MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2008, 60: 191 - 196

Elżbieta Walencka, Beata Sadowska, Marzena Więckowska-Szakiel, Barbara Różalska

AKTYWNOŚĆ INDOLICYDYNY, OSOBNO LUB W POŁĄCZENIU Z OKSACYLINĄ, WOBEC *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* I *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Zakład Biologii Zakażeń, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej,
Instytut Mikrobiologii i Immunologii, Uniwersytet Łódzki
Kierownik: prof. dr hab. *B. Różalska*

Trudności w leczeniu zakażeń gronkowcowych, w tym rosnąca częstość izolacji szczepów antybiotykoopornych, skłaniają do poszukiwania bardziej skutecznych preparatów terapeutycznych wśród produktów układu obronnego roślin i zwierząt. W pracy zbadano aktywność peptydu indolicydyny wobec hodowli planktonicznej oraz biofilmu wybranych szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis.* Zbadano także efekt synergistyczny pomiędzy indolicydyną i oksacyliną. Zachęcające wyniki uzyskane w niniejszej pracy stanowią punkt wyjścia dla sformułowania dalszych zadań badawczych w tym zakresie.

Gronkowce zaliczane są do jednej z najważniejszych grup etiologicznych czynników zakażeń bakteryjnych. Bakterie te cechują się wytwarzaniem licznych czynników wirulencji, ale przede wszystkim dużą łatwością nabywania oporności wobec dostępnych chemioterapeutyków. W związku z powyższym, lekooporność gronkowców stanowi poważny problem kliniczny a metycylinooporne gronkowce (MRSA, MRSE) stanowią najpowszechniej identyfikowane patogeny w szpitalach wielu części świata (5, 17). Niepowodzenia w leczeniu zakażeń gronkowcami związane są także z innym ważnym mechanizmem ich patogenności, tj. zdolnością do tworzenia biofilmu. Sprzyja temu coraz bardziej powszechne stosowanie inwazyjnych procedur medycznych, wykorzystujących przyrządy wykonane z tzw. biomateriałów. Wiadomo, iż złożona i heterogenna struktura utworzonego biofilmu, zawierająca populacje komórek o odmiennych cechach fizjologicznych, wykazuje wzmożoną oporność na działanie różnych czynników bójczych (1, 3, 10, 12).

W świetle przedstawionych faktów uzasadnione jest poszukiwanie bardziej skutecznych niż antybiotyki czynników przeciwdrobnoustrojowych. Bogatym źródłem dla tych poszukiwań wydaje się być grupa produktów wchodzących m. in. w skład układu obronnego roślin i zwierząt. Szczególnie ważnym nurtem dociekań naukowych jest badanie możliwego synergistycznego działania znanych „starych" antybiotyków i naturalnych produktów biobójczych (2, 6, 8). Włączając się w ten nurt badań, ocenie poddano aktywność przeciwgronkowcową indolicydyny - peptydu kationowego izolowanego z neutrofilów bydlęcych. Jej działanie

oceniano wobec komórek gronkowców z hodowli zawiesinowych (planktonicznych) i biofilmu. Badano również synergistyczny efekt indolicydyny i antybiotyków, na przykładzie oksacyliny.

MATERIAŁ I METODY

Drobnoustroje. Łącznie przebadano 25 szczepów gronkowców: referencyjne *S. aureus* ATCC29213, ATCC25923, izolaty kliniczne - 1474/01, A3, A7, B1, C1, D5, D8, D13, E1, E4, E7 oraz referencyjne *S. epidermidis* ATCC12228, RP12, izolaty kliniczne - 6756/99, A4a, A4b, A4c, C10, C11, C12, C13, C15, C27.

Odczynniki chemiczne: a) MTT (bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-yl]-2,5 difenylo-tetrazoliowy, Sigma), b) antybiotyki w krążkach; ciprofloksacyna erytromycyna, gentamycyna, imipenem, linkomycyna, metycylina, mupirocyna, oksacylina, tetracyklina, wankomycyna (Mast Diagnostics), linezolid (Pfizer), chinuprystyna/dalfoprystyna (Becton Dickinson), c) oksacylina *in subst*. (Sigma), d) indolicydyna (Sigma).

