

Paulina ŻELECHOWSKA
Justyna AGIER
Elżbieta KOZŁOWSKA
Ewa BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK

Alternatywy dla antybiotykoterapii – peptydy przeciwdrobnoustrojowe i bakteriofagi

Alternatives for antibiotics - antimicrobial peptides and phages

Zakład Immunologii Doświadczalnej,
Uniwersytet Medyczny, Łódź
Kierownik:
Prof. dr hab. n. med. Ewa Brzezińska-Błaszczyk

Dodatkowe słowa kluczowe:
peptydy przeciwdrobnoustrojowe
bakteriocyny
bakteriofagi
terapia fagowa
antybiotykoterapia

Additional key words:
antimicrobial peptides
bacteriocins
bacteriophages
phage therapy
antibiotic therapy

Nieustanny wzrost liczby drobnoustrojów opornych na antybiotyki stwarza niebagatelny problem dla terapii chorób zakaźnych o różnej etiologii. Narastająca niewrażliwość patogenów na klasyczne formy leczenia związana jest przede wszystkim z wieloma mechanizmami oporności wykształconymi przez bakterie. Ponadto, niewłaściwa antybiotykoterapia powoduje pojawienie się w środowisku szczepów opornych nawet na leki ostatniego rzutu. Dlatego, wciąż są poszukiwane alternatywne sposoby leczenia trudnych do eradykacji patogenów. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe, w tym katelicyny, defensyny, lizozym, laktoferyna, histatyny oraz bakteriocyny wzbudzają ostatnio ogromne zainteresowanie jako potencjalne terapeutyki. Wykazują one bowiem szerokie spektrum aktywności wobec wielu bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych, ale także wobec grzybów. Co więcej, uważane są one za dużo bezpieczniejsze od antybiotyków, ze względu na to, że występują u wszystkich organizmów eukariotycznych, u których stanowią istotny element układu odpornościowego. Duże nadzieje pokładane są również w terapii z wykorzystaniem bakteriofagów, ponieważ charakteryzują się one dużą specyficnością działania. W pracy zwrócono uwagę na potencjalne możliwości wykorzystania peptydów przeciwdrobnoustrojowych i bakteriofagów w terapii oraz przykłady ich praktycznego zastosowania we współczesnej medycynie.

The constant increase in the number of bacteria resistant to antibiotics poses a substantial problem for the therapy of infectious diseases of different etiologies. The growing insensitivity of pathogens on the classical methods of treatment is associated mainly with multiple mechanisms of resistance created by bacteria. Furthermore, no proper antibiotic treatment causes the appearance of resistant strains even at the last line drugs. Therefore, there are still being sought alternatives in the treatment of difficult to eradicate pathogens. The antimicrobial peptides including cathelicidins, defensins, lysozyme, lactoferrin, histatins and bacteriocins arouse huge interest as potential therapeutics. They exhibit a broad spectrum of activity against many Gram-positive and Gram-negative bacteria, but also against fungi. Moreover, they are considered much safer than antibiotics, due to the fact that they are present in all eukaryotic organisms, in which they are an essential element of the immune system. In addition, phage therapy is also strongly recommended as alternative antibacterial approach. In this review we highlight the potential uses of antimicrobial peptides and bacteriophages in the treatment of infections of various etiologies.

Wprowadzenie

W 1928 roku Alexander Fleming przypadkowo odkrył zdolność substancji produkowanej przez grzyb strzępkowy *Penicillium notatum* do hamowania wzrostu bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Związek ten odkrywca nazwał penicyliną. Samo pojęcie „antybiotyk” zostało wprowadzone znacznie później przez mikrobiologa Selmana Waksmana, który w roku 1943 odkrył streptomycynę, produkowaną przez promieniowce *Streptomyces griseus*. Odkrycia te okazały się przełomowe w walce z bakteriami, bowiem zrewolucjonizowały i dały początek zupełnie nowemu podejściu do terapii chorób zakaźnych. W późniejszych latach

wyzolowano szereg kolejnych naturalnych antybiotyków, a dzięki rozwojowi nauk medycznych i biotechnologii wyprodukowano także antybiotyki syntetyczne i półsyntetyczne. Powszechny jest zatem pogląd, że pierwsza połowa XX wieku jest początkiem ery antybiotykoterapii [1].

Szerokie stosowanie penicyliny od początku lat 40. XX wieku, spowodowane przede wszystkim działaniami wojennymi, zaowocowało pojawieniem się pierwszych gronkowców opornych na ten antybiotyk. Obecnie odnotowuje się coraz szybciej narastającą niewrażliwość różnych drobnoustrojów na antybiotyki, co uwarunkowane jest wieloma czynnikami, w tym niebagat-

Adres do korespondencji:
Prof. dr hab. Ewa Brzezińska-Błaszczyk
Zakład Immunologii Doświadczalnej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź
Tel./fax: +48 (42) 6757306
e-mail: ewab@csk.umed.lodz.pl

telną rolę odgrywa także działalność człowieka. Rezultatem tego jest coraz mniejsza skuteczność terapii lub w ogóle brak jej efektywności. Oporność drobnoustrojów jest przede wszystkim wynikiem mutacji spontanicznych genomu bakteryjnego oraz horyzontalnego transferu genów oporności. Ponadto, bakterie wykształciły szereg mechanizmów warunkujących ich antybiotykooporność. Jednym z najpowszechniejszych i najlepiej poznanych mechanizmów jest wytwarzanie przez bakterie enzymów, które zmieniają aktywny produkt leczniczy w jego nieaktywną formę pochodną. Przykładem mogą być β -laktamazy inaktywujące antybiotyki z grupy penicylin i cefalosporyn. W opracowanej w roku 1952 klasyfikacji Davisa i Maasa wyróżniono także oporność związaną z modyfikacją miejsca uchwytu antybiotyku oraz zahamowaniem jego transportu do komórki. Dodatkowo wyróżniono mechanizm powiązany ze zwiększeniem stężenia enzymu, który podlega inaktywacji przez antybiotyki. Co więcej, odnotowano, że bakterie są zdolne do zmniejszenia zapotrzebowania na produkt szlaku metabolicznego, który podlega zahamowaniu lub nawet do wytworzenia szlaku alternatywnego. W toku dalszych prac nad mechanizmami warunkującymi niewrażliwość bakterii na antybiotyki, wyróżniono także wykorzystanie przez drobnoustroje pomp efflux, aktywnie usuwających środki lecznicze, a także zmniejszenie aktywności enzymu przeprowadzającego aktywację leku w komórce.

Niewłaściwe stosowanie antybiotyków znacząco pogłębia lekooporność drobnoustrojów. Wybór leku powinien opierać się przede wszystkim na pobraniu materiału na posiew oraz wynikach badań wrażliwości drobnoustrojów na antybiotyki. Antybiogram pozwala określić stopień podatności i intensywność odpowiedzi patogenów na potencjalny środek terapeutyczny. Powszechnym błędem jest rutynowe podawanie antybiotyków szerokopasmowych bez identyfikacji czynnika etiologicznego zakażenia oraz stosowanie tej grupy produktów leczniczych na infekcje wirusowe. Co więcej, przyjmowanie zbyt małych dawek, a także szybkie przerwanie leczenia przez pacjentów, pogłębia rozwój lekooporności bakterii. Należy także podkreślić, że w czasie antybiotykoterapii zbyt mało uwagi przykładano się do ochrony naturalnej mikroflory organizmu. Dla przykładu, stosowana coraz częściej terapia antybiotykami nowej generacji, w tym na przykład makrolidami, których ważnymi zaletami są krótki czas suplementacji oraz mało działań niepożądanych, może zwiększać ryzyko rozwoju infekcji grzybiczych.

Narastająca oporność mikroorganizmów na chemioterapeutyki stanowi ważną przesłankę do poszukiwań alternatywnych sposobów walki z drobnoustrojami i tym samym skutecznej terapii chorób bakteryjnych człowieka i zwierząt. Obecnie, coraz większe zainteresowanie wzbudza olbrzymia i niezwykle zróżnicowana grupa peptydów wykazujących bezpośrednią aktywność przeciwdrobnoustrojową. Te peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs - antimicrobial peptides) są produkowane przede wszystkim przez różne populacje komórek organizmów eukariotycznych i są

ważnym elementem odporności wrodzonej tych organizmów. Wiele z tych związków cechuje szerokie spektrum działania zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich jak i bakterii Gram-ujemnych, ale także wobec wirusów i grzybów. Istotą bezpośredniej aktywności przeciwdrobnoustrojowej AMPs jest ich zdolność do uszkodzenia mikroorganizmów poprzez oddziaływanie z błonami biologicznymi, a także hamowanie syntezy ściany komórkowej [2]. Wśród AMPs odrębną grupę stanowią bakteriocyny, produkowane przez liczne gatunki bakterii i wydzielane poza komórkę. Bakteriocyny wykazują zdolność ograniczania rozwoju bakterii bądź całkowicie eliminują inne drobnoustroje. Mogą one stanowić także bazę dla tworzenia ich syntetycznych analogów. Dyskutowana jest ponadto możliwość stosowania białek przeciwdrobnoustrojowych, syntetyzowanych przez komórki organizmów eukariotycznych w warunkach fizjologicznych, w eliminacji drobnoustrojów patogennych. Obiecującą alternatywą dla antybiotykoterapii wydaje się być również terapia bakteriofagami - wirusami, których gospodarzem są komórki bakteryjne. Zaletą bakteriofagów, w porównaniu z antybiotykami, jest bardzo wąski zakres ich działania. Mocną stroną fagoterapii jest również zachowanie naturalnej flory bakteryjnej przewodu pokarmowego, często niszczonej podczas konwencjonalnej antybiotykoterapii, bez konieczności dostarczania probiotyków. Dalszy rozwój metod biologii molekularnej oraz poznanie specyfiki bakteriofagów pozwala na wyznaczenie nowych kierunków ich praktycznego wykorzystania w leczeniu wielu chorób zakaźnych [3]. W niniejszym opracowaniu przedstawiono aktualne informacje na temat praktycznej możliwości wykorzystania AMPs, bakteriocyn, fizjologicznych białek przeciwdrobnoustrojowych oraz fagów w leczeniu chorób bakteryjnych.

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe odgrywają zasadniczą rolę w mechanizmach odporności wrodzonej skierowanej przeciwko drobnoustrojom. Do chwili obecnej w bazie APD (*Antimicrobial Peptide Database*) opisano 2650 AMPs, które zostały zidentyfikowane zarówno u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych. Dużą grupę AMPs stanowią katelicydyny i defensyny. Peptydy te zbudowane są z 12 - 50 reszt aminokwasowych i charakteryzują się niewielką masą cząsteczkową, mieszczącą się w granicach od 3 do 10 kDa. Ze względu na obecność od 2 do 9 ładunków dodatnich, co jest wynikiem występowania aminokwasów zasadowych, peptydy te są często nazywane peptydami kationowymi [4].

Katelicydyny wyizolowano z organizmów wielu gatunków ssaków m.in. koni, świń, małp, królików, szczurów, a także ludzi. Podobnie jak inne AMPs, peptydy te są syntetyzowane jako nieaktywne pre-pro-peptydy. Prekursor katelicydyn składa się z wysoce konserwatywnego segmentu N-końcowego, który jest peptydem sygnałowym i warunkuje odpowiednie uwalnianie biologicznie aktywnego peptydu. Drugą składową prekursora jest domena katelinowa, której funkcja nie jest jednoznacznie

określona, jednak zakłada się, że jest ona odpowiedzialna za ochronę tkanek gospodarza przed proteolizą. Ostatni element pre-pro-peptydu to wysoce różnorodna domena C-końcowa, która stanowi dojrzały peptyd uwalniany z prekursora w wyniku działania enzymów proteolitycznych. Katelicydyny mają strukturę α -helisy i są wytwarzane przez neutrofile, komórki nabłonkowe, keratynocyty, makrofagi, komórki tłuszczne, komórki NK, komórki dendrytyczne i limfocyty [4]. U człowieka opisano dotychczas tylko jedną katelicydynę LL-37, której nazwa odnosi się do dwóch pierwszych aminokwasów w sekwencji (leucyna-leucyna) oraz jej długości. Dojrzały peptyd powstaje z białka prekursorowego hCAP18 przy udziale proteiny 3. Nazwa prekursora wskazuje na jego masę cząsteczkową (18 kDa) i kationowy charakter (human Cationic Antimicrobial Protein). Obecność LL-37 i jej prekursora odnotowano w różnych komórkach, tkankach oraz płynach ustrojowych. Ludzka katelicydyna jest produkowana konstytutywnie lub syntetyzowana w odpowiedzi na obecność bakterii lub ich produktów. Produkcję konstytutywną udokumentowano w odniesieniu do neutrofilii, a indukowaną udowodniono w monocytach, komórkach NK, komórkach tłuszcznych, limfocytach B, a także enterocytach jelita, komórkach nabłonka i keratynocytach. LL-37 wykryto w płynie wysiękowym z ran, osoczu, nasieniu oraz aspiratach z tchawicy noworodków. Ekspresja LL-37 może być regulowana przez wiele czynników endogennych, w tym prozapalne cytokiny, czynniki wzrostu i aktywną formę witaminy D [5].

