



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie Mikrobiologii,
Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej

Urszula Tatiana Wójcik-Bojek

**Weryfikacja możliwości zapobiegania
rozwojowi zakażeń z udziałem
Staphylococcus aureus w oparciu
o zastosowanie naturalnych
ekstraktów roślinnych**

Verification of the possibility of preventing the
development of *Staphylococcus aureus* infections based
on the use of natural plant extracts

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Immunologii
i Biologii Infekcyjnej
Instytutu Mikrobiologii,
Biotechnologii i Immunologii

pod kierunkiem
dr hab. Beaty Sadowskiej prof. UŁ

Spis treści

I. Wstęp	5
I.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	5
I.1.1. Ogólna charakterystyka drobnoustrojów	5
I.1.2. Znaczenie kliniczne	6
I.1.3. Czynniki wirulencji <i>S. aureus</i>	7
I.1.4. Tworzenie biofilmu	8
I.1.5. Antybiotykooporność	10
I.1.6. Alternatywne sposoby zwalczania zakażeń gronkowcowych	12
I.2. Ekstrakty roślinne w zwalczaniu zakażeń gronkowcowych	14
I.3. Charakterystyka ekstraktów z kaliny koralowej (<i>Viburnum opulus</i> L.)	17
II. Założenia i cele pracy	19
III. Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej	20
III.1. Publikacja 1 [P1]	21
III.2. Publikacja 2 [P2]	38
IV. Wyniki nieopublikowane	65
IV.1. Założenia - podstawy teoretyczne przeprowadzonych badań	65
IV.2. Materiały i metody	67
IV.2.1. Protokół ogólny	67
IV.2.2. Przygotowanie materiału roślinnego i analiza biochemiczna	67
IV.2.3. Przygotowanie roztworów wyjściowych ekstraktów i składników ściany komórkowej <i>S. aureus</i>	68
IV.2.4. Warunki hodowli <i>Staphylococcus aureus</i>	68
IV.2.5. Ocena minimalnego stężenia hamującego (MIC) i minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) wankomycyny	69
IV.2.6. Ekspozycja hodowli planktonowych i biofilmowych <i>S. aureus</i> na ekstrakty roślinne, kwas chlorogenowy lub wankomycynę i zebranie supernatantów	69

IV.2.7. Ocena uwalniania PG i SpA do supernatantów hodowli planktonowych i biofilmowych <i>S. aureus</i> przy użyciu testu ELISA	70
IV.2.8. Warunki hodowli komórek linii THP-1 i ich różnicowanie do makrofagów	70
IV.2.9. Ekspozycja makrofagów na supernatanty z hodowli gronkowców i oczyszczone składniki ściany komórkowej <i>S. aureus</i>	71
IV.2.10. Ocena produkcji TNF- α i IL-10 przy użyciu testu ELISA.....	71
IV.2.11. Ocena ekspresji markerów CD na makrofagach pochodzących z linii THP-1 przy użyciu cytometrii przepływowej.....	72
IV.2.12. Ocena pochłaniania <i>S. aureus</i> przez makrofagi wyprowadzone z linii THP-1 po ekspozycji na supernatanty z hodowli gronkowców i oczyszczone składniki ściany komórkowej gronkowców	73
IV.2.13. Ocena wewnątrzkomórkowego zabijania pochłoniętych <i>S. aureus</i> przez makrofagi wyprowadzone z linii THP-1 po ekspozycji na supernatanty z hodowli gronkowców i oczyszczone składniki ściany komórkowej gronkowców	74
IV.2.14. Statystyka	75
IV.3. Wyniki	75
IV.3.1. Wpływ ekstraktów z <i>V. opulus</i> na uwalnianie peptydoglikanu i gronkowcowego białka A do supernatantów z hodowli planktonowych i biofilmowych <i>S. aureus</i>	75
IV.3.2. Wpływ badanych i porównawczych supernatantów z hodowli <i>S. aureus</i> oraz składników ściany komórkowej gronkowców na zmiany w powierzchniowej ekspresji markerów CD na makrofagach zróżnicowanych z THP-1.....	77
IV.3.3. Wpływ badanych i porównawczych supernatantów z hodowli <i>S. aureus</i> oraz składników ściany komórkowej gronkowców na produkcję cytokin przez makrofagi pochodzące z THP-1	80
IV.3.4. Wpływ „primingu” supernatantami z hodowli planktonowych i biofilmowych <i>S. aureus</i> oraz składnikami ściany komórkowej gronkowców na	

modulację funkcji makrofagów pochodzących z THP-1 w zakresie ich aktywności fagocytarnej przeciwko gronkowcom	82
IV.4. Podsumowanie wyników nieopublikowanych i wnioski	85
V. Podsumowanie i wnioski	87
VI. Dyskusja	92
VII. Streszczenie w języku polskim.....	98
VIII. Streszczenie w języku angielskim	101
IX. Literatura	104
X. Oświadczenia współautorów	117
XI. Dorobek naukowy	122

I. Wstęp

I.1. *Staphylococcus aureus*

I.1.1. Ogólna charakterystyka drobnoustrojów

Termin „*Staphylococcus*” został po raz pierwszy użyty w 1880 r. przez szkockiego chirurga Alexandra Ogstona, który w preparacie z ropnej wydzieliny zaobserwował groniaste skupiska komórek drobnoustrojów (Ogston 1881, Newsom 2008). Gronkowce to Gram-dodatnie ziarenkowce o średnicy około 1 μm , które nie wykazują zdolności ruchu i nie tworzą przetrwalników. W preparatach mikroskopowych najczęściej układają się w skupiska przypominające grona, choć mogą także występować w formie dwoinek lub pojedynczych ziarniaków. Do cech charakterystycznych tych drobnoustrojów zaliczyć można produkcję enzymu katalazy oraz zdolność do wzrostu na prostych podłożach bakteriologicznych (nie zawierających specjalnych składników odżywczych poza źródłem węgla i energii), w warunkach tlenowych lub przy obniżonej zawartości tlenu (względnie beztlenowce) i tolerujących wysoką zawartość chlorku sodu (nawet do 15%) (Guo i wsp. 2020, Taylor i Unakal 2022). Gronkowce ogólnie dzieli się na koagulazododatnie (CPS, ang. *coagulase positive staphylococci*) oraz koagulazoujemne (CNS, ang. *coagulase negative staphylococci*) ze względu na produkcję enzymu koagulazy, który reagując z protrombiną, prowadzi do aktywacji kaskady wykrzepiania osocza, powodując polimeryzację fibrynogenu i tworzenie włókna. Spośród obecnie wyróżnianych ponad 45 gatunków gronkowców do CNS zalicza się m.in. *S. epidermidis*, *S. auricularis*, *S. saprophyticus*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. warneri*. Wśród tej grupy gronkowców wyróżnić można drobnoustroje wrażliwe na nowobiocynę (np. *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*) oraz odporne na nowobiocynę (np. *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. sciuri*, *S. arlettae*). Natomiast głównym przedstawicielem gronkowców koagulazododatnich jest *S. aureus*, ale do tej grupy zalicza się także *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. simiae*, *S. lutrae* i inne (Becker i wsp. 2014, Gherardi i wsp. 2018, González-Martín i wsp. 2020). Na bogatych podłożach odżywczych gronkowce złociste tworzą okrągłe, gładkie kolonie o złocistym kolorze, który jest wynikiem produkcji barwnika stafyloksantyny (Xue i wsp. 2019). Na podłożach z dodatkiem krwi owczej drobnoustroje te wykazują hemolizę (α , β , δ lub γ) i wyrastają w postaci białoszarych, błyszczących kolonii (Wang i wsp. 2020). Gronkowce złociste

posiadają na powierzchni komórek białko zwane czynnikiem skupiania (Clf – ang. *clumping factor*), które wykazuje zdolność wiązania fibrynogenu, co zostało wykorzystane w szybkich testach diagnostycznych (Malachowa i wsp. 2016, Taylor i Unakal, 2022).

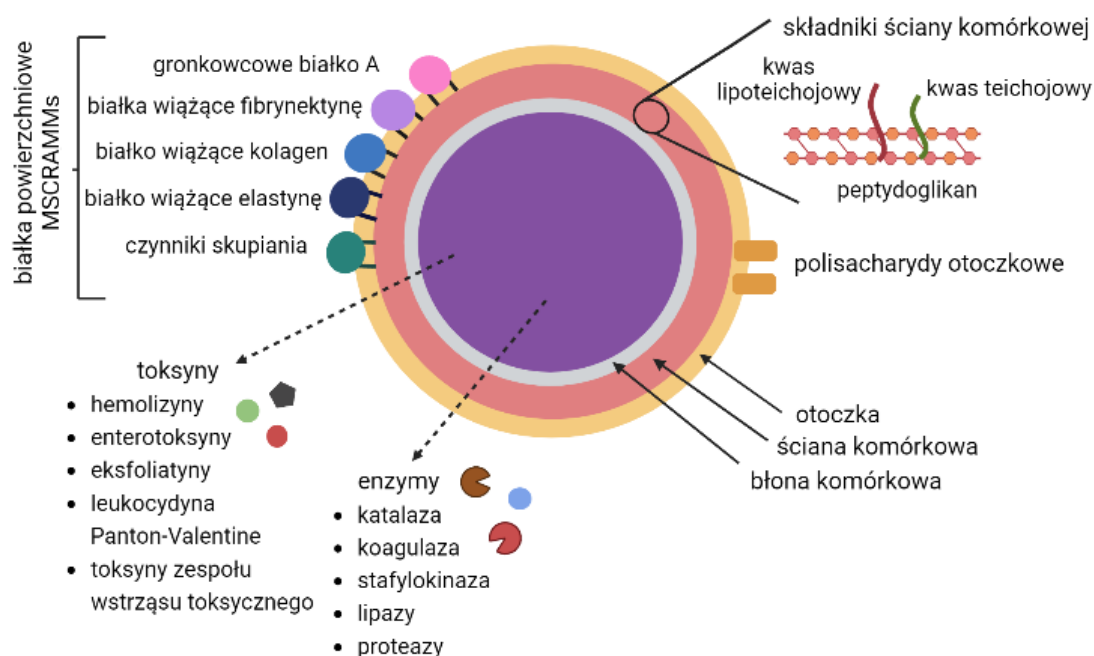
I.1.2. Znaczenie kliniczne

Gronkowiec złocisty może występować w różnych miejscach ludzkiego organizmu jako część naturalnego mikrobiomu, np. na skórze, w okolicy odbytu, lecz przedsionek nosa stanowi jego główny rezerwuuar (Sakr i wsp. 2018). Szacuje się, że około 20-30% populacji ludzkiej jest bezobjawowymi nosicielami *S. aureus*, jednak gdy drobnoustrój przekroczy bariery obronne gospodarza i przedostanie się do głębszych tkanek lub krwioobiegu, może wywoływać poważne infekcje (Verhoeven i wsp. 2014, Chaves-Moreno i wsp. 2016, Cheung i wsp. 2021, Flouchi i wsp. 2021, Raineri i wsp. 2022, Howden i wsp. 2023). *S. aureus* jest najczęstszym patogenem odpowiedzialnym za zakażenia szpitalne i pozaszpitalne u ludzi, które obejmują zarówno infekcje skóry i tkanek miękkich (np. ropnie, czyraki, zakażenia ran, gronkowcowy zespół oparzonej skóry), jak i choroby zagrażające życiu, takie jak bakteriemia, infekcyjne zapalenie wsierdza, sepsa i zespół wstrząsu septycznego. Drobnoustroje te są również wiodącym czynnikiem etiologicznym zakażeń biofilmowych związanych ze stosowaniem biomateriałów, szpitalnych zapaleń płuc oraz zatruc pokarmowych (Tong i wsp. 2015, Turner i wsp. 2019, Cheung i wsp. 2021, Wójcik-Bojek i wsp. 2022). Zdolność *S. aureus* do przeżywania poza organizmem gospodarza, np. na sprzęcie medycznym i powierzchniach szpitalnych pozwala na szybkie rozprzestrzenianie tych bakterii wśród chorych czy personelu szpitala i stanowi ważne źródło i drogę szerzenia się tych zakażeń. Hospitalizowani nosiciele gronkowca złocistego poddawani zabiegom chirurgicznym, dializom, a także pacjenci z ciężkimi chorobami współistniejącymi znajdują się w grupie wysokiego ryzyka rozwoju zagrażających życiu infekcji gronkowcowych (Vanegas i wsp. 2021, Pongbangli i wsp. 2021). Leczenie pacjentów z grup ryzyka zakażonych *S. aureus* często wiąże się z dłuższym pobytem w szpitalu, wyższym kosztem opieki i wyższą śmiertelnością (Tong i wsp. 2015, Bello-Chavolla i wsp. 2018, Lu i wsp. 2021). Wszystkie te czynniki utrudniają walkę z infekcjami gronkowcowymi. Badania wykazały, że w 2019 r. z powodu zakażeń *S. aureus* zmarło 1,1 miliona ludzi na świecie, co stawia te drobnoustroje na pierwszym miejscu pod względem

liczby zgonów z 33. objętych badaniem patogenów (GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022).

I.1.3. Czynniki wirulencji *S. aureus*

Sukces *S. aureus* jako patogenu opiera się na wykorzystaniu wielu czynników wirulencji oraz szybkiej zmianie ich ekspresji w zależności od warunków środowiskowych dzięki obecności dwuskładnikowych systemów sensorycznych (TCS, ang. *two-component systems*) (Jenul i Horswill 2019). Czynniki te pomagają gronkowcom unikać odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza, sprzyjają kolonizacji, uszkodzeniu tkanek i rozprzestrzenianiu się do głębszych narządów (Dayan i wsp. 2016, Pérez i wsp. 2020, Shettigar i wsp. 2020). Część z nich jest bezpośrednio związana z osłonami komórek tych drobnoustrojów, zaś inne wydzielane są na zewnątrz do środowiska otaczającego komórki (Ryc. 1.). W Publikacji 1. [P1], stanowiącej część niniejszej rozprawy, przedstawiono w Tabeli 1. najważniejsze czynniki chorobotwórczości *S. aureus* wraz z ich funkcjami oraz opisano, w jaki sposób dzięki ich zastosowaniu gronkowce złociste interferują z aktywnością układu odpornościowego.



Ryc. 1. Najważniejsze czynniki wirulencji *Staphylococcus aureus*.

(na podstawie Dayan i wsp. 2016, utworzono przy użyciu Biorender.com)

Rozwój infekcji gronkowcowej rozpoczyna проникnięcie patogenu poprzez uszkodzoną skórę lub błony śluzowe do wnętrza organizmu. *S. aureus* skutecznie kolonizuje tkanki gospodarza, wykorzystując do tego celu powierzchniowe czynniki wirulencji umożliwiające proces adhezji, takie jak polisacharydy otoczkowe czy składniki ściany komórkowej, w tym najważniejsze wśród nich białka MSCRAMMs (ang. *microbial surface components recognising adhesive matrix molecules*). Białka MSCRAMMs to powierzchniowe adhezyny zakotwiczone w ścianie komórkowej drobnoustroju, które wiążą się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza (ECM, ang. *extracellular matrix*), do których należą między innymi: kolagen, fibrynogen, fibronektyna, witronektyna, elastyna (Foster i wsp. 2014, Cheung i wsp. 2021). Ponadto białka adhezyjne gronkowców pełnią szereg funkcji związanych z unikaniem odpowiedzi odpornościowej, co zostało opisane w Publikacji P1. W kolejnym etapie zakażenia *S. aureus* zwiększa ekspresję genów kodujących toksyny i enzymy, które zapewniają dalszą inwazję. Wydzielane na zewnątrz enzymy, takie jak proteazy, lipazy, nukleazy powodują degradację otaczającej tkanki i ułatwiają rozprzestrzenianie się patogenu (Dayan i wsp. 2016, Tam i Torres 2019, Raineri i wsp. 2022). Gronkowiec złocisty produkuje także szeroką gamę toksyn, m.in. toksyny cytolityczne, które powodują lizę różnego typu komórek, w tym komórek układu odpornościowego, co zostało szerzej omówione w Publikacji P1.

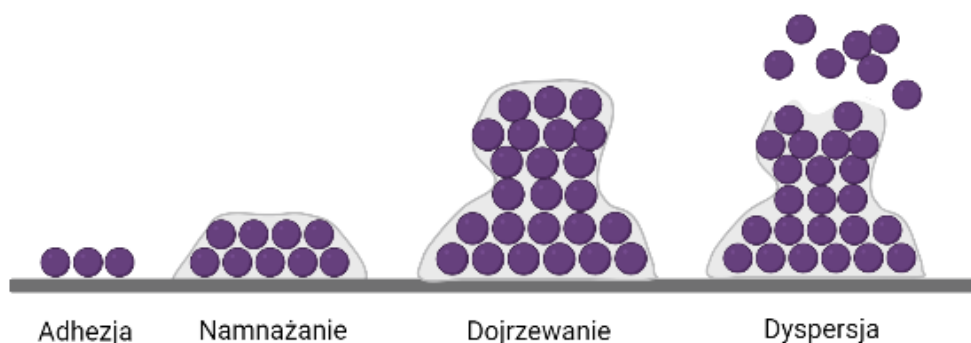
S. aureus może również chronić się w komórkach gospodarza i w ten sposób unikać działania wielu mechanizmów układu odpornościowego (przykładowo litycznej aktywności dopełniacza czy działania przeciwciał). Wewnątrzkomórkowe przeżywanie *S. aureus* uznawane jest za jedną z przyczyn nawrotów infekcji, bo drobnoustroje te są zdolne do inwazji różnych typów komórek, w tym komórek nabłonka i śródbłonka, keratynocytów i osteoblastów, a nawet fagocytów, takich jak neutrofile i monocyty/makrofagi (Hommes i Surewaard 2022, Li i wsp. 2022). Gronkowce złociste mogą przeżywać, a nawet namnażać się w fagosomach komórek fagocytarnych, co zostało opisane w Publikacji P1.

I.1.4. Tworzenie biofilmu

Szacuje się, że ponad 65% zakażeń szpitalnych, 80% zakażeń przewlekłych i 60% wszystkich zakażeń bakteryjnych u ludzi rozwija się z udziałem biofilmu (Jamal i wsp. 2018, Assefa i Amare 2022). Tworzenie biofilmu stanowi bowiem ważny „czynnik” wirulencji, który umożliwia unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza, ochronę przed

niekorzystnymi warunkami środowiskowymi, jak również przed ukierunkowanym działaniem środków przeciwdrobnoustrojowych (Vestby i wsp. 2020). Biofilm definiuje się jako złożoną strukturę mikroorganizmów pokrytą zewnątrzkomórkową substancją polimerową (EPS, ang. *extracellular polymeric substance*), która to struktura przylega do powierzchni biotycznych i abiotycznych lub może występować w postaci wolnej jako agregaty drobnoustrojów pokryte EPS (Costerton i wsp. 1999, Flemming i wsp. 2016).

Biofilmy gronkowcowe charakteryzuje wysoki stopień heterogeniczności komórek, które tworzą odrębne, wyspecjalizowane do pełnienia różnych funkcji subpopulacje. W przebiegu infekcji gronkowcowych, bardzo często dochodzi do utworzenia biofilmu w tkankach gospodarza, w tym w przewlekłych ranach, albo na zastosowanych biomateriałach, np. na implantach czy cewnikach (Otto 2018, Schilcher i Horswill 2020, Pietrocola i wsp. 2022). Jest to złożony proces, jednak można wyróżnić kilka głównych etapów tworzenia się biofilmu osiadłego (Ryc.2.), wspólnych dla większości drobnoustrojów. Na początku komórki planktonowe adherują do powierzchni – najpierw dzięki działaniu m.in. sił van der Waalsa, sił elektrostatycznych i oddziaływań hydrofobowych dochodzi do wstępnej adhezji odwracalnej, a następnie przy udziale adhezyn drobnoustrojów i odpowiednich receptorów na powierzchni zachodzi adhezja nieodwracalna. W kolejnym etapie komórki drobnoustrojów intensywnie proliferują, formując mikrokolonie i produkują EPS, który tworzy macierz biofilmu. W skład macierzy wchodzi głównie: woda, polisacharydy, białka, lipidy/glikolipidy i zewnątrzkomórkowy DNA (eDNA, ang. *extracellular DNA*). Dojrzały biofilm może mieć strukturę warstwy równo pokrywającej powierzchnię, ale częściej to trójwymiarowa struktura z wyniesionymi rozbudowanymi mikrokoloniami bakterii o kształcie przypominającym kolumny lub owocniki grzybów i występującymi między nimi kanałami wypełnionymi wodą. W procesie dyspersji dochodzi zaś do odrywania i uwalniania fragmentów biofilmu lub pojedynczych komórek drobnoustrojów, co w przypadku biofilmów patologicznych prowadzi do rozprzestrzeniania się infekcji (Otto 2018, Rumbaugh i Sauer 2020, Tran i wsp. 2023).



Ryc. 2. Etapy tworzenia się osiadłego biofilmu drobnoustrojów, w tym *S. aureus*.

(utworzono przy użyciu Biorender.com)

Komórki w biofilmie wykazują znacznie wyższą (w literaturze opisuje się od 10-krotnie do 1000-krotnie razy wyższą) oporność/tolerancję na działanie środków przeciwdrobnoustrojowych, środków dezynfekcyjnych, a także mechanizmów obronnych gospodarza w porównaniu do ich form planktonowych (Hoiby i wsp. 2010, Schilcher i Horswill 2020). Wysoka tolerancja biofilmu ma charakter wieloczynnikowy, obejmujący m.in. macierz pełniącą funkcje ochronne, zróżnicowanie metaboliczne komórek wewnątrz biofilmu, aktywność pomp efluksowych (ang. *drug efflux pumps*), występowanie komórek przetrwałych (ang. *persisters*) czy horyzontalny transfer genów między komórkami w biofilmie (Alav i wsp. 2018, Flemming i wsp. 2023, Tran i wsp. 2023). W konsekwencji, zwalczanie biofilmu jest bardzo trudne, może dojść do rozwoju infekcji przewlekłych i/lub nawracających, a dostępne opcje terapeutyczne są często niewystarczające do eradykacji patogenów (Hall i Mah 2017, Schilcher i Horswill 2020).

I.1.5. Antybiotykooporność

Zjawisko lekooporności drobnoustrojów, wywołane m.in. nadmierną konsumpcją antybiotyków jako czynnikiem selekcyjnym, to jedno z największych wyzwań współczesnej opieki zdrowotnej i firm farmaceutycznych. Najtrudniejsze w leczeniu są zakażenia wywoływane przez szczepy wielolekooporne, w tym zaliczane do tzw. grupy ESKAPE (akronim od nazw gatunkowych/rodzajowych drobnoustrojów wchodzących w skład tej grupy). Do grupy tej należą także bakterie z gatunku *S. aureus*, które przez dekady od momentu wprowadzenia antybiotyków do leczenia nabywały oporności. Obecnie znane

są szczepy gronkowców odporne na większość dostępnych antybiotyków (Foster 2017, Mulani i wsp. 2019).

Kiedy w latach 40. XX wieku zaczęto stosować naturalną penicylinę do leczenia zakażeń u ludzi, już kilka lat później odnotowano pierwsze przypadki izolacji szczepów *S. aureus* opornych na ten antybiotyk. Szczepy te wytwarzały enzymy penicylinazy, które hydrolizują pierścień β -laktamowy penicyliny odpowiedzialny za aktywność przeciwbakteryjną. Obecnie praktycznie każdy szczep *S. aureus* produkuje penicylinazy. Dlatego pod koniec lat 50. wprowadzono metycylinę – półsyntetyczną penicylinę, która jest niewrażliwa na działanie penicylinaz. Jednak zaledwie dwa lata po rozpoczęciu jej stosowania, naukowcy zidentyfikowali pierwszy szczep *S. aureus* oporny na metycylinę (MRSA, ang. *methicillin-resistant S. aureus*). Mechanizm tej oporności polega na produkcji zmienionego białka enzymatycznego wiążącego penicyliny – PBP (ang. *penicillin-binding protein*), głównie PBP2 (zmienione białko opisuje się symbolem PBP2a lub PBP2'), które bierze udział w syntezie peptydoglikanu ściany komórkowej gronkowców. Obecność zmienionego białka PBP o zmniejszonym powinowactwie do większości antybiotyków β -laktamowych, pozwala mimo ich obecności przeżywać i rozwijać się tym bakteriom (Turner i wsp. 2019, Guo i wsp. 2020). Wśród szczepów MRSA można wyróżnić szczepy pochodzenia szpitalnego HA-MRSA (ang. *hospital-acquired MRSA*), pozaszpitalnego CA-MRSA (ang. *community-associated MRSA*) oraz zwierzęcego LA-MRSA (ang. *livestock-associated MRSA*), które powstały niezależnie od siebie i różnią się m.in. antybiotykowrażliwością oraz typami wywoływanych zakażeń (Turner i wsp. 2019, Tsouklidis i wsp. 2020). W przypadku zakażeń MRSA stosuje się wankomycynę jako antybiotyk pierwszego rzutu. Niestety w ciągu ostatnich dwóch dekad pojawiły się szczepy kliniczne *S. aureus* o średniej lub całkowitej oporności na wankomycynę: VISA (ang. *vancomycin-intermediate S. aureus*), VRSA (ang. *vancomycin-resistant S. aureus*), co stanowi poważny problem. Za całkowitą oporność na ten antybiotyk odpowiada m.in. gen *vanA*, który koduje ligazę umożliwiającą tworzenie podstawników peptydowych w peptydoglikanie zawierających D-Ala-D-mleczan zamiast D-Ala-D-Ala (układ aminokwasów niezbędny dla działania antybiotyków glikopeptydowych) w trakcie syntezy peptydoglikanu. Gronkowce nabyły klastery genów *van* na drodze horyzontalnego transferu genów prawdopodobnie od wankomycynoopornych szczepów enterokoków. W przypadku szczepów VISA powodem obniżonej wrażliwości na wankomycynę jest akumulacja mutacji, która spowodowała m.in. pogrubienie ściany komórkowej tych drobnoustrojów

(Cong i wsp. 2019). W ciężkich przypadkach zakażeń MRSA w leczeniu stosuje się np. teikoplaninę, linezolid, daptomycynę, tygecyklinę, dalbawancynę czy ceftobiprol (Guo i wsp. 2020). Jednak biorąc pod uwagę szybkość, z jaką *S. aureus* rozwija oporność na antybiotyki, potrzebne są nowe metody zwalczania i prewencji tych zakażeń.

1.1.6. Alternatywne sposoby zwalczania zakażeń gronkowcowych

Rosnąca lekooporność gronkowców, udział biofilmu w przebiegu zakażeń oraz brak skuteczności stosowanej antybiotykoterapii wymuszają konieczność poszukiwania i opracowywania nowych, alternatywnych metod leczenia zakażeń gronkowcowych. Wśród nich można wyróżnić kilka głównych nurtów: (i) wprowadzanie nowych środków przeciwdrobnoustrojowych (m.in. fitozwiązki, chelatory metali, nanocząstki, peptydy przeciwdrobnoustrojowe, biosurfaktanty, enzymy, bakteriofagi, przeciwciała); (ii) modyfikowanie powierzchni sprzętów medycznych oraz implantów w celu zahamowania adhezji *S. aureus*; (iii) zastosowanie istniejących już metod leczniczych w nowym celu (np. ultradźwięki, terapia fotodynamiczna) (Suresh i wsp. 2019). Do najczęściej stosowanych alternatywnych, eksperymentalnych metod zwalczania zakażeń gronkowcowych należą terapia fotodynamiczna i fagoterapia.

Terapia fotodynamiczna stosowana była początkowo głównie w leczeniu zmian nowotworowych, jednak badania wykazały jej skuteczność także przeciwko zakażeniom bakteryjnym, wirusowym oraz grzybiczym (Aroso i wsp. 2021). Fotodynamiczna inaktywacja (PDI, ang. *photodynamic inactivation*), określana również jako fotodynamiczna chemoterapia przeciwdrobnoustrojowa (PACT, ang. *photodynamic antimicrobial chemotherapy*) to metoda niszczenia mikroorganizmów poprzez wywoływanie stresu oksydacyjnego w ich komórkach (Pucelnik i Dąbrowski 2022). Mechanizm jej działania opiera się na wykorzystaniu barwników zwanych fotouczulaczami, które pod wpływem światła widzialnego ulegają ekscytacji, a następnie oddają energię w postaci elektronów dostępnym w otoczeniu akceptorom (np. cząsteczkom tlenu), prowadząc do powstawania związków o charakterze cytotoksycznym, takich jak reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) (Pérez i wsp. 2021). ROS powodują wiele zmian w komórkach drobnoustrojów, m.in. uszkodzenie błon cytoplazmatycznych, co w efekcie prowadzi do wycieku składników komórkowych, zahamowania transportu błonowego oraz działania enzymów. Mogą też bezpośrednio uszkadzać kwasy nukleinowe, np. przez modyfikacje

nukleotydów prowadzące do mutacji, przerywanie łańcucha DNA (Fu i wsp. 2013, Dryden 2018, Aroso i wsp. 2021). Efektywność PDI warunkuje wybór odpowiedniego fotouczulacza – jego struktura oraz zastosowana dawka, jak również odpowiednia dawka światła, tak aby ROS były generowane we właściwym miejscu i czasie z wystarczająco wysoką wydajnością. W przypadku zakażeń gronkowcowych do najczęściej stosowanych związków należą pochodne porfiryne oraz fenotiazynowe barwniki kationowe (błękit toluidynowy O i błękit metylenowy) (Pérez i wsp. 2021, Pucelnik i Dąbrowski 2022). Fotodynamiczna terapia przeciwdrobnoustrojowa może sprawdzić się w leczeniu infekcji miejscowych, np. chorób przyzębia, ran oparzeniowych, owrzodzeniowych i pooperacyjnych (Dai i wsp. 2009, Pantò i wsp. 2020, Vallejo i wsp. 2021). Liczne badania potwierdzają skuteczność PDI w przypadku zakażeń skóry i tkanek miękkich wywoływanych przez *S. aureus* (Branco i wsp. 2018, Braz i wsp. 2020, Akhtar i Khan 2021). Różnorodność generowanych ROS i ich wysoka reaktywność sprawia, że oporność na fotodynamiczną inaktywację jest obserwowana znacznie rzadziej niż w stosunku do antybiotyków. Należy jednak zauważyć, że komórki bakteryjne posiadają enzymy i antyoksydanty, które ograniczają działanie stresu oksydacyjnego, jak na przykład dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza czy glutation. Niemniej, bakterie nie wykształciły jeszcze oporności na działanie tlenu singletowego (Maisch 2015).

Fagoterapia (inaczej terapia fagowa) to metoda zwalczania zakażeń bakteryjnych przy użyciu bakteriofagów, czyli wirusów naturalnie atakujących bakterie. W tym celu wykorzystuje się fagi przechodzące cykl lityczny, w którym po zainfekowaniu i namnożeniu wirusów w komórce bakteryjnej dochodzi do jej lizy. Jedną z głównych zalet tej terapii jest duża swoistość fagów w stosunku do gospodarza czyli określonego gatunku, a czasem nawet szczepu bakterii. Dzięki temu patogenne szczepy bakterii są eliminowane bez naruszania naturalnego mikrobiomu organizmu człowieka. Z drugiej strony wysoka specyficzność ogranicza zastosowanie terapii fagowej w zakażeniach mieszanych czy o nieznanej etiologii. Kolejną istotną właściwością fagów jest to, że ich liczba wzrasta wraz z nasileniem wzrostu bakterii oraz spada w chwili zmniejszania się liczby komórek bakteryjnych. Działanie bakteriofagów ogranicza się więc jedynie do miejsca zakażenia i ulega wygaszeniu po eliminacji drobnoustrojów, co przekłada się na wyższe bezpieczeństwo i tolerancję tej metody przez organizm (Principi i wsp. 2019, Walsh i wsp. 2021). Jednakże bakterie mogą rozwijać mechanizmy oporności na fagi, które powodują zakłócenie cyklu litycznego na różnych etapach, jak na przykład spontaniczne mutacje, systemy restrykcji-modyfikacji czy

adaptacyjny system obrony CRISPR-Cas (Oechslin 2018, Walsh i wsp. 2021). Głównym czynnikiem warunkującym oporność na fagi jest modyfikacja struktury składników powierzchniowych na komórkach bakteryjnych, bowiem stanowią one receptory dla fagów, a tym samym determinują ich specyficzność (Oechslin 2018). Warto jednak podkreślić, że wiele z tych powierzchniowych receptorów pełni również funkcję czynników wirulencji bakterii, więc zmiana ich struktury może wiązać się ze spadkiem zjadliwości patogenów (León i Bastías 2015). Ponadto, zastosowanie koktajli fagowych (dwóch lub więcej fagów podawanych równocześnie) poszerza zakres działania terapii i zmniejsza prawdopodobieństwo rozwoju fagooporności u bakterii (Abedon i wsp. 2021).

W badaniach wykazano, że terapia fagowa jest skuteczna w leczeniu wielu typów zakażeń wywoływanych przez *S. aureus*, w tym przez szczepy MRSA (Fish i wsp. 2018, Morozova i wsp. 2018, Petrovic Fabijan i wsp. 2020, Oduor i wsp. 2020). W bazie NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*) można znaleźć informacje o 69. genomach fagów specyficznych dla gronkowców, w tym 26. i 43. genomach należących odpowiednio do rodzin bakteriofagów *Podoviridae* i *Myoviridae* (Kornienko i wsp. 2020). Pomimo tego, zarówno Europejska Agencja Leków (EMA), jak i Agencja Żywności i Leków (FDA), nie zatwierdziła jeszcze żadnego produktu fagowego do stosowania w terapii u ludzi (Brives i Pourraz 2020). Fagi są najczęściej wykorzystywane w sytuacji, gdy zostaną wyczerpane tradycyjne opcje leczenia, zaś ocena terapeutyczna opiera się głównie na raportach lub analizach poprzednich przypadków klinicznych (Atshan i wsp. 2023, Suh i wsp. 2022). Powodem takiego stanu rzeczy może być fakt, że fagoterapia ma swoje ograniczenia. Oprócz wymienionego wcześniej problemu nabywania oporności na fagi, trzeba również wskazać na: złożone interakcje fagów z układem odpornościowym gospodarza, trudności w doborze fagów, w tym posiadających genomy pozbawione genów oporności na antybiotyki czy genów kodujących czynniki wirulencji bakterii itp., aż w końcu problemy z opracowaniem stabilnych formuł farmaceutycznych preparatów fagowych (Principi i wsp. 2019).

I.2. Ekstrakty roślinne w zwalczaniu zakażeń gronkowcowych

Odkrywanie i opracowywanie nowych klas antybiotyków jest coraz trudniejsze. W świetle kryzysu antybiotykoterapii poszukiwanie niekonwencjonalnych strategii leczenia, w tym alternatyw dla powszechnie stosowanych środków

przeciwdrobnoustrojowych stanowi jeden z wiodących trendów badań. Już w czasach starożytnych wykorzystywano rośliny i zioła do zwalczania i wspomagania leczenia chorób zakaźnych u ludzi, są one bowiem ważnym źródłem substancji leczniczych. Statystyki pokazują, że około 50% farmaceutyków zawiera substancje czynne syntetyzowane z wcześniej zidentyfikowanych/wyzolowanych związków pochodzących z roślin lub zwierząt (Swolana i wsp. 2021). Za właściwości bioaktywne roślin odpowiadają głównie metabolity wtórne – grupa zróżnicowanych biochemicznie substancji wytwarzanych przez komórki roślinne z wykorzystaniem pobocznych szlaków metabolicznych funkcjonujących obok szlaków metabolizmu podstawowego. Choć związki te nie są kluczowe dla wzrostu danej rośliny, to odgrywają ważną rolę w konkurencji międzygatunkowej oraz ochronie przed roślinożercami i drobnoustrojami patogennymi dla roślin (Wu i wsp. 2019, Gorlenko i wsp. 2020). Do metabolitów wtórnych zalicza się m.in. terpenoidy, związki fenolowe (kwasy fenolowe i polifenole), alkaloidy, saponiny, lipidy, kwasy organiczne czy olejki eteryczne stanowiące złożone mieszaniny wielu związków. Metabolity wtórne roślin wykazują różne właściwości prozdrowotne - w literaturze najczęściej opisywane są właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwalergiczne, hepatoprotekcyjne, przeciwzakrzepowe, przeciwnowotworowe i przeciwdrobnoustrojowe (Różalska i wsp. 2018, Suresh i wsp. 2019, Sadowska i wsp. 2019, Gorlenko i wsp. 2020, Sadowska i wsp. 2020, Swolana i wsp. 2021, Wójcik-Bojek i wsp. 2021).

W kontekście leczenia oraz zapobiegania infekcjom, szczególnie istotne są właściwości przeciwdrobnoustrojowe związków pochodzenia roślinnego. Poza bezpośrednią aktywnością biostatyczną/biobójczą, działanie preparatów roślinnych może również polegać na: (i) hamowaniu adhezji i przylegania drobnoustrojów; (ii) hamowaniu agregacji bakterii i tworzenia macierzy biofilmu; (iii) zakłócaniu komunikacji między komórkami mikroorganizmów z wykorzystaniem systemów *quorum-sensing*; (iv) zmniejszeniu produkcji czynników wirulencji; (v) aktywacji układu odpornościowego gospodarza (immunomodulacja) (Wang i wsp. 2018, Lu i wsp. 2019).

Inicjacja infekcji gronkowcowych zależy głównie od właściwości adhezyjnych tych drobnoustrojów. Blokowanie adhezji gronkowców może więc znacząco ograniczyć dalszy rozwój zakażenia, w tym tworzenie biofilmu, stanowiąc tym samym cel działania środków terapeutycznych. Jednym z obiecujących sposobów hamowania adhezji gronkowców jest zablokowanie aktywności sortazy A (SrtA) - enzymu odpowiedzialnego za przyłączanie powierzchniowych białek adhezyjnych *S. aureus* zawierających C-końcowy

pentapeptydowy motyw LPXTG (akronim od składu aminokwasowego tego fragmentu: Leu-Pro-X-Thr-Gly, gdzie X oznacza dowolny aminokwas) do peptydoglikanu ściany komórkowej. Do najważniejszych adhezyn posiadających ten motyw należą białka MSCRAMMs, dlatego SrtA stanowi jeden z pożądanych celów w rozwoju leków oraz szczepionek przeciwgronkowcowych (Wu i wsp. 2019). Ming i wsp. (2017) wykazali, że kemferol, związek należący do flawonoli, zastosowany w stężeniu 64 µg/ml hamował tworzenie biofilmu *S. aureus* ATCC 29213 aż o 80%. Co ciekawe, związek ten nie wpływał na wzrost bakterii planktonowych w badanym zakresie stężeń (64–256 µg/ml). Obserwowany efekt przeciwbiofilmowy według autorów pracy był wynikiem zahamowania adhezji *S. aureus* poprzez obniżenie aktywności SrtA oraz ekspresji genów związanych z adhezją (Ming i wsp. 2017). Na podstawie innych doniesień literaturowych, do związków pochodzenia roślinnego skutecznie blokujących SrtA zaliczyć można także m.in. chalkon (Zhang i wsp. 2017), erianinę (Ouyang i wsp. 2018), izowiteksynę (Mu i wsp. 2018), kwas chlorogenowy (Wang i wsp. 2015) i kurkuminę (Niu i wsp. 2019). Niektóre preparaty roślinne, oprócz właściwości przeciwbiofilmowych, wzmacniały również efekt zastosowanego później antybiotyku. Przykładowo, bogata w kwas elagowy frakcja ekstraktu z korzenia jeżyny *Rubus ulmifolius* była skuteczna w zapobieganiu tworzenia się biofilmu *S. aureus*, niezależnie od badanego szczepu, a także zwiększała wrażliwość drobnoustroju na daptomycynę, klindamycynę i oksacylinę (Quave i wsp. 2012).

Związki pochodzenia roślinnego mogą zaburzać formowanie biofilmu gronkowców także poprzez hamowanie tworzenia się struktur amyloidopodobnych białka Bap, będących rusztowaniem macierzy biofilmu tych bakterii, w tym *S. aureus*. Takie właściwości wykazano w przypadku flawonoidów - kwercetyny, mirycetyny i skutelareiny. Ponadto, kwercetyna i mirycetyna znacznie osłabiały zdolność *S. aureus* do kolonizacji cewników *in vivo* (Matilla-Cuenca i wsp. 2020). We wcześniejszych badaniach naszego Zespołu wykazano zahamowanie adhezji szczepów gronkowca złocistego do powierzchni abiotycznych i pokrytych białkami macierzy zewnątrzkomórkowej oraz ograniczenie tworzenia biofilmu przez te drobnoustroje, stosując frakcje fenolowe i niepolarne ekstraktów z liści, gałązek i owoców rokitnika zwyczajnego (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) oraz ekstrakt z miodunki plamistej (*Pulmonaria officinalis* L.) (Różalska i wsp. 2018, Sadowska i wsp. 2019).

W ostatnich latach podnosi się również znaczenie związków pochodzenia roślinnego w modulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza (Yahfoufi i wsp. 2018, Shakoor

i wsp. 2021). Ekstrakty etanolowe z *Eucalyptus* spp. (testowano 17 gatunków roślin) wykazały działanie przeciwzapalne, hamując produkcję tlenku azotu i TNF- α przez makrofagi RAW 264.7 wystawione na działanie LPS i IFN- γ (Akhtar i wsp. 2016). Zaragozá i wsp. (2020) sprawdzali aktywność immunomodulacyjną wybranych dihydroflawonów, flawonów i flawonoli na komórkach krwi pełnej stymulowanych LPS. Zaobserwowano, że flawonoidy mogą wywierać różne efekty: kwercetyna, naringenina, naringina i diosmetyna znacząco hamowały produkcję TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8, podczas gdy rutyna i diosmina nie (Zaragozá i wsp. 2020). Mendes i wsp. (2019) badali metabolizm ludzkich makrofagów prozapalnych (M1) wyprowadzonych z linii THP-1 w odpowiedzi na wybrane biologicznie aktywne flawonoidy i potwierdzili ich działanie immunomodulujące. Stwierdzono obniżenie aktywności glikolitycznej (wszystkie badane flawonoidy), przeciwzapalne przeprogramowanie cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA) objawiające się m.in. obniżeniem poziomu bursztynianu i wzrostem poziomu cytrynianu (głównie kwercetyna), nasiloną ochronę antyoksydacyjną poprzez zwiększenie poziomu glutationu (GSH) (kwercetyna), osmoregulację (naringina) oraz wpływ na poziom choliny i glicerofosfocholiny, a tym samym możliwą modyfikację błony (naryngenina) (Mendes i wsp. 2019). W poprzednich badaniach naszego Zespołu wykazano, że ekstrakty z rokitnika zwyczajnego (*E. rhamnoides* (L.) A. Nelson) mogą poprawiać fizjologiczną barierę jelitową i skórą poprzez zwiększenie ekspozycji cząsteczek adhezyjnych ICAM-1 na komórkach nabłonka okrężnicy i nasilenie produkcji IL-8 przez fibroblasty skóry (Sadowska i wsp. 2020).

I.3. Charakterystyka ekstraktów z kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.)

Kalina koralowa (*Viburnum opulus* L.), której ekstrakty były przedmiotem badań w prezentowanej pracy doktorskiej, jest gatunkiem krzewu z rodziny piżmaczkowatych (*Adoxaceae*). Kalina występuje powszechnie w Europie, północnej oraz środkowej Azji, a także w północnej Afryce (Kajszczak i wsp. 2020). Roślina ta posiada szereg prozdrowotnych właściwości, wykazując m.in. działanie antyoksydacyjne, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe (Bubulica i wsp. 2012, Kalinkevich i wsp. 2014, Ceylan i wsp. 2018, Barak i wsp. 2019). Z tego powodu jest szeroko stosowana w medycynie naturalnej w przypadku bolesnych i obfitych krwawień menstruacyjnych, skurczów macicy, napięciu mięśniowym, żylakach, kaszlu, przeziębienia,

gorączki, astmy czy chorób reumatoidalnych (Zayachkivska i wsp. 2006, Ersoy i wsp. 2017, Kajszczyk i wsp. 2020). Wykorzystuje się różne części tego krzewu, lecz głównie są to owoce oraz kora (Kajszczyk i wsp. 2020).

Badane w prezentowanej dysertacji acetonowe, etanolowe oraz wodne ekstrakty z owoców i kory kaliny koralowej (*V. opulus* L.) zostały przygotowane oraz przebadane pod kątem ich składu biochemicznego w Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. Stwierdzono, że ekstrakty z owoców zawierały więcej cukru oraz kwasów organicznych niż ekstrakty z kory. Natomiast ekstrakty z kory były bogatsze w związki fenolowe, w tym flawanole i proantocyjanidyny. Analiza ilościowa składu ekstraktów przy użyciu metody UPLC wykazała, że w ekstraktach z owoców dominowały kwasy hydroksycynamonowe (60,37-65,64 mg/g suchej masy), które stanowiły prawie 83% całkowitej zawartości oznaczonych grup związków fenolowych. Z kolei w ekstraktach z kory, flawanole (119,13-132,15 mg/g suchej masy) stanowiły średnio 74% całkowitej zawartości związków fenolowych. Analiza jakościowa ekstraktów z owoców i kory *V. opulus* techniką UPLC-QTOF-MS pokazała, że zawartość związków fenolowych w ekstraktach jest różna - odnotowano 21 i 15 różnych związków fenolowych, odpowiednio, w ekstraktach z owoców i ekstraktach z kory kaliny koralowej. We wszystkich badanych ekstraktach wykazano natomiast obecność kwasu chlorogenowego, dlatego został on wybrany do badań jako związek referencyjny. Szczegółowa charakterystyka składu biochemicznego ekstraktów z kaliny koralowej została przedstawiona w Publikacji P2.

II. Założenia i cele pracy

Niniejsza praca doktorska poświęcona jest problemom związanym z zapobieganiem i leczeniem zakażeń o etiologii gronkowcowej, które stały się podstawą poszukiwania alternatywnych strategii ich prewencji, ograniczania rozwoju oraz eliminacji. Założono, że wśród metod prewencji zakażeń można wyróżnić trzy główne kierunki: (i) rozwój szczepień ochronnych; (ii) działanie bezpośrednie na drobnoustroje i blokowanie ich czynników wirulencji; (iii) immunomodulacja odpowiedzi obronnej gospodarza.

Nadrzędnym celem eksperymentalnej części pracy była weryfikacja możliwości zastosowania naturalnych ekstraktów roślinnych, na przykładzie ekstraktów z kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.), w zapobieganiu zakażeniom wywoływanym przez gronkowce złociste (*Staphylococcus aureus*), w tym ich rozwojowi z zakażeń miejscowych do trudnych w eliminacji i zagrażających życiu zakażeń uogólnionych i biofilmowych.

Biorąc pod uwagę trzy założone kierunki rozwiązań w zakresie prewencji zakażeń oraz wskazany cel nadrzędny, w niniejszej rozprawie postawiono następujące **cele szczegółowe**:

1. Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej w działaniu bezpośrednim przeciwko *S. aureus*.
2. Ocena możliwości zastosowania sortazy A jako celu molekularnego dla preparatów przeciwdrobnoustrojowych i potencjalnego składnika szczepionek przeciwigronkowcowych.
3. Analiza właściwości immunomodulujących ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej przez ocenę wpływu czynników uwalnianych z planktonowych i biofilmowych hodowli *S. aureus* po ekspozycji na ww. ekstrakty na polaryzację makrofagów w subpopulacje M1 lub M2.
4. Analiza właściwości immunomodulujących ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej przez ocenę wpływu czynników uwalnianych z planktonowych i biofilmowych hodowli *S. aureus* po ekspozycji na ww. ekstrakty na wybrane parametry aktywności przeciwwzakażnej komórek fagocytarnych.

III. Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej

Prezentowana rozprawa doktorska ma formę hybrydową – w jej skład wchodzi dwie opublikowane prace naukowe, w tym praca przeglądowa (Publikacja 1 [P1]) stanowiąca uzupełnienie wstępu teoretycznego do rozprawy i praca oryginalna (Publikacja 2 [P2]) oraz wyniki, które nie zostały jeszcze opublikowane opisane w Rozdziale IV dysertacji. Na podstawie tych wyników został przygotowany manuskrypt w języku angielskim do publikacji.

[P1] Wójcik-Bojek U, Różalska B, Sadowska B. *Staphylococcus aureus* – a known opponent against host defense mechanisms and vaccine development – do we still have a chance to win?. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2):948. doi:10.3390/ijms23020948. IF₂₀₂₁=6,208, punkty MEiN₂₀₂₁=140

[P2] Wójcik-Bojek U, Rywaniak J, Bernat P, Podsędek A, Kajszyk D, Sadowska B. An *in vitro* study of the effect of *Viburnum opulus* extracts on key processes in the development of staphylococcal infections. *Molecules.* 2021;26(6):1758. doi:10.3390/molecules26061758. IF₂₀₂₁=4,927, punkty MEiN₂₀₂₁=140

III.1. Publikacja 1 [P1]

Tytuł: *Staphylococcus aureus* – a known opponent against host defense mechanisms and vaccine development – do we still have a chance to win?

Autorzy: Urszula Wójcik-Bojek, Barbara Różalska, Beata Sadowska

Rodzaj pracy: praca przeglądowa

Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences, 2022;23(2):948.
doi:10.3390/ijms23020948.

IF₂₀₂₁: **6,208**; punkty MEiN₂₀₂₁: **140**

Głównym celem niniejszej pracy było przedstawienie pilnej potrzeby wdrożenia swoistej profilaktyki zakażeń z udziałem gronkowców złocistych (*Staphylococcus aureus*), będących istotnymi patogenami w zakażeniach szpitalnych i pozaszpitalnych. Trudności w osiągnięciu tego celu wynikają z posiadania przez *S. aureus* licznych czynników wirulencji ważnych dla przebiegu procesu infekcji oraz niezwyklej zdolności tych bakterii do unikania mechanizmów obronnych gospodarza. Zagadnienia z tego zakresu zostały przedstawione w prezentowanej pracy przeglądowej. W dalszej części pracy skupiono się na szczepionkach przeznaczonych do zwalczania zakażeń wywołanych przez *S. aureus*, które często są odporne na większość dostępnych opcji terapeutycznych. Zaprezentowano historię rozwoju szczepionek przeciwgronkowcowych, podkreślając problemy z opracowaniem składu i efektywności działania kolejnych preparatów. Rozważania te zostały poprzedzone krótkim omówieniem globalnej konieczności intensyfikacji stosowania szczepionek również przeciwko innym patogenom, szczególnie w świetle kryzysu antybiotykoterapii. Na końcu wskazano światowe trendy w badaniach nad nowoczesnymi technologiami z dziedziny mikrobiologii molekularnej wykorzystywanymi do opracowywania nowych szczepionek. Jak dotąd nie udało się stworzyć w pełni skutecznej szczepionki przeciwko *S. aureus*, co uzasadnia konieczność poszukiwania nowych, alternatywnych do antybiotykoterapii metod zapobiegania rozwojowi i leczenia zakażeń gronkowcowych, będących nadrzędnym celem prezentowanej dysertacji.



Review

Staphylococcus aureus—A Known Opponent against Host Defense Mechanisms and Vaccine Development—Do We Still Have a Chance to Win?

Urszula Wójcik-Bojek , Barbara Różalska and Beata Sadowska *

Department of Immunology and Infectious Biology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland; urszula.wojcik@biol.uni.lodz.pl (U.W.-B.); barbara.rozalska@biol.uni.lodz.pl (B.R.)

* Correspondence: beata.sadowska@biol.uni.lodz.pl

Abstract: The main purpose of this review is to present justification for the urgent need to implement specific prophylaxis of invasive *Staphylococcus aureus* infections. We emphasize the difficulties in achieving this goal due to numerous *S. aureus* virulence factors important for the process of infection and the remarkable ability of these bacteria to avoid host defense mechanisms. We precede these considerations with a brief overview of the global necessity to intensify the use of vaccines against other pathogens as well, particularly in light of an impasse in antibiotic therapy. Finally, we point out global trends in research into modern technologies used in the field of molecular microbiology to develop new vaccines. We focus on the vaccines designed to fight the infections caused by *S. aureus*, which are often resistant to the majority of available therapeutic options.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; immune evasion; staphylococcal virulence factors; immune response; vaccines; molecular technologies; alternative therapies; antimicrobial resistance



Citation: Wójcik-Bojek, U.; Różalska, B.; Sadowska, B. *Staphylococcus aureus*—A Known Opponent against Host Defense Mechanisms and Vaccine Development—Do We Still Have a Chance to Win? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 948. <https://doi.org/10.3390/ijms23020948>

Academic Editor: Andreas Burkovski

Received: 17 December 2021

Accepted: 13 January 2022

Published: 16 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Over many decades it has been established that, thanks to vaccines, efficient hygiene procedures and antibiotics, successful treatment and limitation of infectious diseases spread can be easily achieved. Indeed, the discovery and use of antibiotics, considered one of the greatest advances in medicine, was, in the beginning, a very promising direction. Unfortunately, their widespread and not always proper use in medicine, veterinary medicine and agriculture contributes to a growing phenomenon of antimicrobial resistance (AMR), mostly as a consequence of selection pressure, including the development of multiple drug resistance (MDR). As a result, treatment options for the most severe infections have gradually decreased over the years. The progress of microbial drug resistance was and is faster than the introduction of new drugs. Considering the above, it is strongly justified return greater attention once again to the improvement of specific (immune) prophylaxis, i.e., protective vaccinations introduced into medicine much earlier than antibiotic therapy. It is worth emphasizing that the efficacy of a vaccination is independent of the drug resistance profile of pathogens. Therefore, vaccines are a valuable weapon against microorganisms possessing an AMR/MDR phenotype. Moreover, the benefits of vaccination are much broader and include: (i) lowering the use of antimicrobial compounds, (ii) limiting the selection of resistant serotypes and (iii) reducing the infection rate of resistant strains in closely related species [1].

Ten years ago, the World Health Assembly endorsed the Global Vaccine Action Plan (GVAP) for 2011–2020. According to it, the indicated decade was expected to reduce the number of global deaths due to infectious diseases by ten times (25 million people). However, the analysis by the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization (SAGE) of the World Health Organization (WHO) showed this goal was not met. It also suggested

that due to a large backlog in this area, uneven contributions from individual countries and small financial outlays, it would not be possible to reach it in the near future. In addition, the COVID-19 pandemic situation has contributed significantly to the slowing down of the ability to achieve the GVAP targets. According to the experts, in order to extend the beneficial impact of vaccines and vaccination on global health, new vaccines for other diseases, as well as improved supply and delivery mechanisms, need to be developed [2].

Based on the information provided by the WHO, the list of infectious diseases/etiological agents targeted for vaccination and globally available comprises 16 items with the prevalence of viruses. Novel cell targets pending the urgent modification of the composition of current antibacterial vaccines or the development of an entirely new framework and formulations are needed. The list of vaccines that may be much more effective after improvement includes those against the following bacterial species: *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* [3–6]. In addition to the vaccines already on this WHO list, there are important targets (viruses and bacteria) for new vaccines that are currently of little social, scientific, financial and manufacturing interest. Furthermore, the inventory of new “neglected” species of bacteria or those for which no vaccine has been developed, despite attempts, is also long and includes: Group A, B *Streptococcus* (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*), invasive non-typhoid *Salmonella* (iNTS), *Shigella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. and *Staphylococcus aureus*. Although many different vaccine formulations have been proposed to prevent infections caused by some of the AMR pathogens (e.g., *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridioides difficile*), no successful phase III clinical trial data have been published yet. The multiple virulence mechanisms that a vaccine should target are among the numerous other possible reasons for the failure to develop vaccines against these pathogens [1,2,7,8].

In this review, the authors intend to provide the rationale for accelerating the research, pre-clinical and clinical trials needed to introduce a vaccine against *S. aureus* into immunotherapy. We highlight important reasons for this call to action, as well as the challenges. The background for these considerations is a description of the effective “abilities” of *S. aureus* to bypass/overcome/avoid the defense forces of the host, acting at particular stages of local or systemic infection. A presentation of the “history” of the proposed vaccines with the “pros and cons” arguments for selecting the individual *S. aureus* virulence factors as their components is also included. Finally, we discuss the trends in immune prophylaxis against *S. aureus* as well as several alternative strategies for combating this and other “difficult” bacteria.

2. *S. aureus* Infections as a Challenge to Vaccinology: Why Is It Important?

Staphylococcus aureus is a Gram-positive pathogenic bacterium that may be found on the skin and mucous membranes of humans and several animal species. *S. aureus* colonizes the nares or nasopharynx of about 30% of a population in an asymptomatic manner and becomes pathogenic after breaching epithelial barriers, making colonization an important risk factor [9–12]. These bacteria are the most common human pathogens, causing a wide variety of nosocomial and community-acquired infections. Typical staphylococcal infections range from minor skin and soft tissue infections, such as abscesses, furuncles and impetigo, to life threatening diseases, such as bacteremia, sepsis and toxic shock syndrome. In addition, *S. aureus* is a leading causative agent in surgical site infections, biomaterial-associated infections (e.g., catheters, artificial heart valves, bone and joint prostheses), cardiovascular infections, respiratory tract infections and food poisoning [13–16]. Epidemiological data show that *S. aureus* bacteremia leads to approximately 20,000 deaths a year in the USA, which accounts for more deaths than those from AIDS, tuberculosis and viral hepatitis combined together [17,18]. Furthermore, patients with risk factors (e.g., diabetics, immunocompromised, transplant recipients, oncological patients) are prone to developing severe staphylococcal infections and may require more frequent hospitalization [15,19–21]. In healthcare settings, *S. aureus* spreads rapidly, not only due to transmission from patients or medical staff, but also due to the ability of these microorganisms to survive on medical

equipment and various hospital surfaces. The contamination of indwelling devices and implants represents a frequent route of infection because *S. aureus* easily adheres to abiotic surfaces, as well as to the matrix molecules that coat the devices after insertion. Staphylococci can also be transferred from the skin/mucous membranes of patient or healthcare personnel during surgery or other treatment and care procedures [21–23].

Treatment of staphylococcal infections is particularly problematic due to the constantly increasing acquisition of resistance genes and selection of antibiotic resistant *S. aureus* strains. Both community- and hospital-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (CA-MRSA, HA-MRSA), representing multidrug-resistant strains (MDR), spread very quickly [16,24,25]. MRSA infections are associated with higher mortality and longer hospital stays than the infections caused by other pathogens, including methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) [26–28]. Vancomycin was a last resort antibiotic for many years in such cases, but clinical isolates of vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) have emerged and become a major public health concern [16,29]. Resistance to traditional beta-lactams and other available antibiotics limits the therapeutic options for treating these infections. The antibiotics currently approved for use in severe cases include glycopeptides, such as teicoplanin or dalbavancin, linezolid, tedizolid, daptomycin, tigecycline and cephalosporins of the fifth generation (ceftaroline, ceftobiprol) [16]. Finally, during the infection process, the staphylococci frequently form biofilms on both the inserted/implanted biomaterials and host tissues, which once established are difficult to eradicate and tend to recur.

A biofilm is a complex microbial community embedded in a self-made extracellular polymeric substance (EPS) that can be free-floating or attached to biotic or abiotic surfaces [30–32]. Bacteria in a biofilm exhibit different metabolism, gene transcription and protein production than during planktonic growth, which means completely new properties [33–35]. From the clinical point of view, one of the most important features is the higher tolerance of biofilms to environmental factors, which results in a weakened effect of antimicrobial drugs and impaired function of the host defense mechanisms [21,36,37]. The multifactorial tolerance/resistance of biofilms contributes to huge difficulties in combating biofilm-associated infections (BAI). Despite numerous studies regarding the new treatment methods of BAI, surgical excision of the infected tissue or removal of a colonized device is still the only viable solution in some cases [22].

S. aureus Immune Evasion Strategies

The success of *S. aureus* as a pathogen depends on its ability to produce multiple virulence factors simultaneously and to regulate their expression quickly in response to environmental changes. As shown in Table 1, these factors allow staphylococci adhesion to the cell membranes or extracellular matrix proteins/glycoproteins as well as invasion of the host tissues. Then, they make them capable of avoiding immune response, which consequently leads to the spread of infection and serious damage throughout the body [38]. Selected mechanisms of this pathogen that interfere with the innate and adaptive immune system are discussed below.

One of the first barriers of a host's innate immunity that *S. aureus* encounters during infection is the complement system—a proteolytic cascade of plasma proteins that can opsonize *S. aureus* cells, which promote their phagocytosis and killing by neutrophils (PMN—polymorphonuclear cells) and macrophages (M). Complement proteins may also lyse microbial cells directly by the activation and formation of a membrane attack complex (MAC) on the surface of the pathogen cell membrane [39,40]. The complement system can be activated through three activation routes (classical, lectin and alternative), and all of them result in the deposition of C3b on the staphylococcal surface. The C3a formed at the same time is an anaphylatoxin with a range of functions in inflammatory response, including macrophage and T cell activation as well as chemotaxis.

Table 1. The most important virulence factors of *S. aureus* and their targets during infection [38,41,42].

Type of Virulence Factor	Name	Target	Effect
Cell wall-associated factors	Cell wall components—peptidoglycan, teichoic acid, lipoteichoic acid	Immune cells, other tissues	Stimulate immune cell activation and inflammatory response; participate in adhesion and biofilm formation
	Staphylococcal protein A (SpA)	IgG, IgM, complement	Binds Fc region of IgG and IgM, thus inhibiting opsonization and phagocytosis; activates B cells
	Fibronectin-binding proteins (FnBPA, FnBPB)	Fibronectin, fibrinogen, elastin, plasminogen, keratin, complement	Binding to extracellular matrix proteins (ECM), enable adhesion to host tissues and biomaterials; limit phagocytosis and complement activation
	Collagen-binding protein (Cna)	Cartilage and collagen-rich tissues, complement	Binding cartilage and collagen, enables adhesion to host tissues; inhibits complement activation
	Clumping factors (ClfA, ClfB)	Fibrinogen, blood platelets, complement (ClfA), cytokeratin 10 (ClfB)	Binding to fibrinogen, enables adhesion to host tissues; inhibit complement preventing opsonization and phagocytosis; activate platelets
	Serine-aspartate repeat protein E (SdrE)	Complement	Inhibits complement preventing opsonization and phagocytosis
	Iron-regulated surface determinant proteins (IsdA, IsdB)	Heme-iron	Heme uptake and iron acquisition contribute to increased pathogenesis, tissue invasion and abscess formation
	Polysaccharide intercellular adhesion/polymeric N-acetyl-glucosamine (PIA/PNAG)	Staphylococcal cells, mucous membranes, other tissues, abiotic surfaces	Participates in bacterial aggregation, adhesion and biofilm formation (major component of biofilm matrix); reduces phagocytosis
Enzymes	Capsular polysaccharides	Mucous membranes, other tissues, abiotic surfaces	Reduce phagocytosis; increase the efficiency of colonization and durability on the surface of mucous membranes or biomaterials
	Catalase	Hydrogen peroxide	Catalyzes breakdown of hydrogen peroxide into water and oxygen, preventing oxidative stress
	Coagulase	Prothrombin	Reacts with prothrombin, allowing fibrinogen polymerization and clot formation, thus reducing phagocytosis
	Staphylokinase (SAK)	Plasminogen	Converts plasminogen to active serine protease plasmin, which promotes degradation of ECM, complement and IgG
	Lipases	Lipids of cell membranes and components of sebum	Decompose lipids, which allows spreading of staphylococci
	Nucleases	Nucleic acids	Degrade nucleic acids, thereby releasing them from extracellular traps (ETs)
	Proteases, e.g., serine protease V8 (SspA), staphopain A (ScpA) and B (SspB), aureolysin (Aur)	ECM proteins, complement, mucins, pulmonary surfactant	Degrade ECM proteins, mucins and pulmonary surfactant, which allow staphylococcal spread in the host tissues; inhibit chemotaxis and phagocytosis by proteolysis of immune cell receptors; degrade complement preventing opsonization and lysis of bacteria; degrade antimicrobial peptides
	Superoxide dismutases	Superoxide	Convert superoxide to hydrogen peroxide and oxygen, thereby preventing oxidative stress

Table 1. Cont.

Type of Virulence Factor	Name	Target	Effect
Toxins	Hemolysins (alpha, beta, gamma, delta)	Erythrocytes, platelets, leukocytes	Cause lysis of red blood cells, platelets, leukocytes—evading of host immune response; bacterial spreading
	Enterotoxins	Enterocytes, lymphocytes T	Cause diarrhea; after translocation into blood, activate lymphocytes T leading to cytokine storm
	Exfoliative toxins	Desmosomes between keratinocytes	Cleave the granular layer of the epidermis by damaging desmosomes (staphylococcal scalded skin syndrome)
	Panton—Valentine leukocidin (PVL)	Neutrophils, monocytes, macrophages	Causes lysis of neutrophils, monocytes, macrophages—avoiding innate immune response; development of necrotic changes
	Toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1)	Lymphocytes T	Activates lymphocytes T, which causes massive production of cytokines and leads to toxic shock syndrome
Other secreted proteins	Chemotaxis inhibitory protein of <i>Staphylococcus</i> (CHIPS)	Neutrophils	Binds to cell receptors (FPR1 and C5aR) inhibiting neutrophils chemotaxis, thereby preventing phagocytosis
	Staphylococcal complement inhibitor (SCIN)	Complement (C4, C3b)	Inhibits complement activation, thus preventing bacterial lysis, opsonization and phagocytosis
	SSL-5	Neutrophils, platelets	Binds to cell receptors (PSGL-1 and GPCRs) inhibiting neutrophil diapedesis and activation; activates platelets (aggregate formation)
	SSL-7	IgA, complement (C5)	Binds Fc region of IgA and complement protein C5, thus blocking antibodies and inhibiting complement activation
	Extracellular fibrinogen-binding protein (Efb)	Fibrinogen, blood platelets, complement	Binds fibrinogen enabling adhesion and aggregation: interferes with platelet aggregation; inhibits complement activation
	Extracellular adherence protein (Eap)	ICAM-1	Binds ICAM-1 inhibiting neutrophil rolling and migration (diapedesis)

S. aureus produces multiple proteins that interfere with complement activation [39,43,44]. The most versatile one, SCIN, blocks all three pathways by inhibiting C3 convertases and thereby decreasing C3b deposition, C5 convertase formation and the release of chemoattractant C5a [43,45]. Another important factor, Efb, binds both C3 and fibrinogen, thus covering bacteria with a thick layer of fibrinogen that shields the C3b and antibodies from recognition by phagocytic receptors [46]. Several cell wall-associated proteins also inhibit complement activation—Cna binds to C1q and, therefore, inhibits the classical pathway [47], while SdrE recruits factor H to the surface of staphylococci, leading to inhibition of the alternative pathway [48]. In addition, *S. aureus* secretes proteases that degrade the complement proteins, including Aur and Scp A [49,50]. Together, these evasion mechanisms lead to a reduction in the complement-aided phagocytosis of bacteria and inhibition of MAC formation.

Phagocytes are the most important components of innate immunity that migrate to the site of infection and represent another line of host defense against pathogens. Neutrophils are abundantly present in blood, while macrophages reside in tissues or derive from circulating monocytes, but both play a key role in recognizing, engulfing and killing staphylococci [40,51–53]. Most clinical strains of *S. aureus* produce a polysaccharide capsule that protects cell wall proteins from being recognized by the phagocyte receptors [39,54,55]. Coagulase and ClfA also play an important role in avoiding phagocytosis—coagulase activates prothrombin to polymerize fibrinogen (Fg), whereas ClfA allows staphylococci to bind Fg. Both these events lead to fibrin-/fibrinogen-bacteria clump formation [56–58]. The

formation of a fibrin network or fibrinogen clumps protects the bacteria from neutrophil clearance [40]. However, if the phagocytes manage to ingest *S. aureus* cells, the real attack begins inside the phagosome, where the bacteria are subjected to high levels of reactive oxygen species (ROS), enzymes and antimicrobial peptides (AMPs) [52]. *S. aureus* uses multiple strategies to interfere with both oxygen-dependent and -independent bactericidal mechanisms. One of them is staphyloxanthin—a carotenoid pigment that scavenges free radicals and gave *S. aureus* its name [59,60]. Additionally, this pathogen produces several enzymes that prevent ROS formation, such as superoxide dismutase (SOD), which converts superoxide radicals into hydrogen peroxide, and catalase, which further degrades it into water and oxygen [60–62]. Staphylococci reduce the negative charge of their membranes and cell walls through the incorporation of D-alanine into teichoic acid and L-lysine into membrane phosphatidylglycerol, in order to protect themselves against positively charged antimicrobial peptides (AMPs) [63]. They also secrete factors that degrade cathelicidin LL-37 (Aur) and α -defensin (SAK), as well as inhibit neutrophil serine proteases (Eap) [38,40,63]. Moreover, *S. aureus* can persist, and even replicate in mature phagolysosome, due to adaptation to an acidic microenvironment. The influence of stress factors on staphylococci results in the formation of slow-growing subpopulations of bacteria—small colony variants (SCVs), characterized by a high resistance to antibiotics and the host defense mechanisms. It has also been suggested that during continuous contact with staphylococci, the infected macrophages eventually lose their ability to kill this pathogen, so *S. aureus* can multiply and then trigger cell death to disseminate throughout the body [64–66]. Finally, neutrophils and macrophages form extracellular traps (ETs), which often lead to their own death (ETosis). These traps consist of DNA, histones, AMPs, and enzymes and serve to stop spreading the pathogens and kill them, but *S. aureus* can easily escape from ETs using the nucleases and proteases [67].

S. aureus secretes numerous toxins that kill immune cells by disrupting the cell membrane (necrosis) or by inducing programmed cell death (apoptosis/autophagy/pyroptosis) to protect itself against phagocytosis, establish infection and disseminate in the host [68]. The most important pore-forming toxins include α -hemolysin (Hla), Panton–Valentine leukocidin (PVL) and phenol-soluble modulins (PSMs). Hla is a major toxin of *S. aureus* in terms of contribution to the pathogenesis that is manifested in the diversity of its functions. Some of these include the disruption of epithelial and endothelial barriers, induction of inflammatory response and lysis or apoptosis of immunocompetent cells [58,68–70]. Alpha toxin lyses a wide range of human cell types (e.g., erythrocytes, platelets and leukocytes, including T cells), while PVL targets mainly neutrophils, monocytes and macrophages. Although PVL is produced by only 2–3% of *S. aureus* isolates, it is found in most community-acquired MRSA strains, especially those responsible for pneumonia [68,71,72]. Another class of toxins are PSMs, or amphipathic peptides with considerable cytolytic activity against many types of eukaryotic cells, e.g., bone cells, endothelial and epithelial cells, monocytes, erythrocytes and mostly against neutrophils [68,73]. Their function is inhibited by serum lipoproteins; thus, they reach a high concentration inside the condensed phagosomes [74]. PSMs are associated with enhanced virulence in CA-MRSA skin infections [75].

S. aureus is successful in avoiding not only the innate immune system but also in interfering with the development of an antigen-specific response. For this purpose, it uses, for instance, surface-bound protein SpA that can bind the immunoglobulins, TNF α receptor 1, von Willebrand factor and C1qR component of the complement. SpA is expressed by most clinical isolates [76–78]. This protein consists of five immunoglobulin-binding domains capable of binding both the Fc regions of IgG and IgM, thus blocking opsonophagocytosis and complement activation, as well as the Fab domain of some immunoglobulins, including variable heavy 3 (VH3) of the B cell receptors, which leads to the activation and clonal expansion of B cells [77,79]. As a result, the B cells recognize, almost exclusively, protein A and the host response against other staphylococcal virulence factors is then limited [78]. Moreover, *S. aureus* also manipulates the T cell response by staphylococcal superantigens (e.g., TSST-1, enterotoxins) that non-specifically activate T cells by cross-linking the major

histocompatibility complex of class II and the T cell receptor (TCR). This causes a massive activation of T cells and the release of proinflammatory cytokines (cytokine storm), leading to life-threatening toxic shock syndrome and multi-organ dysfunction [80–82].

In summary, *S. aureus* has evolved multiple strategies to avoid the host immune system response, which contributes to difficulties in both treating staphylococcal infections and developing preventive options such as vaccine or immune therapy. However, attempts are constantly being made to win this fight.

3. Past and Present in Active and Passive Immunotherapy of Staphylococcal Infections

S. aureus is one of the best-known bacteria in terms of virulence factors and their participation in pathogenesis. A wide repertoire of staphylococcal adhesive molecules, toxins and enzymes seems to be an excellent starting point to choose proper antigens for vaccine development. Conversely, such diversity allows these bacteria to avoid the activity of specific antibodies by replacing one virulence factor with another during a regular life cycle or by using toxins and enzymes to dampen the immune response. For example, many staphylococcal adhesive molecules from MSCRAMMs are capable of interacting with the same host extracellular matrix proteins (ECM), which is why blocking just one of them does not limit *S. aureus* adhesion and biofilm formation [38,83]. Moreover, as described in Section 2, *S. aureus* cytotoxins, such as hemolysins, leukocidins and PSMs, effectively damage immune cells, including neutrophils, monocytes, macrophages, dendritic cells (DC) and lymphocytes. Given the adaptive immune response, the elimination of B lymphocytes through the formation of pores in cell membranes or through the activation of programmed cell death seems to be of particular importance [38,51,84]. It is also worth mentioning yet again the ability of *S. aureus* surface protein A (SpA) to bind the Fc domains of IgG and IgM, which blocks their interaction with the immune cells and the activation of the complement [77,79]. Furthermore, α -toxin and other staphylococcal immunogenic antigens secreted into host tissues very often interact with specific B lymphocytes and antibodies away from the site of *S. aureus*, causing cell inactivation without co-stimulating a signal from the T lymphocytes [84]. Taking all this into account, the creation of an effective anti-staphylococcal vaccine is quite difficult, similar to the usage of specific antibodies in passive immunotherapy.

The first vaccine programs targeting single *S. aureus* virulence factors ended in failure. The vaccine containing iron surface determinant B (IsdB), necessary for iron acquisition, did not pass the safety tests. In the phase IIb/III clinical trials the V710 vaccine increased the mortality of immunized humans because of *S. aureus* infections. Nishitani et al. [85] proved with a mouse model that the antibodies specific to IsdB facilitated bacterial entry into the leukocytes, and their dissemination was the cause of increased host susceptibility to sepsis following an *S. aureus* local infection. Thus, anti-IsdB antibodies may be, at least in part, the cause of the V710 vaccine failure [85]. The StaphVax vaccine, comprising two predominant staphylococcal capsular polysaccharide (CP) serotypes (CP5 and CP8) conjugated to the recombinant *Pseudomonas aeruginosa* exoprotein A, was one of the first bivalent preparations developed; it achieved phase III efficacy studies and failed [7,86]. The formula: capsular polysaccharide with an immunogenic protein carrier that has been successfully used in the vaccines against such pathogens as *Neisseria meningitidis* (CP conjugated to the nontoxic recombinant variant of tetanus toxin) or *Streptococcus pneumoniae* (CP conjugated to the nontoxic recombinant variant of diphtheria toxin—CRM₁₉₇ or surface lipoprotein D of *Haemophilus influenzae*). This was found to be safe but ineffective in the case of staphylococci [86–88]. Therefore, multivalent anti-staphylococcal vaccines containing a few different antigens targeting multiple virulence mechanisms started to be developed. The CP5 and CP8 (each conjugated to CRM₁₉₇), a recombinant clumping factor A (rClfA) and, additionally, a recombinant lipoprotein rP305A obtained from a manganese transporter C (MntC) were used as the target antigens in the 3-antigen (SA3Ag) and 4-antigen *S. aureus* vaccine (SA4Ag), respectively [86,89–91]. The use of all these antigens is fully justified, not only because of their immunogenicity. As stated in the previous

section, CP allows the bacteria to avoid opsonophagocytosis and elimination by the host innate immune system. ClfA, as one of the most potent adhesive molecules, participates in microbial adhesion, biofilm formation and interaction with the host cells/tissues, as well as renders the bacteria coated with ECM, invisible to the immune system. MntC is a surface molecule responsible for the acquisition of manganese as a cofactor of many enzymes essential for bacterial metabolism, signal transduction, cell division and the host immune evasion [86,92]. Moreover, all of these antigens are over-produced mainly at the beginning of an infection to stabilize colonization, multiplication, possible subsequent biofilm formation and, finally, dissemination [86]. Phase I and II clinical trials in healthy adults demonstrated that the SA3Ag and SA4Ag offered acceptable safety and tolerability. Both vaccines also induced a rapid and robust immune response leading to a generation of functional specific antibodies against all antigens used, observed even through 36 months post-vaccination [89–91]. Because *S. aureus* surgical site infections (SSIs) followed by systemic infections (bacteremia and sepsis) are the most common and life-threatening complications of orthopedic surgeries, a search for their prevention seems particularly important. Thereby, phase IIb/III clinical trials testing the safety and efficacy of the SA4Ag in adults undergoing elective open posterior multilevel instrumented spinal fusion surgery (STRIVE study—*STaphylococcus aureus* surgical Inpatient Vaccine Efficacy) were conducted. The patients who were vaccinated prior to surgery and monitored afterwards demonstrated both the safety and efficacy of the SA4Ag. Thus, similar benefits of vaccination (the prevention of postoperative *S. aureus* infections) for the patients requiring other orthopedic surgeries were suggested [86]. In 2019, the SA4Ag was described as the most advanced anti-staphylococcal vaccine; however, the studies are still in progress.

The main goal is to stop *S. aureus* infection as early as possible, to disallow the formation of a resistant to immune intervention biofilm and/or to prevent later complications, such as cytokine storm and toxic shock syndrome. The current paradigm for vaccine development is targeting multiple staphylococcal virulence factors, considering both the surface antigens and secreted biologically active substances. Thus *S. aureus* adhesins and other surface proteins will generate opsonic antibodies, while non-toxic forms of toxins and superantigens will stimulate the production of neutralizing antibodies and activate effector immune cells [93,94]. An example of such a complex preparation is the *S. aureus* toxoid vaccine, containing modified bi-component pore-forming toxins: mutants of the S and F subunits of PVL (LukS_{mut9} and LukF_{mut1}) and a double mutant of alpha hemolysin (Hla_{H35L/H48L}), as well as the fusion toxoid TBA₂₂₅ of superantigens (SEA, SEB and TSST-1). The toxoid vaccine was tested in the non-human primate model (rhesus macaques) and described as safe, well tolerated and immunogenic. The post-vaccination titers of the specific IgG with neutralizing activity were many times higher than the baseline values (from 5 to 190 times depending on the antigen). Moreover, the population of antigen-specific T cells of the Th1 and Th17 phenotype, as well as the production of some T cell cytokines (e.g., TNF, IFN- γ , IL-2, IL-17A), increased in response to ex vivo re-stimulation of peripheral blood mononuclear cells with the vaccine. It is suggested that such a T cell response may, via feedback, activate the innate immune cells that enhance phagocytosis and bacteria elimination [94].

The B cell-mediated immune response to *S. aureus* infection triggers the production of specific antibodies against many staphylococcal antigens, including cell wall components, such as peptidoglycan and lipoteichoic acid, capsular polysaccharides, pore forming toxins or superantigens [93]. Thus, on the one hand, the idea of using passive immunization as a form of antistaphylococcal therapy seems quite reasonable. On the other hand, the question is why do recurrent *S. aureus* infections happen despite the production of specific anti-staphylococcal antibodies? Regardless, many clinical trials on passive immunization with monoclonal or polyclonal antibodies against *S. aureus* antigens (e.g., ClfA, CP5 and CP8, PNAG, Hla, HlgAB) were carried out [95]. Rupp et al. [96] presented the results of a phase II randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of polyclonal anti-*S. aureus* CP5/CP8 antibodies (Altastaph) in patients with staphylococcal bacteremia.

A shortened median time of fever, as well as hospitalization, for Altastaph recipients, in comparison to the patients from the placebo group, was demonstrated. However, mortality was similar or even greater in the tested group than in control [96]. The monoclonal antibodies against LTA (Pagibaximab) or PNAG also failed in phase III or phase IIa trials, respectively [95]. Thus, passive immunization with opsonic antibodies targeting *S. aureus* cell wall components or envelope polymers cannot be recognized as a strategy solving the problem of staphylococcal infection treatment. Similarly, as with vaccines, the current trend in passive immunization focuses on the antibodies against secretory biologically active staphylococcal products, including pore-forming toxins. For example, human monoclonal anti-*S. aureus* alpha toxin antibodies, known as MEDI4893, undergo clinical trials aimed at the prevention of *S. aureus* pneumonia [95,97]. This strategy will be discussed in Section 4.

As specific antibodies seem not to be fully sufficient for human protection against *S. aureus* infections, greater attention has recently shifted to immunotherapy promoting innate immune response. The modulation of selected cytokine production and the phenotypic reprogramming of innate immune cells to develop innate immune memory as a key element of anti-infective protection are seriously considered [98–101]. Among cytokines, IL-17 seems to be critically important for the host immune response against many types of pathogens, including *S. aureus*. It activates CXC chemokine production (e.g., CXCL8, CXCL1, CXCL2) and, consequently, the recruitment of neutrophils to the site of infection and microorganism elimination [101,102]. Moreover, IL-17A promotes the expression of host defense peptides in the skin (in vivo studies on murine model), which are an important part of innate anti-staphylococcal response [102]. IL-17 is produced by Th17, and also by innate immune cells, such as $\gamma\delta$ T cells, known to be recruited to wounds infected by *S. aureus*, and, thus, a primary source of this interleukin. Further, invariant natural killer T cells (iNKTs) and lymphoid tissue inducer (LTi)-like cells are capable of producing IL-17 [101–103]. Therefore, IL-17 and IL-17-producing cells are proposed to be the targets for novel antistaphylococcal immunotherapeutic strategies.

In the context of the importance of innate immune response and memory, the effect of prior contact of mice with *S. aureus* (priming) on the course of staphylococcal skin infection was studied [98,99,103]. Much smaller skin abscesses with a lower number of staphylococci were formed in the primed mice than in the naive ones. It was accompanied by a significantly increased infiltration of innate immune cells, such as PMN, M (mainly polarized to M1), DC and natural killer cells (NK) into the infection sites of the primed mice. Priming also induced greater production of some cytokines (IL-17, IL-6, IL-22, IFN- γ , MIG—monokine induced by IFN- γ) and antimicrobial peptides (CRAMP and m β D-3) [98,99]. In a mouse model of *S. aureus* skin reinfection, Dillen et al. [103] showed that primary contact with *S. aureus* promoted cloning of $\gamma\delta$ T cells, producing TNF and IFN- γ , which boosted the host defense against subsequent staphylococcal infection. These observations clearly indicate that the contact with *S. aureus* triggers the development of some innate memory. Therefore, our understanding of the mechanisms of innate immune response stimulation and, in the future, their modulation to develop the “trained immunity” hold great promise for the prevention and treatment of *S. aureus* infections.

4. The Prospects of Immune Prophylaxis Trends against *S. aureus*

As discussed in detail above, achieving the GVAP goals mentioned in Section 1 will not be easy in the near future, at least for some infections. Despite huge progress in research on the bacterial species with multiple virulence and immune evasion factors, it is still difficult to find satisfactory tools for ensuring victory. During the development of the vaccines tested thus far, many classic methods and several new technological solutions have been used, and the expected results have yet to be achieved. Although some potential anti-*S. aureus* vaccines showed protective efficacy in preclinical or early clinical trials, none have been approved for use in humans to date [7,104]. Most researchers reasonably believe that we still need to learn more about new technologies in vaccine formulation and performance in order to overcome the limitations of the previous versions. The new approaches, such as

reverse vaccinology, novel adjuvants, structural vaccinology, bioconjugates and rationally designed bacterial outer membrane vesicles (OMVs), seem promising. These lines of research, together with progress in polysaccharide conjugation techniques and antigen in silico design, could be the center of future vaccine development (VRD). As the discussion of these approaches exceeds the assumed scope of this review, we recommend several interesting links for publications on this topic [105–111].

In the final part of this review, we want to highlight only a few promising research directions [112]. An interesting perspective on vaccine “strategy” against *S. aureus* was proposed by Klimka et al. [113]. They suggested narrowing the composition of the vaccine to small epitopes of coproporphyrinogen III oxidase (CgoX) and triose phosphate isomerase (TPI). These epitopes fulfill essential housekeeping functions in heme synthesis and glycolysis, respectively. Two types of monoclonal antibodies (mAb), raised against CgoX and TPI, provided efficient protection against *S. aureus* infection when used for passive immunization. According to the authors, such a strategy will ensure spectacular precision of the vaccine. Their encouraging observation that in over 97% of the more than 35,000 investigated clinical strains of *S. aureus* these epitopes remain unchanged, and thus this vaccine candidate will have a broad effect, is very interesting. Therefore, “epitope-focused immunization” represents a new trend in vaccine development based on the preparation of mAb with narrow specificity. Monoclonal antibodies are now an integral part of the “reverse vaccinology 2.0” concept, where Abs are used to distinguish protective from non-protective epitopes and to support immune-focused antigen design. This strategy is anticipated to improve its immunogenic precision level, resulting in a vaccine with a greater efficacy and safety profile [105,114].

Alternatively, in addition to active immunization, the use of novel antibody-based passive immunization strategies, as described in Section 3, also might offer some hope. One current (though not quite new) concept is targeting the neutralization of *S. aureus* toxins. Mentioned in a previous section, the MEDI4893—human monoclonal antibodies specific to *S. aureus* α -toxin (Hla)—have been dedicated for mechanically ventilated patients to prevent staphylococcal pneumonia. Targeting Hla as a highly conserved and pivotal *S. aureus* virulence factor participating in tissue disruption, programmed cell death, immune response dysregulation and bacterial dissemination seems to be the key to the success of immune prophylaxis. Moreover, the MEDI4893 contain a triple-amino-acid substitution in the Fc region to extend their serum half-life. A phase I clinical trial confirmed their safety and tolerability, as well as their neutralizing potential (ex vivo study) [97]. Although future studies are necessary for such a strategy to be implemented, Miller et al. [93] emphasize that *S. aureus* toxins, especially superantigens and pore-forming toxins that disrupt the host innate and adaptive immune responses are important targets in protective immunity. Therefore, naturally-generated or vaccine-induced antibodies specific to *S. aureus* toxins are, or should be, associated with improved clinical outcomes. However, there are some limitations concerning their efficacy: (i) genetic variability among humans in terms of response to the toxins, (ii) variable expression of the plethora of toxins by *S. aureus* strains, (iii) variable level of antitoxin antibodies production and (iv) probably different host responses to the toxins depending on anatomical sites of infection [93,115]. Thus, this direction of research also needs to be intensified with the use of more modern techniques and tools than those currently available.

5. Conclusions

As mentioned in Section 1, in 2011, as many as 25,000 deaths in the European Union (EU) were attributed to antimicrobial resistance (AMR). It is calculated that without policies and actions to stop the spread of AMR, the number of deaths in Europe could grow up to 390,000 every year by 2050. Evidence has shown that existing vaccines have a positive impact on the reduction in AMR; therefore, the recommended strategies include reasonable use of antimicrobials and greater infection control measures [116,117]. However, it is obvious that National Immunization Programs and vaccination planning in the EU should

be integrated to meet the expectations. A clear vision for vaccine research and development (VRD) is needed in Europe to continue leading to the invention of next-generation vaccines. The Innovation Partnership for a Roadmap on Vaccines in Europe (IPROVE) has been launched. It is a collaboration among leading vaccine experts to develop a roadmap that outlines how Europe can best invest in the science and technology essential for vaccine innovation [118].

It is well accepted that to maximize the impact of vaccines in reducing the emergence of antimicrobial resistance, most of the population that is at risk of infection should be vaccinated, including all countries where the antimicrobial-resistant pathogens are endemic. Unfortunately, for most of the key AMR pathogens, vaccines are either not yet available or widespread social acceptance is unsatisfactory. More must be done to understand and address the reasons for vaccination hesitancy of the general public and healthcare professionals. The WHO and other official Health Services Reports say that while it is essential to develop new antibiotics, there is no guarantee that enough will be discovered to tackle the threat of antimicrobial resistance in the long term. Thus, other approaches (new vaccines) to prevent and treat the infections are needed. It is also strongly recommended that in the short term, the use of existing vaccines needs to be increased in both humans and animals [106–111,117].

As the world rightly focuses on limiting the spread of COVID-19, the current pandemic situation has exposed our vulnerability to the infections for which there are no effective vaccines or treatments [105,106]. An integrated strategy that includes multitargeted vaccines together with modern diagnostic tools, novel antibiotics, monoclonal antibodies, microbiota modulation, as well as the use of antimicrobial peptides, bacteriocins, plant-derived products and bacteriophages are required to combat AMR effectively [119–124]. The still-developing research trend concerning interference with the expression of pathogen virulence factors at the molecular and submolecular levels is also very important. It is assumed that the achievements in this field may turn out to be a key tool in the modern prevention and therapy of AMR-caused infections in the near future.

Author Contributions: Conceptualization, B.S., B.R. and U.W.-B.; software, U.W.-B.; formal analysis, B.S.; data curation, U.W.-B., B.S. and B.R.; writing—original draft preparation, U.W.-B., B.S. and B.R.; writing—review and editing, U.W.-B., B.S. and B.R.; visualization, U.W.-B.; supervision, B.S.; project administration, B.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rosini, R.; Nicch, S.; Pizza, M.; Rappuoli, R. Vaccines against antimicrobial resistance. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1048. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Excler, J.-L.; Privor-Dumm, L.; Kim, J.H. Supply and delivery of vaccines for global health. *Curr. Opin. Immunol.* **2021**, *71*, 13–20. [\[CrossRef\]](#)
3. Castro, S.A.; Dorfmueller, H.C. A brief review on Group A *Streptococcus* pathogenesis and vaccine development. *R. Soc. Open Sci.* **2021**, *8*, 201991. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Ma, L.; Caulfield, A.; Dewan, K.K.; Harvill, E.T. Pertactin-deficient *Bordetella pertussis*, vaccine-driven evolution, and reemergence of pertussis. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 1561–1566. [\[CrossRef\]](#)
5. Masomian, M.; Ahmad, Z.; Gew, L.T.; Poh, C.L. Development of next generation *Streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. *Vaccines* **2020**, *8*, 132. [\[CrossRef\]](#)
6. Stuart, J.M. Editorial for the Special Issue: Bacterial meningitis—Epidemiology and vaccination. *Microorganisms* **2021**, *9*, 917. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Fowler, V.G., Jr.; Proctor, R.A. Where does a *Staphylococcus aureus* vaccine stand? *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 66–75. [\[CrossRef\]](#)
8. Teymournejad, O.; Montgomery, C.P. Evasion of immunological memory by *S. aureus* infection: Implications for vaccine design. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 633672. [\[CrossRef\]](#)

9. Flouchi, R.; Elmnai, A.; Hibatallah, A.; Fahsi, K.; Touzani, I.; Fikri-Benbrahim, K. The relationship between nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and surgical site infections in a Hospital Center in Morocco. *Int. J. Microbiol.* **2021**, 2021, 5585588. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Lin, J.; Peng, Y.; Xu, P.; Zhang, T.; Bai, C.; Lin, D.; Ou, Q.; Yao, Z. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization in Chinese children: A prevalence meta-analysis and review of influencing factors. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0159728. [\[CrossRef\]](#)
11. Sakr, A.; Brégeon, F.; Mège, J.L.; Rolain, J.M.; Blin, O. *Staphylococcus aureus* nasal colonization: An update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2419. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Verhoeven, P.O.; Gagnaire, J.; Botelho-Nevers, E.; Grattard, F.; Carricajo, A.; Lucht, F.; Pozzetto, B.; Berthelot, P. Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: An update. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2014**, *12*, 75–89. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Dayan, G.H.; Mohamed, N.; Scully, I.L.; Cooper, D.; Begier, E.; Eiden, J.; Jansen, K.U.; Gurtman, A.; Anderson, A.S. *Staphylococcus aureus*: The current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. *Expert Rev. Vaccines* **2016**, *15*, 1373–1392. [\[CrossRef\]](#)
14. Hoerr, V.; Franz, M.; Pletz, M.W.; Diab, M.; Niemann, S.; Faber, C.; Doenst, T.; Schulze, P.C.; Deinhardt-Emmer, S.; Löffler, B. *S. aureus* endocarditis: Clinical aspects and experimental approaches. *Int. J. Med. Microbiol.* **2018**, *308*, 640–652. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Tong, S.Y.; Davis, J.S.; Eichenberger, E.; Holland, T.L.; Fowler, V.G., Jr. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 603–661. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Turner, N.A.; Sharma-Kuinkel, B.K.; Maskarinec, S.A.; Eichenberger, E.M.; Shah, P.P.; Carugati, M.; Holland, T.L.; Fowler, V.G., Jr. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An overview of basic and clinical research. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 203–218. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Kourtis, A.P.; Hatfield, K.; Baggs, J.; Mu, Y.; See, I.; Epton, E.; Nadle, J.; Kainer, M.A.; Dumyati, G.; Petit, S.; et al. Vital signs: Epidemiology and recent trends in methicillin-resistant and in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections—United States. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* **2019**, *68*, 214–219. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. van Hal, S.J.; Jensen, S.O.; Vaska, V.L.; Espedido, B.A.; Paterson, D.L.; Gosbell, I.B. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Microbiol. Rev.* **2012**, *25*, 362–386. [\[CrossRef\]](#)
19. Bello-Chavolla, O.Y.; Bahena-Lopez, J.P.; Garciadiego-Fosass, P.; Volkow, P.; Garcia-Horton, A.; Velazquez-Acosta, C.; Vilar-Compte, D. Bloodstream infection caused by *S. aureus* in patients with cancer: A 10-year longitudinal single-center study. *Support. Care Cancer* **2018**, *26*, 4057–4065. [\[CrossRef\]](#)
20. Lu, H.Y.; Turvey, S.E. Human MALT1 deficiency and predisposition to infections. *Curr. Opin. Immunol.* **2021**, *72*, 1–12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Otto, M. Staphylococcal biofilms. *Microbiol. Spectr.* **2018**, *6*, 1–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Schilcher, K.; Horswill, A.R. Staphylococcal biofilm development: Structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2020**, *84*, e00026–19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Zheng, Y.; He, L.; Asiamah, T.K.; Otto, M. Colonization of medical devices by staphylococci. *Environ. Microbiol.* **2018**, *20*, 3141–3153. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Foster, T.J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 430–449. [\[CrossRef\]](#)
25. Guo, Y.; Song, G.; Sun, M.; Wang, J.; Wang, Y. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Ippolito, G.; Leone, S.; Lauria, F.N.; Nicastri, E.; Wenzel, R.P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The superbug. *Int. J. Infect. Dis.* **2010**, *14*, S7–S11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Sakamoto, Y.; Yamauchi, Y.; Jo, T.; Michihata, N.; Hasegawa, W.; Takeshima, H.; Matsui, H.; Fushimi, K.; Yasunaga, H.; Nagase, T. In-hospital mortality associated with community-acquired pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A matched-pair cohort study. *BMC Pulm. Med.* **2021**, *21*, 345. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Zhen, X.; Lundborg, C.S.; Zhang, M.; Sun, X.; Li, Y.; Hu, X.; Gu, S.; Gu, Y.; Wei, J.; Dong, H. Clinical and economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A multicentre study in China. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3900. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin—United States, 2002. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* **2002**, *51*, 565–567.
30. Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **1999**, *284*, 1318–1322. [\[CrossRef\]](#)
31. Flemming, H.C.; Wingender, J.; Szewzyk, U.; Steinberg, P.; Rice, S.A.; Kjelleberg, S. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 563–575. [\[CrossRef\]](#)
32. Hall-Stoodley, L.; Costerton, J.W.; Stoodley, P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 95–108. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Hall, C.W.; Mah, T.F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 276–301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Resch, A.; Rosenstein, R.; Nerz, C.; Götz, F. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 2663–2676. [\[CrossRef\]](#)

35. Sadowska, B.; Więckowska-Szakiel, M.; Paszkiewicz, M.; Różalska, B. The immunomodulatory activity of *Staphylococcus aureus* products derived from biofilm and planktonic cultures. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* **2013**, *61*, 413–420. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 322–332. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Stewart, P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.* **2002**, *292*, 107–113. [\[CrossRef\]](#)
38. Cheung, G.Y.C.; Bae, J.S.; Otto, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* **2021**, *12*, 547–569. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. de Jong, N.W.M.; van Kessel, K.P.M.; van Strijp, J.A.G. Immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7*, 1–27. [\[CrossRef\]](#)
40. Pietrocola, G.; Nobile, G.; Rindi, S.; Speziale, P. *Staphylococcus aureus* manipulates innate immunity through own and host-expressed proteases. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Flannagan, R.S.; Heit, B.; Heinrichs, D.E. Antimicrobial mechanisms of macrophages and the immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* **2015**, *4*, 826–868. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Shettigar, K.; Murali, T.S. Virulence factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *39*, 2235–2246. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. de Vor, L.; Rooijackers, S.H.M.; van Strijp, J.A.G. Staphylococci evade the innate immune response by disarming neutrophils and forming biofilms. *FEBS Lett.* **2020**, *594*, 2556–2569. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Thammavongsa, V.; Kim, H.K.; Missiakas, D.; Schneewind, O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 529–543. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Rooijackers, S.H.; Ruyken, M.; Roos, A.; Daha, M.R.; Presanis, J.S.; Sim, R.B.; van Wamel, W.J.; van Kessel, K.P.; van Strijp, J.A. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 920–927. [\[CrossRef\]](#)
46. Ko, Y.P.; Kuipers, A.; Freitag, C.M.; Jongerius, I.; Medina, E.; van Rooijen, W.J.; Spaan, A.N.; van Kessel, K.P.; Höök, M.; Rooijackers, S.H. Phagocytosis escape by a *Staphylococcus aureus* protein that connects complement and coagulation proteins at the bacterial surface. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003816. [\[CrossRef\]](#)
47. Kang, M.; Ko, Y.P.; Liang, X.; Ross, C.L.; Liu, Q.; Murray, B.E.; Höök, M. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 20520–20531. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Zhang, Y.; Wu, M.; Hang, T.; Wang, C.; Yang, Y.; Pan, W.; Zang, J.; Zhang, M.; Zhang, X. *Staphylococcus aureus* SdrE captures complement factor H's C-terminus via a novel 'close, dock, lock and latch' mechanism for complement evasion. *Biochem. J.* **2017**, *474*, 1619–1631. [\[CrossRef\]](#)
49. Jusko, M.; Potempa, J.; Kantyka, T.; Bielecka, E.; Miller, H.K.; Kalinska, M.; Dubin, G.; Garred, P.; Shaw, L.N.; Blom, A.M. Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system. *J. Innate Immun.* **2014**, *6*, 31–46. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Singh, V.; Phukan, U.J. Interaction of host and *Staphylococcus aureus* protease-system regulates virulence and pathogenicity. *Med. Microbiol. Immunol.* **2019**, *208*, 585–607. [\[CrossRef\]](#)
51. Guerra, F.E.; Borgogna, T.R.; Patel, D.M.; Sward, E.W.; Voyich, J.M. Epic immune battles of history: Neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 286. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Pidwill, G.R.; Gibson, J.F.; Cole, J.; Renshaw, S.A.; Foster, S.J. The role of macrophages in *Staphylococcus aureus* infection. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 620339. [\[CrossRef\]](#)
53. Yamada, K.J.; Heim, C.E.; Xi, X.; Attri, K.S.; Wang, D.; Zhang, W.; Singh, P.K.; Bronich, T.K.; Kielian, T. Monocyte metabolic reprogramming promotes pro-inflammatory activity and *Staphylococcus aureus* biofilm clearance. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008354. [\[CrossRef\]](#)
54. Mohamed, N.; Timofeyeva, Y.; Jamroz, D.; Rojas, E.; Hao, L.; Silmon de Monerri, N.C.; Hawkins, J.; Singh, G.; Cai, B.; Liberator, P.; et al. Molecular epidemiology and expression of capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates in the United States. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0208356. [\[CrossRef\]](#)
55. Nanra, J.S.; Buitrago, S.M.; Crawford, S.; Ng, J.; Fink, P.S.; Hawkins, J.; Scully, I.L.; McNeil, L.K.; Aste-Amézaga, J.M.; Cooper, D.; et al. Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Hum. Vaccin. Immunother.* **2013**, *9*, 480–487. [\[CrossRef\]](#)
56. Cheng, A.G.; McAdow, M.; Kim, H.K.; Bae, T.; Missiakas, D.M.; Schneewind, O. Contribution of coagulases towards *Staphylococcus aureus* disease and protective immunity. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1001036. [\[CrossRef\]](#)
57. Herman-Bausier, P.; Labate, C.; Towell, A.M.; Derclaye, S.; Geoghegan, J.A.; Dufrène, Y.F. *Staphylococcus aureus* clumping factor A is a force-sensitive molecular switch that activates bacterial adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 5564–5569. [\[CrossRef\]](#)
58. Tam, K.; Torres, V.J. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7*, 2. [\[CrossRef\]](#)
59. Clauditz, A.; Resch, A.; Wieland, K.P.; Peschel, A.; Götz, F. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infect Immun.* **2006**, *74*, 4950–4953. [\[CrossRef\]](#)
60. Gaupp, R.; Ledala, N.; Somerville, G.A. Staphylococcal response to oxidative stress. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2012**, *2*, 33. [\[CrossRef\]](#)

61. Cosgrove, K.; Coutts, G.; Jonsson, I.M.; Tarkowski, A.; Kokai-Kun, J.F.; Mond, J.J.; Foster, S.J. Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 1025–1035. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Mandell, G.L. Catalase, superoxide dismutase, and virulence of *Staphylococcus aureus*. *In vitro* and *in vivo* studies with emphasis on staphylococcal–leukocyte interaction. *J. Clin. Investig.* **1975**, *55*, 561–566. [\[CrossRef\]](#)
63. Joo, H.S.; Otto, M. Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. *Biochim. Biophys. Acta.* **2015**, *1848*, 3055–3061. [\[CrossRef\]](#)
64. Flannagan, R.S.; Heit, B.; Heinrichs, D.E. Intracellular replication of *Staphylococcus aureus* in mature phagolysosomes in macrophages precedes host cell death, and bacterial escape and dissemination. *Cell Microbiol.* **2016**, *18*, 514–535. [\[CrossRef\]](#)
65. Jubrail, J.; Morris, P.; Bewley, M.A.; Stoneham, S.; Johnston, S.A.; Foster, S.J.; Peden, A.A.; Read, R.C.; Marriott, H.M.; Dockrell, D.H. Inability to sustain intraphagolysosomal killing of *Staphylococcus aureus* predisposes to bacterial persistence in macrophages. *Cell Microbiol.* **2016**, *18*, 80–96. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Proctor, R.A.; Kriegeskorte, A.; Kahl, B.C.; Becker, K.; Löffler, B.; Peters, G. *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs): A road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2014**, *4*, 99. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Speziale, P.; Pietrocola, G. *Staphylococcus aureus* induces neutrophil extracellular traps (NETs) and neutralizes their bactericidal potential. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2021**, *19*, 3451–3457. [\[CrossRef\]](#)
68. Missiakas, D.; Winstel, V. Selective host cell death by *Staphylococcus aureus*: A strategy for bacterial persistence. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 621733. [\[CrossRef\]](#)
69. Berube, B.J.; Bubeck Wardenburg, J. *Staphylococcus aureus* α -toxin: Nearly a century of intrigue. *Toxins* **2013**, *5*, 1140–1166. [\[CrossRef\]](#)
70. Boyle-Vavra, S.; Daum, R.S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab. Investig.* **2007**, *87*, 3–9. [\[CrossRef\]](#)
71. Darboe, S.; Dobreniecki, S.; Jarju, S.; Jallow, M.; Mohammed, N.I.; Wathuo, M.; Ceesay, B.; Tweed, S.; Basu Roy, R.; Okomo, U.; et al. Prevalence of Panton-Valentine leukocidin (PVL) and antimicrobial resistance in community-acquired clinical *Staphylococcus aureus* in an urban Gambian hospital: A 11-year period retrospective pilot study. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 170. [\[CrossRef\]](#)
72. Graves, S.F.; Kobayashi, S.D.; DeLeo, F.R. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence. *J. Mol. Med.* **2010**, *88*, 109–114. [\[CrossRef\]](#)
73. Cheung, G.Y.C.; Joo, H.S.; Chatterjee, S.S.; Otto, M. Phenol-soluble modulins—critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **2014**, *38*, 698–719. [\[CrossRef\]](#)
74. Surewaard, B.G.; de Haas, C.J.; Vervoort, F.; Rigby, K.M.; DeLeo, F.R.; Otto, M.; van Strijp, J.A.; Nijland, R. Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. *Cell Microbiol.* **2013**, *15*, 1427–1437. [\[CrossRef\]](#)
75. Berlon, N.R.; Qi, R.; Sharma-Kuinkel, B.K.; Joo, H.S.; Park, L.P.; George, D.; Thaden, J.T.; Messina, J.A.; Maskarinec, S.A.; Mueller-Premru, M.; et al. Clinical MRSA isolates from skin and soft tissue infections show increased *in vitro* production of phenol soluble modulins. *J. Infect.* **2015**, *71*, 447–457. [\[CrossRef\]](#)
76. Cruz, A.R.; Boer, M.A.D.; Strasser, J.; Zwarthoff, S.A.; Beurskens, F.J.; de Haas, C.J.C.; Aerts, P.C.; Wang, G.; de Jong, R.N.; Bagnoli, F.; et al. Staphylococcal protein A inhibits complement activation by interfering with IgG hexamer formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2016772118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Deis, L.N.; Pemble, C.W.; 4th, Qi, Y.; Hagarman, A.; Richardson, D.C.; Richardson, J.S.; Oas, T.G. Multiscale conformational heterogeneity in staphylococcal protein A: Possible determinant of functional plasticity. *Structure* **2014**, *22*, 1467–1477. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Pauli, N.T.; Kim, H.K.; Falugi, F.; Huang, M.; Dulac, J.; Henry Dunand, C.; Zheng, N.Y.; Kaur, K.; Andrews, S.F.; Huang, Y.; et al. *Staphylococcus aureus* infection induces protein A-mediated immune evasion in humans. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 2331–2339. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
79. Goodyear, C.S.; Silverman, G.J. Death by a B cell superantigen: In vivo VH-targeted apoptotic supraclonal B cell deletion by a staphylococcal toxin. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 1125–1139. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
80. Krakauer, T. Staphylococcal superantigens: Pyrogenic toxins induce toxic shock. *Toxins* **2019**, *11*, 178. [\[CrossRef\]](#)
81. Paulsen, J.; Mehl, A.; Askim, Å.; Solligård, E.; Åsvold, B.O.; Damås, J.K. Epidemiology and outcome of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection and sepsis in a Norwegian county 1996–2011: An observational study. *BMC Infect. Dis.* **2015**, *15*, 116. [\[CrossRef\]](#)
82. Tuffs, S.W.; Haeryfar, S.M.M.; McCormick, J.K. Manipulation of innate and adaptive immunity by staphylococcal superantigens. *Pathogens* **2018**, *7*, 53. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Wójcik-Bojek, U.; Rywaniak, J.; Bernat, P.; Podśedek, A.; Kajszczak, D.; Sadowska, B. An *in vitro* study of the effect of *Viburnum opulus* extracts on key processes in the development of staphylococcal infections. *Molecules* **2021**, *26*, 1758. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Zhang, X.; Marichannegowda, M.H.; Rakesh, K.P.; Qin, H.L. Master mechanisms of *Staphylococcus aureus*: Consider its excellent protective mechanisms hindering vaccine development! *Microbiol. Res.* **2018**, *212–213*, 59–66. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Nishitani, K.; Ishikawa, M.; Morita, Y.; Yokogawa, N.; Xie, C.; de Mesy Bentley, K.L.; Ito, H.; Kates, S.L.; Daiss, J.L.; Schwarz, E.M. IsdB antibody-mediated sepsis following *S. aureus* surgical site infection. *JCI Insight.* **2020**, *5*, e141164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

86. Gurtman, A.; Begier, E.; Mohamed, N.; Baber, J.; Sabharwal, C.; Haupt, R.M.; Edwards, H.; Cooper, D.; Jansen, K.U.; Anderson, A.S. The development of a *Staphylococcus aureus* four antigen vaccine for use prior to elective orthopedic surgery. *Hum. Vaccin. Immunother.* **2019**, *15*, 358–370. [CrossRef] [PubMed]
87. Mbaeyi, S.A.; Bozio, C.H.; Duffy, J.; Rubin, L.G.; Hariri, S.; Stephens, D.S.; MacNeil, J.R. Meningococcal vaccination: Recommendations of the advisory committee on immunization practices, United States, 2020. *MMWR Recomm. Rep.* **2020**, *69*, 1–41. [CrossRef] [PubMed]
88. Principi, N.; Esposito, S. Prevention of community-acquired pneumonia with available pneumococcal vaccines. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *18*, 30. [CrossRef]
89. Frenck, R.W., Jr.; Creech, C.B.; Sheldon, E.A.; Seiden, D.J.; Kankam, M.K.; Baber, J.; Zito, E.; Hubler, R.; Eiden, J.; Severs, J.M.; et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a 4-antigen *Staphylococcus aureus* vaccine (SA4Ag): Results from a first-in-human randomised, placebo-controlled phase 1/2 study. *Vaccine* **2017**, *35*, 375–384. [CrossRef]
90. Nissen, M.; Marshall, H.; Richmond, P.; Shakib, S.; Jiang, Q.; Cooper, D.; Rill, D.; Baber, J.; Eiden, J.; Gruber, W.; et al. A randomized phase I study of the safety and immunogenicity of three ascending dose levels of a 3-antigen *Staphylococcus aureus* vaccine (SA3Ag) in healthy adults. *Vaccine* **2015**, *33*, 1846–1854. [CrossRef]
91. Creech, C.B.; Frenck, R.W.; Fiquet, A.; Feldman, R.; Kankam, M.K.; Pathirana, S.; Baber, J.; Radley, D.; Cooper, D.; Eiden, J.; et al. Persistence of immune responses through 36 months in healthy adults after vaccination with a novel *Staphylococcus aureus* 4-Antigen Vaccine (SA4Ag). *Open Forum Inf. Dis.* **2020**, *7*, 1–9. [CrossRef]
92. Handke, L.D.; Gribenko, A.V.; Timofeyeva, Y.; Scully, I.L.; Anderson, A.S. MntC-dependent manganese transport is essential for *Staphylococcus aureus* oxidative stress resistance and virulence. *mSphere* **2018**, *3*, e00336-18. [CrossRef]
93. Miller, L.S.; Fowler, V.G., Jr.; Shukla, S.K.; Rose, W.E.; Proctor, R.A. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus* invasive infections: Evidence based on human immunity, genetics and bacterial evasion mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **2020**, *44*, 123–153. [CrossRef] [PubMed]
94. Venkatasubramanian, A.; Liao, G.; Cho, E.; Adhikari, R.P.; Kort, T.; Holtsberg, F.W.; Elsass, K.E.; Kobs, D.J.; Rudge, T.L., Jr.; Kauffman, K.D.; et al. Safety and immunogenicity of a 4-component toxoid-based *Staphylococcus aureus* vaccine in rhesus macaques. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 621754. [CrossRef] [PubMed]
95. Raafat, D.; Otto, M.; Reppschläger, K.; Iqbal, J.; Holtfrete, S. Fighting *Staphylococcus aureus* biofilms with monoclonal antibodies. *Trends Microbiol.* **2019**, *27*, 303–322. [CrossRef]
96. Rupp, M.E.; Holley, H.P., Jr.; Lutz, J.; Dicpinigaitis, P.V.; Woods, C.W.; Levine, D.P.; Veney, N.; Fowler, V.G., Jr. Phase II, randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of a polyclonal anti-*Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide immune globulin in treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 4249–4254. [CrossRef] [PubMed]
97. Yu, X.Q.; Robbie, G.J.; Wu, Y.; Esser, M.T.; Jensen, K.; Schwartz, H.I.; Bellamy, T.; Hernandez-Illas, M.; Jafri, H.S. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of MEDI4893, an investigational, extended-half-life, anti-*Staphylococcus aureus* alpha-toxin human monoclonal antibody, in healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *61*, e01020-16. [CrossRef]
98. Chan, L.C.; Chaili, S.; Filler, S.G.; Miller, L.S.; Solis, N.V.; Wang, H.; Johnson, C.W.; Lee, H.K.; Diaz, L.F.; Yeaman, M.R. Innate immune memory contributes to host defense against recurrent skin and skin structure infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **2017**, *85*, e00876-16. [CrossRef]
99. Chan, L.C.; Rossetti, M.; Miller, L.S.; Filler, S.G.; Johnson, C.W.; Lee, H.K.; Wang, H.; Gjertson, D.; Fowler, V.G., Jr.; Reed, E.F.; et al. Protective immunity in recurrent *Staphylococcus aureus* infection reflects localized immune signatures and macrophage-conferred memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E11111–E11119. [CrossRef] [PubMed]
100. Leentjens, J.; Bekkering, S.; Joosten, L.A.B.; Netea, M.G.; Burgner, D.P.; Riksen, N.P. Trained innate immunity as a novel mechanism linking infection and the development of atherosclerosis. *Circ. Res.* **2018**, *122*, 664–669. [CrossRef]
101. Maher, B.M.; Mulcahy, M.E.; