacjenta (Schlievert *i in.*, 2008). Co ciekawe, w grupie kontrolnej pacjentów bez cech atopii występowały szczepy, które posiadały wyłącznie jeden gen toksyny spośród pięciu badanych. Natomiast w szczepach *S. aureus* z grupy kontrolnej (pacjenci bez cech atopii) nie można wykluczyć obecności innych genów toksyn, których w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej nie badano.

Z danych literaturowych wynika, iż obecność genów toksyn koreluje z nasileniem objawów zapalnych u pacjentów z AZS (Breuer *i in.*, 2002, Bunikowski *i in.*, 2000, Tomi *i in.*,

2005, Zollner *i in.*, 2000). W przypadku analizowanej kolekcji izolatów, nie dysponowano danymi klinicznymi pacjentów, co uniemożliwiło weryfikację tej zależności.

Zagadnienie rozkładu genów kodujących toksyny w szczepach wyizolowanych od osób z AZS zostało szeroko omówione w pracy przeglądowej w oparciu o dane publikowane na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat (Ogonowska *i in.*, 2021). Z przedstawionych w tej pracy przeglądowej danych literaturowych wynika, że w oparciu o klasyczne metody typowania molekularnego nie wskazano jak dotąd charakterystycznego profilu dystrybucji genów badanych toksyn w populacji izolatów od pacjentów z AZS. W przypadku przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej analiz wykazano, że dominującymi genami toksyn identyfikowanymi w badanej populacji były *sec* i *sea*, zarówno w grupie dorosłych jak i dzieci z AZS, a także w próbach ze skóry i jamy nosowo-gardłowej (Wyniki, 8.1.). Dystrybucja genów toksyn w przedstawionej w niniejszej pracy populacji okazała się najbardziej spójna z tą obserwowaną dla populacji niemieckiej, potwierdzając tym samym doniesienia literaturowe o zależności geograficznej w dystrybucji poszczególnych genów. Z kolei biorąc pod uwagę wyniki z krajów europejskich znacznie oddalonych od Polski, wśród populacji hiszpańskiej przeważał gen *tst*, natomiast w portugalskiej, gen *seg*. Natomiast wśród populacji z USA dominował gen *tst* i *sei*, w Tajwanie gen *seb*, a w Singapurze gen *seb* i *egc* (Tab. 16). Należy podkreślić, iż przytoczone w tab. 16 prace opierały się na analizie wyłącznie wybranych genów toksyn.

**Tabela 16. Dystrybucja genów toksyn u pacjentów z AZS w wybranych krajach.**

Kraj	Najczęściej wykrywany gen	Pochodzenie izolatu	Badana populacja	Literatura
Niemcy	<i>sea, sec sea</i>	Wymaz za skóry Wymaz ze skóry	Dzieci Dorośli	(Bunikowski <i>i in.</i> , 2000) (Breuer <i>i in.</i> , 2002)
Hiszpania	<i>tst</i>	Wymaz ze skóry i jamy nosowo-gardłowej	Dzieci	(Gilaberte <i>i in.</i> , 2015)
Portugalia	<i>seg</i>	Wymaz ze skóry	Dzieci Dorośli	(Soares <i>i in.</i> , 2013)
USA	<i>tst, sei</i>	Wymaz ze skóry	Dorośli	(Schlievert <i>i in.</i> , 2008)
Tajwan	<i>seb</i>	Wymaz z jamy nosowo-gardłowej	Dzieci	(Lo <i>i in.</i> , 2010)
Singapur	<i>seb, egc</i>	Wymaz ze skóry i jamy nosowo-gardłowej	Dzieci Dorośli	(Chiu <i>i in.</i> , 2009)

Typowanie molekularne izolatów *S. aureus* pozwala zrozumieć ich strukturę genetyczną, poznać dystrybucję, a co za tym idzie ich znaczenie jako czynnika zaostrzającego i pogarszającego przebieg atopowego zapalenia skóry. Z obecnych badań wynika, iż populacja *S. aureus* jest na tyle zmienna i różnorodna (również geograficznie), iż nie jest możliwe wyróżnienie jednego, przeważającego kompleksu klonalnego, czy typu *spa*, który można powiązać z AZS. W analizowanej grupie izolatów od pacjentów z AZS zidentyfikowano 18 kompleksów klonalnych i 43 typy *spa* (Wyniki, 8.2.). Kompleks CC7 (t091), który był najczęściej reprezentowany w badanej populacji polskiej, w populacjach pacjentów z AZS z innych krajów europejskich był identyfikowany na znacznie niższym poziomie lub wcale (Tab. 17).

**Tabela 17. Kompleksy klonalne zidentyfikowane w izolatach *S. aureus* wrażliwych na metycylinę (MSSA) od pacjentów z AZS w europejskiej populacji.**

Kraj	CC1	CC5	CC7	CC8	CC15	CC30	CC45	Literatura
Polska	2,9%	0,7%	25,9%	3,6%	9,4%	6,5%	18%	(Ogonowska <i>i in.</i> , 2022, w przygotowaniu)
Hiszpania	3,1%	31,2%	-	6,2%	18,7%	18,7%	15,6%	(Rojo <i>i in.</i> , 2014)
Hiszpania	-	11,5%	-	11,5%	15,4%	11,5%	11,5%	(Benito <i>i in.</i> , 2016)
Dania	22%	10%	7%	-	19%	7%	15%	(Clausen <i>i in.</i> , 2017)
Dania	23%	7%	5%	6%	19,6%	8%	13,8%	(Edslev <i>i in.</i> , 2018)
Irlandia	20,5%	13,6%	7%	13,6%	7%	7%	15,9%	(Fleury <i>i in.</i> , 2017)
Wielka Brytania	6%	6%	-	-	17%	61%	6%	(Harkins <i>i in.</i> , 2018)

Z kolei badania szczepów *S. aureus* z europejskiej populacji pacjentów z AZS jako dominujące wskazują kompleksy CC1, CC5, CC8, CC15, CC30 i CC45 (Tab. 17). Okazuje się, że wymienione kompleksy są charakterystyczne dla ogólnej populacji szczepów *S. aureus* wrażliwych na metycylinę (MSSA) w Europie, jakkolwiek częstość ich występowania może się różnić (Argudín *i in.*, 2009, Holtfreter *i in.*, 2007). Typy *spa* t015 (CC45), t084 (CC15) i t091 (CC7) są obserwowane z największą częstością wśród szczepów MSSA w krajach europejskich (Grundmann *i in.*, 2010). Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie są zgodne z dotychczas opublikowanymi doniesieniami o heterogennej strukturze populacji *S. aureus* pochodzących od pacjentów z AZS (Clausen *i in.*, 2019, van Mierlo *i in.*, 2021, Yeung *i in.*, 2011).

Przytoczone w tab. 17 badania podają kompleksy CC1 i CC5, jako jedne z najczęściej obserwowanych wśród izolatów MSSA od pacjentów z AZS. Z kolei w opisanych w niniejszej rozprawie izolatach od pacjentów z AZS, te kompleksy są reprezentowane najrzadziej [CC1 – 4 izolaty (3%); CC5 – 1 izolat (0,8%)] (Wyniki, 8.2.). Nieliczne dane literaturowe wskazują na występowanie kompleksu CC7, jak również CC9 i CC59 wyłącznie w grupie izolatów od pacjentów z AZS, natomiast nie zostały zidentyfikowane w grupie kontrolnej (nosiciele *S. aureus* w jamie nosowo-gardłowej) (Harkins *i in.*, 2018). Ponadto, kompleks CC7 jak dotąd nie został wskazany w żadnej pracy dotyczącej typowania molekularnego izolatów *S. aureus* od pacjentów z AZS jako dominujący. Okazuje się, że kompleks CC7 jest jednym z głównych w europejskiej populacji, jak również jednym z najczęściej obserwowanych w grupie szczepów *S. aureus* wywołujących inwazyjne zakażenia u pacjentów pediatrycznych w Polsce (Ilczyszyn



*i in.*, 2016). Warto zwrócić uwagę na fakt, iż badane w ramach niniejszej rozprawy szczepy od pacjentów z AZS zostały przyporządkowane do kompleksu CC7 z 4-krotnie wyższą częstotliwością w porównaniu do szczepów wyizolowanych z krwioobiegu (22,5% vs. 5,3%), czy izolatów od zdrowych nosicieli (22,5% vs. 5,8%) (Grundmann *i in.*, 2014, Holtfreter *i in.*, 2016). Z kolei kompleks CC97, będący czwartym najliczniejszym w analizowanej grupie szczepów od pacjentów z AZS był identyfikowany u zwierząt (głównie bydła i trzody chlewnej) i często był odpowiedzialny za zapalenie wymion u bydła (Gómez-Sanz *i in.*, 2010, Rabello *i in.*, 2007). Inne badania wskazały, że izolaty, które przynależą do kompleksu CC97 są w stanie przenosić się ze zwierząt na ludzi, potwierdzając takie przypadki wśród pacjentów z Wielkiej Brytanii i USA (Chung *i in.*, 2004, Sung *i in.*, 2008). Dogłębna analiza filogenetyczna wskazała, iż klon CC97 pierwotnie pochodzi od zwierząt. Natomiast pojawienie się tego klonu wśród ludzi i wywoływanie u nich infekcji wiąże się z umiejętnością przekraczania bariery gatunkowej i zdolnościami adaptacyjnymi bakterii pozyskanymi na drodze horyzontalnego transferu genów (Spoor *i in.*, 2013).

Niewiele jest danych na temat powiązania kompleksów klonalnych z objawami klinicznymi AZS. Z danych literaturowych wynika, iż kompleks CC30 wiąże się z zapaleniem wsierdza, natomiast nie zaobserwowano wyraźnych korelacji w AZS czy innymi chorobami (Nienaber *i in.*, 2011). Natomiast istnieje powiązanie między częstszym wykrywaniem kompleksu CC1 u pacjentów z AZS posiadających mutację w genie filagryny (Clausen *i in.*, 2017). Dodatkowo wskazano, że kompleksy CC5 i CC45 były częściej wykrywane wśród szczepów izolowanych od dzieci z ciężkim przebiegiem AZS w hiszpańskiej populacji (Benito *i in.*, 2016). Z kolei w przypadku kolekcji szczepów opisanej w ramach tej rozprawy doktorskiej szukanie powiązań pomiędzy konkretnym kompleksem klonalnym, a objawami klinicznymi AZS jest niemożliwe z uwagi na brak danych pacjentów dotyczących historii chorób, czy objawów nasilenia AZS w skali SCORAD.

Przedśionek nosa uważany jest za potencjalny rezerwuar *S. aureus*, przyczyniający się do rekolonizacji skóry (Patel *i in.*, 2001). W przedstawionej rozprawie spośród 58 par szczepów *S. aureus* wyizolowanych od pacjentów z AZS (skóra i jama nosowo-gardłowa), 36 z nich posiadały takie same typy *spa* w parze (rozd. 8.2.), co jest zgodne z opublikowanymi dotychczas doniesieniami i wskazuje na autotransmisję (Hoeger, 2004, Masiuk *i in.*, 2021, van Mierlo *i in.*, 2021). Pozostałe 23 pary izolatów charakteryzowały się odmiennymi typami *spa* (rozd. 8.2.). Podobne obserwacje zostały opublikowane w 2021 roku. Zhao i wsp. zauważyli, że nie tylko szczepy *S. aureus* pobrane od tego samego pacjenta ze skóry i przedśionka nosa różnią się typem *spa*, ale także pojawiały się różne typy *spa* u izolatów pobranych z różnych

miejsce na skórze od tego samego pacjenta. Co więcej, pobrane izolaty różniły się nie tylko w typowaniu molekularnym, ale również profilem lekooporności, tworzeniem biofilmu, aktywnością hemolityczną i zdolnością adhezji do komórek nabłonka (Zhao *i in.*, 2021). Wskazuje to na fakt, iż szczepy *S. aureus* zlokalizowane na skórze nie rozprzestrzeniają się wyłącznie z jamy nosowo-gardłowej.

Aby pogłębić dotychczas zebrane informacje o strukturze genetycznej szczepów *S. aureus* od pacjentów z AZS należałoby w przyszłości poszerzyć analizy o bardziej zaawansowaną technikę, jaką jest sekwencjonowanie całego genomu (WGS, ang. *Whole Genome Sequencing*). Metodę tą cechuje wysoki potencjał dyskryminujący, co umożliwia zbadanie różnicowania, adaptacji i dróg transmisji bakterii w obrębie gospodarza w procesie kolonizacji. Dodatkowo jest to użyteczne narzędzie do prześledzenia dróg rozprzestrzeniania się danych klonów, czy pochodzenia wielolekoopornych szczepów (Didelot *i in.*, 2016, Kwong *i in.*, 2015). Dotychczas opublikowane badania z zastosowaniem techniki WGS umożliwiły prześledzenie klonów *S. aureus* w trakcie zaostrzenia AZS, zmienności klonalnej podczas trwania AZS, różnic w dynamice populacji *S. aureus* i *S. epidermidis* od pacjentów z AZS zarówno na poziomie gatunku, jak i szczepu (Byrd *i in.*, 2017, Kong *i in.*, 2012). Takie podejścia badawcze pojawiają się w literaturze, jednak nadal na niewielką skalę ze względu na wysoki koszt analiz, brak międzynarodowych baz danych i ogólnodostępnych narzędzi bioinformatycznych (Harkins *i in.*, 2018).

Podsumowując, szczepy *S. aureus* wyizolowane od pacjentów z AZS charakteryzują się wysoką różnorodnością pod względem genetycznym. Dodatkowo przynależność szczepów do CC7, najliczniejszego kompleksu w badanej grupie świadczy o zdolności *S. aureus* do dostosowywania się i przetrwania w danych warunkach (np. na skórze atopowej). Niemniej jednak nie można wykluczyć istnienia specyficznych genotypów *S. aureus* (na poziomie genów, czy polimorfizmów genów), które mogą odpowiadać za określony obraz kliniczny (np. infekcję skóry atopowej).

## **9.2. Róż bengalski jest odpowiednim fotouczulaczem do zastosowań *in vivo***

Traktowanie izolatów *S. aureus* (zarówno klinicznych, jak i referencyjnych) za pomocą aPDI (rózu bengalskiego wzbudzanego światłem zielonym) prowadzi do eradykacji komórek bakteryjnych (spadek przeżywalności ponad 3 log<sub>10</sub>, czyli ponad 99,9%, Wyniki, 8.3.). Tak wysoka efektywność wynika z właściwości biofizycznych zastosowanego fotouczulacza. Róż bengalski jest fotouczulaczem anionowym o lipofilowym charakterze. Dane literaturowe

sugerują, że RB jest efektywnie akumulowany przez komórki bakteryjne nie poprzez prostą dyfuzję, a za pośrednictwem aktywnego transportu i poprzez oddziaływania elektrostatyczne (Cieplik *i in.*, 2014, George *i in.*, 2009). Z danych literaturowych wynika, iż fotouczulacze anionowe i obojętne skutecznie wiążą się z powierzchnią Gram-dodatnich bakterii, a tym samym hamują ich wzrost, bądź prowadzą do ich eradykacji w wyniku działania aPDI (Maisch *i in.*, 2004). Ponadto RB cechuje wysoki potencjał generowania tlenu singletowego ( $^1\text{O}_2$ ) w polarnych rozpuszczalnikach (np. w wodzie) o wysokiej wydajności kwantowej rzędu 0,75-0,76 (Alarcón *i in.*, 2009, Gandin *i in.*, 1983, Redmond i Gamlin, 1999).

Istotną obserwacją, wynikającą z przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej doświadczeń jest fakt, iż aPDI w oparciu o RB prowadzi do eradykacji nie tylko szczepów *S. aureus*, u których nie zidentyfikowano genów toksyn, ale również tych, u których wykryto obecność genów toksyn. Wyniki te pozostają w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami, w których wykazano wysoką efektywność pochodnej porfiryny [tetrajodek 5,10,15,20-tetrakis(1-metylopirydinium-4-ylo) porfiryny, Tetra-Py<sup>+</sup>-Me] wzbudzonej białym światłem (380-700 nm, 40 W/m<sup>2</sup>) zarówno wobec szczepów *S. aureus* posiadających, jak i takich, u których nie zidentyfikowano obecności genów toksyn. Jednakże badacze analizowali efektywność pochodnej porfiryny wyłącznie wobec czterech szczepów *S. aureus*, u których stwierdzono obecność genów toksyn (Bartolomeu *i in.*, 2016). Możliwość eradykacji izolatów posiadających geny toksyn to ważny wniosek z punktu widzenia zastosowania aPDI wobec wysoce wirulentnych szczepów *S. aureus*.

Na podstawie wyników testu MTT stwierdzono, że warunki traktowania fotodynamicznego wykorzystywane w doświadczeniach (Wyniki, 8.4.) przedstawionych w tej rozprawie doktorskiej są bezpieczne dla ludzkich keratynocytów. Nie powodują efektu fototoksycznego względem komórek HaCaT, jak i HaCaT z wyciszoną ekspresją genu filagryny (Wyniki, 8.4.). Z kolei monitorowanie wzrostu komórek w systemie xCELLigence wykazało istotny hamujący wpływ aPDI na dynamikę wzrostu badanych linii komórkowych (Wyniki, 8.5.). Badane linie były jednak w stanie wznowić podziały, chociaż w przypadku linii *FLG* shRNA, czyli z wyciszoną ekspresją genu kodującego filagrynę, było to obserwowane na bardzo niskim poziomie (Ryc. 11, panel A).

Filagryna (FLG) to białko naskórkowe, odpowiedzialne za nawilżenie i utrzymanie homeostazy naskórka (O'Regan i Irvine, 2008). Mutacje w genie filagryny u pacjentów z AZS prowadzą do zaostrzenia procesu zapalnego, a także do zwiększonej kolonizacji *S. aureus* (Brown i McLean, 2012, Clausen *i in.*, 2017). Stąd też komórki z wyciszoną ekspresją genu filagryny wydają się dobrym modelem do badań związków, które potencjalnie mogłyby być

stosowane miejscowo u pacjentów z AZS. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach tej pracy doktorskiej po raz pierwszy pokazały różnicę w odpowiedzi na traktowanie fotodynamiczne zależną od obecności filagryny. Co prawda zastosowana linia komórkowa (*FLG* shRNA) była linią o obniżonej ilości filagryny, a nie linią typu „knock-out”, niemniej jednak właściwości tej linii były wystarczające, aby zaobserwować różny efekt cyto- i fototoksyczny po działaniu fotodynamicznym. W doświadczeniach opisanych w ramach tej pracy doktorskiej, wykorzystana linia była hodowana jako pojedyncza warstwa komórek. Natomiast niezwykle ciekawym wydaje się różnicowanie (stratyfikacja) komórek w hodowli jednowarstwowej linii *FLG* shRNA do wielowarstwowej struktury tzw. ekwiwalentów skórnych, które lepiej odzwierciedlałyby fizjologiczną strukturę naskórka. W związku z opóźnioną dynamiką podziałów linii *FLG* shRNA po traktowaniu aPDI w stosunku do pozostałych badanych linii komórkowych, należy ten aspekt wziąć pod uwagę przy opracowywaniu ewentualnych terapii. W przyszłości warto rozszerzyć badania cyto- i fototoksyczności o modele oparte na pierwotnych liniach komórkowych pochodzących od pacjentów z AZS, posiadających mutacje w genie filagryny. Do analizy szczególnie należałoby włączyć cztery najbardziej rozpowszechnione w europejskiej populacji mutacje – R501X, 2282del4, S3247X i R2447X (Sandilands *i in.*, 2007).

Drugim związkiem stosowanym w badaniach przedstawionych w pracy doktorskiej był nowy błękit metylenowy (NMB), który wykazuje lipofilowy charakter i wysoką wydajność generowania tlenu singletowego (Phoenix *i in.*, 2003). Dotychczas wykazano skuteczność działania NMB w warunkach *in vitro* wobec bakterii Gram-ujemnych (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*), Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*) i grzybów (*Candida albicans*) (Dai *i in.*, 2011, Phoenix *i in.*, 2003, Ragàs *i in.*, 2010, Wainwright *i in.*, 1998). Phoenix i wsp. wykazali, że NMB charakteryzuje wysoka toksyczność w ciemności (62,5  $\mu\text{M}$  dla *Escherichia coli* i 10  $\mu\text{M}$  dla *Staphylococcus aureus*) (Phoenix *i in.*, 2003). Z opisanych w niniejszej rozprawie testów toksyczności (test MTT, Metody, 7.5.) wynika, iż NMB w stężeniu 5  $\mu\text{M}$  jest wysoce cyto- i fototoksyczny względem wszystkich testowanych linii komórkowych – HaCaT, HaCaT z wyciszoną ekspresją w genie filagryny (*FLG* shRNA) i linią komórek kontrolnych (Ctrl shRNA) (Wyniki, 8.4.). Ponadto dynamika wzrostu monitorowana przez system xCELLigence potwierdziła wyniki testów MTT i wskazała, iż komórki poddane działaniu aPDI (NMB i światło czerwone) ulegają fotouszkodzeniu i nie są w stanie kontynuować wzrostu (Wyniki, 8.5.). Tanaka i wsp. opublikowali wyniki badania świadczące o wysokiej toksyczności NMB wobec neutrofilii. Zastosowanie 20  $\mu\text{M}$  NMB i naświetlenie lampą ksenonową ( $\lambda_{\text{max}}=635 \pm 15 \text{ nm}$ , 20  $\text{mW/cm}^2$ , 5  $\text{J/cm}^2$ ) doprowadziło do spadku

przeżywalności neutrofilii o 50%. Natomiast zaaplikowanie 4-krotnie wyższej dawki światła ( $20 \text{ J/cm}^2$ ) spowodowało, że poziom przeżywalności neutrofilii osiągnął zaledwie 15% (Tanaka *i in.*, 2012). Z kolei wyniki badań *in vivo* wskazały wysoką skuteczność terapeutyczną NMB ze światłem czerwonym ( $\lambda_{\text{max}}=628 \text{ nm}$ ,  $32,5 \text{ mW/cm}^2$ ,  $78 \text{ J/cm}^2$ ) wobec *Candida albicans* w leczeniu infekcji skóry. Zaaplikowanie samego związku NMB w stężeniu  $400 \mu\text{M}$  na mysią skórę nie spowodowało spadku sygnału bioluminescencji emitowanego przez drożdżaka *Candida albicans*. Brakuje jednak informacji o wpływie tak wysokiego stężenia fotouczulacza na skórę w obrazie histopatologicznym (Dai *i in.*, 2011). Podsumowując, ze względu na wysoką toksyczność względem komórek eukariotycznych, NMB nie został wykorzystany w badaniach *in vivo* na mysim modelu kolonizacji skóry przez *S. aureus* przedstawionym w niniejszej pracy.

### 9.3. Wybór genu referencyjnego

Dobór stabilnego genu referencyjnego jest kluczową kwestią w przypadku wyznaczenia względnego poziomu ekspresji badanego genu. Dotychczas wykazano, iż do analizy ekspresji genów odpowiadających za wielolekooporność *S. aureus* poddanych działaniu berberyny, najbardziej stabilne geny referencyjne to *fabD*, *proC* i *pyk*, fioletem krystalicznym bądź rodaminą 6G – *rho*, *pyk* i *proC*, etydyną – *fabD*, *tpiA* oraz *gyrA* (Theis *i in.*, 2007). Z kolei do badania ekspresji genów enterotoksyn *S. aureus* pod wpływem stresu osmotycznego i kwasowego w pożywce bogatej w składniki odżywcze, najbardziej stabilnymi genami referencyjnymi były *rplD*, *rpoB*, *gyrB* i *rho* (Sihto *i in.*, 2014). Dodatkowo opublikowano pracę dotyczącą badania ekspresji genów odpowiedzialnych za tworzenie biofilmu u *Candida albicans* po traktowaniu aPDI, w której pokazano, że w zależności od zastosowanego fotouczulacza i źródła światła, różne geny referencyjne okazują się być stabilne w danych warunkach (błękit metylenowy z czerwonym światłem – gen *rip1*; erytrozyna z zielonym światłem – gen *lsc2*) (Freire *i in.*, 2018). W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach wykazano, iż najbardziej stabilnymi genami referencyjnymi w warunkach traktowania różem bengalskim ze światłem zielonym są *ftsZ* (podział komórki) i *gmk* (metabolizm nukleotydów), natomiast dla traktowania z zastosowaniem nowego błękitu metylenowego i światła czerwonego – *fabD* (biosynteza kwasów tłuszczowych), *ftsZ* i *proC* (biosynteza aminokwasów) (Wyniki, 8.6.). Biorąc powyższe obserwacje pod uwagę można stwierdzić, że różne geny referencyjne są stabilne w różnych warunkach eksperymentalnych i w związku z tym należy przeprowadzać dokładną analizę ich stabilności z wykorzystaniem dostępnych programów (BestKeeper, geNorm, NormFinder). Co więcej, zastosowanie więcej niż jednego genu

referencyjnego pozwala na uzyskanie wysoce dokładnych i wiarygodnych wyników (Vandesompele *i in.*, 2002).

Obecnie najpopularniejszym genem referencyjnym stosowanym w analizach ekspresji jest gen *16S rRNA*, kodujący podjednostkę 16S rybosomalnego RNA. Dotychczas opublikowano wiele prac dotyczących analizy ekspresji genów u bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych poddanych działaniu aPDI zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *ex vivo* (Bolhari *i in.*, 2018, Golmohamadpour *i in.*, 2018, Hendiani *i in.*, 2019, Hoorijani *i in.*, 2017, Misba *i in.*, 2018). Niestety, w przytoczonych źródłach zastosowanym genem referencyjnym był gen *16S rRNA* bez podania danych dotyczących jego stabilności w zastosowanych warunkach eksperymentalnych. Takie podejście może skutkować błędnymi wynikami i obserwacjami zważywszy na fakt, iż coraz więcej badaczy wykazuje, że gen *16S rRNA* nie jest stabilnym genem referencyjnym. Udokumentowano, iż gen *16S rRNA* jest nieodpowiedni do badania ekspresji genów u bakterii *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* ze względu na dużą ilość transkryptu i najniższą stabilność w badanych warunkach (wzrost bakterii w różnych temperaturach i fazach wzrostu) (Florindo *i in.*, 2012, Gomes *i in.*, 2018, Theis *i in.*, 2007). W przypadku analizy ekspresji u *Corynebacterium glutamicum* w różnych fazach wzrostu i pod wpływem różnych czynników stresowych (kwas, sól, temperatura), gen *16S rRNA* został zaklasyfikowany jako niestabilny (Wang *i in.*, 2018). Podobne rezultaty zostały opublikowane dla *Ochrobactrum quorumnecens* i *Pseudomonas brassicacearum* (Bai *i in.*, 2020, Krzyżanowska *i in.*, 2019). Wszystkie powyższe obserwacje zostały poparte dogłębnymi analizami z wykorzystaniem dostępnych programów do określania stabilności genów referencyjnych – BestKeeper, geNorm i NormFinder. W przypadku analiz opisanych w niniejszej pracy, gen *16 rRNA* został wykluczony już na początkowym etapie badań z uwagi na wysoki poziom ekspresji i niskie wartości Cp (poniżej 10), co klasyfikuje go jako nieodpowiedni i niestabilny gen referencyjny w prezentowanych warunkach eksperymentalnych (Wyniki, 8.6.) (Ogonowska i Nakonieczna, 2020). Ponadto zastosowanie genu *16S rRNA* w subletalnych warunkach aPDI jest błędnym podejściem z uwagi na to, że subletalne warunki powodują przeżycie wyłącznie części bakteryjnej populacji, a gen *16S rRNA* jest wykrywany również w martwych komórkach bakteryjnych (McKillip *i in.*, 1998).

Podsumowując, dobór stabilnych genów referencyjnych ma kluczowe znaczenie w przypadku określania względnego poziomu ekspresji genów. Ich odpowiedni wybór powinien być poprzedzony dogłębnym przeanalizowaniem stabilności z wykorzystaniem dostępnych programów – BestKeeper, geNorm, NormFinder.

#### 9.4. aPDI wpływa na ekspresję genów i aktywność toksyn

Przeciwbakteryjna metoda fotodynamiczna jest skuteczna wobec wielu gatunków bakterii, jednak wciąż jest niewiele prac poświęconych działaniu aPDI na bakteryjne czynniki wirulencji. Dlatego w ramach tej pracy skupiono szczególną uwagę na efekcie, jaki aPDI wywiera na pięć toksyn gronkowcowych (SEA, SEB, SEC, SED, TSST-1), które są najczęściej wykrywane u pacjentów z AZS. Efekt działania aPDI obserwowano zarówno na poziomie transkryptu, jak i białka. Do przeprowadzenia tych analiz wykorzystano subletalne dawki aPDI (gdzie ok. 50% bakteryjnej populacji ginie) z dwóch powodów: (i) obecność RNA wyłącznie w żywych komórkach bakteryjnych, (ii) odtworzenie sytuacji leczenia skóry zakażonej bakteriami, gdzie nie do każdej komórki bakteryjnej dotrze taka sama dawka światła, bądź związku fotouczulającego.