Ocena wrażliwości gronkowców na antybiotyki metodą dyfuzyjno-krążkową. Ocenę aktywności antybiotyków wobec w/w kolekcji szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis* przeprowadzano metodą dyfuzyjno-krążkową, zgodnie z procedurą badania lekowrażliwości drobnoustrojów zalecaną przez CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (11).

Ocena wrażliwości gronkowców na działanie indolicydyny metodą oznaczania MIC (minimal inhibitory concentration) (11). Rozcieńczenia indolicydyny: 1,25 - 40,0 µg/ml w podłożu Luria broth (LB) +0,2% BSA+0,01% kwasu octowego, nanoszono w objętości 100 µl do studzienek mikropłytek polipropylenowych (Greiner BioOne GmbH, Niemcy). Do studzienek dodawano następnie równe objętości zawiesin bakterii o gęstości 10^6 komórek/ml. Po inkubacji (24 godz., 37˚C) odczytywano absorbancję (czytnik Victor 2, 600 nm), będącą miernikiem intensywności wzrostu bakterii.

Ocena wrażliwości gronkowców na działanie indolicydyny metodą MBC (minimal bactericidal concentration). Rozcieńczenia indolicydyny: 1,25 - 40,0 µg/ml w podłożu LB+0,2%BSA+0,01% kwasu octowego nanoszono w objętości 100 µl do studzienek mikropłytek polipropylenowych. Do studzienek dodawano następnie równe objętości zawiesin bakterii o gęstości 10^3 komórek/ml w tym samym podłożu. Płytki inkubowano 3 godz., 37˚C, a następnie po 100 µl zawiesiny komórek wysiewano na podłoże zwykłe agarowe. Po inkubacji (24 godz., 37˚C) liczono CFU i oceniano odsetek komórek żywych.

Ocena synergistycznego działania indolicydyny i oksacyliny metodą oznaczania MIC. Rozcieńczenia oksacyliny: 1,25 - 40,0 µg/ml w podłożu LB+0,2%BSA+0,01% kwasu octowego nanoszono w objętości 50 µl do studzienek mikropłytek polipropylenowych. Do wszystkich studzienek zawierających rozcieńczenia antybiotyku dodawano równą objętość indolicydyny o stężeniu ½MIC. Kolejno dodawano zawiesiny bakterii o gęstości 10^6 komórek/ml w tym samym podłożu. Płytki inkubowano 24 godz., 37˚C, a po inkubacji odczytywano absorbancję (czytnik Victor 2, 600 nm).

Tworzenie biofilmu i ocena jego wrażliwości na czynniki biobójcze. 24-godzinny biofilm gronkowców tworzono w studzienkach mikropłytek do hodowli komórek (Nunclon™ Surface, Nunc, Dania). Na powstały biofilm nanoszono rozcieńczenia indoli-

cydyny: 0,63-20,0 μg/ml w podłożu LB/BSA/kwas octowy. Płytki inkubowano (24 godz., 37˚C) następnie usuwano podłoże znad biofilmu, a pozostały biofilm barwiono z użyciem metody redukcji MTT (14).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Analiza profilu lekowrażliwości badanej grupy gronkowców wykazała występowanie licznych szczepów, zarówno z gatunku *S. aureus* jak i *S. epidermidis*, opornych jednocześnie na 4 - 9 antybiotyków należących do różnych grup terapeutycznych. Wykazała także wysoką, sięgającą 84,6 - 91,6 %, częstość oporności na antybiotyki β-laktamowe (Tabela I). Stwierdzono natomiast skuteczne działanie przeciwgronkowcowe indolicydyny hamujące wzrost szczepów, niezależnie od reprezentowanego przez nie wzoru oporności na antybiotyki. Dla szczepów *S. aureus* wartości MIC_{IND} mieściły się w zakresie 5,0 - 20,0 μg/ml, przy czym dla większości z nich MIC wynosił 10,0 μg/ml. Szczepy *S. epidermidis* wykazywały większą wrażliwość na działanie indolicydyny, o czym świadczył ustalony przedział wartości MIC mieszczący się w zakresie stężeń 1,25 - 10,0 μg/ml. Należy podkreślić, iż w przypadku większości szczepów *S. epidermidis* wartość MIC_{IND} wynosiła 2,5 μg/ml, a więc 4-krotnie mniej niż dla *S. aureus*. Podobny zakres stężeń indolicydyny wykazującej działanie bakteriostatyczne opisano w pracy *Giacometti i wsp.* (7) także wobec innych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.