Obecnie znane są wstępne informacje, że katelicydyna LL-37 może skutecznie hamować rozwój bakterii patogennych. Hou i wsp. [6] w badaniach prowadzonych *in vivo* na modelu mysim udokumentowali, że katelicydyna LL-37 może być efektywna w leczeniu zapalenia płuc wywołanego przez szczep *Staphylococcus aureus* oporny na metycylinę (MRSA). Jednorazowe podanie ludzkiej katelicydyny w dawce 0,8 mg/kg masy ciała, znacząco poprawiło obraz histopatologiczny płuc u zakażonych zwierząt. Co więcej, poziom ekspresji prozapalnych cytokin interleukiny (IL)-6 i czynnika martwicy nowotworu (TNF) w osoczu oraz popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) był znacząco niższy u zakażonych myszy, którym podano LL-37, w porównaniu z grupą chorych myszy nieleczonych katelicydyną. Podobne badania prowadzili Beaumont i wsp. [7], którzy wskazali, że po 24 godzinach od podania myszom z infekcją płuc wywołaną *Pseudomonas aeruginosa* katelicydyny LL-37, obserwuje się znaczące zmniejszenie liczby bakterii w BAL. Katelicydyna LL-37 hamuje również tworzenie biofilmów przez *Pseudomonas aeruginosa* [8,9]. LL-37 wykazuje efektywność przeciwdrobnoustrojową w odniesieniu do bakterii z rodzaju *Francisella*, a także blokuje tworzenie biofilmów przez te bakterie [10]. Wykazano ponadto, że LL-37 i jej syntetyczne pochodne powstrzymują rozwój biofilmów *Staphylococcus aureus* [11, 12]. Należy podkreślić, że obserwacje na temat zdolności LL-37 do hamowania tworzenia biofilmów, silnie sugerują możliwość wyko-

rzystania tej katelicidydy w leczeniu infekcji bakteryjnych ran, wywoływanych różnymi czynnikami etiologicznymi [13]. Katelicydyna LL-37 i jej syntetyczne pochodne skutecznie hamują rozwój szczepów MRSA oraz szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na mupirocynę [11]. Xia i wsp. [14] udowodnili, że katelicydyna wyizolowana z jadu węża *Bungarus fasciatus* jest efektywna w terapii infekcji *Salmonella typhimurium*. Na modelu mysim udokumentowano, że po zastosowaniu katelicidydy, rozprzestrzenianie się bakterii do śledziony i wątroby było mniejsze, w porównaniu z nieleczoną grupą kontrolną. Zaobserwowano również mniejsze uszkodzenie śluzówki jelit u zwierząt, którym podano katelicydynę.

Defensyny cechują się obecnością sześciu reszt cysteinowych tworzących trzy mostki disiarczkowe i charakterystycznym uformowaniem łańcucha w β -harmonijkę. U kręgowców peptydy te podzielono na 3 grupy - α -defensyny, β -defensyny oraz θ -defensyny, które różnią się strukturą prekursorów, długością łańcucha aminokwasowego oraz umiejscowieniem wiązań disiarczkowych [4]. Defensyny α , nazywane defensynami klasycznymi, mają masę cząsteczkową w granicach 3 - 4 kDa i posiadają od 29 do 35 reszt aminokwasowych w cząsteczce. U człowieka opisano sześć peptydów z grupy defensyn α . W ziarnistościach azurofilnych neutrofilów człowieka odnotowano cztery α -defensyny oznaczone jako HNP-1, HNP-2, HNP-3 i HNP-4, a w komórkach Panetha oraz komórkach nabłonka układu moczowo-płciowego udokumentowano obecność α -defensyn HD-5 i HD-6. Peptydy te konstytutywnie syntetyzowane przez neutrofile mogą być również wytwarzane przez monocyty i limfocyty T CD8⁺ pod wpływem stymulacji cytokinami prozapalnymi i lipopolisacharydem (LPS). Peptydy z grupy β -defensyn mają masę cząsteczkową 4 - 5 kDa i zbudowane są z 38 - 42 reszt aminokwasowych. U człowieka najlepiej poznаныmi β -defensynami są hBD-1, hBD-2, hBD-3 i hBD-4. Defensyna hBD-1 jest ekspresjonowana konstytutywnie przez keratynocyty i komórki nabłonka, ale może być również syntetyzowana przez monocyty i komórki dendrytyczne w odpowiedzi na aktywację przez cytokiny prozapalne i LPS. Synteza defensyn hBD-2-4 przez keratynocyty, komórki nabłonka, monocyty, komórki tuczne i komórki dendrytyczne jest indukowana przez cytokiny. Najmniej poznana i opisana grupą defensyn są θ -defensyny, których nie opisano u człowieka [4].

Dotychczas niewielu autorów wskazało na możliwość stosowania defensyn w terapii zakażeń bakteryjnych. Opisano, że rekombinowane defensyny hBD-1 i hBD-2 hamują *in vitro* tworzenie biofilmów przez *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella enterica* Typhi. Co więcej, podane myszom rekombinowane peptydy hBD-1 i hBD-2 hamowały w warunkach *in vivo* namnażanie się *Salmonella enterica* Typhi w płynie otrzewnowym, nerkach i śledzionie [15]. Udokumentowano ponadto zdolność hBD-3 do hamowania powstawania biofilmu *Enterococcus faecalis* [16]. Zaobserwowano także, że β -defensyna 3 hamuje *in vitro* wzrost *Staphylococcus pseudintermedius*

[17]. Peptydy z grupy α -defensyn - HNP-1 i HD-5 - mogą być skuteczne w leczeniu zakażeń wywoływanych przez *Clostridium difficile*, ponieważ, jak wykazano w warunkach *in vitro*, hamują rozwój różnych szczepów tego drobnoustroju [18].

Do grupy peptydów przeciwdrobnoustrojowych zaliczony jest także lizozym. Powstrzymuje on rozwój bakterii poprzez zdolność do niszczenia peptydoglikanu (PGN) ściany komórkowej drobnoustrojów. Działa on głównie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim [19], ale powstałe w wyniku proteolizy lizozymu mniejsze peptydy wykazują także aktywność *in vitro* przeciwko bakteriom Gram-ujemnym takim jak *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* oraz *Bordetella bronchiseptica* [20]. Niezwykle interesujące badania przeprowadził Teneback i wsp. [21] dokumentując na modelu mysim efektywność terapii lizozymem infekcji płuc wywołanej przez *Pseudomonas aeruginosa*. Opisano również, że terapia lizozymem infekcji wywołanej przez *Listeria monocytogenes* u myszy, prowadzi do znacznego obniżenia poziomu białka C-reaktywnego (CRP) i fibrynogenu, poziomu cytokin prozapalnych IL-6, IL-8, interferonu (IFN)- γ i TNF oraz redukcji ekspresji cząsteczek CD4, CD25, CD8a i CD8b na limfocytach T [22].

Laktoferyna, także wliczana do AMP, jest transferyną mającą zdolność wiązania jonów żelaza. W ten sposób, działając bakteriostatycznie, pośrednio blokuje rozwój drobnoustrojów. Udokumentowano, że laktoferyna *in vivo* hamuje rozwój wielu bakterii zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, w tym *Listeria monocytogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori* oraz *Pseudomonas aeruginosa* [23, 24, 25, 26]. Co więcej, opisano, że laktoferyna skutecznie hamuje indukowaną *Streptococcus mutans* posocznicę u myszy, redukując bakteriemię i wpływając na obniżenie poziomu cytokin prozapalnych IFN- γ oraz TNF w surowicy oraz poziomu CRP [27]. Co ciekawe, laktoferyna dodana do szczepionki BCG poprawia jej skuteczność, poprzez zwiększanie natężenia odpowiedzi immunologicznej typu Th1 [28].

W ślinie wykazano obecność niskocząsteczkowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych - histatyn. Są to bogate w histydyne białka syntetyzowane przez ślinianki przyuszne i podżuchwowe. Do tej pory sklasyfikowano 12 peptydów zaliczanych do rodziny histatyn, z których w najwyższym stężeniu w ślinie występują histatyna 1, 3 oraz 5, stanowiąc aż 80% ogółu histatyn. Histatyny wykazują przede wszystkim działanie przeciwbakteryjne [29], ale charakteryzują się również aktywnością przeciwrzybiczą wobec *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, jak i wobec innych gatunków z rodzaju *Candida* [29,30]. W badaniach *in vitro* jednoznacznie udowodniono wysoką aktywność bakteriobójczą histatyn, głównie histatyny 5, wobec *Porphyromonas gingivalis* [31]. Wykazano także, że syntetyczny analog histatyny, peptyd P-113D, przejawia silne właściwości bakteriobójcze *in vitro* wobec antybiotykoopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Staphylococcus aureus* [32].

Podobnie w badaniach *in vivo* potwierdzono aktywność peptydu P-113D przeciwko *Pseudomonas aeruginosa* [33]. Vukosavljevic i wsp. [34] wskazali, że histatyna 5 ma zdolność hamowania kolonizacji jamy ustnej przez *Candida albicans*. Także Kong i wsp. [35] udokumentowali, że w warunkach *in vivo* ten peptyd zapobiega rozwojowi kandydozy jamy ustnej.

Bakteriocyny

Odrębną grupę związków przeciwdrobnoustrojowych stanowią bakteriocyny wytwarzane przez różne gatunki bakterii, zarówno Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne. Reprezentują one bardzo dużą grupę peptydów, niezwykle zróżnicowanych pod względem właściwości fizycznych, biologicznych, masy cząsteczkowej, mechanizmu działania i zakresu aktywności. Są syntetyzowane rybosomalnie i z reguły wydzielane poza komórkę. Ich charakterystyczną cechą jest to, że wykazują aktywność przeciwko bakteriom blisko spokrewnionym z mikroorganizmem produkującym daną bakteriocynę, chociaż mogą również wykazywać aktywność wobec mikroorganizmów należących do innych rodzajów niż producent. Co istotne, bakterie wytwarzające daną bakteriocynę, są równocześnie odporne na jej działanie. Należy podkreślić, że bakteriocyny mają zdolność inaktywacji lub hamowania wzrostu bakterii, nie wywołując przy tym żadnych toksycznych efektów ubocznych. Trzeba również wskazać, że wykazują efektywne działanie już w stężeniach pikko- i nanomolarnych [36].

Bakteriocyny są niezwykle heterogenną grupą związków, a ich podział oparty jest na różnicach mas cząsteczkowych, struktury i aktywności biologicznej. Na podstawie powyższych kryteriów, bakteriocyny syntetyzowane przez bakterie Gram-dodatnie podzielono na 3 klasy. Pierwszą klasę stanowią lantibiotyki – niskocząsteczkowe, termostabilne, policykliczne peptydy, zawierające nietypowe aminokwasy, np. lantioninę czy 3-metylolantioninę. Drugą klasę stanowią termostabilne białka o niskiej masie cząsteczkowej, niezawierające modyfikowanych aminokwasów. Trzecią klasę bakteriocyn bakterii Gram-dodatnich stanowią związki o dużej masie cząsteczkowej, ulegające łatwo degradacji i inaktywacji pod wpływem wysokiej temperatury. Bakteriocyny bakterii Gram-ujemnych podzielono na 2 grupy - kolicyny i mikrocyny. Kolicyny są syntetyzowane przez szczepy *Escherichia coli* oraz bakterie z rodzajów *Shigella* i *Serratia*. Są to peptydy o masie cząsteczkowej od 25 do 80 kDa. Mikrocyny mają niższą masę cząsteczkową (5 - 10 kDa) i są niewrażliwe na wysoką temperaturę. Cechą charakterystyczną kolicyn i mikrocyn jest bardzo wąskie spektrum działania [36].