Z dostępnych danych literaturowych wynika, iż różne typy fotouczulaczy, jak i różne źródła światła prowadzą do obniżenia ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji. Zarówno subletalne, jak i letalne warunki aPDI (błękit metylenowy z czerwonym światłem LED,  $\lambda_{\max}=660$  nm) powodują statystycznie istotny spadek ekspresji genów *bsmA*, *bsmB*, *flhD*, *swrR*, odpowiedzialnych za tworzenie biofilmu, ruchliwość i regulację systemu quorum-sensing u bakterii *Serratia marcescens* (Fekrirad *i in.*, 2019). W przypadku *Staphylococcus aureus*, subletalne warunki (25  $\mu\text{g/ml}$  błękitu toluidynowego O, lampa LED  $\lambda_{\max}=630 \pm 10$  nm, dawka światła 104,1  $\text{J/cm}^2$ ) obniżają poziom ekspresji genów *ica ABCD* zaangażowanych w tworzenie biofilmu oraz genu *ica R*, będącego represorem operonu *ica* (Mahmoudi *i in.*, 2019). Zieleń indocyjaninowa (31,2  $\mu\text{g/ml}$ ) wzbudzona bliską podczerwienią ( $\lambda_{\max}=810$  nm, dawka światła 31,2  $\text{J/cm}^2$ ) w subletalnych warunkach obniża poziom ekspresji genów *abaI*, *agrA* i *lasI* odpowiedzialnych za tworzenie biofilmu u bakterii *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* (Pourhajibagher *i in.*, 2020). Do tej pory nie opublikowano danych o wpływie aPDI na poziom ekspresji genów enterotoksyn *Staphylococcus aureus*.

aPDI w subletalnych warunkach (RB ze światłem zielonym i NMB ze światłem czerwonym) prowadzi do spadku ekspresji genów kodujących enterotoksyny *sea*, *seb*, *sec* i *sed* (Wyniki, 8.7.). Oznacza to, że aPDI skutecznie obniża poziom transkryptu toksyn gronkowcowych zaangażowanych w przebieg AZS. Zaobserwowano również, że samo światło (zielone, czerwone), jak i sam związek fotouczulający może obniżać ekspresję genów niektórych toksyn (Wyniki, 8.7.). Dotychczas opublikowano badania, w których dowiedziono,

że działanie światłem niebieskim ( $\lambda_{\max}=462$  nm) w oparciu o endogenne związki fotouczulające reguluje zdolność *S. aureus* do hemolizy, ruchliwości, czy wzrostu w warunkach ubogich w żelazo (Tuttobene *i in.*, 2021). Co ciekawe, w naszych warunkach eksperymentalnych nie zaobserwowano spadku ekspresji genu toksyny *tst* pod wpływem aPDI w warunkach *in vitro*, przeciwnie, poziom ekspresji tego konkretnego genu wzrastał jako jedyny spośród badanych (Wyniki, 8.7.). Natomiast na bardziej złożonym modelu badawczym, jakim jest model *ex vivo* wykazano spadek ekspresji genu *tst* (Wyniki, 8.10.). W związku z różnymi obserwacjami w zależności od zastosowanych warunków bądź modelu badawczego należy podjąć próbę wyjaśnienia tego fenomenu. Transkrypcja genu *tst* jest regulowana w sposób bardzo złożony (Ryc. 3). *RNAIII*, *SigB*, *SarA*, *SarT*, *CcpA*, *SrrAB* i *Rot* mają wpływ na poziom transkrypcji genu *tst* (Andrey *i in.*, 2010, 2015, Pragman *i in.*, 2007, Schmidt *i in.*, 2001, Seidl *i in.*, 2008). Warto zaznaczyć, że szczepy referencyjne *S. aureus* pozyskane z NIL (Narodowy Instytut Leków w Warszawie), w tym również wykorzystany do badań *in vitro* izolat 1005/05 (Materiały, 6.1. i Suplement, tab. 3) niosący gen *tst*, to szczepy przebadane pod kątem obecności genów toksyn, natomiast są to izolaty kliniczne. W związku z tym nie można wykluczyć obecności mutacji lub polimorfizmów, które mogą mieć wpływ na uzyskany wynik. Według danych literaturowych delecja w genie *rot* skutkuje wzrostem ekspresji *tst* w fazie wykładniczego wzrostu (Tuffs *i in.*, 2019). Inne badania wskazują, że zakłócenie alternatywnego szlaku czynnika  $\sigma^B$  (sigma B) w wyniku delecji w genie *sigB*, bądź w genie *rsbU*, skutkuje znacznie zwiększoną transkrypcją genu *tst* (Andrey *i in.*, 2015). Co więcej, *SrrAB* (system gronkowcowej odpowiedzi oddechowej, ang. *Staphylococcal Respiratory Response*) odpowiada za hamowanie produkcji toksyny TSST-1, zwłaszcza w warunkach o niskiej zawartości tlenu (Pragman *i in.*, 2004). Jednakże, nie jest do końca jasne, jak przebiega szlak regulacji *SrrAB* w izolatach klinicznych. Zhao *i wsp.* opublikowali badania, w których wykazali, iż w szczepach *S. aureus* o zróżnicowanej ekspresji genu *tst*, ekspresja genów *srrA* i *srrB* nie osiąga takich samych poziomów (Zhao *i in.*, 2019). Z tego powodu, iż regulacja produkcji toksyn jest wysoce złożona, ten problem badawczy wymaga poszerzonych i dogłębnych analiz.

W przypadku analiz na poziomie białka, aPDI z wykorzystaniem błękitu metylenowego ( $\lambda_{\max}=665$  nm, 32 mW/cm<sup>2</sup>, 1,93 J/cm<sup>2</sup>) doprowadziło do całkowitego zahamowania aktywności  $\alpha$ -hemolizyny u bakterii *S. aureus* (Tubby *i in.*, 2009). Tseng *i wsp.* przy pomocy techniki Western Blot wykazali, iż subletalne warunki aPDI ( $\lambda_{\max}=630$  nm, 50 mW/cm<sup>2</sup>, 20 J/cm<sup>2</sup>, 0,25  $\mu$ M błękitu toluidynowego O, 1,7 log<sub>10</sub> spadku przeżywalności) prowadzą do wyraźnego obniżenia poziomu czynników wirulencji u *S. aureus* -  $\alpha$ -hemolizyny



i enterotoksyny B (SEB) (Tseng *i in.*, 2017). Ponadto zielen indocyjaninowa wzbudzana bliską podczerwienią ( $\lambda_{\max}=1100$  nm,  $65,5$  mW/cm<sup>2</sup>,  $100$  J/cm<sup>2</sup>,  $50$  µg/ml zieleni indocyjaninowej) spowodowała istotne zmniejszenie ilości gronkowcowej enterotoksyny A (SEA) i E (SEE). W tym wypadku efekt mierzono testem immunoenzymatycznym w oparciu o komercyjny zestaw (Ridascreen® Set A, B, C, D, E, Kit, R-Biopharm AG, Niemcy) (Wong *i in.*, 2018).

W przeciwieństwie do przytoczonych danych literaturowych, wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie wykazały, że subletalne warunki aPDI, nie powodują obniżenia poziomu białek żadnej z pięciu analizowanych toksyn (Wyniki, 8.8.). Biorąc pod uwagę szereg właściwości toksyn (odporność na ciepło, wysuszenie, inaktywację przez proteazy i kwasy), czyniących je wysoce odpornymi na warunki środowiska, brak efektu może zależeć od dobranej dawki światła, bądź stężenia związku fotouczulającego. Podobny efekt został zaobserwowany przez zespół Tubby i wsp., gdzie efekt hamowania aktywności gronkowcowej proteazy V8 i sfingomielinazy był silnie uzależniony od dawki światła i stężenia fotouczulacza (Tubby *i in.*, 2009). Z kolei zbyt wysokie stężenia fotouczulacza ( $200$  µM NMB, Metody, 7.13.) również może skutkować tym, iż ilość białek toksyn nie ulega znaczącym zmianom. W takim wypadku niezwiązane cząsteczki NMB pozostające w zawiesinie bakteryjnej pochłaniają światło podczas procesu naświetlania, tym samym osłabiają skuteczność aPDI (Dai *i in.*, 2011). Dodatkowym czynnikiem wpływającym na brak efektu jest długi czas naświetlania światłem czerwonym (ok. 45 min), który może prowadzić do tzw. fotowycierania (ang. *photobleaching*), czyli degradacji fotouczulacza pod wpływem światła, powodujący zmniejszenie jego absorpcji i intensywności fluorescencji (Strattonnikov *i in.*, 2000). Aby zapobiec takiemu zjawisku, grupa badaczy z USA w trakcie procesu naświetlania światłem czerwonym ( $\lambda_{\max}=635\pm 15$  nm) o dawce  $360$  J/cm<sup>2</sup>, ponownie dodawała roztwór fotouczulacza po dostarczeniu dawki światła  $180$  J/cm<sup>2</sup> i  $300$  J/cm<sup>2</sup> (badania *in vivo*). Umożliwiło to uzyskanie skutecznego efektu terapeutycznego, przejawiającego się brakiem sygnału bioluminescencji emitowanym przez bakterię *Acinetobacter baumannii* (Ragàs *i in.*, 2010). W związku tym, iż ilość badanych białek nie uległa zmianie w wyniku działania aPDI, sprawdzono, czy traktowanie aPDI wpłynie na ich aktywność.

Główne właściwości immunologiczne toksyn gronkowcowych to przede wszystkim zdolność do indukcji proliferacji limfocytów T oraz uwalniania dużej ilości cytokin prozapalnych przez limfocyty T (Harris *i in.*, 1993, Miethke *i in.*, 1993, Yokomizo *i in.*, 1995). W oparciu o te właściwości badanych toksyn zastosowano dwa niezależne testy funkcjonalne (test proliferacji – Metody, 7.15. i test ELISA pomiaru IL-2 – Metody, 7.16.) z wykorzystaniem komórek PBMC. Obydwa testy funkcjonalne wykazały, iż subletalne warunki aPDI tylko

nieznacznie osłabiły aktywność biologiczną badanych toksyn (Wyniki, 8.9.). Brak widocznego efektu może wynikać z faktu, że subletalne warunki są niewystarczające do zaobserwowania istotnego efektu biologicznego. Z kolei, letalne dawki aPDI w oparciu o róż bengalski i światło zielone skutecznie pozbawiało toksyny ich biologicznej aktywności, manifestowane jako znaczący spadek indeksu proliferacji limfocytów T, a także obniżenie ilości IL-2 (Wyniki, 8.9.). Do podobnych wniosków doszedł brytyjski zespół badawczy. Badał on zdolność kluczowego czynnika wirulencji u bakterii *Escherichia coli* – lipopolisacharydu (LPS) i jego zdolności do stymulowania uwalniania IL-6 i IL-8 z komórek PBMC po traktowaniu błękitem toluidynowym O (TBO) ze światłem czerwonym. Udowodniono, że pozbawienie LPS jego biologicznej funkcji jest silnie uzależnione zarówno od stężenia fotouczulacza i dawki światła (Kömerik *i in.*, 2000).

Róż bengalski działa według II typu reakcji fotochemicznej, polegającej na generowaniu wysoce cytotoksycznego tlenu singletowego. Dane literaturowe wskazują, że tlen singletowy ( $^1\text{O}_2$ ) powoduje utlenianie cysteiny (Cys), histydyny (His), metioniny (Met), tryptofanu (Trp) oraz tyrozyny (Tyr) (Davies, 2004). Z kolei cząsteczki toksyn gronkowcowych są bogate w lizynę (Lys), kwas asparaginowy (Asp), kwas glutaminowy (Glu), cysteinę (Cys) i tyrozinę (Tyr) (Hovde *i in.*, 1994, Le Loir *i in.*, 2003, Orwin *i in.*, 2003). Najprawdopodobniej reszty cysteiny i tyrozyny są głównym celem fotogenerowanego tlenu singletowego w strukturze aminokwasowej toksyn, prowadząc do ich oksydacyjnych modyfikacji (np. utlenianiu reszt tiolowych zawartych w cysteinie), tym samym pozbawiając je biologicznej funkcji (Tsaytler *i in.*, 2008).

Ważnym aspektem w fotodynamicznej terapii przeciwdrobnoustrojowej jest dobór odpowiedniej dawki, rozumianej jako optymalna kombinacja stężenia związku fotouczulającego i dawki światła. Zbyt niska dawka może okazać się nieskuteczna i niewystarczająca, powodując tym samym przetrwanie części mikroorganizmów. Sama dawka może dodatkowo wpłynąć na zmiany w ekspresji genów, ułatwić namnażanie się drobnoustrojów i utrudnić dalsze leczenie. Dlatego w praktyce klinicznej do uzyskania efektu terapeutycznego niezbędne jest zastosowanie dawki letalnej, która doprowadzi do inaktywacji większości komórek bakteryjnej populacji. Pozbawianie aktywności toksyn gronkowcowych w wyniku działania letalnych warunków aPDI to obiecująca obserwacja. Stwarza to możliwość zastosowania aPDI w dekolonizacji skóry *S. aureus* u pacjentów z AZS i zmniejszania stanu zapalnego wywołanego przez toksyny gronkowcowe.

## 9.5. Róż bengalski ze światłem zielonym może być skuteczną opcją terapeutyczną w zwalczaniu *S. aureus* bytującego na skórze pacjentów z AZS

Obecnie do badania skuteczności aPDI z użyciem różnych typów fotouczulaczy, czy źródeł światła coraz częściej stosuje się model *ex vivo* świńskiej skóry. W modelu tym procedura eksperymentalna przeprowadzana była w ciągu jednej doby i koncentrowała się wyłącznie na ocenie przeżywalności bakterii bezpośrednio po działaniu aPDI. Takie podejście opierało się na przygotowaniu i sterylizacji świńskiej skóry, przygotowaniu zawiesiny bakteryjnej, którą aplikowano na skórę, krótkiej, kilkunastominutowej inkubacji w celu wchłonięcia zawiesiny bakterii w skórę, następnie fotodynamicznym traktowania skóry, po czym wysianiu bakterii na odpowiednie podłoże w celu zliczenia komórek, które przeżyły traktowanie aPDI (Branco *i in.*, 2018, Braz *i in.*, 2020, Maisch *i in.*, 2007, Schreiner *i in.*, 2018, Tortik *i in.*, 2016). Niestety tego typu podejście eksperymentalne nie odwzorowuje naturalnego procesu kolonizacji *S. aureus* na skórze pacjentów. Bakterie nie są w stanie zasiedlić powierzchni skóry i skutecznie się na niej namnożyć. Zoptymalizowany w ramach przedstawianej rozprawy model jest poszerzony o dobową inkubację skóry po naniesieniu na jej powierzchnię bakterii *S. aureus*, co stwarza optymalne warunki czasowe do kolonizacji i produkcji bakteryjnych czynników wirulencji (Metody, 7.17.). Dodatkowo, dobową inkubacją skóry powoduje, iż bakterie są zdolne do stworzenia na powierzchni skóry struktury biofilmu, istotnej z punktu widzenia pacjentów z AZS skolonizowanych *S. aureus*. Z danych literaturowych wynika, iż struktura biofilmu została wykryta również na powierzchni skóry pacjentów z AZS i może przyczyniać się do procesu zapalnego (Sonesson *i in.*, 2017). Zaproponowany w niniejszej rozprawie model *ex vivo* umożliwia nie tylko badanie efektywności aPDI, ale również śledzenie w czasie zmian ilości bakteryjnych czynników wirulencji zarówno na poziomie transkrypty i białka, co zostało przedstawione w niniejszej rozprawie (Wyniki, 8.10.). Stanowi to odpowiedni model wyjściowy do ustalania warunków niezbędnych do przeprowadzenia badań *in vivo*. Wykazano, że zastosowanie RB i światła zielonego prowadzi do statystycznie istotnego obniżenia ilości enterotoksyny A w zastosowanym modelu *ex vivo*. W związku z tym aPDI może skutecznie obniżać potencjał wirulencji *S. aureus* na skórze pacjentów.

Dotychczas skuteczność aPDI z zastosowaniem różu bengalskiego i światła zielonego na mysim modelu była badana wyłącznie wobec bakterii *Pseudomonas aeruginosa* (model chronicznej infekcji ran, 500  $\mu$ M RB,  $\lambda_{\max}$ =525 $\pm$ 15 nm, 50 mW/cm<sup>2</sup>, 100 J/cm<sup>2</sup>) (Fila *i in.*, 2016). W zastosowanych warunkach nie uzyskano efektu terapeutycznego. Brak efektywności

wynikała z budowy bakterii Gram-ujemnych, gdyż fotouczulacze anionowe takie jak RB wiążą się tylko z zewnętrzną błoną, zawierającą ciasno upakowaną warstwę lipopolisacharydów, co utrudnia fotouczulaczom ich dalszą penetrację (Nikaido i Vaara, 1985). W 2017 ukazała się praca, w której badacze porównywali skuteczność samego RB (500  $\mu$ M), jak również w połączeniu z jodkiem potasu (KI, 1 M) wobec bakterii *Pseudomonas aeruginosa* w mysim modelu zakażeń ran. Naświetlanie dawką światła 20 J/cm<sup>2</sup> ( $\lambda_{\max}$ =540 nm) w połączeniu z RB i KI obniżyło sygnał bioluminescencji emitowany przez bakterie *Pseudomonas aeruginosa* do tego stopnia, że był on niewykrywalny (monitorowanie sygnału bezpośrednio po aPDI). W kolejnych dniach obrazowania bakterie zaczęły się namnażać, doszło do nasilenia infekcji bakteryjnej. Nie zaobserwowano widocznego efektu terapeutycznego, a infekcja we wszystkich analizowanych grupach (zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupie poddawanej aPDI) samoistnie wygasła (Wen *i in.*, 2017). Poprzez przeprowadzone i zaprezentowane w niniejszej rozprawie badania *in vivo* stworzono stabilny model kolonizacji mysiej skóry przez bakterie *Staphylococcus aureus* (Metody, 7.18.). Ponadto, uzyskano statystycznie istotne obniżenie sygnału bioluminescencji pochodzącego od żywych komórek bakteryjnych, a także zmniejszenie ilości enterotoksyny gronkowcowej A (Wyniki, 8.11.). Oznacza to, iż w wyniku działania aPDI (RB i zielone światło) dochodzi nie tylko do spadku przeżywalności komórek bakteryjnych, ale również obniżenia ich wirulencji. Z punktu widzenia terapeutycznego stanowi to obiecujący wynik, mogący w przyszłości pomóc w złagodzeniu stanu zapalnego u pacjentów z AZS. W przyszłości warto zweryfikować, czy po traktowaniu aPDI w dłuższym czasie kolonizacji (powyżej 5 dni eksperymentu) może dochodzić do ponownego namnażania się bakterii i nawrotu kolonizacji. Drugim aspektem jest sprawdzenie efektywności i jednocześnie wpływu wielokrotnych, sekwencyjnych traktowań (np. pojedyncze traktowanie codziennie przez okres 5 dni, bądź podwójne naświetlanie co drugi dzień) na skórę. Możliwą do zbadania opcją jest także połączenie aPDI wraz z maścią zawierającą antybiotyki (np. mupirocynę). Tego typu podejście - antybiotykoterapia (wankomycyna i tobramycyna) wraz z aPDI (0,1% roztwór rózu bengalskiego,  $\lambda_{\max}$ =525 nm, dawka światła 5,4 J/cm<sup>2</sup>) okazało się wysoce skuteczne wobec owrzodzeń rogówki wywołanych przez bakterię *Serratia marcescens* (Levine *i in.*, 2021).

W niniejszej rozprawie, dzięki analizom histopatologicznym udokumentowano, że zaaplikowanie samego rózu bengalskiego, działanie samym światłem zielonym, jak również traktowanie aPDI (RB ze światłem zielonym) nie powodują dodatkowych uszkodzeń skóry (Wyniki, 8.11.). Przytoczone obserwacje po raz pierwszy przedstawiają wpływ samego RB, jak i samego światła zielonego na obraz histopatologiczny mysiej skóry. Dotychczas opublikowane

badania wskazywały jedynie na brak widocznych oznak dodatkowych zmian patologicznych skóry w wyniku zaaplikowania RB z jodkiem potasu (inkubacja w ciemności), czy RB ze światłem zielonym ( $\lambda_{\max}=540$  nm) (Wen *i in.*, 2017).

Na modelu mysim wykazano, iż aPDI powoduje zmniejszenie kolonizacji przez bakterie *S. aureus*, a zastosowane stężenie fotouczulacza i dawka światła nie pogłębiają już istniejących uszkodzeń skóry. Oznacza to, że aPDI może stanowić skuteczną i bezpieczną metodę eradykacji w procesie dekolonizacji u pacjentów z AZS.

## 10. Wnioski

1. Izolaty *S. aureus* pochodzące od pacjentów z AZS stanowią wysoce zróżnicowaną pod kątem genetycznym populację.
2. Efektywność aPDI wobec szczepów *S. aureus* od pacjentów z AZS nie zależy od wirulencji związanej z toksynami gronkowcowymi.
3. Subletalne warunki aPDI powodują spadek ekspresji genów enterotoksyn A, B, C, D i wzrost ekspresji genu toksyny TSST-1, natomiast nie wpływają na poziom analizowanych białek toksyn gronkowcowych w warunkach *in vitro*.
4. aPDI powoduje utratę aktywności toksyn gronkowcowych.
5. Róż bengalski ze światłem zielonym powoduje spadek przeżywalności *S. aureus* i obniża poziom toksyn gronkowcowych w modelu *ex vivo* i *in vivo*, co potencjalnie stanowi skuteczną opcję terapeutyczną w zwalczaniu *S. aureus* bytującego na skórze.

## 11. Literatura

1. Abad, E. D. *i in.*, „High incidence of acquiring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Brazilian children with Atopic Dermatitis and associated risk factors”, *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, t. 53, nr 5, ss. 724–730, 2020, doi: 10.1016/j.jmii.2018.12.014.
2. Aires-De-Sousa, M. *i in.*, „High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study”, *J. Clin. Microbiol.*, 2006, doi: 10.1128/JCM.44.2.619-621.2006.
3. Alarcón, E., Edwards, A. M., Aspée, A., Borsarelli, C. D., i Lissi, E. A., „Photophysics and photochemistry of rose bengal bound to human serum albumin”, *Photochem. Photobiol. Sci.*, t. 8, nr 7, s. 933, 2009, doi: 10.1039/b901056d.
4. Alsterholm, M. *i in.*, „Variation in *Staphylococcus aureus* Colonization in Relation to Disease Severity in Adults with Atopic Dermatitis during a Five-month Follow-up”, *Acta Derm. Venereol.*, t. 97, nr 7, ss. 802–807, 2017, doi: 10.2340/00015555-2667.
5. Alves, E., Faustino, M. A., Neves, M. G., Cunha, A., Tome, J., i Almeida, A., „An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation.”, *Future Med. Chem.*, t. 6, nr 2, ss. 141–64, 2014, doi: 10.4155/fmc.13.211.
6. Andersen, C. L., Jensen, J. L., i Ørntoft, T. F., „Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets”, *Cancer Res.*, t. 64, nr 15, ss. 5245–5250, 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
7. Andrey, D. O. *i in.*, „Impact of the Regulators SigB, Rot, SarA and sarS on the Toxic Shock Tst Promoter and TSST-1 Expression in *Staphylococcus aureus*”, *PLoS One*, t. 10, nr 8, s. e0135579, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0135579.
8. Andrey, D. O., Renzoni, A., Monod, A., Lew, D. P., Cheung, A. L., i Kelley, W. L., „Control of the *Staphylococcus aureus* Toxic Shock *tst* Promoter by the Global Regulator SarA”, *J. Bacteriol.*, t. 192, nr 22, ss. 6077–6085, 2010, doi: 10.1128/JB.00146-10.
9. Antonov, N. K., Garzon, M. C., Morel, K. D., Whittier, S., Planet, P. J., i Lauren, C. T., „High Prevalence of Mupirocin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates from a Pediatric Population”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, t. 59, nr 6, ss. 3350–3356, 2015, doi: 10.1128/aac.00079-15.

10. Argudín, M. A., Mendoza, M. C., Méndez, F. J., Martín, M. C., Guerra, B., i Rodicio, M. R., „Clonal Complexes and Diversity of Exotoxin Gene Profiles in Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates from Patients in a Spanish Hospital”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 47, nr 7, ss. 2097–2105, 2009, doi: 10.1128/JCM.01486-08.
11. Arikawa, J., Ishibashi, M., Kawashima, M., Takagi, Y., Ichikawa, Y., i Imokawa, G., „Decreased Levels of Sphingosine, a Natural Antimicrobial Agent, may be Associated with Vulnerability of the Stratum Corneum from Patients with Atopic Dermatitis to Colonization by *Staphylococcus aureus*”, *J. Invest. Dermatol.*, t. 119, nr 2, ss. 433–439, 2002, doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01846.x.
12. Babić, M., „Expression of toxic shock syndrome toxin-1 gene of *Staphylococcus aureus* in milk: Proof of concept”, *Mljekarstvo*, ss. 12–20, 2018, doi: 10.15567/mljekarstvo.2018.0102.
13. Bai, B., Ren, J., Bai, F., i Hao, L., „Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Pseudomonas brassicacearum* GS20 using real-time quantitative reverse transcription PCR”, *PLoS One*, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0227927.
14. Balaban, N. i Rasooly, a., „Staphylococcal enterotoxins.”, *Int. J. Food Microbiol.*, t. 61, nr 1, ss. 1–10, 2000, doi: 10.3390/toxins2082177.
15. Barnes, T. M. i Greive, K. A., „Use of bleach baths for the treatment of infected atopic eczema”, *Australasian Journal of Dermatology*. 2013, doi: 10.1111/ajd.12015.
16. Baroja, M. L. i in., „The SaeRS Two-Component System Is a Direct and Dominant Transcriptional Activator of Toxic Shock Syndrome Toxin 1 in *Staphylococcus aureus*”, *J. Bacteriol.*, t. 198, nr 19, ss. 2732–2742, 2016, doi: 10.1128/JB.00425-16.
17. Bartolomeu, M., Rocha, S., Cunha, Â., Neves, M. G. P. M. S., Faustino, M. A. F., i Almeida, A., „Effect of Photodynamic Therapy on the Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*”, *Front. Microbiol.*, t. 7, nr MAR, ss. 1–11, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00267.
18. Bayer, M. G., Heinrichs, J. H., i Cheung, A. L., „The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*”, *J. Bacteriol.*, t. 178, nr 15, ss. 4563–4570, 1996, doi: 10.1128/jb.178.15.4563-4570.1996.
19. Bayles, K. W. i Iandolo, J. J., „Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D”, *J. Bacteriol.*, t. 171, nr 9, ss. 4799–4806, 1989, doi: 10.1128/jb.171.9.4799-4806.1989.
20. Benito, D. i in., „Genetic lineages and antimicrobial resistance genotypes in



- Staphylococcus aureus* from children with atopic dermatitis: detection of clonal complexes CC1, CC97 and CC398”, *J. Chemother.*, t. 28, nr 5, ss. 359–366, 2016, doi: 10.1179/1973947815Y.0000000044.
21. Bergdoll, M. S., Sugiyama, H., i Dack, G. M., „Staphylococcal enterotoxin. I. Purification”, *Arch. Biochem. Biophys.*, t. 85, nr 1, ss. 62–69, 1959, doi: 10.1016/0003-9861(59)90447-3.
  22. Bergdoll, M. S., Borja, C. R., i Avena, R. M., „Identification of a New Enterotoxin as Enterotoxin C”, *J. Bacteriol.*, t. 90, nr 5, ss. 1481–1485, 1965, doi: 10.1128/jb.90.5.1481-1485.1965.
  23. Berth-Jones, J. i Berth-Jones, J., „Six area, six sign atopic dermatitis (SASSAD) severity score: a simple system for monitoring disease activity in atopic dermatitis.”, *Br. J. Dermatol.*, t. 135 Suppl, nr s48, ss. 25–30, 1996, doi: 10.1111/j.1365-2133.1996.tb00706.x.
  24. Bieber, T., „Atopic dermatitis”, *Ann. Dermatol.*, t. 22, nr 2, ss. 125–137, 2010, doi: 10.5021/ad.2010.22.2.125.
  25. Bitschar, K. i in., „*Staphylococcus aureus* Skin Colonization Is Enhanced by the Interaction of Neutrophil Extracellular Traps with Keratinocytes”, *J. Invest. Dermatol.*, t. 140, nr 5, ss. 1054-1065.e4, 2020, doi: 10.1016/j.jid.2019.10.017.
  26. Blome, C., Radtke, M. A., Eissing, L., i Augustin, M., „Quality of Life in Patients with Atopic Dermatitis: Disease Burden, Measurement, and Treatment Benefit”, *Am. J. Clin. Dermatol.*, t. 17, nr 2, ss. 163–169, 2016, doi: 10.1007/s40257-015-0171-3.
  27. Bolhari, B., Pourhajibagher, M., Bazarjani, F., Chiniforush, N., Rad, M. R., Pirmoazen, S., i Bahador, A., „*Ex vivo* assessment of synergic effect of chlorhexidine for enhancing antimicrobial photodynamic therapy efficiency on expression patterns of biofilm-associated genes of *Enterococcus faecalis*”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2018, doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.04.019.
  28. Bonamonte, D., Filoni, A., Vestita, M., Romita, P., Foti, C., i Angelini, G., „The Role of the Environmental Risk Factors in the Pathogenesis and Clinical Outcome of Atopic Dermatitis”, *Biomed Res. Int.*, t. 2019, ss. 1–11, 2019, doi: 10.1155/2019/2450605.
  29. Borst, D. W. i Betley, M. J., „Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression correlate with *sea* allele class.”, *Infect. Immun.*, t. 62, nr 1, ss. 113–8, 1994, doi: 10.1128/iai.62.1.113-118.1994.
  30. Bos, J. D., Sillevius Smitt, J. H., i Kapsenberg, M. L., „Pathogenesis of atopic eczema”, *Lancet*, t. 343, nr 8909, ss. 1338–1341, 1994, doi: 10.1016/S0140-6736(94)92473-2.