Tabela I. Częstość (%) występowania lekoopornych szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis* (metoda dyfuzyjno-krążkowa).

Grupa chemiczna antybiotyku	Antybiotyk	*S. aureus* n=13	*S. epidermidis* n=12
Penicyliny	penicylina	11 (84,6%)	9 (75,0 %)
	metycylina	7 (53,8 %)	nb
	oksacylina	7 (53,8 %)	11 (91,6 %)
Glikopeptydy	wankomycyna	0	0
Karbapenemy	imipenem	6 (46,2 %)	3 (25,0 %)
Makrolidy	erytromycyna	7 (53,8 %)	7 (58,3 %)
Linkozamidy	linkomycyna	5 (38,5 %)	2 (16,7 %)
Aminoglikozydy	gentamycyna	7 (53,8 %)	6 (50,0 %)
Tetracykliny	tetracyklina	8 (61,5 %)	5 (41,6 %)
Fluorochinolony	ciprofloksacyna	6 (46,2 %)	3 (25,0 %)
Oksazolidynony	linezolid	0	0
Streptograminy	chinuprystyna/ dalfoprystyna	0	0
...	mupirocyna	0	5 (41,6 %)

Na przykładzie wybranych szczepów *S. aureus* (ATCC29213, A3, 1474/01) i *S. epidermidis* (RP12, A4c, 6756/99) wykazano, iż obserwowane działanie inhibicyjne indolicydyny było efektem bakteriobójczej aktywności tego peptydu (metoda oznaczania MBC, Tabela II, średnie dane reprezentatywne jednego z trzech doświadczeń). Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono silne działanie bakteriobójcze indolicydyny w zakresie stężeń 10,0

- 20,0 μg/ml, objawiające się zabiciem wszystkich bakterii w badanych zawiesinach. Natomiast, działanie przeciwbakteryjne wyrażające się ponad 50-procentową redukcją gęstości zawiesin gronkowców, widoczne było jeszcze dla stężeń indolicydyny wynoszących 1,25 μg/ml (*S. aureus*) i 0,63 μg/ml (*S. epidermidis*).

Tabela II. Działanie bójcze indolicydyny na gronkowce z hodowli zawiesinowej (metoda oznaczania MBC).

Szczep gronkowców	Odsetek liczby żywych bakterii [**% CFU/ml] w zawiesinach, traktowanych indolicydyną (*μg/ml)					
	20*	10	5	2,5	1,25	0,63
ATCC29213 (MSSA)	0**	0	2,09	26,35	30,47	58,85
A3 (MRSA)	0	0	5,41	30,07	47,65	55,76
1474/01 (MRSA/hVISA)	0	0,29	7,87	33,38	31,78	73,47
RP12 (MRSE)	0	0	0	0	3,55	30,96
A4c (MRSE)	0	0	0,38	0,38	4,51	20,68
6756/99 (MRSE)	0	0	0	0,23	1,41	47,24

W związku z wykazaną silną aktywnością bakteriobójczą indolicydyny podjęto próbę oceny jej synergistycznego działania z oksacyliną. Aktywność tą w odniesieniu do bakterii z hodowli planktonicznych oceniano poprzez porównanie wartości MIC_{OX} i $MIC_{OX(+IND)}$ (Tabela III, średnie dane reprezentatywne jednego z trzech doświadczeń). Uzyskane wyniki potwierdziły synergistyczne działanie oksacyliny i indolicydyny w stosunku do 6 badanych szczepów gronkowców zaklasyfikowanych wcześniej jako MRSA i MRSE. Obecność indolicydyny w stężeniu ½MIC pozwoliła na zwiększenie aktywności oksacyliny i przywrócenie wrażliwości badanych szczepów na ten antybiotyk. W przypadku *S. aureus* A3 i 1474/01 wartości MIC_{OX} obniżyły się odpowiednio do poniżej 4,0 μg/ml i 4,0 μg/ml. Nie obserwowano natomiast pogłębienia wrażliwości na oksacylinę szczepu *S. aureus* ATCC29213, dla którego $MIC_{OX(+IND)}$ było równe MIC_{OX} i wynosiło 0,5 μg/ml. Przywrócenie wrażliwości na oksacylinę obserwowano także dla szczepów *S. epidermidis*, a najbardziej znaczący spadek

Tabela III. Aktywność bakteriostatyczna oksacyliny, osobno lub w połączeniu z indolicydyną wobec hodowli zawiesinowej gronkowców (metoda oznaczania MIC).

Szczep gronkowców	MIC [μg/ml]		
	MIC_{OX}	MIC_{IND}	$MIC_{OX (+ ½ IND)}$
S. aureus			
ATCC29213 (MSSA)	0,5	10,0	0,5 (+ 5,0)
A3 (MRSA)	>128,0	10,0	<4,0 (+ 5,0)
1474/01 (MRSA/hVISA)	>128,0	10,0	4,0 (+ 5,0)
S. epidermidis			
RP12 (MRSE)	1,0	2,5	0,125 (1,25)
A4c (MRSE)	1,0	2,5	0,5 (1,25)
6756/99 (MRSE)	16,0	5,0	<4,0 (2,5)

MIC_{OX} obserwowano w przypadku *S. epidermidis* 6756/99 (z 16,0 µg/ml do poniżej 4,0 µg/ml). Badania podobnej aktywności synergistycznej oksacyliny i indolicydyny wobec biofilmu gronkowców *S. aureus* (ATCC29213, A3, 1474/01) i *S. epidermidis* (RP12, A4c, 6756/99) nie potwierdziły jednak znaczącej aktywności przeciwbiofilmowej samej indolicydyny w zastosowanym zakresie stężeń, jak i jej połączenia z oksacyliną.

Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy i dostępnych danych piśmiennictwa można sądzić, iż próby łącznego stosowania aktualnie mało skutecznych antybiotyków z innymi naturalnymi produktami biobójczymi, są perspektywiczne i zasługują na uwagę (6, 15, 16, 18). Wzrasta w tym kontekście zainteresowanie m.in. badaną w niniejszej pracy indolicydyną. Peptyd ten, pierwotnie izolowany z ziarnistości neutrofilów bydlęcych występuje także u innych kręgowców, bezkręgowców i roślin. Posiada masę cząsteczkową ok. 4 kDa, dzięki czemu zaliczany jest do najmniejszych peptydów przeciwbakteryjnych. Wykazuje unikatowy skład aminokwasowy; największa zawartość (5 reszt) tryptofanu, 3 z pozostałych 8 aminokwasów to prolina. Uważa się, że zarówno skład jak i „plastyczność" tego liniowego peptydu ma istotne znaczenie dla bójczej aktywności wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, grzybów i pierwotniaków. Mechanizm działania indolicydyny wymaga oddziaływania z negatywnie naładowaną powierzchnią i jest zależny od stężenia peptydu. Wysokie stężenie indolicydyny umożliwia wbudowywanie i akumulację w błonie komórkowej oraz zaburzanie jej potencjału membranowego, prowadzące do lizy komórki. Z kolei pomimo, iż indolicydyna w niższych stężeniach nie powoduje bezpośredniego efektu bójczego, to z dużą łatwością przenika przez dwuwarstwę lipidową do wnętrza komórki gdzie może ulegać wiązaniu do białek regulatorowych, zakłócając ich prawidłowe funkcjonowanie lub bezpośrednio do DNA, blokując proces jego replikacji (4, 9, 13).

E. Walencka, B. Sadowska, M. Więckowska-Szakiel, B. Różalska

ACTIVITY OF INDOLICIDIN, ALONE OR TOGETHER WITH OXACILLIN, AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *S. EPIDERMIDIS*

SUMMARY

Difficulties in the treatment of staphylococcal infections as well as the increasing frequency of isolating resistant clinical strains have prompted a search, among the products of immune systems of plants and animals, for more effective antistaphylococcal therapies. This study examined the activity of indolicidin towards the planktonic cultures and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *S.epidermidis* strains representing different clinical sources and various profiles of drug sensitivity. The synergistic effect between the peptide and oxacilin was also studied.

PIŚMIENNICTWO

1. *Costerton JW, Veeh R, Shirtliff M* i inni. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. J Clin Invest 2003; 112: 1466-77.
2. *Devine DA, Hancock REW.* Cationic peptides: distribution and mechanisms of resistance. Curr Pharm Des 2002; 8: 703-14.

3. *Donlan R. M, Costerton JW.* Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 169-93.
4. *Falla TJ, Karunaratne DN, Hancock REW*. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. J Biol Chem 1996; 271: 19298-303.
5. *Foster TJ.* The *Staphylococcus aureus* „superbug". J Clin Invest 2004; 114: 1693-6.
6. *Fujita M, Shiota S, Kuroda T* i inni. Synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and β-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol 2005; 49: 391-6.
7. *Giacometti A, Cirioni O, Greganti G* i inni. *In vitro* activities of membrane-active peptides against Gram-positive and Gram-negative aerobic bacteria. Antimirob Agents Chemother 1998; 42: 3320-4.
8. *Hancock REW, Scott MG.* The role of antimicrobial peptides in animal defenses. Proc Nat Acad Sci 2000; 97: 8856-61**.**
9. *Hsu C-H, Chen C, Jou M-L* i inni. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA. Nucleic Acid Res 2005; 33**:** 4053-64.
10. *Lewis K.* Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 999-1007.
11. *National Commitee for Clinical Laboratory Standards*. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard fifth edition. M7-A5 2000, 1-54.
12. *O`Gara JP, Humphreys H. Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. J Med Microbiol 2001; 50: 582-7.
13. *Staubitz PA, Peschel WF, Nieuwenhuizen* WF i inni. Structure-function relationships in the tryptophan-rich, antimicrobial peptide indolicidin. J Peptide Sci 2001; 7: 552-64.
14. *Walencka E, Sadowska B, Różalska S* i inni. Lysostaphin as a potential therapeutic agent for staphylococcal biofilm eradication. Pol J Microbiol 2005; 54: 191-200.
15. *Walencka E, Sadowska B, Różalska S* i inni. *Staphylococcus aureus* as a target for single or repeated doses of oxacillin, vancomycin, linezolid and/or lysostaphin. Folia Microbiol 2006; 51: 381-6.
16. *Walencka E, Różalska S, Wysokińska H* i inni. Salvipisone and aethiopinone from *Salvia sclarea* hairy roots modulate staphylococcal antibiotic resistance and express anti-biofilm activity. Planta Med 2007; 73: 1-7.
17. *von Eiff C, Peters G, Heilmann C.* Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci. Lancet Infect Dis 2002; 2: 667-84.
18. *Zhao W-H, Hu Z-Q, Okubo S* i inni. Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and β-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother 2001; 45**:** 1737-42.

Otrzymano: 28 VII 2008 r.

Adres Autorów: 91-237 Łódź, ul. Banacha 12/16,
Zakład Biologii Zakażeń, Instytut Mikrobiologii i Immunologii,
Uniwersytet Łódzki,
E-mail: rozab@biol.uni.lodz.pl