W badaniach prowadzonych w warunkach *in vitro* jednoznacznie udokumentowano aktywność różnych bakteriocyn przeciwko bakteriom patogennym dla człowieka. Lantibiotyk wytwarzany przez *Lactobacillus lactis* DP3147 - laktycyna 3147 - wykazuje wysoką efektywność przeciwko szczepom enterokoków opornym na wankomocynę (VRE) i niższą, przeciwko szczepom MRSA, natomiast lantibiotyk

nizyna, syntetyzowany również przez *Lactobacillus lactis* jest wysoce efektywny przeciwko szczepom MRSA [37]. W szeroko zakrojonych badaniach udokumentowano, że nizyna oraz inny lantibiotyk syntetyzowany przez *Streptococcus mutans* - mutacyna B-Ny266, wykazują silne właściwości bójcze wobec wielu bakterii patogennych, w tym *Listeria sp.*, *Clostridium sp.*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Gardnerella vaginalis*, *Propionibacterium acnes*, *Campylobacter jejuni*, *Neisseria sp.* oraz *Helicobacter pylori* [38]. Laktocyna 3147 jest także efektywna przeciwko różnym szczepom *Clostridium difficile* [39,40]. W badaniach *in vitro* wskazano, że bakteriocyną cechującą się aktywnością przeciw różnym szczepom *Clostridium difficile* jest również turicin CD syntetyzowany przez *Bacillus thuringiensis* DPC 643 [41]. Obserwacje te potwierdzono także w badaniach *ex vivo* [40]. Wysoką aktywność skierowaną przeciwko *Staphylococcus aureus* wykazuje również syntetyzowana przez *Staphylococcus simulans* biotyp *staphylolyticus* lizostafina, o charakterze bakteriolizyny, należąca do III klasy bakteriocyn [42]. Ciekawe są dane, że lizostafina wykazuje wysoką skuteczność przeciwko szczepom MRSA, działającą wspólnie z katelicydyną ranalexyną izolowaną ze skóry żaby *Rana catesbeiana* [43], peptydem wykazującym wysokie podobieństwo strukturalne do antybiotyku polimyksyny. Wykazano także, że lizostafina, w wyższych stężeniach, jest zdolna do niszczenia biofilmu utworzonego przez *Staphylococcus epidermidis* [44,45]. W dobrze zaprojektowanych badaniach wskazano ponadto, że szczepy *Streptococcus salivarius* izolowane z nosogardła dzieci wykazują silną aktywność przeciwko bakteriom odpowiedzialnym za zapalenie ucha środkowego, w tym *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis* [46].

Wiadomo obecnie, że niektóre bakterie probiotyczne wytwarzają związki o charakterze bakteriocyn. Co więcej, wydaje się, że stosowanie takich szczepów probiotycznych, które są producentami bakteriocyn znacząco poprawia stan homeostazy przewodu pokarmowego. Niezwykle intrygujące są obserwacje, że bakteriocyny szczepów probiotycznych mogą znacząco eradykować zakażenia *Helicobacter pylori*. Doustne podawanie szczepu *Lactobacillus acidophilus* LB zapobiegało zakażeniu myszy *Helicobacter sp.* [47]. Wskazano ponadto, że obecność bakterii probiotycznych wytwarzających bakteriocyny może prowadzić do eliminacji bakterii patogennych w jelicie. Bardzo interesujące informacje przedstawił Corr i wsp. [48]. W swoich badaniach udokumentowali bowiem, że podanie myszom szczepu probiotycznego *Lactobacillus salivarius* UCC118, wytwarzającego bakteriocynę o aktywności skierowanej przeciwko *Listeria sp.*, powoduje znaczącą redukcję infekcji powodowanej przez *Listeria monocytogenes*. Co więcej, badania Casey i wsp. [49] oraz Walsh i wsp. [50] wykazały, że podawanie mleka suplementowanego bakteriocynami produkowanymi przez 5 różnych szczepów bakterii probiotycznych, prowadzi do redukcji natężenia objawów i

czasu trwania biegunki w przebiegu salmonellozy u świń. Millette i wsp. [51] zanotowali, że produkujące bakteriocyny *Pedococcus acidilactici* oraz *Lactobacillus lactis* mogą redukować kolonizację jelit myszy enterokokami szczepów VRE. Wykazano ponadto, że podawanie myszom lantibiotyku mersacydyny produkowanego przez szczepy *Bacillus sp.*, prowadzi do eradykacji kolonizacji błony śluzowej nosa szczepami MRSA [52]. Stwierdzono również, że do otrzewnowa iniekcja mutacynej B-Ny266 całkowicie eliminowała śmiertelność myszy zakażonych *Staphylococcus aureus* [53]. Także aplikacja doodbytnicza myszom turicin CD zamiennie zmniejszała liczebność *Clostridium difficile* w jelicie [54]. Ciekawe dane przedstawił Howell i wsp. [55] wskazując, że podawanie psom paszy wzbogaconej nizyną, istotnie zmniejszało tworzenie płytki nazębnej oraz rozwój *gingivitis*. Cruchet i wsp. [56] udokumentowali, że podawanie dzieciom zakażonym *Helicobacter pylori* żywych *Lactobacillus johnsonii* La1, skutkowało istotnym zmniejszeniem stopnia kolonizacji błony śluzowej żołądka.

Bakteriofagi

Istnieją dane, że w eliminacji bakterii patogennych mogą być pomocne wirusy atakujące bakterie, czyli bakteriofagi. Bakteriofagi charakteryzują się bowiem tym, że po replikacji wewnątrz bakterii indukują lizę komórki gospodarza, a więc jej całkowite zniszczenie. Ważną cechą bakteriofagów jest to, że wykazują one bardzo wysoką specyficzność w stosunku do gospodarza-bakterii, ograniczoną do określonego gatunku, a nawet szczepu. Tak więc bakteriofagi nie wpływają na populację bakterii tworzących fizjologiczną mikroflorę. Należy również podkreślić, że bakteriofagi wykazują specyficzność zarówno w stosunku do wielu bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych [57].

Wiele badań dokumentujących efektywność stosowania bakteriofagów w eliminacji bakterii patogennych, przeprowadzono na zwierzętach. Tanji i wsp. [58] wykazali, że koktajl fagowy SP15-21-22 jest bardzo skuteczny w warunkach *in vitro* w eliminacji różnych szczepów *Escherichia coli*. Co więcej, doustne podanie tych bakteriofagów było efektywne w eliminacji szczepu *Escherichia coli* O157:H7 z układu pokarmowego myszy. Biswas i wsp. [59] stwierdzili, że u myszy terapia bakteriofagami może być niezwykle skuteczna w leczeniu infekcji powodowanej przez szczep VRE *Enterococcus faecium*. Opisano także szybką eradykację szczepu MRSA po terapii fagowej u myszy [60]. W badaniach prowadzonych na myszach wskazano również wysoką efektywność terapii bakteriofagami w infekcji wywołanej szczepem *Pseudomonas aeruginosa* opornym na imipenem [61]. Udokumentowano także skuteczność stosowania koktajlu fagowego w leczeniu salmonellozy. U świń, leczenie fagami prowadziło do znacznego obniżenia populacji *Salmonella enterica* Typhimurium w jelicie krętym oraz w jelicie ślepym. Co więcej, w badaniach *in vitro* potwierdzono skuteczność bakteriofagów przeciwko wielu różnym serotypom *Salmonella enterica* [62]. W badaniach *in vivo* prowadzonych na myszach, wskazano na

skuteczność enzymu litycznego bakteriofagów w eliminacji różnych serotypów pneumokoków [63]. Zastosowanie specyficznej kombinacji fagów może wpływać znacząco na zmniejszenie populacji *Clostridium difficile* zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* [64].

Efektywność terapii fagowej potwierdzono w badaniach na pacjentach. Niezwykle interesujące obserwacje przedstawił Strój i wsp. [65] wskazując, że leczenie noworodka z objawami posocznicy z ropnym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych, wywołanych szczepem *Klebsiella pneumoniae* opornym na antybiotyki, preparatem zawierającym szczep faga lizującego tę bakterię, doprowadziło do wyjąłwienia płynu mózgowo-rdzeniowego. Leszczyński i wsp. [66] wskazali na wysoką efektywność stosowania terapii fagowej w eradykacji szczepów MRSA z przewodu pokarmowego i układu moczowego. Opisano ponadto eradykację *Enterococcus faecalis*, odpowiedzialnych za zakażenie układu moczowego u mężczyzn, w efekcie stosowania fagoterapii [67]. Ciekawe dane przedstawił Jikia i wsp. [68] dokumentując efektywność stosowania złożonego preparatu zawierającego ciprofloksacynę i bakteriofagi w terapii zakażenia *Staphylococcus aureus*. Warto dodać, iż zaletą terapii fagowej jest duże bezpieczeństwo jej stosowania [69]. Należy również wskazać, że stosowanie terapii fagowej skutkuje zmniejszeniem kosztów terapii w porównaniu z kosztami antybiotykoterapii [70].

Pomimo wielu zalet wynikających z zastosowania terapii bakteriofagami, istnieją również uzasadnione obawy wobec tego typu leczenia. Szybkość procesu niszczenia dużej liczby bakterii może bowiem wpłynąć na uwolnienie znacznej ilości endotoksyn bakteryjnych, a w konsekwencji może doprowadzić do wielu efektów ubocznych, w tym nawet do objawów związanych z niedokrwieniem lub niedotlenieniem organów czy tkanek. Niebezpieczeństwo wynika również z udziału fagów w horyzontalnym transferze genów, co może skutkować pojawianiem się nowych alarmowych szczepów bakterii. Przeszkody te jednak można ominąć, aplikując zamiast całych, aktywnych bakteriofagów, jedynie ich części, jak na przykład produkowane przez nie białka [63].

Podsumowanie

Narastająca liczba szczepów bakterii wielolekoopornych stanowi poważny problem kliniczny, bowiem znacząco zmniejsza skuteczność leczenia chorób infekcyjnych, a nawet może prowadzić do całkowitego niepowodzenia terapii konwencjonalnymi antybiotykami. Obecnie problem ten ma zasięg globalny, głównie ze względu na szerokie stosowanie nieracjonalnej antybiotykoterapii. W ciągu ostatnich lat opisano chociażby szybko rosnącą niewrażliwość *Neisseria gonorrhoeae* w odniesieniu do nowych antybiotyków i chemioterapeutyków wprowadzanych do schematu leczenia rzeżączki [71]. Pojawienie się w środowisku szpitalnym antybiotykkoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* czy *Enterococcus faecium* wpływa na zwiększenie zapotrzebowania na kolejne leki, które okażą się efektywne

Tabela I

Zastosowanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych i bakteriofagów w eliminacji wybranych patogenów.
Application of the antimicrobial peptides and phages in elimination of selected pathogens.

Czynnik etiologiczny	LL-37	defensyny	lizozym	laktoferyna	histatyny	bakteriocyny	bakteriofagi
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+ ^{a,b}		+ ^{a,b}	+ ^b	+ ^{a,b}		+ ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	+ ^{a,b}	+ ^a			+ ^a	+ ^a	+ ^b
<i>Clostridium difficile</i>		+ ^a				+ ^{a,b}	+ ^{a,b}
<i>Escherichia coli</i>		+ ^a	+ ^a				+ ^a
<i>Salmonella typhimurium</i>	+ ^b		+ ^a			+ ^b	
<i>Enterococcus faecalis</i>		+ ^a					+ ^b
<i>Haemophilus influenzae</i>				+ ^b		+ ^b	
<i>Helicobacter pylori</i>				+ ^b		+ ^{a,b}	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			+ ^a				+ ^b
<i>Listeria monocytogenes</i>				+ ^b		+ ^{a,b}	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>						+ ^b	+ ^b
<i>Francisella sp.</i>	+ ^a						
<i>Salmonella Typhi</i>		+ ^{a,b}					
<i>Streptococcus mutans</i>				+ ^b			

a – badania *in vitro*, b – badania *in vivo*

w leczeniu infekcji wewnątrzszpitalnych o tej etiologii. Coraz więcej jest również danych, że bakterie z rodzaju *Enterobacteriaceae*, w tym gatunki *Escherichia coli* czy *Klebsiella pneumoniae* wykształciły oporność na kolistynę - antybiotyk ostatniego rzutu w infekcjach wywołanych przez te patogeny [72]. Należy także podkreślić, że antybiotyki mogą wywoływać wiele skutków niepożądanym u pacjenta, tj. grzybice, stany zapalne czy nawet poważne uszkodzenia narządów wewnętrznych m.in. wątroby i nerek. Problemy te zmuszają nas do poszukiwania nowych, alternatywnych metod leczenia zakażeń bakteryjnych. Obiecującą możliwością dla terapii antybiotykami stwarza grupa peptydów przeciwdrobnoustrojowych, zarówno endogennych jak i syntetycznych. Uważane są one za dużo bezpieczniejsze od antybiotyków, ze względu na fakt, że występują u wszystkich organizmów eukariotycznych, u których stanowią istotny element układu odpornościowego. Alternatywę dla antybiotyków może stanowić ludzka katelicyna LL-37, a także α -defensyny: HNP-1, HD-5 oraz β -defensyny: hBD-1, hBD-2, hBD-3. Lizozym, laktoferyna oraz histatyny to także obiecujące związki w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Ponadto, mogą one znaleźć zastosowanie w przyspieszaniu gojenia się ran [13] czy jako środki grzybobójcze [29], a dodane jako adjuwant do szczepionek - sprzyjają zwiększeniu ich skuteczności [28]. Spośród metabolitów produkowanych przez bakterie, do standardów leczenia włączyć można bakteriocyny. Co więcej, przekonywane dane wskazują także na zalekty wynikające ze stosowania terapii bakteriofagami (Tabela I). Bez wątpliwości niezbędne są jednak dalsze szczegółowe badania w tym zakresie.

Piśmiennictwo

1. Bush K: The coming of age of antibiotics: discovery and therapeutic value. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;

1213: 1-4.

- Jenssen H, Hamill P, Hancock RE: Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19: 491-511.
- Kowalczyk P, Chalimoniuk K, Danielak A, Dziedzic D, Jankowska P. et al: Terapia fagowa - nadzieje i obawy. *Nowa Med.* 2013; 20: 61-65.
- Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM: Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol.* 2010; 135: 1-11.
- Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L: A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol.* 2012; 280: 22-35.
- Hou M, Zhang N, Yang J, Meng X, Yang R. et al: Antimicrobial peptide LL-37 and IDR-1 ameliorate MRSA pneumonia in *Vivo*. *Cell Physiol Biochem.* 2013; 32: 614-623.
- Beaumont PE, McHugh B, Gwyer-Findlay E, Mackellar A, Mackenzie KJ. et al: Cathelicidin host defence peptide augments clearance of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection by its influence on neutrophil function *in vivo*. *PLoS One* 2014; 9: e99029.
- Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML: Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to alpha-helical peptides: D-enantiomer of LL-37. *Front Microbiol.* 2011; 2: 128.
- Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE: Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun.* 2008; 76: 4176-4182.
- Amer LS, Bishop BM, van Hoek ML: Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396: 246-251.
- Haisma EM, de Breij A, Chan H, van Dissel JT, Drijfhout JW. et al: LL-37 derived peptides eradicate multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from thermally wounded human skin equivalents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 4411-4419.
- Dean SN, Bishop BM, van Hoek ML: Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 114.
- Duplantier AJ, van Hoek ML: The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. *Front Immunol.* 2013; 4: 143.
- Xia X, Zhang L, Wang Y: The antimicrobial peptide cathelicidin-BF could be a potential therapeutic for *Salmonella typhimurium* infection. *Microbiol Res.* 2015; 171: 45-51.

- Maiti S, Patro S, Purohit S, Jain S, Senapati S, Dey N: Effective control of *Salmonella* infections by employing combinations of recombinant antimicrobial human β -defensins hBD-1 and hBD-2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 6896-6903.
- Lee JK, Park YJ, Kum KY, Han SH, Chang SW. et al: Antimicrobial efficacy of a human β -defensin-3 peptide using an *Enterococcus faecalis* dentine infection model. *Int Endod J.* 2013; 4: 406-412.
- Fazakerley J, Crossley J, McEwan N, Carter S, Nuttall T: In vitro antimicrobial efficacy of β -defensin 3 against *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy and atopic canine skin. *Vet Dermatol.* 2010; 21: 463-468.
- Furci L, Baldan R, Bianchini V, Trovato A, Ossi C. et al: New role for human α -defensin 5 in the fight against hypervirulent *Clostridium difficile* strains. *Infect Immun.* 2015; 83: 986-995.
- Gajda E, Bugla-Płoskońska G: Lizozym - występowanie w przyrodzie, właściwości biologiczne i możliwości zastosowań. *Postepy Hig Med Dosw.* 2014; 68: 1501-1515.
- Ibrahim HR, Imazato K, Ono H: Human lysozyme possesses novel antimicrobial peptides within its N-terminal domain that target bacterial respiration. *J Agric Food Chem.* 2011; 59: 10336-10345.
- Teneback CC, Scanlon TC, Wargo MJ, Bement JL, Griswold KE, Leclair LW: Bioengineered lysozyme reduces bacterial burden and inflammation in a murine model of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 5559-5564.
- Palumbo D, Iannaccone M, Porta A, Capparelli R: Experimental antibacterial therapy with puroindolines, lactoferrin and lysozyme in *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Microbes Infect.* 2010; 12: 538-545.
- Lee HY, Park JH, Seok SH, Baek MW, Kim DJ. et al: Potential antimicrobial effects of human lactoferrin against oral infection with *Listeria monocytogenes* in mice. *J Med Microbiol.* 2005; 54: 1049-1054.
- Qiu J, Hendrixson DR, Baker EN, Murphy TF, St Geme 3rd JW, Plaut AG: Human milk lactoferrin inactivates two putative colonization factors expressed by *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12641-12646.
- Wang X, Hirmo S, Willén R, Wadström T: Inhibition of *Helicobacter pylori* infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB/cA mouse model. *J Med Microbiol.* 2001; 50: 430-435.
- Rogan MP, Taggart CC, Green CM, Murphy PG, O'Neill SJ, McElvaney NG: Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 2004; 190: 1245-1253.
- Velusamy SK, Fine DH, Velliyagounder K: Prophylactic effect of human lactoferrin against *Streptococcus mutans* bacteremia in lactoferrin knockout mice. *Microbes Infect.* 2014; 16: 762-767.
- Hwang SA, Arora R, Kruzel ML, Actor JK: Lactoferrin enhances efficacy of the BCG vaccine: comparison between two inbred mice strains (C57BL/6 and BALB/c). *Tuberculosis* 2009; 89: 49-54.
- Tsai H, Bobek LA: Human salivary histatins: promising anti-fungal therapeutic agents. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9: 480-497.
- Melino S, Santone C, Di Nardo P, Sarkar B: Histatins: salivary peptides with copper(II) - and zinc(II) - binding motifs. Perspectives for biomedical applications. *FEBS J.* 2014; 281: 657-672.
- Imatani T, Kato T, Okuda K, Yamashita Y: Histatin 5 inhibits apoptosis in human gingival fibroblasts induced by *Porphyromonas gingivalis* cell-surface polysaccharide. *Eur J Med Res.* 2004; 9: 528-532.
- Giacometti A, Cirioni O, Kamysz W, D'Amato G, Silvestri C. et al: *In vitro* activity of the histatin derivative P-113 against multidrug-resistant pathogens responsible for pneumonia in immunocompromised patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 1249-1252.
- Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Orlando F, Kamysz W. et al: Potential therapeutic role of histatin derivative P-113D in experimental rat models of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *J Infect Dis.* 2004; 190: 356-364.
- Vukosavljevic D, Custodio W, Del Bel Cury AA, Siqueira WL: The effect of histatin 5, adsorbed on PMMA and hydroxyapatite, on *Candida albicans*

- colonization. *Yeast*. 2012; 29: 459-466.
35. Kong EF, Tsui C, Boyce H, Ibrahim A, Hoag SW, et al: Development and *in vivo* evaluation of a novel histatin-5 bioadhesive hydrogel formulation against oral candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; pii: AAC.02624-15.
 36. Nishie M, Nagao JI, Sonomoto K: Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci*. 2012; 17: 1-16.
 37. Piper C, Draper LA, Cotter PD, Ross RP, Hill C: A comparison of the activities of lactacin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 64: 546-551.
 38. Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix C, Lavoie MC: MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44: 24-29.
 39. Rea MC, Clayton E, O'Connor PM, Shanahan F, Kiely B, et al: Antimicrobial activity of lactacin 3147 against clinical *Clostridium difficile* strains. *J Med Microbiol*. 2007; 56: 940-946.
 40. Rea MC, Dobson A, O'Sullivan O, Crispie F, Fohy F, et al: Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on *Clostridium difficile* and microbial diversity in a model of the distal colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 4639-4644.
 41. Rea MC, Sit CS, Clayton E, O'Connor PM, Whittall RM, et al: Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 9352-9357.
 42. von Eiff C, Kokai-Kun JF, Becker K, Peters G: *In vitro* activity of recombinant lysostaphin against *Staphylococcus aureus* isolates from anterior nares and blood. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 3613-3615.
 43. Graham S, Coote PJ: Potent, synergistic inhibition of *Staphylococcus aureus* upon exposure to a combination of the endopeptidase lysostaphin and the cationic peptide ranalexin. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59: 759-762.
 44. Wu JA, Kusuma C, Mond JJ, Kokai-Kun JF: Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 3407-3414.
 45. Kokai-Kun JF, Chanturiya T, Mond JJ: Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 64: 94-100.
 46. Walls T, Power D, Tagg J: Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by the normal flora of the nasopharynx: potential to protect against otitis media? *J Med Microbiol*. 2003; 52: 829-833.
 47. Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL: Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64: 4573-4580.
 48. Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CG: Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 7617-7621.
 49. Casey PG, Gardiner GE, Casey G, Bradshaw B, Lawlor PG, et al: A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73: 1858-1863.
 50. Walsh MC, Gardiner GE, Hart OM, Lawlor PG, Daly M, et al: Predominance of a bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. *FEMS Microbiol Ecol*. 2008; 64: 317-327.
 51. Millette M, Cornut G, Dupont C, Shareck F, Archambault D, Lacroix M: Capacity of human nisin- and pediocin-producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74: 1997-2003.
 52. Kruszewska D, Sahl HG, Bierbaum G, Pag U, Hynes SO, Ljungh A: Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 54: 648-653.
 53. Mota-Meira M, Morency H, Lavoie MC: *In vivo* activity of mutacin B-Ny266. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56: 869-871.
 54. Rea MC, Alemayehu D, Casey PG, O'Connor PM, Lawlor PG, et al: Bioavailability of the anti-clostridial bacteriocin thuricin CD in gastrointestinal tract. *Microbiology* 2014; 160: 439-445.
 55. Howell TH, Fiorellini JP, Blackburn P, Projan SJ, de la Harpe J, Williams RC: The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. *J Clin Periodontol*. 1993; 20: 335-339.
 56. Cruchet S, Obregon MC, Salazar G, Diaz E, Gotteland M: Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. *Nutrition* 2003; 19: 716-721.
 57. Wittebole X, De Roock S, Opal SM: A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 2014; 5: 226-235.
 58. Tanji Y, Shimada T, Fukudomi H, Miyayama K, Nakai Y, Unno H: Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *J Biosci Bioeng*. 2005; 100: 280-287.
 59. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, et al: Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*. 2002; 70: 204-210.
 60. Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D: Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51: 2765-2773.
 61. Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, et al: Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Med*. 2006; 17: 309-317.
 62. Wall SK, Zhang J, Rostagno MH, Ebner PD: Phage therapy to reduce pre-processing *Salmonella* infections in market-weight swine. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76: 48-53.
 63. Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA: Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 2001; 294: 2170-2172.
 64. Nale JY, Spencer J, Hargreaves KR, Buckley AM, Trzepiński P, et al: Better together: bacteriophage combinations significantly reduce *Clostridium difficile* growth *in vitro* and proliferation *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; pii: AAC.01774-15.
 65. Strój L, Weber-Dąbrowska B, Partyka K, Mulczyk M, Wójcik M: Skuteczne zastosowanie bakteriofagoterapii w ropnym zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych u noworodka. *Neurol Neurochir Pol*. 1999; 33: 693-698.
 66. Leszczyński P, Weber-Dąbrowska B, Kohutnicka M, Luczak M, Górecki A, Górski A: Successful eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) intestinal carrier status in a health-care worker—case report. *Folia Microbiol. (Praha)* 2006; 51: 236-238.
 67. Letkiewicz S, Miedzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dąbrowska B, Górski A: Eradication of *Enterococcus faecalis* by phage therapy in chronic bacterial prostatitis—case report. *Folia Microbiol. (Praha)* 2009; 54: 457-461.
 68. Jikia D, Chkhaidze N, Imedashvili E, Mgaloblishvili I, Tsitlanadze G, et al: The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90. *Clin Exp Dermatol*. 2005; 30: 23-26.
 69. Bruttin A, Brüßow H: Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 2874-2878.
 70. Miedzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dąbrowska B, Górski A: Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postepy Hig Med Dosw*. 2007; 61: 461-465.
 71. Serwin AB, Koper M, Unemo M: Rzeżączka w XXI wieku – sytuacja na świecie i w Polsce. *Przegl Epidemiol*. 2014; 68: 127-131.
 72. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM: Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014; 26: 643.