31. Branco, T. M., Valério, N. C., Jesus, V. I. R., Dias, C. J., Neves, M. G. P. M. S., Faustino, M. A. F., i Almeida, A., „Single and combined effects of photodynamic therapy and antibiotics to inactivate *Staphylococcus aureus* on skin”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, t. 21, ss. 285–293, 2018, doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.01.001.
32. Braz, M., Salvador, D., Gomes, A. T. P. C., Mesquita, M. Q., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., i Almeida, A., „Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on skin using a porphyrinic formulation”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, t. 30, s. 101754, 2020, doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101754.
33. Breuer, K., HAussler, S., Kapp, A., i Werfel, T., „*Staphylococcus aureus*: colonizing features and influence of an antibacterial treatment in adults with atopic dermatitis.”, *Br. J. Dermatol.*, t. 147, nr 1, ss. 55–61, 2002, doi: 10.1046/j.1365-2133.2002.04872.x.
34. Brown, S. J. i McLean, W. H. I., „One remarkable molecule: Filaggrin”, *Journal of Investigative Dermatology*. 2012, doi: 10.1038/jid.2011.393.
35. Bunikowski, R. i in., „Evidence for a disease-promoting effect of *Staphylococcus aureus*-derived exotoxins in atopic dermatitis.”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 105, nr 4, ss. 814–9, 2000, doi: 10.1067/mai.2000.105528.
36. Van Den Bussche, R. A., Lyon, J. D., i Bohach, G. A., „Molecular Evolution of the Staphylococcal and Streptococcal Pyrogenic Toxin Gene Family”, *Mol. Phylogenet. Evol.*, t. 2, nr 4, ss. 281–292, 1993, doi: 10.1006/mpev.1993.1027.
37. Butaye, P., Argudín, M. A., i Smith, T. C., „Livestock-Associated MRSA and Its Current Evolution”, *Curr. Clin. Microbiol. Reports*, t. 3, nr 1, ss. 19–31, 2016, doi: 10.1007/s40588-016-0031-9.
38. Bylund, S., Kobyletzki, L. B., Svalstedt, M., i Svensson, Å., „Prevalence and Incidence of Atopic Dermatitis: A Systematic Review.”, *Acta Derm. Venereol.*, t. 100, nr 12, s. adv00160, 2020, doi: 10.2340/00015555-3510.
39. Byrd, A. L. i in., „*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis.”, *Sci. Transl. Med.*, t. 9, nr 397, s. eaal4651, 2017, doi: 10.1126/scitranslmed.aal4651.
40. Calzavara-Pinton, P. G., Venturini, M., Capezzer, R., Sala, R., i Zane, C., „Photodynamic therapy of interdigital mycoses of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid”, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, t. 20, nr 3, ss. 144–147, 2004, doi: 10.1111/j.1600-0781.2004.00095.x.
41. Candi, E., Schmidt, R., i Melino, G., „The cornified envelope: A model of cell death in the skin”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005, doi: 10.1038/nrm1619.

42. Cao, R., Zeaki, N., Wallin-Carlquist, N., Skandamis, P. N., Schelin, J., i Rådström, P., „Elevated Enterotoxin A Expression and Formation in *Staphylococcus aureus* and Its Association with Prophage Induction”, *Appl. Environ. Microbiol.*, t. 78, nr 14, ss. 4942–4948, 2012, doi: 10.1128/AEM.00803-12.
43. Cardona, I. D., Cho, S. H., i Leung, D. Y. M., „Role of Bacterial Superantigens in Atopic Dermatitis”, *Am. J. Clin. Dermatol.*, t. 7, nr 5, ss. 273–279, 2006, doi: 10.2165/00128071-200607050-00001.
44. Casman, E. P., Bergdoll, M. S., i Robinson, J., „Designation of staphylococcal enterotoxins.”, *J. Bacteriol.*, t. 85, nr 3, ss. 715–6, 1963, doi: 10.1128/jb.85.3.715-716.1963.
45. Chan, A. i Mauro, T., „Acidification in the epidermis and the role of secretory phospholipases”, *Dermatoendocrinol.*, t. 3, nr 2, ss. 84–90, 2011, doi: 10.4161/derm.3.2.15140.
46. Chang, C.-C., Yang, Y.-T., Yang, J.-C., Wu, H.-D., i Tsai, T., „Absorption and emission spectral shifts of rose bengal associated with DMPC liposomes”, *Dye. Pigment.*, t. 79, nr 2, ss. 170–175, 2008, doi: 10.1016/j.dyepig.2008.02.003.
47. Cheung, A. L., Koomey, J. M., Butler, C. A., Projan, S. J., i Fischetti, V. A., „Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*.”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 89, nr 14, ss. 6462–6466, 1992, doi: 10.1073/pnas.89.14.6462.
48. Cheung, A. L., Bayer, A. S., Zhang, G., Gresham, H., i Xiong, Y.-Q., „Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*”, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, t. 40, nr 1, ss. 1–9, 2004, doi: 10.1016/S0928-8244(03)00309-2.
49. Cheung, A. L., „Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* by the SarA protein family”, *Front. Biosci.*, t. 7, nr 4, s. A882, 2002, doi: 10.2741/A882.
50. Chiu, L. S., Ho, M. S. L., Hsu, L. Y., i Tang, M. B. Y., „Prevalence and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates colonizing patients with atopic dermatitis and their close contacts in Singapore”, *Br. J. Dermatol.*, t. 160, nr 5, ss. 965–971, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09038.x.
51. Chung, H. J., Jeon, H. S., Sung, H., Kim, M. N., i Hong, S. J., „Epidemiological characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children with eczematous atopic dermatitis lesions”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 46, nr 3, ss. 991–995, 2008, doi: 10.1128/JCM.00698-07.
52. Chung, M., Dickinson, G., de Lencastre, H., i Tomasz, A., „International Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Two Hospitals in Miami, Florida”, *J.*

- Clin. Microbiol.*, t. 42, nr 2, ss. 542–547, 2004, doi: 10.1128/JCM.42.2.542-547.2004.
53. Cieplik, F., Deng, D., Crielaard, W., Buchalla, W., Hellwig, E., Al-Ahmad, A., i Maisch, T., „Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don’t”, *Crit. Rev. Microbiol.*, t. 44, nr 5, ss. 571–589, 2018, doi: 10.1080/1040841X.2018.1467876.
54. Cieplik, F., Tabenski, L., Buchalla, W., i Maisch, T., „Antimicrobial photodynamic therapy for inactivation of biofilms formed by oral key pathogens”, *Front. Microbiol.*, t. 5, 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00405.
55. Clausen, M. L., Edslev, S. M., Andersen, P. S., Clemmensen, K., Krogfelt, K. A., i Agner, T., „*Staphylococcus aureus* colonization in atopic eczema and its association with filaggrin gene mutations”, *Br. J. Dermatol.*, t. 177, nr 5, ss. 1394–1400, 2017, doi: 10.1111/bjd.15470.
56. Clausen, M. L., Edslev, S. M., Nørreslet, L. B., Sørensen, J. A., Andersen, P. S., i Agner, T., „Temporal variation of *Staphylococcus aureus* clonal complexes in atopic dermatitis: a follow-up study”, *Br. J. Dermatol.*, t. 180, nr 1, ss. 181–186, 2019, doi: 10.1111/bjd.17033.
57. Collaud, S., Juzeniene, A., Moan, J., i Lange, N., „On the Selectivity of 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Formation”, *Curr. Med. Chem. Agents*, t. 4, nr 3, ss. 301–316, 2004, doi: 10.2174/1568011043352984.
58. Conceição, T., Diamantino, F., Coelho, C., de Lencastre, H., i Aires-de-Sousa, M., „Contamination of Public Buses with MRSA in Lisbon, Portugal: A Possible Transmission Route of Major MRSA Clones within the Community”, *PLoS One*, t. 8, nr 11, s. e77812, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0077812.
59. Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T., i Yang, Z., „Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions”, *Pharmaceutics*, t. 13, nr 9, s. 1332, 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13091332.
60. Crisostomo, M. I., Westh, H., Tomasz, A., Chung, M., Oliveira, D. C., i de Lencastre, H., „The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 98, nr 17, ss. 9865–9870, 2001, doi: 10.1073/pnas.161272898.
61. Dai, T., Bil de Arce, V. J., Tegos, G. P., i Hamblin, M. R., „Blue Dye and Red Light, a Dynamic Combination for Prophylaxis and Treatment of Cutaneous *Candida albicans* Infections in Mice”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, t. 55, nr 12, ss. 5710–5717, 2011, doi: 10.1128/AAC.05404-11.

62. Darras-Vercambre, S., Carpentier, O., Vincent, P., Bonneville, A., i Thomas, P., „Photodynamic action of red light for treatment of erythrasma: preliminary results”, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, t. 22, nr 3, ss. 153–156, 2006, doi: 10.1111/j.1600-0781.2006.00211.x.
63. Davies, M. J., „Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen”, *Photochem. Photobiol. Sci.*, t. 3, nr 1, s. 17, 2004, doi: 10.1039/b307576c.
64. Dellabona, P., Peccoud, J., Kappler, J., Marrack, P., Benoist, C., i Mathis, D., „Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove”, *Cell*, t. 62, nr 6, ss. 1115–1121, 1990, doi: 10.1016/0092-8674(90)90388-U.
65. Didelot, X., Walker, A. S., Peto, T. E., Crook, D. W., i Wilson, D. J., „Within-host evolution of bacterial pathogens”, *Nat. Rev. Microbiol.*, t. 14, nr 3, ss. 150–162, 2016, doi: 10.1038/nrmicro.2015.13.
66. Dinges, M. M., Orwin, P. M., i Schlievert, P. M., „Exotoxins of *Staphylococcus aureus*”, *Clin. Microbiol. Rev.*, t. 13, nr 1, ss. 16–34, 2000, doi: 10.1128/CMR.13.1.16.
67. Doughty, M. J., „Rose bengal staining as an assessment of ocular surface damage and recovery in dry eye disease—A review”, *Contact Lens Anterior Eye*, t. 36, nr 6, ss. 272–280, 2013, doi: 10.1016/j.clae.2013.07.008.
68. Dubey, T., Gorantla, N. V., Chandrashekara, K. T., i Chinnathambi, S., „Photodynamic exposure of Rose-Bengal inhibits Tau aggregation and modulates cytoskeletal network in neuronal cells”, *Sci. Rep.*, t. 10, nr 1, s. 12380, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-69403-2.
69. Ducrotoy, M. J. i Bardosh, K. L., „How do you get the Rose Bengal Test at the point-of-care to diagnose brucellosis in Africa? The importance of a systems approach”, *Acta Trop.*, t. 165, ss. 33–39, 2017, doi: 10.1016/j.actatropica.2016.10.004.
70. Edslev, S. M., Clausen, M.-L., Agner, T., Stegger, M., i Andersen, P. S., „Genomic analysis reveals different mechanisms of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus* from Danish atopic dermatitis patients”, *J. Antimicrob. Chemother.*, t. 73, nr 4, ss. 856–861, 2018, doi: 10.1093/jac/dkx481.
71. Enright, M. C., Day, N. P. J., Davies, C. E., Peacock, S. J., i Spratt, B. G., „Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 38, nr 3, ss. 1008–1015, 2000, doi: 10.1128/jcm.38.3.1008-1015.2000.
72. Ericson, M. B., Wennberg, A.-M., i Larkö, O., „Review of photodynamic therapy in actinic keratosis and basal cell carcinoma.”, *Ther. Clin. Risk Manag.*, t. 4, nr 1, ss. 1–9,

- 2008, [Online]. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18728698>.
73. Etter, D., Schelin, J., Schuppler, M., i Johler, S., „Staphylococcal Enterotoxin C—An Update on SEC Variants, Their Structure and Properties, and Their Role in Foodborne Intoxications”, *Toxins (Basel)*, t. 12, nr 9, s. 584, 2020, doi: 10.3390/toxins12090584.
  74. Faria, N. A., Carrico, J. A., Oliveira, D. C., Ramirez, M., i de Lencastre, H., „Analysis of Typing Methods for Epidemiological Surveillance of both Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 46, nr 1, ss. 136–144, 2008, doi: 10.1128/JCM.01684-07.
  75. Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., i Spratt, B. G., „eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data”, *J. Bacteriol.*, t. 186, nr 5, ss. 1518–1530, 2004, doi: 10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004.
  76. Fekrirad, Z., Kashef, N., i Arefian, E., „Photodynamic inactivation diminishes quorum sensing-mediated virulence factor production and biofilm formation of *Serratia marcescens*”, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, t. 35, nr 12, s. 191, 2019, doi: 10.1007/s11274-019-2768-9.
  77. Fila, G., Kasimova, K., Arenas, Y., Nakonieczna, J., Grinholc, M., Bielawski, K. P., i Lilge, L., „Murine Model Imitating Chronic Wound Infections for Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy Efficacy”, *Front. Microbiol.*, t. 7, nr AUG, ss. 1–11, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01258.
  78. Fink, P. J., Matis, L. A., McElligott, D. L., Bookman, M., i Hedrick, S. M., „Correlations between T-cell specificity and the structure of the antigen receptor”, *Nature*, t. 321, nr 6067, ss. 219–226, 1986, doi: 10.1038/321219a0.
  79. Fisher, E. L., Otto, M., i Cheung, G. Y. C., „Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning”, *Front. Microbiol.*, t. 9, nr March, ss. 1–18, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00436.
  80. Fleury, O. M. *i in.*, „Clumping Factor B Promotes Adherence of *Staphylococcus aureus* to Corneocytes in Atopic Dermatitis”, *Infect. Immun.*, t. 85, nr 6, ss. e00994-16, 2017, doi: 10.1128/IAI.00994-16.
  81. Florindo, C., Ferreira, R., Borges, V., Spellerberg, B., Gomes, J. P., i Borrego, M. J., „Selection of reference genes for real-time expression studies in *Streptococcus agalactiae*”, *J. Microbiol. Methods*, 2012, doi: 10.1016/j.mimet.2012.05.011.
  82. Francis, K. P., Joh, D., Bellinger-Kawahara, C., Hawkinson, M. J., Purchio, T. F., i Contag, P. R., „Monitoring Bioluminescent *Staphylococcus aureus* Infections in Living

- Mice Using a Novel luxABCDE Construct”, *Infect. Immun.*, t. 68, nr 6, ss. 3594–3600, 2000, doi: 10.1128/IAI.68.6.3594-3600.2000.
83. Freire, F., de Barros, P. P., Pereira, C. A., Junqueira, J. C., i Jorge, A. O. C., „Photodynamic inactivation in the expression of the *Candida albicans* genes ALS3, HWP1, BCR1, TEC1, CPH1, and EFG1 in biofilms”, *Lasers Med. Sci.*, 2018, doi: 10.1007/s10103-018-2487-8.
  84. Frénay, H. M. E., Bunschoten, A. E., Schouls, L. M., Van Leeuwen, W. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Verhoef, J., i Mooi, F. R., „Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, t. 15, nr 1, ss. 60–64, 1996, doi: 10.1007/BF01586186.
  85. Fritsch, C., Stege, H., Saalman, G., Goerz, G., Ruzicka, T., i Krutmann, J., „Green light is effective and less painful than red light in photodynamic therapy of facial solar keratoses”, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, t. 13, nr 5–6, ss. 181–185, 1997, doi: 10.1111/j.1600-0781.1997.tb00226.x.
  86. Gandin, E., Lion, Y., i Van de Vorst, A., „Quantum yield of singlet oxygen production by xanthene derivatives”, *Photochem. Photobiol.*, t. 37, nr 3, ss. 271–278, 1983, doi: 10.1111/j.1751-1097.1983.tb04472.x.
  87. Garcez, A. S., Nuñez, S. C., Hamblin, M. R., i Ribeiro, M. S., „Antimicrobial Effects of Photodynamic Therapy on Patients with Necrotic Pulps and Periapical Lesion”, *J. Endod.*, t. 34, nr 2, ss. 138–142, 2008, doi: 10.1016/j.joen.2007.10.020.
  88. Geisinger, E., Adhikari, R. P., Jin, R., Ross, H. F., i Novick, R. P., „Inhibition of *rot* translation by RNAIII, a key feature of *agr* function”, *Mol. Microbiol.*, t. 61, nr 4, ss. 1038–1048, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05292.x.
  89. Geoghegan, J. A., Irvine, A. D., i Foster, T. J., „*Staphylococcus aureus* and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship”, *Trends Microbiol.*, t. 26, nr 6, ss. 484–497, 2018, doi: 10.1016/j.tim.2017.11.008.
  90. George, S., Hamblin, M. R., i Kishen, A., „Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria”, *Photochem. Photobiol. Sci.*, t. 8, nr 6, s. 788, 2009, doi: 10.1039/b809624d.
  91. Gilaberte, Y. *i in.*, „Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D and virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolates colonizing children with atopic dermatitis”, *Pediatr. Dermatol.*, 2015, doi: 10.1111/pde.12436.
  92. Giraud, A. T., Raspanti, C. G., Calzolari, A., i Nagel, R., „Characterization of a Tn 551

- mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins”, *Can. J. Microbiol.*, t. 40, nr 8, ss. 677–681, 1994, doi: 10.1139/m94-107.
93. Golding, G. R., Campbell, J., Spreitzer, D., i Chui, L., „Pulsed-field gel electrophoresis of *Staphylococcus aureus*”, *Methods Mol. Biol.*, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2599-5\_8.
  94. Golmohamadpour, A., Bahramian, B., Khoobi, M., Pourhajbagher, M., Barikani, H. R., i Bahador, A., „Antimicrobial photodynamic therapy assessment of three indocyanine green-loaded metal-organic frameworks against *Enterococcus faecalis*”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2018, doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.08.004.
  95. Gomes, A. É. I. *i in.*, „Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Klebsiella pneumoniae* using Reverse Transcription Quantitative real-time PCR”, *Sci. Rep.*, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-27420-2.
  96. Gómez-Sanz, E., Torres, C., Lozano, C., Fernández-Pérez, R., Aspiroz, C., Ruiz-Larrea, F., i Zarazaga, M., „Detection, Molecular Characterization, and Clonal Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish Slaughter Pigs of Different Age Groups”, *Foodborne Pathog. Dis.*, t. 7, nr 10, ss. 1269–1277, 2010, doi: 10.1089/fpd.2010.0610.
  97. Grinholc, M., Rapacka-Zdonczyk, A., Rybak, B., Szabados, F., i Bielawski, K. P., „Multiresistant Strains Are as Susceptible to Photodynamic Inactivation as Their Naïve Counterparts: Protoporphyrin IX-Mediated Photoinactivation Reveals Differences Between Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains”, *Photomed. Laser Surg.*, t. 32, nr 3, ss. 121–129, 2014, doi: 10.1089/pho.2013.3663.
  98. Grinholc, M. *i in.*, „Fine-tuning recA expression in *Staphylococcus aureus* for antimicrobial photoinactivation: importance of photo-induced DNA damage in the photoinactivation mechanism”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, t. 99, nr 21, ss. 9161–9176, 2015, doi: 10.1007/s00253-015-6863-z.
  99. Gruber, R. *i in.*, „Filaggrin Genotype in Ichthyosis Vulgaris Predicts Abnormalities in Epidermal Structure and Function”, *Am. J. Pathol.*, t. 178, nr 5, ss. 2252–2263, 2011, doi: 10.1016/j.ajpath.2011.01.053.
  100. Grundmann, H. *i in.*, „The dynamic changes of dominant clones of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in the European region: Results of a second structured survey”, *Eurosurveillance*, t. 19, nr 49, 2014, doi: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.49.20987.



101. Grundmann, H., Aanensen, D. M., van den Wijngaard, C. C., Spratt, B. G., Harmsen, D., i Friedrich, A. W., „Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis”, *PLoS Med.*, t. 7, nr 1, s. e1000215, 2010, doi: 10.1371/journal.pmed.1000215.
102. Guldimann, C., Boor, K. J., Wiedmann, M., i Guariglia-Oropeza, V., „Resilience in the Face of Uncertainty: Sigma Factor B Fine-Tunes Gene Expression To Support Homeostasis in Gram-Positive Bacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, t. 82, nr 15, ss. 4456–4469, 2016, doi: 10.1128/AEM.00714-16.
103. Hamblin, M. R., „Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes”, *Curr. Opin. Microbiol.*, t. 33, ss. 67–73, 2016, doi: 10.1016/j.mib.2016.06.008.
104. Hanifin i Rajka, G., „Diagnostic features of atopic dermatitis”, *Acta Derm Venereol Suppl*, 1980.
105. Hanifin, J. M., Thurston, M., Omoto, M., Cherill, R., Tofte, S. J., i Graeber, M., „The eczema area and severity index (EASI): Assessment of reliability in atopic dermatitis”, *Exp. Dermatol.*, t. 10, nr 1, ss. 11–18, 2001, doi: 10.1034/j.1600-0625.2001.100102.x.
106. Harkins, C. P. *i in.*, „The widespread use of topical antimicrobials enriches for resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from patients with atopic dermatitis”, *Br. J. Dermatol.*, t. 179, nr 4, ss. 951–958, 2018, doi: 10.1111/bjd.16722.
107. Harkins, C. P. *i in.*, „The Microevolution and Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Colonization during Atopic Eczema Disease Flare”, *J. Invest. Dermatol.*, t. 138, nr 2, ss. 336–343, 2018, doi: 10.1016/j.jid.2017.09.023.
108. Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothgänger, J., Claus, H., Turnwald, D., i Vogel, U., „Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for spa Repeat Determination and Database Management”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 41, nr 12, ss. 5442–5448, 2003, doi: 10.1128/JCM.41.12.5442-5448.2003.
109. Harris, T. O., Grossman, D., Kappler, J. W., Marrack, P., Rich, R. R., i Betley, M. J., „Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins.”, *Infect. Immun.*, t. 61, nr 8, ss. 3175–3183, 1993, doi: 10.1128/IAI.61.8.3175-3183.1993.
110. Hauk, P. J., Hamid, Q. A., Chrousos, G. P., i Leung, D. Y. M., „Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 105, nr 4, ss. 782–787, 2000, doi: 10.1067/mai.2000.105807.

111. Hauser, C., Wuethrich, B., Matter, L., Wilhelm, J. A., Sonnabend, W., i Schopfer, K., „*Staphylococcus aureus* skin colonization in atopic dermatitis patients”, *Dermatologica*, 1985, doi: 10.1159/000249493.
112. Hendiani, S., Pornour, M., i Kashef, N., „Sub-lethal antimicrobial photodynamic inactivation: an *in vitro* study on quorum sensing-controlled gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation”, *Lasers Med. Sci.*, t. 34, nr 6, ss. 1159–1165, 2019, doi: 10.1007/s10103-018-02707-y.
113. Hoeger, P. H., „Antimicrobial susceptibility of skin-colonizing *S. aureus* strains in children with atopic dermatitis”, *Pediatr. Allergy Immunol.*, t. 15, nr 5, ss. 474–477, 2004, doi: 10.1111/j.1399-3038.2004.00182.x.
114. Holtfreter, S. *i in.*, „Clonal Distribution of Superantigen Genes in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 45, nr 8, ss. 2669–2680, 2007, doi: 10.1128/JCM.00204-07.
115. Holtfreter, S. *i in.*, „Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in the General Population in Northeast Germany: Results of the Study of Health in Pomerania (SHIP-TREND-0)”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 54, nr 11, ss. 2774–2785, 2016, doi: 10.1128/JCM.00312-16.
116. Hon, K. L. *i in.*, „Efficacy of sodium hypochlorite (bleach) baths to reduce *Staphylococcus aureus* colonization in childhood onset moderate-to-severe eczema: A randomized, placebo-controlled cross-over trial”, *J. Dermatolog. Treat.*, t. 27, nr 2, ss. 156–162, 2016, doi: 10.3109/09546634.2015.1067669.
117. Hoorijani, M. N. *i in.*, „The effect of antimicrobial photodynamic therapy on the expression of novel methicillin resistance markers determined using cDNA-AFLP approach in *Staphylococcus aureus*”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, t. 19, ss. 249–255, 2017, doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.06.012.
118. Housman, T. S., Patel, M. J., Camacho, F., Feldman, S. R., Fleischer, A. B., i Balkrishnan, R., „Use of the Self-Administered Eczema Area and Severity Index by parent caregivers: Results of a validation study”, *Br. J. Dermatol.*, 2002, doi: 10.1046/j.1365-2133.2002.05031.x.
119. Hovde, C. J. *i in.*, „Investigation of the role of the disulphide bond in the activity and structure of staphylococcal enterotoxin C1”, *Mol. Microbiol.*, t. 13, nr 5, ss. 897–909, 1994, doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00481.x.
120. Hsieh, H.-Y., Tseng, C. W., i Stewart, G. C., „Regulation of Rot Expression in *Staphylococcus aureus*”, *J. Bacteriol.*, t. 190, nr 2, ss. 546–554, 2008, doi:

- 10.1128/JB.00536-07.
121. Hung, S.-H. *i in.*, „*Staphylococcus* colonization in atopic dermatitis treated with fluticasone or tacrolimus with or without antibiotics.”, *Ann. Allergy. Asthma Immunol.*, t. 98, nr 1, ss. 51–6, 2007, doi: 10.1016/S1081-1206(10)60859-9.
  122. Ilczyszyn, W. M. *i in.*, „Clonal Structure and Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains from Invasive Infections in Paediatric Patients from South Poland: Association between Age, *spa* Types, Clonal Complexes, and Genetic Markers”, *PLoS One*, t. 11, nr 3, s. e0151937, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0151937.
  123. Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M., i Hidano, A., „Decreased Level of Ceramides in Stratum Corneum of Atopic Dermatitis: An Etiologic Factor in Atopic Dry Skin?”, *J. Invest. Dermatol.*, t. 96, nr 4, ss. 523–526, 1991, doi: 10.1111/1523-1747.ep12470233.
  124. Jenul, C. i Horswill, A. R., „Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence”, *Microbiol. Spectr.*, t. 7, nr 2, 2019, doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018.
  125. Jinnestål, C. L., Belfrage, E., Bäck, O., Schmidtchen, A., i Sonesson, A., „Skin barrier impairment correlates with cutaneous *Staphylococcus aureus* colonization and sensitization to skin-associated microbial antigens in adult patients with atopic dermatitis”, *Int. J. Dermatol.*, t. 53, nr 1, ss. 27–33, 2014, doi: 10.1111/ijd.12198.
  126. Kanda, N. i Watanabe, S., „Increased serum human  $\beta$ -defensin-2 levels in atopic dermatitis: Relationship to IL-22 and oncostatin M”, *Immunobiology*, t. 217, nr 4, ss. 436–445, 2012, doi: 10.1016/j.imbio.2011.10.010.
  127. Karynski, M., Sabat, A. J., Empel, J., i Hryniewicz, W., „Molecular surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiple-locus variable number tandem repeat fingerprinting (formerly multiple-locus variable number tandem repeat analysis) and *spa* typing in a hierarchic approach”, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, t. 62, nr 3, ss. 255–262, 2008, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.06.019.
  128. Kasela, M., Malm, A., Nowakowicz-Dębek, B., i Ossowski, M., „Genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus*”, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, t. 73, ss. 245–255, 2019, doi: 10.5604/01.3001.0013.2020.
  129. Kędzierska, A., Kapińska-Mrowiecka, M., Czubak-Macugowska, M., Wójcik, K., i Kędzierska, J., „Susceptibility testing and resistance phenotype detection in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with atopic dermatitis, with apparent and recurrent skin colonization”, *Br. J. Dermatol.*, t. 159, nr 6, ss. 1290–1299, 2008, doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08817.x.

130. Kim, D.-W., Park, J.-Y., Park, K.-D., Kim, T.-H., Lee, W.-J., Lee, S.-J., i Kim, J., „Are there predominant strains and toxins of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis patients? Genotypic characterization and toxin determination of *S. aureus* isolated in adolescent and adult patients with atopic dermatitis.”, *J. Dermatol.*, t. 36, nr 2, ss. 75–81, 2009, doi: 10.1111/j.1346-8138.2009.00592.x.
131. Kim, J., Kim, B. E., Ahn, K., i Leung, D. Y. M., „Interactions between atopic dermatitis and *Staphylococcus aureus* infection: Clinical implications”, *Allergy, Asthma Immunol. Res.*, t. 11, nr 5, ss. 593–603, 2019, doi: 10.4168/aaair.2019.11.5.593.
132. King, M. D., Humphrey, B. J., Wang, Y. F., Kourbatova, E. V., Ray, S. M., i Blumberg, H. M., „Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections”, *Ann. Intern. Med.*, 2006, doi: 10.7326/0003-4819-144-5-200603070-00005.
133. Klotz, M., Opper, S., Heeg, K., i Zimmermann, S., „Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins A to D by Real-Time Fluorescence PCR Assay”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 41, nr 10, ss. 4683–4687, 2003, doi: 10.1128/JCM.41.10.4683-4687.2003.
134. Kömerik, N., Wilson, M., i Poole, S., „The Effect of Photodynamic Action on Two Virulence Factors of Gram-negative Bacteria”, *Photochem. Photobiol.*, t. 72, nr 5, s. 676, 2000, doi: 10.1562/0031-8655(2000)072<0676:TEOPAO>2.0.CO;2.
135. Kong, H. H. *i in.*, „Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis”, *Genome Res.*, t. 22, nr 5, ss. 850–859, 2012, doi: 10.1101/gr.131029.111.
136. Koreen, L., Ramaswamy, S. V., Graviss, E. A., Naidich, S., Musser, J. M., i Kreiswirth, B. N., „*spa* Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 42, nr 2, ss. 792–799, 2004, doi: 10.1128/JCM.42.2.792-799.2004.
137. Kowalska-Olędzka, E., Czarnecka, M., i Baran, A., „Epidemiology of atopic dermatitis in Europe”, *J. Drug Assess.*, t. 8, nr 1, ss. 126–128, 2019, doi: 10.1080/21556660.2019.1619570.
138. Kowalski, T. J., Berbari, E. F., i Osmon, D. R., „Epidemiology, treatment, and prevention of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections”, *Mayo Clin. Proc.*, t. 80, nr 9, ss. 1201–1208, 2005, doi: 10.4065/80.9.1201.
139. Kremer, N. *i in.*, „Self-administered daylight-activated photodynamic therapy for the treatment of hand eczema: A prospective proof-of-concept study”, *Dermatol. Ther.*, 2020, doi: 10.1111/dth.14329.

140. Krzyżanowska, D. M., Supernat, A., Maciąg, T., Matuszewska, M., i Jafra, S., „Selection of reference genes for measuring the expression of *aiiO* in *Ochrobactrum quorumnocens* A44 using RT-qPCR”, *Sci. Rep.*, t. 9, nr 1, s. 13129, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-49474-6.
141. Kunz, B., Oranje, A. P., Labréze, L., Stabler, J. F., Ring, J., i Taïeb, A., „Clinical validation and guidelines for the scorad index: Consensus report of the european task force on atopic dermatitis”, *Dermatology*, 1997, doi: 10.1159/000245677.
142. Kusch, K. *i in.*, „The influence of SaeRS and  $\sigma$ B on the expression of superantigens in different *Staphylococcus aureus* isolates”, *Int. J. Med. Microbiol.*, t. 301, nr 6, ss. 488–499, 2011, doi: 10.1016/j.ijmm.2011.01.003.
143. Kwon, S. H., Jeong, M. Y., Park, K. C., Youn, S. W., Huh, C. H., i Na, J. I., „A new therapeutic option for facial seborrheic dermatitis: indole-3-acetic acid photodynamic therapy”, *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, t. 28, nr 1, ss. 94–99, 2014, doi: 10.1111/jdv.12070.
144. Kwong, J. C., Mccallum, N., Sintchenko, V., i Howden, B. P., „Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology”, *Pathology*, t. 47, nr 3, ss. 199–210, 2015, doi: 10.1097/PAT.0000000000000235.
145. Lee, J. W., Kim, B. J., i Kim, M. N., „Photodynamic therapy: New treatment for recalcitrant *Malassezia folliculitis*”, *Lasers Surg. Med.*, t. 42, nr 2, ss. 192–196, 2010, doi: 10.1002/lsm.20857.
146. Leung, D. Y. M., „The microbiome and allergic diseases”, *Ann. Allergy, Asthma Immunol.*, t. 122, nr 3, ss. 231–232, 2019, doi: 10.1016/j.anai.2019.01.003.
147. Leung, D. Y. M., „New Insights into Atopic Dermatitis: Role of Skin Barrier and Immune Dysregulation”, *P*, t. 62, nr 2, ss. 151–161, 2013, doi: 10.2332/allergolint.13-RAI-0564.
148. Levine, H., Sepulveda-Beltran, P. A., i Amescua, G., „Rose Bengal Photodynamic Antimicrobial Therapy as potential adjuvant treatment for *Serratia marcescens* corneal ulcer”, *Am. J. Ophthalmol.*, t. 231, ss. e1–e2, 2021, doi: 10.1016/j.ajo.2021.07.007.
149. Leyden, J. J., „Ecologic Principles and Antibiotic Therapy in Chronic Dermatoses”, *Arch. Dermatol.*, t. 107, nr 2, s. 208, 1973, doi: 10.1001/archderm.1973.01620170020006.
150. Lina, G., Bohach, G. A., Nair, S. P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., i Mariuzza, R., „Standard Nomenclature for the Superantigens Expressed by *Staphylococcus*”, *J. Infect. Dis.*, t. 189, nr 12, ss. 2334–2336, 2004, doi: 10.1086/420852.

151. Lo, W. T., Wang, S. R., Tseng, M. H., Huang, C. F., Chen, S. J., i Wang, C. C., „Comparative molecular analysis of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children with atopic dermatitis and healthy subjects in Taiwan”, *Br. J. Dermatol.*, t. 162, nr 5, ss. 1110–1116, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09679.x.
152. Le Loir, Y., Baron, F., i Gautier, M., „*Staphylococcus aureus* and food poisoning.”, *Genet. Mol. Res.*, t. 2, nr 1, ss. 63–76, 2003, [Online]. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917803>.
153. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., i Randall, R., „Protein measurement with the folin phenol reagent”, *J. Biol. Chem.*, t. 193, nr 1, ss. 265–275, 1951, doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
154. Mackay, I. M., „Real-time PCR in the microbiology laboratory”, *Clin. Microbiol. Infect.*, t. 10, nr 3, ss. 190–212, 2004, doi: 10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x.
155. Mahmoudi, H., Pourhajibagher, M., Alikhani, M. Y., i Bahador, A., „The effect of antimicrobial photodynamic therapy on the expression of biofilm associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from wound infections in burn patients”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, t. 25, ss. 406–413, 2019, doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.01.028.
156. Maiden, M. C. J. *i in.*, „Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 95, nr 6, ss. 3140–3145, 1998, doi: 10.1073/pnas.95.6.3140.
157. Maisch, T., Bosl, C., Szeimies, R. M., Love, B., i Abels, C., „Determination of the antibacterial efficacy of a new porphyrin-based photosensitizer against MRSA *ex vivo*”, *Photochem. Photobiol. Sci.*, t. 6, nr 5, ss. 545–551, 2007, doi: 10.1039/b614770d.
158. Maisch, T., Szeimies, R.-M., Jori, G., i Abels, C., „Antibacterial photodynamic therapy in dermatology.”, *Photochem. Photobiol. Sci.*, t. 3, nr 10, ss. 907–17, 2004, doi: 10.1039/b407622b.
159. Majewski, S. *i in.*, „Sodium hypochlorite body wash in the management of *Staphylococcus aureus*–colonized moderate-to-severe atopic dermatitis in infants, children, and adolescents”, *Pediatr. Dermatol.*, t. 36, nr 4, ss. 442–447, 2019, doi: 10.1111/pde.13842.
160. Malachowa, N. *i in.*, „Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, *spa* typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 43, nr 7, ss. 3095–3100, 2005, doi: 10.1128/JCM.43.7.3095-3100.2005.

161. Manna, A. C. i Ray, B., „Regulation and characterization of *rot* transcription in *Staphylococcus aureus*”, *Microbiology*, t. 153, nr 5, ss. 1538–1545, 2007, doi: 10.1099/mic.0.2006/004309-0.
162. Markley, J. D., Edmond, M. B., Major, Y., Bearman, G., i Stevens, M. P., „Are gym surfaces reservoirs for *Staphylococcus aureus*? A point prevalence survey”, *Am. J. Infect. Control*, t. 40, nr 10, ss. 1008–1009, 2012, doi: 10.1016/j.ajic.2012.01.015.
163. Mashruwala, A. A. i Boyd, J. M., „The *Staphylococcus aureus* SrrAB Regulatory System Modulates Hydrogen Peroxide Resistance Factors, Which Imparts Protection to Aconitase during Aerobic Growth”, *PLoS One*, t. 12, nr 1, s. e0170283, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0170283.
164. Masiuk, H., Wcislek, A., i Jursa-Kulesza, J., „Determination of nasal carriage and skin colonization, antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with atopic dermatitis in Szczecin, Poland”, *BMC Infect. Dis.*, t. 21, nr 1, s. 701, 2021, doi: 10.1186/s12879-021-06382-3.
165. Matsui, K., Nishikawa, A., Suto, H., Tsuboi, R., i Ogawa, H., „Comparative Study of *Staphylococcus aureus* Isolated from Lesional and Non-Lesional Skin of Atopic Dermatitis Patients”, *Microbiol. Immunol.*, t. 44, nr 11, ss. 945–947, 2000, doi: 10.1111/j.1348-0421.2000.tb02587.x.
166. McCormick, J. K., Yarwood, J. M., i Schlievert, P. M., „Toxic Shock Syndrome and Bacterial Superantigens: An Update”, *Annu. Rev. Microbiol.*, t. 55, nr 1, ss. 77–104, 2001, doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.77.
167. McDougal, L. K., Steward, C. D., Killgore, G. E., Chaitram, J. M., McAllister, S. K., i Tenover, F. C., „Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 41, nr 11, ss. 5113–5120, 2003, doi: 10.1128/JCM.41.11.5113-5120.2003.
168. McKenna, P. J., Lehr, G. S., Leist, P., i Welling, R. E., „Antiseptic effectiveness with fibroblast preservation”, *Ann. Plast. Surg.*, 1991, doi: 10.1097/00000637-199109000-00011.
169. McKillip, J. L., Jaykus, L.-A., i Drake, M., „rRNA Stability in Heat-Killed and UV-Irradiated Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*O157:H7†”, *Appl. Environ. Microbiol.*, t. 64, nr 11, ss. 4264–4268, 1998, doi: 10.1128/AEM.64.11.4264-4268.1998.
170. McNamara, P. J., Milligan-Monroe, K. C., Khalili, S., i Proctor, R. A., „Identification,

- Cloning, and Initial Characterization of *rot*, a Locus Encoding a Regulator of Virulence Factor Expression in *Staphylococcus aureus*”, *J. Bacteriol.*, t. 182, nr 11, ss. 3197–3203, 2000, doi: 10.1128/JB.182.11.3197-3203.2000.
171. Mempel, M. *i in.*, „High prevalence of superantigens associated with the *egc* locus in *Staphylococcus aureus* isolates from patients with atopic eczema.”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, t. 22, nr 5, ss. 306–309, 2003, doi: 10.1007/s10096-003-0928-0.
  172. Mempel, M., Schmidt, T., Weidinger, S., Schnopp, C., Ring, J., Abeck, D., i Foster, T., „Role of *Staphylococcus aureus* Surface-Associated Proteins in the Attachment to Cultured HaCaT Keratinocytes in a New Adhesion Assay”, *J. Invest. Dermatol.*, t. 111, nr 3, ss. 452–456, 1998, doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00293.x.
  173. Miajlovic, H., Fallon, P. G., Irvine, A. D., i Foster, T. J., „Effect of filaggrin breakdown products on growth of and protein expression by *Staphylococcus aureus*”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 126, nr 6, ss. 1184-1190.e3, 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2010.09.015.
  174. van Mierlo, M. M. F. *i in.*, „Temporal Variation in *Staphylococcus aureus* Protein A Genotypes from Nose and Skin in Atopic Dermatitis Patients”, *Dermatology*, t. 237, nr 4, ss. 506–512, 2021, doi: 10.1159/000515235.
  175. Miethke, T., Wahl, C., Regele, D., Gaus, H., Heeg, K., i Wagner, H., „Superantigen Mediated Shock: A Cytokine Release Syndrome”, *Immunobiology*, t. 189, nr 3–4, ss. 270–284, 1993, doi: 10.1016/S0171-2985(11)80362-1.
  176. Misba, L., Zaidi, S., i Khan, A. U., „A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, t. 18, ss. 24–33, 2017, doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.01.177.
  177. Misba, L., Zaidi, S., i Khan, A. U., „Efficacy of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* biofilm: Role of singlet oxygen”, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, t. 183, ss. 16–21, 2018, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.04.024.
  178. Morton, C. A., Szeimies, R.-M., Sidoroff, A., i Braathen, L. R., „European guidelines for topical photodynamic therapy part 1: treatment delivery and current indications - actinic keratoses, Bowen’s disease, basal cell carcinoma”, *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, t. 27, nr 5, ss. 536–544, 2013, doi: 10.1111/jdv.12031.
  179. Morton, C. A. *i in.*, „European Dermatology Forum guidelines on topical photodynamic therapy 2019 Part 1: treatment delivery and established indications – actinic keratoses, Bowen’s disease and basal cell carcinomas”, *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, t. 33, nr 12, ss. 2225–2238, 2019, doi: 10.1111/jdv.16017.



180. Morton, C. A., Szeimies, R.-M., Sidoroff, A., i Braathen, L. R., „European guidelines for topical photodynamic therapy part 2: emerging indications - field cancerization, photorejuvenation and inflammatory/infective dermatoses”, *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, t. 27, nr 6, ss. 672–679, 2013, doi: 10.1111/jdv.12026.
181. Mulvey, M. R., Chui, L., Ismail, J., Louie, L., Murphy, C., Chang, N., i Alfa, M., „Development of a Canadian Standardized Protocol for Subtyping Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 39, nr 10, ss. 3481–3485, 2001, doi: 10.1128/JCM.39.10.3481-3485.2001.
182. Murata, Y. *i in.*, „Abnormal Expression of Sphingomyelin Acylase in Atopic Dermatitis: An Etiologic Factor for Ceramide Deficiency?”, *J. Invest. Dermatol.*, t. 106, nr 6, ss. 1242–1249, 1996, doi: 10.1111/1523-1747.ep12348937.
183. Murchan, S. *i in.*, „Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for Epidemiological Typing of Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a Single Approach Developed by Consensus in 10 European Laboratories and Its Application for Tracing the Spr”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 41, nr 4, ss. 1574–1585, 2003, doi: 10.1128/JCM.41.4.1574-1585.2003.
184. Na, S.-Y., Roh, J.-Y., Kim, J.-M., Tamang, M. D., i Lee, J.-R., „Analysis of Colonization and Genotyping of the Exotoxins of *Staphylococcus aureus* in Patients with Atopic Dermatitis”, *Ann. Dermatol.*, t. 24, nr 4, s. 413, 2012, doi: 10.5021/ad.2012.24.4.413.
185. Nada, H. A., Gomaa, N. I. M., Elakhras, A., Wasfy, R., i Baker, R. A., „Skin colonization by superantigen-producing *Staphylococcus aureus* in Egyptian patients with atopic dermatitis and its relation to disease severity and serum interleukin-4 level”, *Int. J. Infect. Dis.*, t. 16, nr 1, ss. e29–e33, 2012, doi: 10.1016/j.ijid.2011.09.014.
186. Nakatsuji, T. *i in.*, „Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis.”, *Sci. Transl. Med.*, t. 9, nr 378, s. eaah4680, 2017, doi: 10.1126/scitranslmed.aah4680.
187. Nakonieczna, J., Wozniak, A., Pieranski, M., Rapacka-Zdonczyk, A., Ogonowska, P., i Grinholc, M., „Photoinactivation of ESKAPE pathogens: overview of novel therapeutic strategy”, *Future Med. Chem.*, t. 11, nr 5, ss. 443–461, 2019, doi: 10.4155/fmc-2018-0329.
188. Nakonieczna, J., Wolnikowska, K., Ogonowska, P., Neubauer, D., Bernat, A., i Kamysz, W., „Rose Bengal-Mediated Photoinactivation of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Is Enhanced in the Presence of Antimicrobial Peptides”, *Front. Microbiol.*, t. 9, nr August, ss. 1–15, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01949.

189. Di Nardo, A., Wertz, P., Giannetti, A., i Seidenari, S., „Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis”, *Acta Derm. Venereol.*, 1998, doi: 10.1080/00015559850135788.
190. Nienaber, J. J. C. *i in.*, „Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Endocarditis Isolates Are Associated With Clonal Complex 30 Genotype and a Distinct Repertoire of Enterotoxins and Adhesins”, *J. Infect. Dis.*, t. 204, nr 5, ss. 704–713, 2011, doi: 10.1093/infdis/jir389.
191. Nikaido, H. i Vaara, M., „Molecular basis of bacterial outer membrane permeability”, *Microbiol. Rev.*, t. 49, nr 1, ss. 1–32, 1985, doi: 10.1128/mr.49.1.1-32.1985.
192. Novick, R. P. *i in.*, „Theagr P2 operon: An autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*”, *Mol. Gen. Genet. MGG*, t. 248, nr 4, ss. 446–458, 1995, doi: 10.1007/BF02191645.
193. Nutten, S., „Atopic dermatitis: Global epidemiology and risk factors”, *Ann. Nutr. Metab.*, t. 66, ss. 8–16, 2015, doi: 10.1159/000370220.
194. O’Regan, G. M. i Irvine, A. D., „The role of filaggrin loss-of-function mutations in atopic dermatitis”, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, t. 8, nr 5, ss. 406–410, 2008, doi: 10.1097/ACI.0b013e32830e6fb2.
195. O’Regan, G. M., Sandilands, A., McLean, W. H. I., i Irvine, A. D., „Filaggrin in atopic dermatitis”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 122, nr 4, ss. 689–693, 2008, doi: 10.1016/j.jaci.2008.08.002.
196. Ogonowska, P. *i in.*, „Application and characterization of light-emitting diodes for photodynamic inactivation of bacteria”, *Light. Res. Technol.*, t. 51, nr 4, ss. 612–624, 2019, doi: 10.1177/1477153518781478.
197. Ogonowska, P., Gilaberte, Y., Barańska-Rybak, W., i Nakonieczna, J., „Colonization With *Staphylococcus aureus* in Atopic Dermatitis Patients: Attempts to Reveal the Unknown”, *Front. Microbiol.*, t. 11, 2021, doi: 10.3389/fmicb.2020.567090.
198. Ogonowska, P. i Nakonieczna, J., „Validation of stable reference genes in *Staphylococcus aureus* to study gene expression under photodynamic treatment: a case study of SEB virulence factor analysis”, *Sci. Rep.*, t. 10, nr 1, s. 16354, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-73409-1.
199. Ohnishi, Y., Okino, N., Ito, M., i Imayama, S., „Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis.”, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, t. 6, nr 1, ss. 101–4, 1999, [Online]. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9874672%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov>

/articlerender.fcgi?artid=PMC95668.

200. de Oliveira, R. R., Schwartz-Filho, H. O., Novaes, A. B., i Taba, M., „Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: A Preliminary Randomized Controlled Clinical Study”, *J. Periodontol.*, t. 78, nr 6, ss. 965–973, 2007, doi: 10.1902/jop.2007.060494.
201. Ong, P. Y. *i in.*, „Endogenous Antimicrobial Peptides and Skin Infections in Atopic Dermatitis”, *N. Engl. J. Med.*, t. 347, nr 15, ss. 1151–1160, 2002, doi: 10.1056/NEJMoa021481.
202. Ortega, E., Abriouel, H., Lucas, R., i G??lvez, A., „Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance”, *Toxins (Basel)*, t. 2, nr 8, ss. 2117–2131, 2010, doi: 10.3390/toxins2082117.
203. Orwin, P. M., Fitzgerald, J. R., Leung, D. Y. M., Gutierrez, J. A., Bohach, G. A., i Schlievert, P. M., „Characterization of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin L”, *Infect. Immun.*, t. 71, nr 5, ss. 2916–2919, 2003, doi: 10.1128/IAI.71.5.2916-2919.2003.
204. Osiecka, B. J., Nockowski, P., i Szepietowski, J. C., „Treatment of actinic keratosis with photodynamic therapy using red or green light: A comparative study”, *Acta Derm. Venereol.*, t. 98, nr 7, ss. 689–693, 2018, doi: 10.2340/00015555-2931.
205. Park, J. M. *i in.*, „Change in antimicrobial susceptibility of skin-colonizing *Staphylococcus aureus* in Korean patients with atopic dermatitis during ten-year period”, *Ann. Dermatol.*, t. 28, nr 4, ss. 470–478, 2016, doi: 10.5021/ad.2016.28.4.470.
206. Pascolini, C. *i in.*, „Molecular and Immunological Characterization of *Staphylococcus aureus* in Pediatric Atopic Dermatitis: Implications for Prophylaxis and Clinical Management”, *Clin. Dev. Immunol.*, t. 2011, ss. 1–7, 2011, doi: 10.1155/2011/718708.
207. Patel, G. K., Wyatt, H., Kubiak, E. M., Clark, S. M., i Mills, C. M., „*Staphylococcus aureus* colonization of children with atopic eczema and their parents [2]”, *Acta Dermato-Venereologica*. 2001, doi: 10.1080/000155501317140124.
208. Pendaries, V. *i in.*, „Knockdown of Filaggrin in a Three-Dimensional Reconstructed Human Epidermis Impairs Keratinocyte Differentiation”, *J. Invest. Dermatol.*, t. 134, nr 12, ss. 2938–2946, 2014, doi: 10.1038/jid.2014.259.
209. Peng, H. L., Novick, R. P., Kreiswirth, B., Kornblum, J., i Schlievert, P., „Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*”, *J. Bacteriol.*, t. 170, nr 9, ss. 4365–4372, 1988, doi: 10.1128/jb.170.9.4365-4372.1988.

210. Pérez-Laguna, V. *i in.*, „Antimicrobial photodynamic activity of Rose Bengal, alone or in combination with Gentamicin, against planktonic and biofilm *Staphylococcus aureus*”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2018, doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.11.012.
211. Pfaffl, M. W., „A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR”, *Nucleic Acids Res.*, t. 29, nr 9, ss. 45e – 45, 2001, doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
212. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., i Neuvians, T. P., „Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations”, *Biotechnol. Lett.*, t. 26, nr 6, ss. 509–515, 2004, doi: 10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47.
213. Phoenix, D. A., Sayed, Z., Hussain, S., Harris, F., i Wainwright, M., „The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*”, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, t. 39, nr 1, ss. 17–22, 2003, doi: 10.1016/S0928-8244(03)00173-1.
214. Pieranski, M., Sitkiewicz, I., i Grinholc, M., „Increased photoinactivation stress tolerance of *Streptococcus agalactiae* upon consecutive sublethal phototreatments”, *Free Radic. Biol. Med.*, t. 160, nr August, ss. 657–669, 2020, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.003.
215. Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., i Reyes, V. E., „Staphylococcal Enterotoxins”, *Toxins (Basel)*, t. 2, nr 8, ss. 2177–2197, 2010, doi: 10.3390/toxins2082177.
216. Pinheiro, S. L., Schenka, A. A., Neto, A. A., de Souza, C. P., Rodriguez, H. M. H., i Ribeiro, M. C., „Photodynamic therapy in endodontic treatment of deciduous teeth”, *Lasers Med. Sci.*, t. 24, nr 4, ss. 521–526, 2009, doi: 10.1007/s10103-008-0562-2.
217. Pottier, R. H., Chow, Y. F. A., LaPlante, J. -P, Truscott, T. G., Kennedy, J. C., i Beiner, L. A., „Non-Invasive Technique for Obtaining Fluorescence Excitation and Emission Spectra *in vivo*”, *Photochem. Photobiol.*, t. 44, nr 5, ss. 679–687, 1986, doi: 10.1111/j.1751-1097.1986.tb04726.x.
218. Pourcel, C., Hormigos, K., Onteniente, L., Sakwinska, O., Deurenberg, R. H., i Vergnaud, G., „Improved Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Assay for *Staphylococcus aureus* Genotyping, Providing a Highly Informative Technique Together with Strong Phylogenetic Value”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 47, nr 10, ss. 3121–3128, 2009, doi: 10.1128/JCM.00267-09.
219. Pourhajibagher, M., Mahmoudi, H., Rezaei-soufi, L., Alikhani, M. Y., i Bahador, A., „Potentiation effects of antimicrobial photodynamic therapy on quorum sensing genes expression: A promising treatment for multi-species bacterial biofilms in burn wound

- infections”, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, t. 30, s. 101717, 2020, doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.101717.
220. Pozzi, G. i Asero, R., „Skin photodynamic therapy in severe localized atopic dermatitis: A case report”, *Br. J. Dermatol.*, t. 163, nr 2, ss. 430–431, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09823.x.
221. Pragman, A. A., Yarwood, J. M., Tripp, T. J., i Schlievert, P. M., „Characterization of Virulence Factor Regulation by SrrAB, a Two-Component System in *Staphylococcus aureus*”, *J. Bacteriol.*, t. 186, nr 8, ss. 2430–2438, 2004, doi: 10.1128/JB.186.8.2430-2438.2004.
222. Pragman, A. A., Ji, Y., i Schlievert, P. M., „Repression of *Staphylococcus aureus* SrrAB Using Inducible Antisense *srrA* Alters Growth and Virulence Factor Transcript Levels”, *Biochemistry*, t. 46, nr 1, ss. 314–321, 2007, doi: 10.1021/bi0603266.
223. Proksch, E., Brandner, J. M., i Jensen, J. M., „The skin: An indispensable barrier”, *Exp. Dermatol.*, 2008, doi: 10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.
224. Rabello, R. F., Moreira, B. M., Lopes, R. M. M., Teixeira, L. M., Riley, L. W., i Castro, A. C. D., „Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds”, *J. Med. Microbiol.*, t. 56, nr 11, ss. 1505–1511, 2007, doi: 10.1099/jmm.0.47357-0.
225. Ragàs, X., Dai, T., Tegos, G. P., Agut, M., Nonell, S., i Hamblin, M. R., „Photodynamic inactivation of *Acinetobacter baumannii* using phenothiazinium dyes: *In vitro* and *in vivo* studies”, *Lasers Surg. Med.*, t. 42, nr 5, ss. 384–390, 2010, doi: 10.1002/lsm.20922.
226. Ramstad, S., Le Anh-Vu, N., i Johnsson, A., „The temperature dependence of porphyrin production in *Propionibacterium acnes* after incubation with 5-aminolevulinic acid (ALA) and its methyl ester (m-ALA)”, *Photochem. Photobiol. Sci.*, t. 5, nr 1, ss. 66–72, 2006, doi: 10.1039/B512837D.
227. Rangel, S. M. i Paller, A. S., „Bacterial colonization, overgrowth, and superinfection in atopic dermatitis”, *Clin. Dermatol.*, t. 36, nr 5, ss. 641–647, 2018, doi: 10.1016/j.clindermatol.2018.05.005.
228. Rapacka-Zdonczyk, A., Wozniak, A., Pieranski, M., Woziwodzka, A., Bielawski, K. P., i Grinholc, M., „Development of *Staphylococcus aureus* tolerance to antimicrobial photodynamic inactivation and antimicrobial blue light upon sub-lethal treatment”, *Sci. Rep.*, t. 9, nr 1, ss. 1–18, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-45962-x.
229. Rawlings, A. V., Scott, I. R., Harding, C. R., i Bowser, P. A., „Stratum corneum moisturization at the molecular level”, *J. Invest. Dermatol.*, 1994, doi: 10.1111/1523-

- 1747.ep12398620.
230. Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A., i Novick, R. P., „Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*”, *Mol. Gen. Genet. MGG*, t. 202, nr 1, ss. 58–61, 1986, doi: 10.1007/BF00330517.
  231. Redmond, R. W. i Gamlin, J. N., „A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules”, *Photochem. Photobiol.*, t. 70, nr 4, ss. 391–475, 1999, doi: 10.1111/j.1751-1097.1999.tb08240.x.
  232. Reischl, U. *i in.*, „Single-nucleotide polymorphism in the SCCmec-orfX junction distinguishes between livestock-associated MRSA CC398 and human epidemic MRSA strains.”, *Euro Surveill.*, t. 14, nr 49, 2009, [Online]. Dostępne na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003904>.
  233. Ring, J., Abeck, D., i Neuber, K., „Atopic eczema: role of microorganisms on the skin surface”, *Allergy*, t. 47, nr 4, ss. 265–269, 1992, doi: 10.1111/j.1398-9995.1992.tb02051.x.
  234. Rodenbeck, D. L., Silverberg, J. I., i Silverberg, N. B., „Phototherapy for atopic dermatitis”, *Clin. Dermatol.*, t. 34, nr 5, ss. 607–613, 2016, doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.05.011.
  235. Rodriguez, M. *i in.*, „Discriminatory Indices of Typing Methods for Epidemiologic Analysis of Contemporary *Staphylococcus aureus* Strains”, *Medicine (Baltimore)*, t. 94, nr 37, s. e1534, 2015, doi: 10.1097/MD.0000000000001534.
  236. Rojo, A., Aguinaga, A., Monecke, S., Yuste, J. R., Gastaminza, G., i España, A., „*Staphylococcus aureus* genomic pattern and atopic dermatitis: May factors other than superantigens be involved?”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, t. 33, nr 4, ss. 651–658, 2014, doi: 10.1007/s10096-013-2000-z.
  237. Roll, A., Cozzio, A., Fischer, B., i Schmid-Grendelmeier, P., „Microbial colonization and atopic dermatitis”, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2004, doi: 10.1097/00130832-200410000-00008.
  238. Rolo, J. *i in.*, „High Genetic Diversity among Community-Associated *Staphylococcus aureus* in Europe: Results from a Multicenter Study”, *PLoS One*, t. 7, nr 4, s. e34768, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0034768.
  239. Sabat, A. *i in.*, „New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 41, nr 4, ss. 1801–1804, 2003, doi: 10.1128/JCM.41.4.1801-1804.2003.

240. Saïd-Salim, B. *i in.*, „Global Regulation of *Staphylococcus aureus* Genes by Rot”, *J. Bacteriol.*, t. 185, nr 2, ss. 610–619, 2003, doi: 10.1128/JB.185.2.610-619.2003.
241. Salgado-Pabón, W., Case-Cook, L. C., i Schlievert, P. M., „Molecular Analysis of Staphylococcal Superantigens”, w *Methods in Molecular Biology*, 2014, ss. 169–185.
242. Sandilands, A. *i in.*, „Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema”, *Nat. Genet.*, t. 39, nr 5, ss. 650–654, 2007, doi: 10.1038/ng2020.
243. Schlievert, P. M., Case, L. C., Strandberg, K. L., Abrams, B. B., i Leung, D. Y. M., „Superantigen Profile of *Staphylococcus aureus* Isolates from Patients with Steroid-Resistant Atopic Dermatitis”, *Clin. Infect. Dis.*, t. 46, nr 10, ss. 1562–1567, 2008, doi: 10.1086/586746.
244. Schlievert, P. M., Strandberg, K. L., Lin, Y.-C., Peterson, M. L., i Leung, D. Y. M., „Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, t. 125, nr 1, ss. 39–49, 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2009.10.039.
245. Schmidt, K. A., Manna, A. C., Gill, S., i Cheung, A. L., „SarT, a Repressor of  $\alpha$ -Hemolysin in *Staphylococcus aureus*”, *Infect. Immun.*, t. 69, nr 8, ss. 4749–4758, 2001, doi: 10.1128/IAI.69.8.4749-4758.2001.
246. Schreiner, M., Bäumlner, W., Eckl, D. B., Späth, A., König, B., i Eichner, A., „Photodynamic inactivation of bacteria to decolonize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from human skin”, *Br. J. Dermatol.*, t. 179, nr 6, ss. 1358–1367, 2018, doi: 10.1111/bjd.17152.
247. Schroder, W., Goerke, C., i Wolz, C., „Opposing effects of aminocoumarins and fluoroquinolones on the SOS response and adaptability in *Staphylococcus aureus*”, *J. Antimicrob. Chemother.*, t. 68, nr 3, ss. 529–538, 2013, doi: 10.1093/jac/dks456.
248. Scott, I. R. i Harding, C. R., „Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment”, *Dev. Biol.*, t. 115, nr 1, ss. 84–92, 1986, doi: 10.1016/0012-1606(86)90230-7.
249. Seidl, K., Bischoff, M., i Berger-Bächli, B., „CcpA Mediates the Catabolite Repression of *tst* in *Staphylococcus aureus*”, *Infect. Immun.*, t. 76, nr 11, ss. 5093–5099, 2008, doi: 10.1128/IAI.00724-08.
250. Senn, M. M. *i in.*, „Molecular Analysis and Organization of the  $\sigma$ B Operon in *Staphylococcus aureus*”, *J. Bacteriol.*, t. 187, nr 23, ss. 8006–8019, 2005, doi:

- 10.1128/JB.187.23.8006-8019.2005.
251. Shafer, W. M. i Iandolo, J. J., „Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B”, *Infect. Immun.*, t. 20, nr 1, ss. 273–278, 1978, doi: 10.1128/iai.20.1.273-278.1978.
252. Shalita, Z., Hertman, I., i Sarid, S., „Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*”, *J. Bacteriol.*, t. 129, nr 1, ss. 317–325, 1977, doi: 10.1128/jb.129.1.317-325.1977.
253. Sihto, H. M., Tasara, T., Stephan, R., i Johler, S., „Validation of reference genes for normalization of qPCR mRNA expression levels in *Staphylococcus aureus* exposed to osmotic and lactic acid stress conditions encountered during food production and preservation”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2014, doi: 10.1111/1574-6968.12491.
254. Silva, A., Borges, A., Freitas, C., Hioka, N., Mikcha, J., i Simões, M., „Antimicrobial Photodynamic Inactivation Mediated by Rose Bengal and Erythrosine Is Effective in the Control of Food-Related Bacteria in Planktonic and Biofilm States”, *Molecules*, t. 23, nr 9, s. 2288, 2018, doi: 10.3390/molecules23092288.
255. Silverberg, J. I., „Public Health Burden and Epidemiology of Atopic Dermatitis”, *Dermatologic Clinics*. 2017, doi: 10.1016/j.det.2017.02.002.
256. Soares, J., Lopes, C., Tavaría, F., Delgado, L., i Pintado, M., „A diversity profile from the staphylococcal community on atopic dermatitis skin: A molecular approach”, *J. Appl. Microbiol.*, t. 115, nr 6, ss. 1411–1419, 2013, doi: 10.1111/jam.12296.
257. Sonesson, A. *i in.*, „Identification of bacterial biofilm and the *Staphylococcus aureus* derived protease, staphopain, on the skin surface of patients with atopic dermatitis”, *Sci. Rep.*, t. 7, nr 1, ss. 1–12, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-08046-2.
258. Spagnul, C., Turner, L. C., i Boyle, R. W., „Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications”, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, t. 150, ss. 11–30, 2015, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.04.021.
259. Spaulding, A. R., Salgado-Pabón, W., Kohler, P. L., Horswill, A. R., Leung, D. Y. M., i Schlievert, P. M., „Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins”, *Clin. Microbiol. Rev.*, t. 26, nr 3, ss. 422–447, 2013, doi: 10.1128/CMR.00104-12.
260. Spoor, L. E. *i in.*, „Livestock Origin for a Human Pandemic Clone of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*”, *MBio*, t. 4, nr 4, 2013, doi: 10.1128/mBio.00356-13.
261. Spratt, B. G., „Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet”, *Curr. Opin. Microbiol.*, t. 2, nr 3, ss. 312–316, 1999, doi: 10.1016/S1369-5274(99)80054-X.



262. Ster, C., Gilbert, F. B., Cochard, T., i Poutrel, B., „Transcriptional profiles of regulatory and virulence factors of *Staphylococcus aureus* of bovine origin: oxygen impact and strain-to-strain variations”, *Mol. Cell. Probes*, t. 19, nr 4, ss. 227–235, 2005, doi: 10.1016/j.mcp.2005.01.002.
263. Strattonnikov, A. A., Meerovich, G. A., i Loschenov, V. B., „Photobleaching of photosensitizers applied for photodynamic therapy”, 2000, ss. 81–91, doi: 10.1117/12.379885.
264. Suh, L., Coffin, S., Leckerman, K. H., Gelfand, J. M., Honig, P. J., i Yan, A. C., „Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization in Children with Atopic Dermatitis”, *Pediatr. Dermatol.*, t. 25, nr 5, ss. 528–534, 2008, doi: 10.1111/j.1525-1470.2008.00768.x.
265. Sule, O., Brown, N. M., Willocks, L. J., Day, J., Shankar, S., Palmer, C. R., i Burrows, N. P., „Fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus* (FRSA) carriage in patients with atopic eczema and pattern of prior topical fusidic acid use”, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2007, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.02.015.
266. Sun, F. *i in.*, „Quorum-sensing agr mediates bacterial oxidation response via an intramolecular disulfide redox switch in the response regulator AgrA”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, t. 109, nr 23, ss. 9095–9100, 2012, doi: 10.1073/pnas.1200603109.
267. Sung, J. M.-L., Lloyd, D. H., i Lindsay, J. A., „*Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray”, *Microbiology*, t. 154, nr 7, ss. 1949–1959, 2008, doi: 10.1099/mic.0.2007/015289-0.
268. Sybilski, A. J. *i in.*, „Atopic dermatitis is a serious health problem in Poland. Epidemiology studies based on the ECAP study”, *Postep. Dermatologii i Alergol.*, t. 32, nr 1, ss. 1–10, 2015, doi: 10.5114/pdia.2014.40935.
269. Tam, K. i Torres, V. J., „*Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes”, *Microbiol. Spectr.*, t. 7, nr 2, 2019, doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018.
270. Tanaka, M. *i in.*, „Optimal Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Infections Should Kill Bacteria but Spare Neutrophils”, *Photochem. Photobiol.*, t. 88, nr 1, ss. 227–232, 2012, doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.01005.x.
271. Tang, Y.-W. *i in.*, „Comparison of Protein A Gene Sequencing with Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Epidemiologic Data for Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 38, nr 4, ss. 1347–1351, 2000, doi: 10.1128/JCM.38.4.1347-1351.2000.

272. Taskapan, M. O. i Kumar, P., „Role of staphylococcal superantigens in atopic dermatitis: From colonization to inflammation”, *Ann. Allergy, Asthma Immunol.*, t. 84, nr 1, ss. 3–12, 2000, doi: 10.1016/S1081-1206(10)62731-7.
273. Tenover, F. C. *i in.*, „Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*”, *J. Clin. Microbiol.*, t. 32, nr 2, ss. 407–415, 1994, doi: 10.1128/jcm.32.2.407-415.1994.
274. Theis, T., Skurray, R. A., i Brown, M. H., „Identification of suitable internal controls to study expression of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance system by quantitative real-time PCR.”, *J. Microbiol. Methods*, t. 70, nr 2, ss. 355–62, 2007, doi: 10.1016/j.mimet.2007.05.011.
275. Tomi, N. S., Kränke, B., i Aberer, E., „Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects”, *J. Am. Acad. Dermatol.*, t. 53, nr 1, ss. 67–72, 2005, doi: 10.1016/j.jaad.2005.02.034.
276. Tortik, N., Steinbacher, P., Maisch, T., Spaeth, A., i Plaetzer, K., „A comparative study on the antibacterial photodynamic efficiency of a curcumin derivative and a formulation on a porcine skin model”, *Photochem. Photobiol. Sci.*, t. 15, nr 2, ss. 187–195, 2016, doi: 10.1039/C5PP00393H.
277. Totté, J. E. E., van der Feltz, W. T., Hennekam, M., van Belkum, A., van Zuuren, E. J., i Pasmans, S. G. M. A., „Prevalence and odds of *Staphylococcus aureus* carriage in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis”, *Br. J. Dermatol.*, t. 175, nr 4, ss. 687–695, 2016, doi: 10.1111/bjd.14566.
278. Tremaine, M. T., Brockman, D. K., i Betley, M. J., „Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*)”, *Infect. Immun.*, t. 61, nr 1, ss. 356–359, 1993, doi: 10.1128/iai.61.1.356-359.1993.
279. Tsaytler, P. A., C. O’Flaherty, M., Sakharov, D. V., Krijgsveld, J., i Egmond, M. R., „Immediate Protein Targets of Photodynamic Treatment in Carcinoma Cells”, *J. Proteome Res.*, t. 7, nr 9, ss. 3868–3878, 2008, doi: 10.1021/pr800189q.
280. Tseng, S.-P. *i in.*, „Effects of toluidine blue O (TBO)-photodynamic inactivation on community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates”, *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, t. 50, nr 1, ss. 46–54, 2017, doi: 10.1016/j.jmii.2014.12.007.
281. Tubby, S., Wilson, M., i Nair, S. P., „Inactivation of staphylococcal virulence factors using a light-activated antimicrobial agent”, *BMC Microbiol.*, t. 9, nr 1, s. 211, 2009, doi: 10.1186/1471-2180-9-211.
282. Tuffs, S. W., Herfst, C. A., Baroja, M. L., Podskalniy, V. A., DeJong, E. N., Coleman,

- C. E. M., i McCormick, J. K., „Regulation of toxic shock syndrome toxin-1 by the accessory gene regulator in *Staphylococcus aureus* is mediated by the repressor of toxins”, *Mol. Microbiol.*, t. 112, nr 4, ss. 1163–1177, 2019, doi: 10.1111/mmi.14353.
283. Tuttobene, M. R. *i in.*, „Light Modulates Important Pathogenic Determinants and Virulence in ESKAPE Pathogens *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*”, *J. Bacteriol.*, t. 203, nr 5, 2021, doi: 10.1128/JB.00566-20.
284. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., i Speleman, F., „Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.”, *Genome Biol.*, t. 3, nr 7, s. RESEARCH0034, 2002, doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
285. Vasconcelos, N. G., Lourdes, M. De, Souza, R. De, Gaebler Vasconcelos, N., i de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, M., „Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods”, *J. Public Heal. Epidemiol.*, t. 2, nr June, ss. 29–42, 2010, [Online]. Dostępne na: <http://www.academicjournals.org/jphe>.
286. Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., i Wulf, M., „Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pig Farming”, *Emerg. Infect. Dis.*, t. 11, nr 12, ss. 1965–1966, 2005, doi: 10.3201/eid1112.050428.
287. Wainwright, M., Phoenix, D. A., Laycock, S. L., Wareing, D. R. A., i Wright, P. A., „Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*”, *FEMS Microbiol. Lett.*, t. 160, nr 2, ss. 177–181, 1998, doi: 10.1016/S0378-1097(97)00545-4.
288. Wainwright, M., „Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)”, *J. Antimicrob. Chemother.*, t. 42, nr 1, ss. 13–28, 1998, doi: 10.1093/jac/42.1.13.
289. Wainwright, M., Maisch, T., Nonell, S., Plaetzer, K., Almeida, A., Tegos, G. P., i Hamblin, M. R., „Photoantimicrobials—are we afraid of the light?”, *Lancet Infect. Dis.*, t. 17, nr 2, ss. e49–e55, 2017, doi: 10.1016/S1473-3099(16)30268-7.
290. Wang, X. W. *i in.*, „Deficiency of filaggrin regulates endogenous cysteine protease activity, leading to impaired skin barrier function”, *Clin. Exp. Dermatol.*, t. 42, nr 6, ss. 622–631, 2017, doi: 10.1111/ced.13113.
291. Wang, X. *i in.*, „Identification and validation of appropriate reference genes for qRT-PCR analysis in *Corynebacterium glutamicum*”, *FEMS Microbiol. Lett.*, t. 365, nr 8, 2018, doi: 10.1093/femsle/fny030.
292. Wanke, I., Skabytska, Y., Kraft, B., Peschel, A., Biedermann, T., i Schitteck, B., „*Staphylococcus aureus* skin colonization is promoted by barrier disruption and leads to

- local inflammation”, *Exp. Dermatol.*, t. 22, nr 2, ss. 153–155, 2013, doi: 10.1111/exd.12083.
293. Wen, X., Zhang, X., Szewczyk, G., El-Hussein, A., Huang, Y.-Y., Sarna, T., i Hamblin, M. R., „Potassium Iodide Potentiates Antimicrobial Photodynamic Inactivation Mediated by Rose Bengal in *In vitro* and *In vivo* Studies”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, t. 61, nr 7, 2017, doi: 10.1128/AAC.00467-17.
294. Wiegell, S. R., „Update on Photodynamic Treatment for Actinic Keratosis”, *Curr. Probl. Dermatol.*, t. 46, ss. 122–128, 2014, doi: 10.1159/000366548.
295. Wiegell, S. R. i Wulf, H. C., „Photodynamic therapy of acne vulgaris using 5-aminolevulinic acid versus methyl aminolevulinate”, *J. Am. Acad. Dermatol.*, t. 54, nr 4, ss. 647–651, 2006, doi: 10.1016/j.jaad.2005.12.033.
296. Witt, R. T., Van Belkum, A., i Van Leeuwen, W. B., „Molecular diagnostics and genotyping of MRSA: An update”, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, t. 10, nr 4, ss. 375–380, 2010, doi: 10.1586/erm.10.34.
297. Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., i Sabat, R., „IL-22 Increases the Innate Immunity of Tissues”, *Immunity*, t. 21, nr 2, ss. 241–254, 2004, doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.007.
298. Wong, T.-W., Wu, E.-C., Ko, W.-C., Lee, C.-C., Hor, L.-I., i Huang, I.-H., „Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by indocyanine green and near infrared light”, *Dermatologica Sin.*, t. 36, nr 1, ss. 8–15, 2018, doi: 10.1016/j.dsi.2017.08.003.
299. Yagi, S., Wakaki, N., Ikeda, N., Takagi, Y., Uchida, H., Kato, Y., i Minamino, M., „Presence of staphylococcal exfoliative toxin A in sera of patients with atopic dermatitis”, *Clin. Exp. Allergy*, t. 34, nr 6, ss. 984–993, 2004, doi: 10.1111/j.1365-2222.2004.1687.x.
300. Yarwood, J. M., McCormick, J. K., i Schlievert, P. M., „Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*”, *J. Bacteriol.*, t. 183, nr 4, ss. 1113–1123, 2001, doi: 10.1128/JB.183.4.1113-1123.2001.
301. Yarwood, J. M., McCormick, J. K., Paustian, M. L., Orwin, P. M., Kapur, V., i Schlievert, P. M., „Characterization and Expression Analysis of *Staphylococcus aureus* Pathogenicity Island 3”, *J. Biol. Chem.*, t. 277, nr 15, ss. 13138–13147, 2002, doi: 10.1074/jbc.M111661200.
302. Yarwood, J. M., Leung, D. Y. M., i Schlievert, P. M., „Evidence for the involvement of

- bacterial superantigens in psoriasis, atopic dermatitis, and Kawasaki syndrome”, *FEMS Microbiol. Lett.*, t. 192, nr 1, ss. 1–7, 2000, doi: 10.1016/S0378-1097(00)00400-6.
303. Yeung, M., Balma-Mena, A., Shear, N., Simor, A., Pope, E., Walsh, S., i McGavin, M. J., „Identification of major clonal complexes and toxin producing strains among *Staphylococcus aureus* associated with atopic dermatitis”, *Microbes Infect.*, t. 13, nr 2, ss. 189–197, 2011, doi: 10.1016/j.micinf.2010.10.023.
304. Yokomizo, Y., Mori, Y., Shimoji, Y., Shimizu, S., Sentsui, H., Kodama, M., i Igarashi, H., „Proliferative response and cytokine production of bovine peripheral blood mononuclear cells induced by the superantigens staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1.”, *J. Vet. Med. Sci.*, t. 57, nr 2, ss. 299–305, 1995, doi: 10.1292/jvms.57.299.
305. Zeaki, N., Budi Susilo, Y., Pregiel, A., Rådström, P., i Schelin, J., „Prophage-Encoded Staphylococcal Enterotoxin A: Regulation of Production in *Staphylococcus aureus* Strains Representing Different Sea Regions”, *Toxins (Basel)*, t. 7, nr 12, ss. 5359–5376, 2015, doi: 10.3390/toxins7124889.
306. Zeaki, N., Johler, S., Skandamis, P. N., i Schelin, J., „The Role of Regulatory Mechanisms and Environmental Parameters in Staphylococcal Food Poisoning and Resulting Challenges to Risk Assessment”, *Front. Microbiol.*, t. 10, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01307.
307. Zhao, H. *i in.*, „Molecular Typing and Variations in Amount of *tst* Gene Expression of TSST-1-Producing Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates”, *Front. Microbiol.*, t. 10, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01388.
308. Zhao, N. *i in.*, „Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates colonizing human nares and skin”, *Med. Microecol.*, t. 7, s. 100031, 2021, doi: 10.1016/j.medmic.2020.100031.
309. Zollner, T. M., Wichelhaus, T. A., Hartung, A., Von Mallinckrodt, C., Wagner, T. O. F., Brade, V., i Kaufmann, R., „Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis”, *Clin. Exp. Allergy*, t. 30, nr 7, ss. 994–1000, 2000, doi: 10.1046/j.1365-2222.2000.00848.x.

## 12. Supplement

**Tabela 1. Izolaty *S. aureus* pochodzące od pacjentów z AZS.**

Lp	Numer szczepu	Fenotyp	CA/HA	Pacjent	Płeć	Miejsce izolacji
1	001N	<b>MRSA</b>	HA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
2	001S	<b>MRSA</b>	HA	Dorosły	Kobieta	Skóra
3	002N	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
4	002S	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Skóra
5	003N	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
6	003S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
7	004N	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
8	004S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
9	005N	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
10	005S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
11	006N	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
12	006S	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
13	007N	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
14	007S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
15	008N	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
16	009S	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Skóra
17	010N	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
18	010S	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Skóra
19	011N	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
20	011S	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
21	012N	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
22	012S	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Skóra
23	013S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
24	014S	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Skóra
25	015N	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
26	016N	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
27	016S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
28	017N	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
29	017S	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Skóra
30	018N	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
31	018S	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Skóra
32	019S	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
33	020N	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
34	020S	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Skóra
35	021S	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
36	022N	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
37	023N	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
38	023S	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
39	024S	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Skóra
40	025N	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa

41	025S	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
42	026N	MSSA	CA	Dziecko	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
43	027N	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
44	027S	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
45	028S	MSSA	CA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
46	029N	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
47	029S	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Skóra
48	030N	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
49	030S	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Skóra
50	031N	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
51	031S	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
52	032N	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
53	033N	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
54	033S	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Skóra
55	034N	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
56	034S	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
57	035N	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
58	035S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
59	036N	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
60	036S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
61	037N	MSSA	CA	Dziecko	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
62	037S	MSSA	CA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
63	038N	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
64	038S	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Skóra
65	039N	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
66	039S	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Skóra
67	040N	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
68	040S	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Skóra
69	042N	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
70	043S	<b>MRSA</b>	CA	Dziecko	Kobieta	Skóra
71	044N	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
72	045N	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
73	045S	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Skóra
74	046N	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
75	046S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
76	048N	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
77	048S	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
78	051N	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
79	051S	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Skóra
80	052N	MSSA	CA	Dziecko	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
81	052S	MSSA	CA	Dziecko	Kobieta	Skóra
82	053N	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
83	053S	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Skóra
84	055N	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
85	055S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
86	056N	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa

87	056S	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Skóra
88	057N	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
89	057S	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Skóra
90	059N	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
91	059S	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
92	060N	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
93	060S	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Skóra
94	061N	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
95	061S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
96	062N	<b>MRSA</b>	HA	Dziecko	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
97	062S	<b>MRSA</b>	HA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
98	063N	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
99	063S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
100	064S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
101	065N2	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
102	065N3	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
103	065S	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Skóra
104	068N	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
105	068S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
106	070N	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
107	070S	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Skóra
108	071N	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
109	071S	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
110	072N	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
111	072S	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Skóra
112	073N	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
113	073S	MSSA	HA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
114	074N	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
115	074S	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Skóra
116	077N	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
117	077S	MSSA	HA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
118	079N	MSSA	CA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
119	080N	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
120	080S	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
121	081N	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
122	081S	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
123	083N	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
124	083S	MSSA	CA	Dorosły	Mężczyzna	Skóra
125	086N	MSSA	CA	Dziecko	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
126	086S	MSSA	CA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
127	087N	MSSA	CA	Dziecko	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
128	088N	MSSA	HA	Dziecko	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
129	089N	MSSA	CA	Dziecko	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
130	089S	MSSA	CA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
131	090S	MSSA	CA	Dziecko	Kobieta	Skóra
132	092N	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa



133	093N	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
134	093S	MSSA	HA	Dorosły	Kobieta	Skóra
135	094N	MSSA	CA	Dziecko	Kobieta	Jama nosowo-gardłowa
136	094S	MSSA	CA	Dziecko	Kobieta	Skóra
137	095S	MSSA	CA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra
138	096N	MSSA	CA	Dziecko	Mężczyzna	Jama nosowo-gardłowa
139	096S	MSSA	CA	Dziecko	Mężczyzna	Skóra

MRSA – gronkowiec złocisty oporny na metycylinę; MSSA – gronkowiec złocisty wrażliwy na metycylinę; CA – pozaszpitalny szczep; HA – szpitalny szczep

**Tabela 2. Szczepy *S. aureus* pozyskane od pacjentów bez cech atopii (grupa kontrolna).**

Lp	Nr szczepu	MRSA/MSSA	Miejsce izolacji
1	95	MSSA	Skóra
2	118	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
3	119	MSSA	Gardło
4	138	MSSA	Gardło
5	140	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
6	269	MSSA	Ucho
7	591	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
8	598	MSSA	Gardło
9	970	MSSA	Gardło
10	1327	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
11	1385	MSSA	Ucho
12	1457	MSSA	Drzewo oskrzelowe
13	1917	MSSA	Pępek
14	2086	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
15	2469	MSSA	Odbyt
16	3076	MSSA	Skóra
17	3097	MSSA	Gardło
18	3098	MSSA	Ucho
19	3149	MSSA	Ucho
20	3840	MSSA	Ucho
21	4597	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
22	4759	MSSA	Ucho
23	6558	MSSA	Drzewo oskrzelowe
24	10221	MSSA	Gardło
25	13289	MSSA	Skóra
26	15587	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
27	1159/S	MSSA	Drzewo oskrzelowe
28	1162/O	MSSA	Drzewo oskrzelowe

29	1289/2	MSSA	Wymaz z pępka
30	1611/S	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
31	1964/S	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
32	2028/S	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
33	345/0/7	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
34	491/e	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
35	529/e	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
36	564/E	MSSA	Jama nosowo-gardłowa
37	5718/2	MSSA	Drzewo oskrzelowe
38	80/0	MSSA	Drzewo oskrzelowe
39	990/P/7	MSSA	Gardło

MRSA – gronkowiec złocisty oporny na metycylinę; MSSA – gronkowiec złocisty wrażliwy na metycylinę

**Tabela 3. Szczepy referencyjne *S. aureus*.**

Lp	Numer szczepu	MRSA/ MSSA	Miejsce izolacji	Typ <i>spa</i>	ST	CC	<i>agr</i>	Geny toksyn
1	140/05	MSSA	Krew	t529	ST59	CC59	1	<i>seb</i>
2	1005/05	MSSA	Krew	t008	ST8	CC8	1	<i>tst, sed</i>
3	1057/05	MSSA	Drzewo oskrzelowe	t091	ST7	CC7	1	<i>see</i>
4	1200/05	MSSA	Rana	t037	ST239	CC8	1	<i>sea</i>
5	1273/05	MSSA	Rana	t2104	ST8	CC8	1	<i>sed</i>
6	1817/05	MSSA	Rana	t127	ST1	CC1	3	<i>seh</i>
7	1825/07	MSSA	Krew	t121	ST8	CC8	1	<i>sed</i>
8	1947/05	MSSA	Krew	t015	ST45	CC45	1	<i>sec, seg, sei</i>
9	2128/05	MSSA	Drzewo oskrzelowe	t091	ST7	CC7	1	<i>see</i>
10	3640/08	MRSA	Rana	t437	ST338	CC59	1	<i>seb</i>
11	447/05	MSSA	Rana	t711	ST8	CC8	1	<i>sed</i>
12	4620/09	MSSA	Wymaz z jamy nosowo-gardłowej	t021	ST30	CC30	3	<i>tst, seg, sei</i>
13	7198/12	MSSA	Kurz	t127	ST1	CC1	3	<i>seh</i>
14	10798/11	MSSA	Wymaz z jamy nosowo-gardłowej	t127	ST1	CC1	3	<i>sea, seh</i>

MSSA – szczep gronkowca złocistego wrażliwego na metycylinę; MRSA – szczep gronkowca złocistego opornego na metycylinę; *spa* – gen białka A *S. aureus*; ST – typ sekwencji; CC – kompleks klonalny; *agr* – dodatkowy regulator genu

**Tabela 4. Wyniki genotypowania kolekcji izolatów *S. aureus* od pacjentów z AZS.**

Lp	Szczep	Geny toksyn gronkowcowych					Typ <i>spa</i>	Typ MLST-CC
		<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>tst</i>		
1	001N	-	-	-	-	-	t437	CC59
2	001S	-	-	-	-	-	t010	CC5
3	002N	-	-	<i>sec</i>	<i>sed</i>	-	t005	CC22
4	002S	-	-	<i>sec</i>	<i>sed</i>	-	t005	CC22
5	003N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	<i>sed</i>	-	t091	CC7
6	003S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	<i>sed</i>	-	t091	CC7
7	004N	-	-	-	<i>sed</i>	-	t084	CC15
8	004S	-	-	-	<i>sed</i>	-	t084	CC15
9	005N	-	-	<i>sec</i>	-	<i>tst</i>	t2223	CC45
10	005S	-	-	<i>sec</i>	-	<i>tst</i>	t2223	CC45
11	006N	<i>sea</i>	-	-	<i>sed</i>	-	t1685	CC7
12	006S	<i>sea</i>	-	-	<i>sed</i>	-	t091	CC7
13	007N	<i>sea</i>	-	-	<i>sed</i>	-	t1255	CC398
14	007S	<i>sea</i>	-	-	<i>sed</i>	-	t1255	CC398
15	008N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	<i>sed</i>	-	t095	CC45
16	009S	-	-	<i>sec</i>	-	-	t095	CC45
17	010N	-	-	-	-	-	t005	CC22
18	010S	<i>sea</i>	-	-	-	-	t091	CC7
19	011N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	<i>sed</i>	-	t1312	ST7425
20	011S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	<i>sed</i>	-	t1312	ST7425
21	012N	<i>sea</i>	-	-	<i>sed</i>	-	t024	CC8
22	012S	<i>sea</i>	-	-	<i>sed</i>	-	t024	CC8
23	013S	<i>sea</i>	-	-	<i>sed</i>	-	t024	CC8
24	014S	-	-	-	-	-	t084	CC15
25	015N	<i>sea</i>	-	-	<i>sed</i>	-	t018	CC30
26	016N	-	-	<i>sec</i>	-	-	t084	CC15
27	016S	-	-	<i>sec</i>	-	-	t084	CC15

28	017N	<i>sea</i>	-	-	-	-	t018	CC30
29	017S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	<i>sed</i>	-	t084	CC15
30	018N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t084	CC15
31	018S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	<i>sed</i>	-	t880	CC45
32	019S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t050	CC45
33	020N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	<i>sed</i>	-	t156	CC12
34	020S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	<i>sed</i>	-	t156	CC12
35	021S	<i>sea</i>	-	-	<i>sed</i>	-	t282	CC45
36	022N	-	-	-	-	-	t091	CC7
37	023N	-	-	-	-	-	t084	CC15
38	023S	-	-	-	-	-	t084	CC15
39	024S	-	-	-	-	-	t084	CC15
40	025N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	<i>sed</i>	-	t091	CC7
41	025S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	<i>sed</i>	-	t091	CC7
42	026N	-	-	<i>sec</i>	-	-	t015	CC45
43	027N	-	-	-	-	-	t091	CC7
44	027S	-	-	-	-	-	t091	CC7
45	028S	-	-	-	-	-	t282	CC45
46	029N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t091	CC7
47	029S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t091	CC7
48	030N	-	-	-	-	-	t12375	CC97
49	030S	-	-	-	-	-	t091	CC7
50	031N	-	-	-	-	-	t12375	CC97
51	031S	-	-	<i>sec</i>	-	-	t015	CC45
52	032N	<i>sea</i>	-	-	-	-	t12375	CC97
53	033N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t12375	CC97
54	033S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t12375	CC97
55	034N	-	-	-	-	-	t12375	CC97
56	034S	-	-	-	-	-	t091	CC7
57	035N	-	-	<i>sec</i>	-	-	t050	CC45

58	035S	-	-	<i>sec</i>	-	-	t050	CC45
59	036N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t015	CC45
60	036S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t015	CC45
61	037N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t864	CC10
62	037S	-	-	-	-	-	t12375	CC97
63	038N	-	-	-	-	-	t091	CC7
64	038S	-	-	-	-	-	t091	CC7
65	039N	-	-	<i>sec</i>	-	-	t2301	CC45
66	039S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t091	CC7
67	040N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t091	CC7
68	040S	-	-	-	-	-	t2301	CC45
69	042N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t127	CC1
70	043S	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	-	-	t437	CC59
71	044N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t127	CC1
72	045N	-	-	<i>sec</i>	-	-	t015	CC45
73	045S	-	-	<i>sec</i>	-	-	t015	CC45
74	046N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t084	CC15
75	046S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t359	CC97
76	048N	-	-	-	-	-	t5995	CC22
77	048S	-	-	-	-	-	t5995	CC22
78	051N	-	-	-	-	-	t692	CC88
79	051S	-	-	<i>sec</i>	-	-	t091	CC7
80	052N	-	-	-	-	-	t091	CC7
81	052S	-	-	-	-	-	t091	CC7
82	053N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t091	CC7
83	053S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t091	CC7
84	055N	-	-	<i>sec</i>	-	-	t537	CC72
85	055S	-	-	<i>sec</i>	-	-	t537	CC72
86	056N	-	-	<i>sec</i>	-	-	t209	CC9
87	056S	-	-	-	-	-	t005	CC22

88	057N	<i>sea</i>	-	-	-	-	t267	CC97
89	057S	<i>sea</i>	-	-	-	-	t267	CC97
90	059N	-	-	-	-	-	t091	CC7
91	059S	-	-	<i>sec</i>	-	-	t537	CC72
92	060N	-	-	-	-	-	t880	CC45
93	060S	-	-	-	-	-	t091	CC7
94	061N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t1814	CC88
95	061S	-	-	-	-	-	t692	CC88
96	062N	<i>sea</i>	-	-	-	-	t008	CC8
97	062S	<i>sea</i>	-	-	-	-	t008	CC8
98	063N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t1743	CC7
99	063S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t1743	CC7
100	064S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t012	CC30
101	065N2	-	-	-	-	-	t537	CC72
102	065N3	-	-	-	-	-	t091	CC7
103	065S	-	-	<i>sec</i>	-	-	t156	CC12
104	068N	-	-	-	-	<i>tst</i>	t012	CC30
105	068S	-	-	-	-	<i>tst</i>	t012	CC30
106	070N	-	-	<i>sec</i>	-	-	t015	CC45
107	070S	-	-	<i>sec</i>	-	-	t015	CC45
108	071N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t015	CC45
109	071S	-	-	-	-	-	t309	CC22
110	072N	-	-	-	-	-	t091	CC7
111	072S	-	-	-	-	-	t091	CC7
112	073N	-	-	-	-	-	t693	CC1
113	073S	-	-	-	-	-	t091	CC7
114	074N	-	-	<i>sec</i>	-	-	t156	CC12
115	074S	-	-	<i>sec</i>	-	-	t156	CC12
116	077N	-	-	<i>sec</i>	-	-	t537	CC72
117	077S	-	-	<i>sec</i>	-	-	t537	CC72



118	079N	-	-	-	-	-	t20244	ST1027
119	080N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t230	CC45
120	080S	-	-	-	-	-	t1442	CC718
121	081N	<i>sea</i>	-	-	-	<i>tst</i>	t18582	CC30
122	081S	<i>sea</i>	-	-	-	<i>tst</i>	t18582	CC30
123	083N	-	-	-	-	-	t084	CC15
124	083S	-	-	-	-	-	t084	CC15
125	086N	-	-	-	-	-	t693	CC1
126	086S	-	-	-	-	-	t091	CC7
127	087N	-	-	-	-	-	t359	CC97
128	088N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t056	CC101
129	089N	-	-	-	-	-	t091	CC7
130	089S	-	-	-	-	-	t091	CC7
131	090S	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	-	-	t160	CC12
132	092N	<i>sea</i>	-	-	-	-	t091	CC7
133	093N	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t521	CC97
134	093S	<i>sea</i>	-	<i>sec</i>	-	-	t521	CC97
135	094N	-	-	-	-	-	t2301	CC45
136	094S	-	-	-	-	-	t2301	CC45
137	095S	<i>sea</i>	-	-	-	<i>tst</i>	t037	CC30
138	096N	<i>sea</i>	-	-	-	<i>tst</i>	t021	CC30
139	096S	-	-	-	-	-	t867	CC7

N – szczep *S. aureus* wyizolowany z jamy nosowo-gardłowej; S – szczep *S. aureus* wyizolowany ze skóry; MLST – typowanie na podstawie sekwencji wielu loci, ang. *Multi-Locus Sequence Typing*; NA – nie analizowano; CC – kompleks klonalny, ang. *Clonal Complex*

**Tabela 5. Rozkład obecności genów toksyn w grupie kontrolnej.**

Lp	Nr szczepu	Geny toksyn gronkowcowych				
		<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>tst</i>
1	95	<i>sea</i>	-	-	-	-
2	118	-	<i>seb</i>	-	-	-
3	119	-	-	-	-	-
4	138	-	-	-	-	-
5	140	-	<i>seb</i>	-	-	-
6	269	-	-	-	-	-
7	591	-	-	-	-	-
8	598	-	<i>seb</i>	-	-	-
9	970	-	-	<i>sec</i>	-	-
10	1327	-	-	<i>sec</i>	-	-
11	1385	-	-	-	-	-
12	1457	<i>sea</i>	-	-	-	-
13	1917	-	-	<i>sec</i>	-	-
14	2086	-	-	<i>sec</i>	-	-
15	2469	-	-	-	-	-
16	3076	-	-	-	-	-
17	3097	-	-	-	-	-
18	3098	-	-	-	-	-
19	3149	-	-	-	-	-
20	3840	-	-	-	<i>sed</i>	-
21	4597	-	-	-	-	-
22	4759	-	-	-	-	-
23	6558	<i>sea</i>	-	-	-	-
24	10221	<i>sea</i>	-	-	-	-
25	13289	<i>sea</i>	-	-	-	-
26	15587	<i>sea</i>	-	-	-	-
27	1159/S	-	-	-	-	-

28	1162/O	-	-	-	<i>sed</i>	-
29	1289/2	-	<i>seb</i>	-	-	-
30	1611/S	-	-	-	-	-
31	1964/S	-	-	-	-	-
32	2028/S	-	-	-	-	-
33	345/0/7	-	-	-	-	-
34	491/e	-	-	-	-	-
35	529/e	-	-	-	-	-
36	564/E	-	-	-	-	-
37	5718/2	-	-	-	<i>sed</i>	-
38	80/0	<i>sea</i>	-	-	-	-
39	990/P/7	-	-	-	-	-

**Tabela 6. Efektywność przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej (aPDI) wobec izolatów klinicznych *Staphylococcus aureus*.**

Szczep	Średnia redukcja przeżywalności [ $\log_{10}$ CFU/ml $\pm$ SD]			
	Róż bengalski (RB) + światło zielone ( $\lambda_{\max}=515$ nm)			
	J/cm <sup>2</sup>	0 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M
001N	0		0,02 $\pm$ 0,10	-0,12 $\pm$ 0,08
	10	-0,26 $\pm$ 0,07	<b>5,05 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>5,05 <math>\pm</math> 0,06</b>
	20	0,00 $\pm$ 0,02	<b>5,05 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>5,05 <math>\pm</math> 0,06</b>
	40	0,17 $\pm$ 0,02	<b>5,05 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>5,05 <math>\pm</math> 0,06</b>
001S	0		0,00 $\pm$ 0,00	0,26 $\pm$ 0,21
	10	0,00 $\pm$ 0,01	<b>5,15 <math>\pm</math> 0,14</b>	<b>5,15 <math>\pm</math> 0,14</b>
	20	0,13 $\pm$ 0,22	<b>5,15 <math>\pm</math> 0,14</b>	<b>5,15 <math>\pm</math> 0,14</b>
	40	-0,15 $\pm$ 0,15	<b>5,15 <math>\pm</math> 0,14</b>	<b>5,15 <math>\pm</math> 0,14</b>
002N	0		0,16 $\pm$ 0,15	0,09 $\pm$ 0,10
	10	0,20 $\pm$ 0,19	<b>5,61 <math>\pm</math> 0,13</b>	<b>5,61 <math>\pm</math> 0,13</b>
	20	0,11 $\pm$ 0,09	<b>5,61 <math>\pm</math> 0,13</b>	<b>5,61 <math>\pm</math> 0,13</b>
	40	0,17 $\pm$ 0,22	<b>5,61 <math>\pm</math> 0,13</b>	<b>5,61 <math>\pm</math> 0,13</b>
002S	0		0,07 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,17
	10	0,03 $\pm$ 0,10	<b>3,97 <math>\pm</math> 1,02</b>	<b>5,68 <math>\pm</math> 0,05</b>
	20	0,15 $\pm$ 0,03	<b>5,68 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>5,68 <math>\pm</math> 0,05</b>
	40	0,07 $\pm$ 0,11	<b>5,68 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>5,68 <math>\pm</math> 0,05</b>
003N	0		0,10 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,05
	10	0,11 $\pm$ 0,07	<b>5,69 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>5,69 <math>\pm</math> 0,07</b>
	20	0,08 $\pm$ 0,18	<b>5,69 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>5,69 <math>\pm</math> 0,07</b>
	40	0,04 $\pm$ 0,17	<b>5,69 <math>\pm</math> 0,07</b>	<b>5,69 <math>\pm</math> 0,07</b>
003S	0		0,01 $\pm$ 0,03	-0,03 $\pm$ 0,04
	10	0,12 $\pm$ 0,07	<b>5,79 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>5,79 <math>\pm</math> 0,03</b>
	20	0,17 $\pm$ 0,02	<b>5,79 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>5,79 <math>\pm</math> 0,03</b>
	40	0,13 $\pm$ 0,03	<b>5,79 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>5,79 <math>\pm</math> 0,03</b>
004N	0		0,25 $\pm$ 0,14	0,07 $\pm$ 0,13
	10	0,16 $\pm$ 0,12	<b>3,60 <math>\pm</math> 1,11</b>	<b>5,66 <math>\pm</math> 0,14</b>
	20	0,08 $\pm$ 0,05	<b>5,66 <math>\pm</math> 0,14</b>	<b>5,66 <math>\pm</math> 0,14</b>
	40	-0,05 $\pm$ 0,12	<b>5,66 <math>\pm</math> 0,14</b>	<b>5,66 <math>\pm</math> 0,14</b>
004S	0		-0,15 $\pm$ 0,35	0,07 $\pm$ 0,03
	10	0,08 $\pm$ 0,16	2,47 $\pm$ 0,30	<b>5,42 <math>\pm</math> 0,12</b>
	20	0,24 $\pm$ 0,30	<b>5,42 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>5,42 <math>\pm</math> 0,12</b>
	40	0,66 $\pm$ 0,55	<b>5,42 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>5,42 <math>\pm</math> 0,12</b>
005N	0		0,08 $\pm$ 0,01	-0,06 $\pm$ 0,17
	10	0,12 $\pm$ 0,07	<b>5,71 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>5,71 <math>\pm</math> 0,04</b>
	20	0,05 $\pm$ 0,12	<b>5,71 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>5,71 <math>\pm</math> 0,04</b>
	40	0,04 $\pm$ 0,05	<b>5,71 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>5,71 <math>\pm</math> 0,04</b>
005S	0		0,09 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,11
	10	0,18 $\pm$ 0,13	<b>5,70 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>5,70 <math>\pm</math> 0,05</b>
	20	0,35 $\pm$ 0,21	<b>5,70 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>5,70 <math>\pm</math> 0,05</b>
	40	0,15 $\pm$ 0,10	<b>5,70 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>5,70 <math>\pm</math> 0,05</b>
006N	0		0,14 $\pm$ 0,14	0,27 $\pm$ 0,14
	10	-0,10 $\pm$ 0,08	<b>5,80 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>5,80 <math>\pm</math> 0,03</b>
	20	0,21 $\pm$ 0,13	<b>5,80 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>5,80 <math>\pm</math> 0,03</b>
	40	0,01 $\pm$ 0,04	<b>5,80 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>5,80 <math>\pm</math> 0,03</b>
006S	0		0,01 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,14
	10	0,15 $\pm$ 0,13	<b>5,83 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>5,83 <math>\pm</math> 0,08</b>
	20	0,31 $\pm$ 0,09	<b>5,83 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>5,83 <math>\pm</math> 0,08</b>
	40	0,13 $\pm$ 0,02	<b>5,83 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>5,83 <math>\pm</math> 0,08</b>
007N	0		-0,04 $\pm$ 0,10	0,01 $\pm$ 0,04

	10	0,12 ± 0,02	<b>5,65 ± 0,06</b>	<b>5,65 ± 0,06</b>
	20	0,14 ± 0,20	<b>5,65 ± 0,06</b>	<b>5,65 ± 0,06</b>
	40	0,17 ± 0,14	<b>5,65 ± 0,06</b>	<b>5,65 ± 0,06</b>
007S	0		0,07 ± 0,17	0,07 ± 0,09
	10	-0,04 ± 0,13	<b>5,65 ± 0,12</b>	<b>5,65 ± 0,12</b>
	20	0,15 ± 0,05	<b>5,65 ± 0,12</b>	<b>5,65 ± 0,12</b>
	40	-0,04 ± 0,14	<b>5,65 ± 0,12</b>	<b>5,65 ± 0,12</b>
008N	0		0,04 ± 0,11	-0,04 ± 0,14
	10	0,07 ± 0,16	<b>5,64 ± 0,07</b>	<b>5,64 ± 0,07</b>
	20	0,01 ± 0,07	<b>5,64 ± 0,07</b>	<b>5,64 ± 0,07</b>
	40	0,09 ± 0,10	<b>5,64 ± 0,07</b>	<b>5,64 ± 0,07</b>
009S	0		0,22 ± 0,10	0,11 ± 0,05
	10	0,25 ± 0,03	<b>4,22 ± 1,12</b>	<b>5,83 ± 0,04</b>
	20	0,27 ± 0,10	<b>5,83 ± 0,04</b>	<b>5,83 ± 0,04</b>
	40	0,10 ± 0,02	<b>5,83 ± 0,04</b>	<b>5,83 ± 0,04</b>
010N	0		-0,11 ± 0,18	0,00 ± 0,01
	10	0,05 ± 0,11	<b>4,53 ± 1,27</b>	<b>6,53 ± 0,10</b>
	20	0,15 ± 0,09	<b>5,53 ± 0,10</b>	<b>6,53 ± 0,10</b>
	40	0,09 ± 0,08	<b>5,53 ± 0,10</b>	<b>6,53 ± 0,10</b>
010S	0		0,02 ± 0,19	-0,13 ± 0,16
	10	-0,03 ± 0,08	1,77 ± 0,09	<b>5,54 ± 0,10</b>
	20	0,08 ± 0,07	<b>5,54 ± 0,10</b>	<b>5,54 ± 0,10</b>
	40	-0,11 ± 0,11	<b>5,54 ± 0,10</b>	<b>5,54 ± 0,10</b>
011N	0		0,16 ± 0,21	0,05 ± 0,29
	10	0,03 ± 0,27	1,41 ± 0,82	<b>5,65 ± 0,13</b>
	20	-0,12 ± 0,11	<b>3,40 ± 1,16</b>	<b>5,65 ± 0,13</b>
	40	-0,02 ± 0,07	<b>5,65 ± 0,13</b>	<b>5,65 ± 0,13</b>
011S	0		0,17 ± 0,10	0,07 ± 0,19
	10	0,18 ± 0,11	<b>3,78 ± 1,28</b>	<b>5,57 ± 0,12</b>
	20	0,12 ± 0,03	<b>5,57 ± 0,12</b>	<b>5,57 ± 0,12</b>
	40	0,05 ± 0,15	<b>5,57 ± 0,12</b>	<b>5,57 ± 0,12</b>
012N	0		0,01 ± 0,15	0,04 ± 0,04
	10	0,02 ± 0,20	0,93 ± 0,30	<b>5,67 ± 0,05</b>
	20	0,13 ± 0,14	1,69 ± 0,84	<b>5,67 ± 0,05</b>
	40	-0,06 ± 0,15	<b>3,00 ± 1,36</b>	<b>5,67 ± 0,05</b>
012S	0		-0,08 ± 0,07	-0,23 ± 0,22
	10	0,17 ± 0,08	0,99 ± 0,28	<b>5,45 ± 0,02</b>
	20	-0,03 ± 0,11	1,19 ± 0,40	<b>5,45 ± 0,02</b>
	40	-0,20 ± 0,07	2,60 ± 0,12	<b>5,45 ± 0,02</b>
013S	0		-0,12 ± 0,21	0,13 ± 0,44
	10	-0,13 ± 0,21	<b>3,42 ± 1,30</b>	<b>5,53 ± 0,23</b>
	20	0,21 ± 0,29	<b>5,53 ± 0,23</b>	<b>5,53 ± 0,23</b>
	40	-0,02 ± 0,17	<b>5,53 ± 0,23</b>	<b>5,53 ± 0,23</b>
014S	0		0,06 ± 0,07	0,06 ± 0,11
	10	0,12 ± 0,13	<b>4,43 ± 1,07</b>	<b>5,56 ± 0,07</b>
	20	0,10 ± 0,06	<b>5,56 ± 0,07</b>	<b>5,56 ± 0,07</b>
	40	0,03 ± 0,01	<b>5,56 ± 0,07</b>	<b>5,56 ± 0,07</b>
015N	0		0,21 ± 0,14	0,27 ± 0,31
	10	0,34 ± 0,20	<b>5,74 ± 0,15</b>	<b>5,74 ± 0,15</b>
	20	0,36 ± 0,24	<b>5,74 ± 0,15</b>	<b>5,74 ± 0,15</b>
	40	0,20 ± 0,10	<b>5,74 ± 0,15</b>	<b>5,74 ± 0,15</b>
016N	0		0,00 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	10	0,09 ± 0,07	1,82 ± 0,16	<b>5,61 ± 0,15</b>
	20	0,15 ± 0,12	<b>3,57 ± 1,31</b>	<b>5,61 ± 0,15</b>

	40	0,10 ± 0,05	<b>4,84 ± 1,02</b>	<b>5,61 ± 0,15</b>
016S	0		0,04 ± 0,08	0,07 ± 0,02
	10	0,05 ± 0,07	<b>5,67 ± 0,07</b>	<b>5,67 ± 0,07</b>
	20	0,17 ± 0,16	<b>5,67 ± 0,07</b>	<b>5,67 ± 0,07</b>
	40	0,02 ± 0,05	<b>5,67 ± 0,07</b>	<b>5,67 ± 0,07</b>
017N	0		0,00 ± 0,04	0,11 ± 0,23
	10	0,17 ± 0,19	<b>4,83 ± 1,32</b>	<b>5,64 ± 0,18</b>
	20	0,22 ± 0,28	<b>5,64 ± 0,18</b>	<b>5,64 ± 0,18</b>
	40	-0,02 ± 0,35	<b>5,64 ± 0,18</b>	<b>5,64 ± 0,18</b>
017S	0		-0,09 ± 0,02	-0,05 ± 0,05
	10	-0,02 ± 0,16	<b>4,35 ± 1,07</b>	<b>5,47 ± 0,06</b>
	20	0,03 ± 0,11	<b>5,47 ± 0,06</b>	<b>5,47 ± 0,06</b>
	40	-0,04 ± 0,10	<b>5,47 ± 0,06</b>	<b>5,47 ± 0,06</b>
018N	0		-0,03 ± 0,17	0,00 ± 0,01
	10	-0,09 ± 0,22	<b>3,75 ± 1,37</b>	<b>5,56 ± 0,17</b>
	20	-0,13 ± 0,31	<b>5,56 ± 0,17</b>	<b>5,56 ± 0,17</b>
	40	-0,12 ± 0,13	<b>5,56 ± 0,17</b>	<b>5,56 ± 0,17</b>
018S	0		0,08 ± 0,14	0,00 ± 0,01
	10	-0,10 ± 0,13	<b>5,70 ± 0,05</b>	<b>5,70 ± 0,05</b>
	20	0,06 ± 0,03	<b>5,70 ± 0,05</b>	<b>5,70 ± 0,05</b>
	40	-0,05 ± 0,02	<b>5,70 ± 0,05</b>	<b>5,70 ± 0,05</b>
019S	0		0,03 ± 0,02	0,10 ± 0,05
	10	-0,10 ± 0,04	<b>3,67 ± 1,20</b>	<b>5,39 ± 0,04</b>
	20	-0,14 ± 0,11	<b>5,39 ± 0,04</b>	<b>5,39 ± 0,04</b>
	40	-0,21 ± 0,00	<b>5,39 ± 0,04</b>	<b>5,39 ± 0,04</b>
020N	0		0,05 ± 0,06	0,06 ± 0,02
	10	-0,05 ± 0,05	<b>5,48 ± 0,11</b>	<b>5,48 ± 0,11</b>
	20	0,00 ± 0,02	<b>5,48 ± 0,11</b>	<b>5,48 ± 0,11</b>
	40	-0,02 ± 0,05	<b>5,48 ± 0,11</b>	<b>5,48 ± 0,11</b>
020S	0		0,05 ± 0,09	0,16 ± 0,15
	10	-0,06 ± 0,05	<b>5,59 ± 0,04</b>	<b>5,59 ± 0,04</b>
	20	0,05 ± 0,21	<b>5,59 ± 0,04</b>	<b>5,59 ± 0,04</b>
	40	-0,09 ± 0,06	<b>5,59 ± 0,04</b>	<b>5,59 ± 0,04</b>
021S	0		0,02 ± 0,09	0,01 ± 0,02
	10	0,16 ± 0,19	<b>5,71 ± 0,17</b>	<b>5,71 ± 0,17</b>
	20	0,15 ± 0,32	<b>5,71 ± 0,17</b>	<b>5,71 ± 0,17</b>
	40	-0,04 ± 0,33	<b>5,71 ± 0,17</b>	<b>5,71 ± 0,17</b>
022N	0		-0,19 ± 0,13	-0,15 ± 0,13
	10	-0,30 ± 0,26	<b>5,54 ± 0,25</b>	<b>5,54 ± 0,25</b>
	20	-0,17 ± 0,15	<b>5,54 ± 0,25</b>	<b>5,54 ± 0,25</b>
	40	-0,14 ± 0,22	<b>5,54 ± 0,25</b>	<b>5,54 ± 0,25</b>
023N	0		-0,08 ± 0,04	-0,05 ± 0,14
	10	0,11 ± 0,05	2,16 ± 0,18	<b>5,95 ± 0,07</b>
	20	0,19 ± 0,02	<b>5,12 ± 1,13</b>	<b>5,95 ± 0,07</b>
	40	-0,09 ± 0,02	<b>5,95 ± 0,07</b>	<b>5,95 ± 0,07</b>
023S	0		0,00 ± 0,01	0,05 ± 0,02
	10	0,21 ± 0,32	2,14 ± 1,19	<b>5,90 ± 0,12</b>
	20	0,12 ± 0,22	2,22 ± 1,14	<b>5,90 ± 0,12</b>
	40	0,09 ± 0,25	2,59 ± 1,06	<b>5,90 ± 0,12</b>
024S	0		0,08 ± 0,15	0,05 ± 0,08
	10	0,09 ± 0,12	<b>5,48 ± 0,10</b>	<b>5,48 ± 0,10</b>
	20	0,02 ± 0,14	<b>5,48 ± 0,10</b>	<b>5,48 ± 0,10</b>
	40	0,10 ± 0,17	<b>5,48 ± 0,10</b>	<b>5,48 ± 0,10</b>
025N	0		0,02 ± 0,08	0,04 ± 0,12

	10	0,04 ± 0,16	0,52 ± 0,32	<b>5,57 ± 0,14</b>
	20	0,06 ± 0,29	0,81 ± 0,09	<b>5,57 ± 0,14</b>
	40	0,08 ± 0,08	1,54 ± 0,39	<b>5,57 ± 0,14</b>
025S	0		0,02 ± 0,17	0,10 ± 0,09
	10	0,05 ± 0,09	0,74 ± 0,04	<b>5,73 ± 0,07</b>
	20	0,24 ± 0,03	1,16 ± 0,26	<b>5,73 ± 0,07</b>
	40	0,08 ± 0,13	1,58 ± 0,22	<b>5,73 ± 0,07</b>
026N	0		0,07 ± 0,19	0,03 ± 0,03
	10	0,10 ± 0,12	1,38 ± 0,36	<b>5,21 ± 1,27</b>
	20	0,05 ± 0,10	<b>4,17 ± 1,38</b>	<b>6,06 ± 0,06</b>
	40	-0,08 ± 0,10	<b>6,06 ± 0,06</b>	<b>6,06 ± 0,06</b>
027N	0		0,13 ± 0,15	0,15 ± 0,17
	10	0,07 ± 0,19	<b>3,74 ± 1,05</b>	<b>6,03 ± 0,08</b>
	20	-0,05 ± 0,13	<b>6,03 ± 0,08</b>	<b>6,03 ± 0,08</b>
	40	-0,01 ± 0,12	<b>6,03 ± 0,08</b>	<b>6,03 ± 0,08</b>
027S	0		0,06 ± 0,11	0,16 ± 0,12
	10	0,24 ± 0,12	1,65 ± 0,95	<b>5,10 ± 1,37</b>
	20	0,35 ± 0,08	<b>4,24 ± 1,24</b>	<b>6,09 ± 0,06</b>
	40	0,32 ± 0,20	<b>4,80 ± 1,07</b>	<b>6,09 ± 0,06</b>
028S	0		0,04 ± 0,02	0,09 ± 0,08
	10	-0,07 ± 0,05	1,23 ± 0,54	<b>5,10 ± 0,86</b>
	20	-0,05 ± 0,08	<b>4,58 ± 1,10</b>	<b>6,07 ± 0,01</b>
	40	-0,03 ± 0,02	<b>6,07 ± 0,01</b>	<b>6,07 ± 0,01</b>
029N	0		0,03 ± 0,16	-0,17 ± 0,03
	10	0,08 ± 0,16	2,42 ± 0,48	<b>5,53 ± 0,09</b>
	20	0,17 ± 0,13	<b>4,57 ± 1,38</b>	<b>5,53 ± 0,09</b>
	40	-0,04 ± 0,06	<b>5,53 ± 0,09</b>	<b>5,53 ± 0,09</b>
029S	0		0,25 ± 0,11	0,23 ± 0,07
	10	-0,17 ± 0,05	1,44 ± 0,83	<b>5,51 ± 0,01</b>
	20	-0,08 ± 0,30	<b>5,51 ± 0,01</b>	<b>5,51 ± 0,01</b>
	40	-0,09 ± 0,17	<b>5,51 ± 0,01</b>	<b>5,51 ± 0,01</b>
030N	0		-0,10 ± 0,15	-0,12 ± 0,13
	10	-0,18 ± 0,16	<b>4,55 ± 0,14</b>	<b>4,55 ± 0,14</b>
	20	-0,12 ± 0,23	<b>4,55 ± 0,14</b>	<b>4,55 ± 0,14</b>
	40	0,01 ± 0,08	<b>4,55 ± 0,14</b>	<b>4,55 ± 0,14</b>
030S	0		-0,05 ± 0,12	0,11 ± 0,25
	10	-0,07 ± 0,17	<b>3,23 ± 1,03</b>	<b>4,13 ± 1,25</b>
	20	-0,07 ± 0,09	<b>4,81 ± 1,39</b>	<b>5,86 ± 0,07</b>
	40	-0,11 ± 0,13	<b>5,86 ± 0,07</b>	<b>5,86 ± 0,07</b>
031N	0		-0,04 ± 0,05	-0,03 ± 0,19
	10	-0,27 ± 0,24	0,23 ± 0,37	2,36 ± 0,39
	20	-0,35 ± 0,11	0,89 ± 0,59	<b>5,76 ± 0,06</b>
	40	-0,35 ± 0,07	2,29 ± 0,82	<b>5,76 ± 0,06</b>
031S	0		-0,10 ± 0,13	-0,07 ± 0,16
	10	-0,22 ± 0,25	<b>4,86 ± 1,27</b>	<b>5,71 ± 0,07</b>
	20	-0,19 ± 0,12	<b>5,71 ± 0,07</b>	<b>5,71 ± 0,07</b>
	40	-0,21 ± 0,16	<b>5,71 ± 0,07</b>	<b>5,71 ± 0,07</b>
032N	0		0,01 ± 0,11	0,14 ± 0,06
	10	-0,04 ± 0,19	1,06 ± 0,39	<b>5,53 ± 0,11</b>
	20	0,04 ± 0,22	2,51 ± 0,18	<b>5,53 ± 0,11</b>
	40	-0,09 ± 0,16	<b>5,53 ± 0,11</b>	<b>5,53 ± 0,11</b>
033N	0		0,02 ± 0,08	0,10 ± 0,06
	10	0,08 ± 0,11	1,32 ± 0,38	<b>5,63 ± 0,05</b>
	20	0,12 ± 0,08	2,26 ± 0,53	<b>5,63 ± 0,05</b>

	40	0,07 ± 0,08	<b>4,76 ± 1,22</b>	<b>5,63 ± 0,05</b>
033S	0		0,02 ± 0,13	0,16 ± 0,15
	10	0,21 ± 0,15	1,26 ± 0,28	<b>5,66 ± 0,13</b>
	20	0,04 ± 0,06	2,06 ± 0,30	<b>5,66 ± 0,13</b>
	40	0,15 ± 0,27	<b>3,84 ± 1,20</b>	<b>5,66 ± 0,13</b>
034N	0		0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,08
	10	-0,13 ± 0,09	1,49 ± 0,35	<b>4,58 ± 1,04</b>
	20	-0,11 ± 0,05	<b>4,91 ± 1,15</b>	<b>6,02 ± 0,01</b>
	40	-0,12 ± 0,08	<b>6,02 ± 0,01</b>	<b>6,02 ± 0,01</b>
034S	0		0,02 ± 0,13	0,08 ± 0,11
	10	-0,04 ± 0,07	1,09 ± 0,55	2,62 ± 0,63
	20	0,10 ± 0,08	<b>3,46 ± 1,14</b>	<b>6,02 ± 0,05</b>
	40	0,04 ± 0,05	<b>4,80 ± 1,22</b>	<b>6,02 ± 0,05</b>
035N	0		0,06 ± 0,40	0,07 ± 0,30
	10	0,10 ± 0,23	<b>4,85 ± 1,32</b>	<b>5,64 ± 0,19</b>
	20	-0,02 ± 0,08	<b>5,64 ± 0,19</b>	<b>5,64 ± 0,19</b>
	40	-0,02 ± 0,23	<b>5,64 ± 0,19</b>	<b>5,64 ± 0,19</b>
035S	0		0,13 ± 0,09	0,08 ± 0,14
	10	0,03 ± 0,08	1,23 ± 0,28	<b>5,54 ± 0,03</b>
	20	0,01 ± 0,08	1,80 ± 0,10	<b>5,54 ± 0,03</b>
	40	0,04 ± 0,08	2,79 ± 0,13	<b>5,54 ± 0,03</b>
036N	0		-0,02 ± 0,15	0,03 ± 0,04
	10	-0,14 ± 0,02	0,82 ± 0,14	<b>5,45 ± 0,06</b>
	20	-0,05 ± 0,14	1,39 ± 0,52	<b>5,45 ± 0,06</b>
	40	-0,16 ± 0,02	2,38 ± 0,53	<b>5,45 ± 0,06</b>
036S	0		-0,08 ± 0,06	-0,09 ± 0,03
	10	-0,10 ± 0,34	<b>5,50 ± 0,28</b>	<b>5,50 ± 0,28</b>
	20	-0,07 ± 0,27	<b>5,50 ± 0,28</b>	<b>5,50 ± 0,28</b>
	40	0,04 ± 0,39	<b>5,50 ± 0,28</b>	<b>5,50 ± 0,28</b>
037N	0		0,06 ± 0,17	0,01 ± 0,21
	10	-0,16 ± 0,35	<b>5,33 ± 0,18</b>	<b>5,33 ± 0,18</b>
	20	-0,05 ± 0,13	<b>5,33 ± 0,18</b>	<b>5,33 ± 0,18</b>
	40	-0,27 ± 0,11	<b>5,33 ± 0,18</b>	<b>5,33 ± 0,18</b>
037S	0		-0,09 ± 0,11	-0,04 ± 0,24
	10	-0,12 ± 0,02	0,19 ± 0,24	2,19 ± 0,56
	20	-0,16 ± 0,12	2,25 ± 0,87	<b>5,82 ± 0,16</b>
	40	-0,30 ± 0,14	<b>4,82 ± 1,29</b>	<b>5,82 ± 0,16</b>
038N	0		0,03 ± 0,11	0,08 ± 0,05
	10	0,00 ± 0,06	1,18 ± 0,78	2,97 ± 0,64
	20	-0,05 ± 0,08	<b>3,36 ± 1,18</b>	<b>5,92 ± 0,09</b>
	40	0,01 ± 0,12	<b>4,78 ± 1,35</b>	<b>5,92 ± 0,09</b>
038S	0		0,01 ± 0,09	0,07 ± 0,15
	10	0,07 ± 0,04	<b>3,12 ± 1,05</b>	<b>5,59 ± 0,18</b>
	20	0,01 ± 0,19	<b>4,63 ± 1,24</b>	<b>5,59 ± 0,18</b>
	40	-0,02 ± 0,10	<b>5,59 ± 0,18</b>	<b>5,59 ± 0,18</b>
039N	0		0,00 ± 0,02	0,01 ± 0,06
	10	-0,16 ± 0,24	<b>3,70 ± 1,13</b>	<b>5,50 ± 0,24</b>
	20	-0,02 ± 0,07	<b>5,50 ± 0,24</b>	<b>5,50 ± 0,24</b>
	40	-0,22 ± 0,14	<b>5,50 ± 0,24</b>	<b>5,50 ± 0,24</b>
039S	0		0,08 ± 0,18	0,01 ± 0,15
	10	-0,01 ± 0,11	1,15 ± 0,30	<b>5,43 ± 0,09</b>
	20	-0,11 ± 0,10	1,90 ± 0,49	<b>5,43 ± 0,09</b>
	40	-0,04 ± 0,15	<b>3,41 ± 1,00</b>	<b>5,43 ± 0,09</b>
040N	0		-0,04 ± 0,02	0,12 ± 0,08



	10	0,12 ± 0,08	1,92 ± 0,51	<b>5,47 ± 0,08</b>
	20	0,09 ± 0,09	<b>3,37 ± 1,09</b>	<b>5,47 ± 0,08</b>
	40	0,14 ± 0,04	<b>3,64 ± 1,28</b>	<b>5,47 ± 0,08</b>
040S	0		0,18 ± 0,18	0,27 ± 0,03
	10	0,06 ± 0,03	2,31 ± 0,18	<b>5,78 ± 0,25</b>
	20	0,07 ± 0,21	<b>5,78 ± 0,25</b>	<b>5,78 ± 0,25</b>
	40	-0,06 ± 0,22	<b>5,78 ± 0,25</b>	<b>5,78 ± 0,25</b>
042N	0		0,08 ± 0,06	0,09 ± 0,07
	10	0,05 ± 0,04	0,82 ± 0,04	<b>5,48 ± 0,04</b>
	20	0,14 ± 0,06	1,24 ± 0,13	<b>5,48 ± 0,04</b>
	40	-0,06 ± 0,09	1,61 ± 0,09	<b>5,48 ± 0,04</b>
043S	0		0,13 ± 0,10	-0,04 ± 0,11
	10	0,21 ± 0,20	<b>5,52 ± 0,05</b>	<b>5,52 ± 0,05</b>
	20	0,30 ± 0,10	<b>5,52 ± 0,05</b>	<b>5,52 ± 0,05</b>
	40	0,03 ± 0,02	<b>5,52 ± 0,05</b>	<b>5,52 ± 0,05</b>
044N	0		0,01 ± 0,11	0,14 ± 0,03
	10	0,21 ± 0,09	0,97 ± 0,29	<b>5,57 ± 0,09</b>
	20	0,20 ± 0,08	1,57 ± 0,41	<b>5,57 ± 0,09</b>
	40	0,18 ± 0,11	2,28 ± 0,66	<b>5,57 ± 0,09</b>
045N	0		0,12 ± 0,14	-0,02 ± 0,10
	10	0,00 ± 0,01	<b>5,72 ± 0,04</b>	<b>5,72 ± 0,04</b>
	20	0,26 ± 0,13	<b>5,72 ± 0,04</b>	<b>5,72 ± 0,04</b>
	40	-0,10 ± 0,21	<b>5,72 ± 0,04</b>	<b>5,72 ± 0,04</b>
045S	0		0,00 ± 0,04	0,01 ± 0,05
	10	-0,07 ± 0,08	0,31 ± 0,34	<b>3,23 ± 1,09</b>
	20	-0,02 ± 0,04	1,92 ± 0,97	<b>6,07 ± 0,03</b>
	40	-0,05 ± 0,04	<b>4,02 ± 1,16</b>	<b>6,07 ± 0,03</b>
046N	0		0,11 ± 0,12	0,17 ± 0,05
	10	0,04 ± 0,12	0,66 ± 0,13	<b>5,55 ± 0,08</b>
	20	0,14 ± 0,15	0,86 ± 0,08	<b>5,55 ± 0,08</b>
	40	0,05 ± 0,13	1,35 ± 0,35	<b>5,55 ± 0,08</b>
046S	0		-0,08 ± 0,18	-0,07 ± 0,16
	10	-0,18 ± 0,10	<b>5,43 ± 0,06</b>	<b>5,43 ± 0,06</b>
	20	-0,07 ± 0,10	<b>5,43 ± 0,06</b>	<b>5,43 ± 0,06</b>
	40	-0,04 ± 0,08	<b>5,43 ± 0,06</b>	<b>5,43 ± 0,06</b>
048N	0		-0,06 ± 0,05	0,04 ± 0,06
	10	0,15 ± 0,12	<b>3,99 ± 1,29</b>	<b>5,76 ± 0,06</b>
	20	0,17 ± 0,25	<b>5,76 ± 0,06</b>	<b>5,76 ± 0,06</b>
	40	-0,02 ± 0,10	<b>5,76 ± 0,06</b>	<b>5,76 ± 0,06</b>
048S	0		-0,13 ± 0,03	-0,15 ± 0,12
	10	0,00 ± 0,05	0,70 ± 0,07	<b>3,82 ± 1,28</b>
	20	-0,04 ± 0,08	0,93 ± 0,12	<b>5,73 ± 0,09</b>
	40	-0,06 ± 0,05	2,29 ± 0,39	<b>5,73 ± 0,09</b>
051N	0		0,03 ± 0,12	0,07 ± 0,28
	10	0,14 ± 0,13	<b>3,14 ± 1,05</b>	<b>5,68 ± 0,07</b>
	20	0,28 ± 0,09	<b>4,84 ± 1,24</b>	<b>5,68 ± 0,07</b>
	40	0,19 ± 0,24	<b>5,68 ± 0,07</b>	<b>5,68 ± 0,07</b>
051S	0		0,08 ± 0,12	0,10 ± 0,08
	10	0,05 ± 0,08	2,81 ± 0,13	<b>5,66 ± 0,04</b>
	20	0,13 ± 0,14	<b>5,66 ± 0,04</b>	<b>5,66 ± 0,04</b>
	40	-0,10 ± 0,07	<b>5,66 ± 0,04</b>	<b>5,66 ± 0,04</b>
052N	0		-0,07 ± 0,08	0,00 ± 0,06
	10	-0,13 ± 0,09	1,43 ± 0,38	<b>3,88 ± 1,07</b>
	20	-0,03 ± 0,15	<b>3,16 ± 0,10</b>	<b>5,97 ± 0,07</b>

	40	-0,15 ± 0,09	<b>5,97 ± 0,07</b>	<b>5,97 ± 0,07</b>
052S	0		0,16 ± 0,21	0,02 ± 0,03
	10	-0,17 ± 0,30	<b>5,56 ± 0,14</b>	<b>5,56 ± 0,14</b>
	20	0,03 ± 0,22	<b>5,56 ± 0,14</b>	<b>5,56 ± 0,14</b>
	40	-0,04 ± 0,29	<b>5,56 ± 0,14</b>	<b>5,56 ± 0,14</b>
053N	0		0,05 ± 0,05	0,03 ± 0,17
	10	0,02 ± 0,09	<b>4,31 ± 1,12</b>	<b>5,53 ± 0,07</b>
	20	-0,02 ± 0,17	<b>5,53 ± 0,07</b>	<b>5,53 ± 0,07</b>
	40	0,01 ± 0,05	<b>5,53 ± 0,07</b>	<b>5,53 ± 0,07</b>
053S	0		-0,19 ± 0,19	0,06 ± 0,06
	10	-0,12 ± 0,11	2,38 ± 0,39	<b>5,42 ± 0,04</b>
	20	0,04 ± 0,06	<b>5,42 ± 0,04</b>	<b>5,42 ± 0,04</b>
	40	-0,25 ± 0,05	<b>5,42 ± 0,04</b>	<b>5,42 ± 0,04</b>
055N	0		0,02 ± 0,07	0,03 ± 0,03
	10	-0,13 ± 0,14	<b>4,90 ± 0,89</b>	<b>5,70 ± 0,26</b>
	20	-0,01 ± 0,23	<b>5,70 ± 0,26</b>	<b>5,70 ± 0,26</b>
	40	-0,19 ± 0,25	<b>5,70 ± 0,26</b>	<b>5,70 ± 0,26</b>
055S	0		0,00 ± 0,06	-0,18 ± 0,02
	10	-0,10 ± 0,29	<b>4,25 ± 1,20</b>	<b>5,54 ± 0,13</b>
	20	0,00 ± 0,14	<b>5,54 ± 0,13</b>	<b>5,54 ± 0,13</b>
	40	-0,13 ± 0,05	<b>5,54 ± 0,13</b>	<b>5,54 ± 0,13</b>
056N	0		0,02 ± 0,07	0,13 ± 0,31
	10	0,19 ± 0,08	<b>4,43 ± 1,10</b>	<b>5,61 ± 0,14</b>
	20	0,38 ± 0,17	<b>5,61 ± 0,14</b>	<b>5,61 ± 0,14</b>
	40	0,15 ± 0,14	<b>5,61 ± 0,14</b>	<b>5,61 ± 0,14</b>
056S	0		0,00 ± 0,07	-0,10 ± 0,06
	10	-0,08 ± 0,16	1,79 ± 0,48	<b>5,97 ± 0,10</b>
	20	0,06 ± 0,05	<b>5,08 ± 1,23</b>	<b>5,97 ± 0,10</b>
	40	-0,02 ± 0,17	<b>5,97 ± 0,10</b>	<b>5,97 ± 0,10</b>
057N	0		0,12 ± 0,12	0,19 ± 0,12
	10	0,00 ± 0,11	2,19 ± 0,61	<b>5,63 ± 0,01</b>
	20	0,12 ± 0,10	<b>4,65 ± 1,38</b>	<b>5,63 ± 0,01</b>
	40	-0,20 ± 0,02	<b>5,63 ± 0,01</b>	<b>5,63 ± 0,01</b>
057S	0		-0,04 ± 0,10	0,02 ± 0,10
	10	-0,06 ± 0,02	0,92 ± 0,23	<b>5,43 ± 0,04</b>
	20	0,05 ± 0,07	1,76 ± 0,32	<b>5,43 ± 0,04</b>
	40	-0,15 ± 0,03	<b>4,45 ± 1,44</b>	<b>5,43 ± 0,04</b>
059N	0		-0,07 ± 0,12	-0,01 ± 0,02
	10	-0,02 ± 0,08	<b>4,21 ± 1,18</b>	<b>5,47 ± 0,12</b>
	20	0,05 ± 0,14	<b>4,68 ± 1,14</b>	<b>5,47 ± 0,12</b>
	40	-0,10 ± 0,04	<b>5,47 ± 0,12</b>	<b>5,47 ± 0,12</b>
059S	0		-0,05 ± 0,13	0,02 ± 0,19
	10	0,02 ± 0,09	<b>3,92 ± 1,03</b>	<b>6,61 ± 0,12</b>
	20	-0,04 ± 0,15	<b>6,61 ± 0,12</b>	<b>6,61 ± 0,12</b>
	40	-0,10 ± 0,05	<b>6,61 ± 0,12</b>	<b>6,61 ± 0,12</b>
060N	0		0,03 ± 0,04	-0,02 ± 0,01
	10	0,10 ± 0,11	1,22 ± 0,42	<b>5,25 ± 1,34</b>
	20	0,01 ± 0,06	<b>4,36 ± 1,33</b>	<b>6,02 ± 0,04</b>
	40	0,07 ± 0,07	<b>5,27 ± 1,31</b>	<b>6,02 ± 0,04</b>
060S	0		0,19 ± 0,07	0,13 ± 0,15
	10	0,08 ± 0,10	<b>5,60 ± 0,07</b>	<b>5,60 ± 0,07</b>
	20	0,06 ± 0,12	<b>5,60 ± 0,07</b>	<b>5,60 ± 0,07</b>
	40	0,18 ± 0,41	<b>5,60 ± 0,07</b>	<b>5,60 ± 0,07</b>
061N	0		0,06 ± 0,09	0,03 ± 0,05

	10	0,09 ± 0,12	1,19 ± 0,43	<b>5,49 ± 0,06</b>
	20	0,12 ± 0,07	2,18 ± 0,56	<b>5,49 ± 0,06</b>
	40	0,12 ± 0,06	<b>4,59 ± 1,22</b>	<b>5,49 ± 0,06</b>
061S	0		0,01 ± 0,04	0,01 ± 0,04
	10	0,02 ± 0,02	1,49 ± 0,15	<b>5,42 ± 0,03</b>
	20	-0,01 ± 0,06	<b>3,44 ± 1,34</b>	<b>5,42 ± 0,03</b>
	40	0,00 ± 0,06	<b>5,42 ± 0,03</b>	<b>5,42 ± 0,03</b>
062N	0		0,06 ± 0,15	-0,14 ± 0,20
	10	0,03 ± 0,11	<b>5,37 ± 0,12</b>	<b>5,37 ± 0,12</b>
	20	0,03 ± 0,03	<b>5,37 ± 0,12</b>	<b>5,37 ± 0,12</b>
	40	0,09 ± 0,12	<b>5,37 ± 0,12</b>	<b>5,37 ± 0,12</b>
062S	0		0,03 ± 0,12	0,03 ± 0,05
	10	0,12 ± 0,06	2,76 ± 0,12	<b>5,46 ± 0,06</b>
	20	0,21 ± 0,07	<b>5,46 ± 0,06</b>	<b>5,46 ± 0,06</b>
	40	0,06 ± 0,10	<b>5,46 ± 0,06</b>	<b>5,46 ± 0,06</b>
063N	0		0,13 ± 0,06	0,07 ± 0,07
	10	0,00 ± 0,09	<b>5,74 ± 0,07</b>	<b>5,74 ± 0,07</b>
	20	0,09 ± 0,10	<b>5,74 ± 0,07</b>	<b>5,74 ± 0,07</b>
	40	0,23 ± 0,09	<b>5,74 ± 0,07</b>	<b>5,74 ± 0,07</b>
063S	0		0,00 ± 0,03	0,07 ± 0,10
	10	-0,07 ± 0,22	<b>5,53 ± 0,12</b>	<b>5,53 ± 0,12</b>
	20	0,00 ± 0,32	<b>5,53 ± 0,12</b>	<b>5,53 ± 0,12</b>
	40	-0,14 ± 0,23	<b>5,53 ± 0,12</b>	<b>5,53 ± 0,12</b>
064S	0		0,03 ± 0,44	0,04 ± 0,45
	10	-0,11 ± 0,12	<b>5,43 ± 0,07</b>	<b>5,43 ± 0,07</b>
	20	0,17 ± 0,20	<b>5,43 ± 0,07</b>	<b>5,43 ± 0,07</b>
	40	-0,01 ± 0,16	<b>5,43 ± 0,07</b>	<b>5,43 ± 0,07</b>
065N	0		-0,03 ± 0,04	-0,02 ± 0,08
	10	0,02 ± 0,08	0,54 ± 0,66	<b>6,16 ± 0,05</b>
	20	0,13 ± 0,10	<b>3,69 ± 1,80</b>	<b>6,16 ± 0,05</b>
	40	0,14 ± 0,07	<b>4,69 ± 1,11</b>	<b>6,16 ± 0,05</b>
065S	0		-0,05 ± 0,08	-0,07 ± 0,05
	10	-0,11 ± 0,05	<b>5,68 ± 0,07</b>	<b>5,68 ± 0,07</b>
	20	0,03 ± 0,13	<b>5,68 ± 0,07</b>	<b>5,68 ± 0,07</b>
	40	-0,08 ± 0,06	<b>5,68 ± 0,07</b>	<b>5,68 ± 0,07</b>
068N	0		-0,05 ± 0,09	0,09 ± 0,02
	10	0,00 ± 0,04	1,47 ± 0,26	<b>5,45 ± 0,02</b>
	20	0,03 ± 0,02	2,18 ± 0,50	<b>5,45 ± 0,02</b>
	40	0,06 ± 0,05	<b>4,45 ± 1,40</b>	<b>5,45 ± 0,02</b>
068S	0		-0,01 ± 0,12	0,00 ± 0,08
	10	0,07 ± 0,10	1,31 ± 0,23	<b>5,47 ± 0,07</b>
	20	0,04 ± 0,06	2,07 ± 0,51	<b>5,47 ± 0,07</b>
	40	-0,02 ± 0,06	<b>5,47 ± 0,07</b>	<b>5,47 ± 0,07</b>
070N	0		-0,04 ± 0,16	-0,03 ± 0,14
	10	-0,16 ± 0,25	<b>4,72 ± 1,22</b>	<b>5,62 ± 0,16</b>
	20	-0,04 ± 0,10	<b>5,62 ± 0,16</b>	<b>5,62 ± 0,16</b>
	40	-0,20 ± 0,17	<b>5,62 ± 0,16</b>	<b>5,62 ± 0,16</b>
070S	0		-0,08 ± 0,08	0,00 ± 0,05
	10	0,03 ± 0,16	2,66 ± 0,40	<b>5,93 ± 0,12</b>
	20	0,24 ± 0,20	<b>3,13 ± 0,21</b>	<b>5,93 ± 0,12</b>
	40	0,08 ± 0,20	<b>5,93 ± 0,12</b>	<b>5,93 ± 0,12</b>
071S	0		0,04 ± 0,04	0,08 ± 0,13
	10	0,13 ± 0,04	1,61 ± 0,42	<b>6,05 ± 0,02</b>
	20	0,07 ± 0,05	<b>3,86 ± 1,07</b>	<b>6,05 ± 0,02</b>

	40	$0,12 \pm 0,04$	<b><math>5,21 \pm 1,19</math></b>	<b><math>6,05 \pm 0,02</math></b>
071N	0		$0,01 \pm 0,11$	$0,19 \pm 0,20$
	10	$-0,18 \pm 0,30$	<b><math>4,13 \pm 1,15</math></b>	<b><math>5,57 \pm 0,14</math></b>
	20	$-0,02 \pm 0,35$	<b><math>4,57 \pm 1,15</math></b>	<b><math>5,57 \pm 0,14</math></b>
	40	$-0,27 \pm 0,21$	<b><math>5,57 \pm 0,14</math></b>	<b><math>5,57 \pm 0,14</math></b>
072N	0		$-0,06 \pm 0,09$	$-0,06 \pm 0,09$
	10	$-0,15 \pm 0,03$	$1,03 \pm 0,37$	<b><math>5,46 \pm 0,06</math></b>
	20	$-0,13 \pm 0,09$	$1,31 \pm 0,13$	<b><math>5,46 \pm 0,06</math></b>
	40	$-0,22 \pm 0,11$	$2,07 \pm 0,08$	<b><math>5,46 \pm 0,06</math></b>
072S	0		$-0,11 \pm 0,06$	$-0,10 \pm 0,02$
	10	$-0,06 \pm 0,07$	$1,32 \pm 0,37$	<b><math>5,49 \pm 0,04</math></b>
	20	$-0,15 \pm 0,09$	$1,71 \pm 0,28$	<b><math>5,49 \pm 0,04</math></b>
	40	$-0,06 \pm 0,16$	<b><math>3,49 \pm 1,43</math></b>	<b><math>5,49 \pm 0,04</math></b>
073N	0		$0,07 \pm 0,10$	$-0,02 \pm 0,03$
	10	$0,14 \pm 0,05$	$1,03 \pm 0,04$	<b><math>5,91 \pm 0,03</math></b>
	20	$0,13 \pm 0,06$	$2,75 \pm 1,03$	<b><math>5,91 \pm 0,03</math></b>
	40	$0,29 \pm 0,14$	<b><math>4,26 \pm 1,19</math></b>	<b><math>5,91 \pm 0,03</math></b>
073S	0		$0,05 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,07$
	10	$0,34 \pm 0,08$	$2,35 \pm 0,75$	<b><math>6,13 \pm 0,13</math></b>
	20	$0,37 \pm 0,11$	<b><math>4,04 \pm 1,36</math></b>	<b><math>6,13 \pm 0,13</math></b>
	40	$0,19 \pm 0,20$	<b><math>6,13 \pm 0,13</math></b>	<b><math>6,13 \pm 0,13</math></b>
074N	0		$0,20 \pm 0,15$	$0,08 \pm 0,17$
	10	$0,12 \pm 0,14$	$1,02 \pm 0,25$	<b><math>5,62 \pm 0,10</math></b>
	20	$0,12 \pm 0,15$	$1,67 \pm 0,42$	<b><math>5,62 \pm 0,10</math></b>
	40	$0,16 \pm 0,07$	$2,57 \pm 0,56$	<b><math>5,62 \pm 0,10</math></b>
074S	0		$0,27 \pm 0,19$	$0,46 \pm 0,34$
	10	$0,11 \pm 0,03$	<b><math>5,72 \pm 0,03</math></b>	<b><math>5,72 \pm 0,03</math></b>
	20	$0,15 \pm 0,23$	<b><math>5,72 \pm 0,03</math></b>	<b><math>5,72 \pm 0,03</math></b>
	40	$-0,11 \pm 0,19$	<b><math>5,72 \pm 0,03</math></b>	<b><math>5,72 \pm 0,03</math></b>
077N	0		$-0,24 \pm 0,18$	$-0,23 \pm 0,16$
	10	$-0,34 \pm 0,26$	<b><math>5,45 \pm 0,17</math></b>	<b><math>5,45 \pm 0,17</math></b>
	20	$0,02 \pm 0,37$	<b><math>5,45 \pm 0,17</math></b>	<b><math>5,45 \pm 0,17</math></b>
	40	$0,06 \pm 0,31$	<b><math>5,45 \pm 0,17</math></b>	<b><math>5,45 \pm 0,17</math></b>
077S	0		$-0,07 \pm 0,15$	$-0,08 \pm 0,08$
	10	$0,05 \pm 0,13$	<b><math>5,74 \pm 0,10</math></b>	<b><math>5,74 \pm 0,10</math></b>
	20	$0,08 \pm 0,09$	<b><math>5,74 \pm 0,10</math></b>	<b><math>5,74 \pm 0,10</math></b>
	40	$0,15 \pm 0,06$	<b><math>5,74 \pm 0,10</math></b>	<b><math>5,74 \pm 0,10</math></b>
079N	0		$0,07 \pm 0,09$	$-0,03 \pm 0,04$
	10	$0,10 \pm 0,07$	<b><math>4,62 \pm 1,28</math></b>	<b><math>5,62 \pm 0,03</math></b>
	20	$0,16 \pm 0,06$	<b><math>5,62 \pm 0,03</math></b>	<b><math>5,62 \pm 0,03</math></b>
	40	$0,02 \pm 0,08$	<b><math>5,62 \pm 0,03</math></b>	<b><math>5,62 \pm 0,03</math></b>
080N	0		$0,04 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,06$
	10	$0,01 \pm 0,03$	<b><math>3,49 \pm 1,35</math></b>	<b><math>5,39 \pm 0,01</math></b>
	20	$-0,05 \pm 0,10$	<b><math>5,39 \pm 0,01</math></b>	<b><math>5,39 \pm 0,01</math></b>
	40	$-0,17 \pm 0,11$	<b><math>5,39 \pm 0,01</math></b>	<b><math>5,39 \pm 0,01</math></b>
080S	0		$0,01 \pm 0,06$	$-0,06 \pm 0,15$
	10	$-0,04 \pm 0,10$	<b><math>5,40 \pm 0,06</math></b>	<b><math>5,40 \pm 0,06</math></b>
	20	$0,05 \pm 0,06$	<b><math>5,40 \pm 0,06</math></b>	<b><math>5,40 \pm 0,06</math></b>
	40	$-0,04 \pm 0,03$	<b><math>5,40 \pm 0,06</math></b>	<b><math>5,40 \pm 0,06</math></b>
081N	0		$-0,09 \pm 0,08$	$0,01 \pm 0,07$
	10	$0,04 \pm 0,07$	$1,43 \pm 0,32$	<b><math>5,47 \pm 0,03</math></b>
	20	$0,06 \pm 0,03$	$2,34 \pm 0,41$	<b><math>5,47 \pm 0,03</math></b>
	40	$-0,06 \pm 0,13$	<b><math>5,47 \pm 0,03</math></b>	<b><math>5,47 \pm 0,03</math></b>
081S	0		$-0,02 \pm 0,05$	$0,08 \pm 0,12$

	10	0,07 ± 0,15	<b>5,61 ± 0,06</b>	<b>5,61 ± 0,06</b>
	20	0,07 ± 0,05	<b>5,61 ± 0,06</b>	<b>5,61 ± 0,06</b>
	40	0,01 ± 0,10	<b>5,61 ± 0,06</b>	<b>5,61 ± 0,06</b>
083N	0		-0,06 ± 0,09	-0,12 ± 0,11
	10	-0,07 ± 0,07	1,01 ± 0,22	<b>5,42 ± 0,06</b>
	20	0,07 ± 0,03	1,70 ± 0,23	<b>5,42 ± 0,06</b>
	40	0,06 ± 0,07	2,63 ± 0,50	<b>5,42 ± 0,06</b>
083S	0		0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,10
	10	0,18 ± 0,09	1,06 ± 0,17	<b>5,72 ± 0,01</b>
	20	0,11 ± 0,03	1,71 ± 0,35	<b>5,72 ± 0,01</b>
	40	0,13 ± 0,10	<b>3,99 ± 1,24</b>	<b>5,72 ± 0,01</b>
086N	0		-0,12 ± 0,08	-0,06 ± 0,11
	10	0,11 ± 0,10	0,19 ± 0,08	<b>4,95 ± 1,36</b>
	20	0,18 ± 0,12	0,59 ± 0,41	<b>6,07 ± 0,10</b>
	40	0,08 ± 0,23	1,31 ± 0,82	<b>6,07 ± 0,10</b>
086S	0		0,00 ± 0,04	0,02 ± 0,07
	10	0,13 ± 0,18	<b>5,72 ± 0,04</b>	<b>5,72 ± 0,04</b>
	20	0,27 ± 0,13	<b>5,72 ± 0,04</b>	<b>5,72 ± 0,04</b>
	40	0,00 ± 0,06	<b>5,72 ± 0,04</b>	<b>5,72 ± 0,04</b>
087N	0		0,01 ± 0,04	-0,16 ± 0,02
	10	0,04 ± 0,11	<b>5,51 ± 0,09</b>	<b>5,51 ± 0,09</b>
	20	0,03 ± 0,28	<b>5,51 ± 0,09</b>	<b>5,51 ± 0,09</b>
	40	-0,02 ± 0,18	<b>5,51 ± 0,09</b>	<b>5,51 ± 0,09</b>
088N	0		0,09 ± 0,09	0,16 ± 0,18
	10	-0,11 ± 0,05	0,74 ± 0,12	<b>6,72 ± 0,05</b>
	20	0,10 ± 0,11	1,27 ± 0,47	<b>6,72 ± 0,05</b>
	40	-0,02 ± 0,10	<b>3,19 ± 0,10</b>	<b>6,72 ± 0,05</b>
089N	0		0,04 ± 0,09	0,00 ± 0,05
	10	0,00 ± 0,09	1,22 ± 0,38	<b>5,59 ± 0,04</b>
	20	0,18 ± 0,06	2,06 ± 0,48	<b>5,59 ± 0,04</b>
	40	0,07 ± 0,14	<b>3,78 ± 1,30</b>	<b>5,59 ± 0,04</b>
089S	0		0,12 ± 0,09	0,27 ± 0,11
	10	0,10 ± 0,16	<b>5,65 ± 0,09</b>	<b>5,65 ± 0,09</b>
	20	0,20 ± 0,03	<b>5,65 ± 0,09</b>	<b>5,65 ± 0,09</b>
	40	-0,05 ± 0,10	<b>5,65 ± 0,09</b>	<b>5,65 ± 0,09</b>
090S	0		0,17 ± 0,17	-0,03 ± 0,03
	10	-0,09 ± 0,10	<b>4,12 ± 0,46</b>	<b>5,57 ± 0,16</b>
	20	0,14 ± 0,12	<b>4,77 ± 1,07</b>	<b>5,57 ± 0,16</b>
	40	-0,06 ± 0,23	<b>5,57 ± 0,16</b>	<b>5,57 ± 0,16</b>
092N	0		0,19 ± 0,13	0,05 ± 0,11
	10	-0,01 ± 0,13	<b>5,54 ± 0,11</b>	<b>5,54 ± 0,11</b>
	20	0,07 ± 0,17	<b>5,54 ± 0,11</b>	<b>5,54 ± 0,11</b>
	40	-0,05 ± 0,30	<b>5,54 ± 0,11</b>	<b>5,54 ± 0,11</b>
093N	0		-0,05 ± 0,07	0,07 ± 0,01
	10	-0,11 ± 0,06	<b>5,58 ± 0,11</b>	<b>5,58 ± 0,11</b>
	20	0,02 ± 0,07	<b>5,58 ± 0,11</b>	<b>5,58 ± 0,11</b>
	40	-0,02 ± 0,13	<b>5,58 ± 0,11</b>	<b>5,58 ± 0,11</b>
093S	0		0,07 ± 0,06	0,06 ± 0,08
	10	0,09 ± 0,08	1,66 ± 0,36	<b>5,66 ± 0,02</b>
	20	0,15 ± 0,03	<b>4,41 ± 0,25</b>	<b>5,66 ± 0,02</b>
	40	0,06 ± 0,09	<b>4,79 ± 1,23</b>	<b>5,66 ± 0,02</b>
094N	0		-0,20 ± 0,19	-0,19 ± 0,18
	10	-0,47 ± 0,21	<b>5,28 ± 0,23</b>	<b>5,28 ± 0,23</b>
	20	-0,23 ± 0,21	<b>5,28 ± 0,23</b>	<b>5,28 ± 0,23</b>

	40	-0,23 ± 0,21	<b>5,28 ± 0,23</b>	<b>5,28 ± 0,23</b>
094S	0		0,05 ± 0,06	0,12 ± 0,07
	10	-0,19 ± 0,10	<b>4,20 ± 1,36</b>	<b>6,04 ± 0,07</b>
	20	-0,17 ± 0,10	<b>6,04 ± 0,07</b>	<b>6,04 ± 0,07</b>
	40	-0,08 ± 0,10	<b>6,04 ± 0,07</b>	<b>6,04 ± 0,07</b>
095S	0		0,01 ± 0,03	0,02 ± 0,01
	10	0,07 ± 0,05	1,26 ± 0,66	<b>5,02 ± 1,39</b>
	20	0,01 ± 0,08	2,38 ± 1,01	<b>6,04 ± 0,06</b>
	40	0,09 ± 0,11	<b>4,01 ± 1,02</b>	<b>6,04 ± 0,06</b>
096N	0		0,03 ± 0,04	-0,02 ± 0,15
	10	-0,07 ± 0,06	<b>3,02 ± 1,09</b>	<b>5,53 ± 0,04</b>
	20	-0,13 ± 0,05	<b>4,40 ± 1,05</b>	<b>5,53 ± 0,04</b>
	40	-0,13 ± 0,16	<b>5,53 ± 0,04</b>	<b>5,53 ± 0,04</b>
096S	0		0,08 ± 0,08	0,01 ± 0,07
	10	0,05 ± 0,09	1,62 ± 0,13	<b>5,48 ± 0,06</b>
	20	0,05 ± 0,04	2,27 ± 0,39	<b>5,48 ± 0,06</b>
	40	0,09 ± 0,09	<b>3,73 ± 1,20</b>	<b>5,48 ± 0,06</b>

<sup>a</sup>Średnią przeżywalność obliczono poprzez odjęcie od wartości log<sub>10</sub> CFU/ml prób nietraktowanych (L-PS-), wartości log<sub>10</sub> CFU/ml prób traktowanych wyłącznie światłem (L+), prób traktowanych wyłącznie fotouczulaczem (PS+), bądź prób traktowanych zarówno światłem i fotouczulaczem (aPDI) na podstawie trzech powtórzeń biologicznych; SD – odchylenie standardowe. Pogrubieniem zaznaczono skuteczną eradykację, tj. redukcja przeżywalności powyżej 3 log<sub>10</sub> CFU/ml (spadek ponad 99,9%)

**Tabela 7. Efektywność przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej (aPDI) wobec szczepów referencyjnych *Staphylococcus aureus*.**

Szczep	Średnia redukcja przeżywalności [ $\log_{10}$ CFU/ml $\pm$ SD]			
	Róż bengalski (RB) + światło zielone ( $\lambda_{\max}=515$ nm)			
	J/cm <sup>2</sup>	0 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M
447/05	0		0,03 $\pm$ 0,11	0,09 $\pm$ 0,04
	10	-0,05 $\pm$ 0,12	<b>5,64 <math>\pm</math> 0,00</b>	<b>5,64 <math>\pm</math> 0,00</b>
	20	0,04 $\pm$ 0,04	<b>5,64 <math>\pm</math> 0,00</b>	<b>5,64 <math>\pm</math> 0,00</b>
	40	0,06 $\pm$ 0,05	<b>5,64 <math>\pm</math> 0,00</b>	<b>5,64 <math>\pm</math> 0,00</b>
140/05	0		-0,14 $\pm$ 0,17	0,00 $\pm$ 0,01
	10	-0,31 $\pm$ 0,13	<b>5,59 <math>\pm</math> 0,13</b>	<b>5,59 <math>\pm</math> 0,13</b>
	20	-0,17 $\pm$ 0,09	<b>5,59 <math>\pm</math> 0,13</b>	<b>5,59 <math>\pm</math> 0,13</b>
	40	-0,29 $\pm$ 0,14	<b>5,59 <math>\pm</math> 0,13</b>	<b>5,59 <math>\pm</math> 0,13</b>
1005/05	0		-0,09 $\pm$ 0,12	0,12 $\pm$ 0,33
	10	0,08 $\pm$ 0,11	<b>5,59 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>5,59 <math>\pm</math> 0,03</b>
	20	0,04 $\pm$ 0,14	<b>5,59 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>5,59 <math>\pm</math> 0,03</b>
	40	-0,16 $\pm$ 0,12	<b>5,59 <math>\pm</math> 0,03</b>	<b>5,59 <math>\pm</math> 0,03</b>
1057/05	0		0,00 $\pm$ 0,07	-0,10 $\pm$ 0,20
	10	-0,16 $\pm$ 0,13	<b>5,51 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>5,51 <math>\pm</math> 0,12</b>
	20	-0,15 $\pm$ 0,13	<b>5,51 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>5,51 <math>\pm</math> 0,12</b>
	40	-0,17 $\pm$ 0,11	<b>5,51 <math>\pm</math> 0,12</b>	<b>5,51 <math>\pm</math> 0,12</b>
1200/05	0		0,01 $\pm$ 0,22	0,12 $\pm$ 0,22
	10	0,22 $\pm$ 0,25	<b>5,57 <math>\pm</math> 0,21</b>	<b>5,57 <math>\pm</math> 0,21</b>
	20	0,25 $\pm$ 0,21	<b>5,57 <math>\pm</math> 0,21</b>	<b>5,57 <math>\pm</math> 0,21</b>
	40	0,21 $\pm$ 0,19	<b>5,57 <math>\pm</math> 0,21</b>	<b>5,57 <math>\pm</math> 0,21</b>
1273/05	0		0,14 $\pm$ 0,19	0,03 $\pm$ 0,10
	10	-0,14 $\pm$ 0,11	<b>4,22 <math>\pm</math> 1,08</b>	<b>5,68 <math>\pm</math> 0,24</b>
	20	0,03 $\pm$ 0,16	<b>4,80 <math>\pm</math> 1,09</b>	<b>5,68 <math>\pm</math> 0,24</b>
	40	-0,17 $\pm$ 0,17	<b>5,68 <math>\pm</math> 0,24</b>	<b>5,68 <math>\pm</math> 0,24</b>
1817/05	0		0,10 $\pm$ 0,12	0,16 $\pm$ 0,17
	10	0,07 $\pm$ 0,04	<b>5,55 <math>\pm</math> 0,11</b>	<b>5,55 <math>\pm</math> 0,11</b>
	20	0,10 $\pm$ 0,15	<b>5,55 <math>\pm</math> 0,11</b>	<b>5,55 <math>\pm</math> 0,11</b>
	40	0,05 $\pm$ 0,09	<b>5,55 <math>\pm</math> 0,11</b>	<b>5,55 <math>\pm</math> 0,11</b>
1825/05	0		-0,08 $\pm$ 0,23	-0,23 $\pm$ 0,09
	10	-0,11 $\pm$ 0,10	<b>5,40 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>5,40 <math>\pm</math> 0,08</b>
	20	-0,09 $\pm$ 0,24	<b>5,40 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>5,40 <math>\pm</math> 0,08</b>
	40	-0,12 $\pm$ 0,08	<b>5,40 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>5,40 <math>\pm</math> 0,08</b>
1947/05	0		0,14 $\pm$ 0,21	0,12 $\pm$ 0,12
	10	-0,10 $\pm$ 0,11	<b>4,57 <math>\pm</math> 1,04</b>	<b>5,78 <math>\pm</math> 0,19</b>
	20	0,07 $\pm$ 0,21	<b>5,78 <math>\pm</math> 0,19</b>	<b>5,78 <math>\pm</math> 0,19</b>
	40	-0,11 $\pm$ 0,12	<b>5,78 <math>\pm</math> 0,19</b>	<b>5,78 <math>\pm</math> 0,19</b>
2128/05	0		-0,05 $\pm$ 0,10	-0,06 $\pm$ 0,13
	10	0,03 $\pm$ 0,11	<b>5,65 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>5,65 <math>\pm</math> 0,10</b>
	20	0,06 $\pm$ 0,18	<b>5,65 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>5,65 <math>\pm</math> 0,10</b>
	40	-0,10 $\pm$ 0,07	<b>5,65 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>5,65 <math>\pm</math> 0,10</b>
3640/08	0		0,20 $\pm$ 0,10	0,03 $\pm$ 0,10
	10	0,00 $\pm$ 0,08	<b>4,45 <math>\pm</math> 1,06</b>	<b>5,67 <math>\pm</math> 0,04</b>
	20	0,04 $\pm$ 0,14	<b>5,67 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>5,67 <math>\pm</math> 0,04</b>
	40	0,01 $\pm$ 0,19	<b>5,67 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>5,67 <math>\pm</math> 0,04</b>
4620/09	0		0,26 $\pm$ 0,16	0,24 $\pm$ 0,11
	10	0,14 $\pm$ 0,06	<b>5,56 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>5,56 <math>\pm</math> 0,06</b>
	20	0,31 $\pm$ 0,14	<b>5,56 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>5,56 <math>\pm</math> 0,06</b>
	40	0,15 $\pm$ 0,02	<b>5,56 <math>\pm</math> 0,06</b>	<b>5,56 <math>\pm</math> 0,06</b>

7198/02	0		-0,01 ± 0,18	0,09 ± 0,26
	10	0,03 ± 0,04	<b>4,31 ± 1,02</b>	<b>5,66 ± 0,18</b>
	20	0,20 ± 0,12	<b>4,78 ± 1,08</b>	<b>5,66 ± 0,18</b>
	40	0,25 ± 0,36	<b>5,66 ± 0,18</b>	<b>5,66 ± 0,18</b>
10798/11	0		0,12 ± 0,15	0,08 ± 0,16
	10	0,03 ± 0,13	<b>5,69 ± 0,15</b>	<b>5,69 ± 0,15</b>
	20	0,19 ± 0,26	<b>5,69 ± 0,15</b>	<b>5,69 ± 0,15</b>
	40	0,03 ± 0,09	<b>5,69 ± 0,15</b>	<b>5,69 ± 0,15</b>

<sup>a</sup>Srednią przeżywalność obliczono poprzez odjęcie od wartości  $\log_{10}$  CFU/ml prób nietraktowanych (L-PS-), wartości  $\log_{10}$  CFU/ml prób traktowanych wyłącznie światłem (L+), prób traktowanych wyłączenie fotouczulaczem (PS+), bądź prób traktowanych zarówno światłem i fotouczulaczem (aPDI) na podstawie trzech powtórzeń biologicznych; SD – odchylenie standardowe. Pogrubieniem zaznaczono skuteczną eradykację, tj. redukcja przeżywalności powyżej 3  $\log_{10}$  CFU/ml (spadek ponad 99,9%).



### 13. Wykaz rycin

<b>Rycina 1.</b> Zestawienie czynników sprzyjających kolonizacji <i>S aureus</i> na skórze pacjentów z AZS.....	13
<b>Rycina 2.</b> Wiązanie antygeny i superantygeny z cząsteczką głównego układu zgodności tkankowej klasy II i receptorem limfocytów T.....	16
<b>Rycina 3.</b> Systemy regulacji toksyn gronkowcowych.....	19
<b>Rycina 4.</b> Schemat działania przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej (aPDI).....	26
<b>Rycina 5.</b> Widma emisji źródeł światła wykorzystanych w niniejszej pracy.....	44
<b>Rycina 6.</b> Schemat doświadczenia – aPDI na modelu <i>ex vivo</i> świńskiej skóry.....	62
<b>Rycina 7.</b> Schemat doświadczenia i podział na grupy badawcze – weryfikacja efektywności aPDI na mysim modelu kolonizacji skóry przez <i>S. aureus</i> .....	65
<b>Rycina 8.</b> Skuteczność metody fotodynamicznej (aPDI) względem izolatów klinicznych posiadających i nieposiadających geny toksyn.....	74
<b>Rycina 9.</b> Analiza cyto- i fototoksyczności aPDI (róż bengalski ze światłem zielonym) względem komórek HaCaT, komórek HaCaT z wyciszoną ekspresją w genie filagryny ( <i>FLG</i> shRNA) i komórek linii kontrolnej (Ctrl shRNA).....	76
<b>Rycina 10.</b> Analiza cyto- i fototoksyczności aPDI (nowy błękit metylenowy ze światłem czerwonym) względem komórek HaCaT, komórek HaCaT z wyciszoną ekspresją w genie filagryny ( <i>FLG</i> shRNA) i komórek linii kontrolnej (Ctrl shRNA).....	77
<b>Rycina 11.</b> Dynamika wzrostu ludzkich keratynocytów: komórek HaCaT, HaCaT kontrolnych z wprowadzonym pustym wektorem (Ctrl shRNA) i HaCaT z wyciszoną ekspresją w genie filagryny ( <i>FLG</i> shRNA) poddanych traktowaniu aPDI - różem bengalskim ze światłem zielonym (A) lub nowym błękitem metylenowym ze światłem czerwonym (B) .....	80
<b>Rycina 12.</b> Względny poziom ekspresji genów toksyny SEA, SEB, SEC, SED i TSST-1 pod wpływem subletalnego traktowania aPDI.....	87
<b>Rycina 13.</b> Obraz immunodetekcji toksyn gronkowcowych poddanych działaniu aPDI w warunkach subletalnych.....	88
<b>Rycina 14.</b> Zestawienie stężeń białek toksyn uzyskanych techniką Western Blot po traktowaniu aPDI w subletalnych warunkach.....	89
<b>Rycina 15.</b> Wpływ toksyn traktowanych aPDI (róż bengalski ze światłem zielonym, warunki subletalne i letalne) na proliferację komórek PBMC.....	91
<b>Rycina 16.</b> Wpływ toksyn traktowanych aPDI (nowy błękit metylenowy ze światłem czerwonym) na proliferację komórek PBMC.....	92

<b>Rycina 17.</b> Wpływ aPDI (róż bengalski ze światłem zielonym) na aktywność białek toksyn – pomiar ilości interleukiny 2 (IL-2).....	93
<b>Rycina 18.</b> Wpływ aPDI (nowy błękit metylenowy ze światłem czerwonym) na aktywność białek toksyn – pomiar ilości interleukiny 2 (IL-2).....	94
<b>Rycina 19.</b> Względny poziom ekspresji genów <i>sea</i> i <i>tst</i> pod wpływem traktowania aPDI (róż bengalski ze światłem zielonym).....	96
<b>Rycina 20.</b> Zmiana stężeń białka enterotoksyny A (SEA) po traktowaniu aPDI (róż bengalski ze światłem zielonym) w modelu <i>ex vivo</i> kolonizacji <i>S. aureus</i> świńskiej skóry.....	97
<b>Rycina 21.</b> Monitorowanie sygnału bioluminescencyjnego w procesie kolonizacji mysiej skóry bakteriami <i>S. aureus</i> .....	100
<b>Rycina 22.</b> Sygnał bioluminescencyjny uzyskany z obszarów ROI (ang. <i>Region of Interest</i> ) skóry skolonizowanej przez <i>S. aureus</i> .....	101
<b>Rycina 23.</b> Obraz histologiczny mysiej skóry poddanej procedurze <i>tape-stripping</i> i skolonizowanej <i>S. aureus</i> .....	103
<b>Rycina 24.</b> Zestawienie stężeń białka enterotoksyny A (SEA) po traktowaniu aPDI (róż bengalski ze światłem zielonym) na mysim modelu kolonizacji skóry przez <i>S. aureus</i> .....	104

## 14. Wykaz tabel

<b>Tabela 1.</b> Lokalizacja genów toksyn gronkowcowych i systemy ich regulacji.....	17
<b>Tabela 2.</b> Charakterystyka grupy izolatów <i>S. aureus</i> od pacjentów z AZS.....	31
<b>Tabela 3.</b> Startery stosowane do amplifikacji DNA.....	34
<b>Tabela 4.</b> Startery wykorzystane w reakcji qPCR.....	37
<b>Tabela 5.</b> Skład żeli poliakryloamidowych do analizy białek metodą SDS-PAGE.....	39
<b>Tabela 6.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej (amplifikacja genów toksyn).....	47
<b>Tabela 7.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej (amplifikacja regionu VNTR).....	48
<b>Tabela 8.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej (reakcja qPCR).....	55
<b>Tabela 9.</b> Częstotliwość wykrywania genów toksyn gronkowcowych w izolatach <i>S. aureus</i> pochodzących od pacjentów z AZS oraz grupy kontrolnej bez cech atopii.....	69
<b>Tabela 10.</b> Częstotliwość wykrywania genów toksyn gronkowcowych w izolatach <i>S. aureus</i> pochodzących od pacjentów z AZS z podziałem na odpowiednie grupy.....	70
<b>Tabela 11.</b> Typy <i>spa</i> zidentyfikowane w grupie izolatów do pacjentów z AZS.....	71
<b>Tabela 12.</b> Ocena stabilności genów referencyjnych poddanych traktowaniu różem bengalskim ze światłem zielonym na podstawie analiz w programie BestKeeper.....	82
<b>Tabela 13.</b> Wartości stabilności ekspresji ośmiu testowanych genów referencyjnych przy użyciu programów BestKeeper, geNorm i NormFinder dla różu bengalskiego ze światłem zielonym.....	83
<b>Tabela 14.</b> Ocena stabilności genów referencyjnych poddanych traktowaniu nowym błękitem metylenowym ze światłem czerwonym na podstawie analiz w programie BestKeeper.....	83
<b>Tabela 15.</b> Wartości stabilności ekspresji ośmiu testowanych genów referencyjnych przy użyciu programów BestKeeper, geNorm i NormFinder dla nowego błękitu metylenowego ze światłem czerwonym.....	84
<b>Tabela 16.</b> Dystrybucja genów toksyn u pacjentów z AZS w wybranych krajach.....	107
<b>Tabela 17.</b> Kompleksy klonalne zidentyfikowane w izolatach <i>S. aureus</i> wrażliwych na metycylinę (MSSA) od pacjentów z AZS w europejskiej populacji.....	108

## 15. Dorobek naukowy

### Publikacje naukowe

- **Ogonowska P.**, Woźniak A., Pierański MK., Wasylew T., Kwiek P., Brasel M., Grinholc M., Nakonieczna J. „Application and characterization of light-emitting diodes for photodynamic inactivation of bacteria”, *Lighting Research & Technology*, 0: 1-13, 2018.
- Nakonieczna J., Wolnikowska K., **Ogonowska P.**, Neubauer D., Bernat A., Kamysz W. „Rose Bengal-mediated photoinactivation of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* is enhanced in the presence of antimicrobial peptides”, *Frontiers in Microbiology*, 9: 1-15, 2018.
- Nakonieczna J., Woźniak A., Pierański M., Rapacka-Zdończyk A., **Ogonowska P.**, Grinholc M. „Photoinactivation of ESKAPE pathogens: overview of novel therapeutic strategy”, *Future Medicinal Chemistry*, 11(5), 2019.
- **Ogonowska P.**, Nakonieczna J. „Validation of stable reference genes in *Staphylococcus aureus* to study gene expression under photodynamic treatment: a case study of SEB virulence factor analysis”, *Scientific Reports*, 2020.
- **Ogonowska P.**, Gilaberte Y., Barańska-Rybak W., Nakonieczna J. „Colonization with *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis patients: attempts to reveal the unknown”, *Frontiers in Microbiology*, 11:567090, 2020.
- Rapacka-Zdończyk A., Woźniak A., Michalska K., Pierański M., **Ogonowska P.**, Grinholc M., Nakonieczna J. „Factors determining the susceptibility of bacteria to antibacterial photodynamic inactivation”, *Frontiers in Medicine*, 8:642609, 2021.

### Wystąpienia konferencyjne

- **Patrycja Ogonowska**, Wioletta Barańska-Rybak, Krzysztof P. Bielawski, Joanna Nakonieczna

**Poster:** „The association between antibiotic resistance pattern and efficiency of photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*”

16<sup>th</sup> International Photodynamic Association World Congress, 8-13.06.2017, Coimbra, Portugal

- Joanna Nakonieczna, Monika Kossakowska-Zwierucho, **Patrycja Ogonowska**, Damian Neubauer, Wojciech Kamysz

**Prezentacja ustna (współautorstwo):** „Targeting bacterial cells with a photosensitizer conjugated to antibacterial peptides”

16<sup>th</sup> International Photodynamic Association World Congress, 8-13.06.2017, Coimbra, Portugalia

- Joanna Nakonieczna, Mariusz Grinholc, **Patrycja Ogonowska**, Agata Woźniak, Michał Pierański, Tomasz Wasylew

**Poster (współautorstwo):** Characterization of new LED light source for antimicrobial photodynamic inactivation (APDI)

European Society for Photobiology Congress, Piza, Włochy, 4-8.09.2017

- **Patrycja Ogonowska**, Krzysztof P. Bielawski, Joanna Nakonieczna

**Prezentacja ustna:** „Antibacterial photodynamic inactivation of superantigens producing *Staphylococcus aureus*”

Mikrobiot – Microbiology in Healthcare and Environmental Protection, 19-21.09.2017, Łódź, Polska

- **Patrycja Ogonowska**, Krzysztof P. Bielawski, Joanna Nakonieczna

**Prezentacja ustna:** „Możliwość zastosowania terapii fotodynamicznej w eradykacji gronkowca złocistego produkującego antygeny u osób z atopowym zapaleniem skóry”

IV Toruńskie Sympozjum Doktorantów Nauk Przyrodniczych, 24-25.03.2018, Toruń, Polska

- **Patrycja Ogonowska**, Marek Bronk, Krzysztof P. Bielawski, Joanna Nakonieczna

**Poster:** „The efficiency of antimicrobial photodynamic inactivation (aPDI) against *Escherichia coli* strains producing extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)”

5<sup>th</sup> ESP Photobiology School, 11-16.06.2018, Brixen/Bressanone, Włochy

- **Patrycja Ogonowska**

**Prezentacja ustna:** „Zastosowanie kombinacji inaktywacji fotodynamicznej i peptydów przeciwdrobnoustrojowych wobec wielolekoopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*”

XXV Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 7-8.12.2018, Gdańsk, Polska

- **Patrycja Ogonowska**, Krzysztof P. Bielawski, Joanna Nakonieczna

**Poster:** „RNA purification and selection of a stable reference gene in qPCR technique – why it matters?”

8<sup>th</sup> Intercollegiate Biotechnology Symposium “Symbioza”, 17-19.05.2019, Warszawa, Polska

- **Patrycja Ogonowska**, Krzysztof P. Bielawski, Joanna Nakonieczna

**Poster:** „The effect of photooxidative stress on the expression of genes encoding virulence factors produced by *Staphylococcus aureus*”

17<sup>th</sup> International Congress on Photobiology and 18<sup>th</sup> Congress of the European Society for Photobiology, 25-30.08.2019, Barcelona, Hiszpania

- **Patrycja Ogonowska**, Paulina Czaplewska, Aleksandra Lewandowska, Joanna Nakonieczna

**Prezentacja ustna:** „A photodynamic approach to inactivate staphylococcal enterotoxin B”

FEMS Online Conference on Microbiology, 28-31.10.2020, Belgrad, Serbia

- **Patrycja Ogonowska**, Adrian Kobiela, Danuta Gutowska-Owsiak, Joanna Nakonieczna

**Poster:** „Antimicrobial photodynamic inactivation against staphylococcal enterotoxin A – *in vitro* and *ex vivo* studies”

19<sup>th</sup> Congress of the European Society for Photobiology, 30.08.-3.09.2021, Salzburg, Austria

## Granty

- Kierownik projektu dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich „Wpływ stresu fotooksydacyjnego na poziom ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji produkowane przez *Staphylococcus aureus*”, nr projektu 538-M036-B038-18, 2018

- Wykonawca projektu „Wpływ przeciwdrobnoustrojowej fotoinaktywacji na wirulencję szczepów *Staphylococcus aureus* kolonizujących chorych z atopowym zapaleniem skóry: badania *in vitro* oraz *in vivo*”, grant NCN OPUS nr 2017/27/B/NZ7/02323

## Nagrody

- European Society for Photobiology (ESP) Fellowship – stypendium konferencyjne (2019)

- Zwiększone stypendium z dotacji pro jakościowej dla najlepszych doktorantów MWB UG i GUMed (2018-2022)
- Stypendium Rektora dla najlepszych doktorantów (2018)

### **Publikacje w materiałach pokonferencyjnych**

- **Patrycja Ogonowska**, Krzysztof P. Bielawski, Joanna Nakonieczna  
„Antibacterial photodynamic inactivation of superantigens producing *Staphylococcus aureus*.” Postępy Mikrobiologii (Advances in Microbiology), tom 56, supplement 1, 2017
- **Patrycja Ogonowska**, Paulina Czaplewska, Aleksandra Lewandowska, Joanna Nakonieczna  
„A photodynamic approach to inactivate staphylococcal enterotoxin B”, Federation of European Microbiological Societies: Book of Abstracts of the FEMS Conference on Microbiology, 2020, ISBN-978-86-914897-6-2
- **Patrycja Ogonowska**, Adrian Kobiela, Danuta Gutowska-Owsiak, Joanna Nakonieczna  
„Antimicrobial photodynamic inactivation against staphylococcal enterotoxin A – *in vitro* and *ex vivo* studies”, European Society for Photobiology (ed.): Book of Abstracts of the 19<sup>th</sup> Congress of the European Society for Photobiology, 2021, ISBN 978-3-200-07802-4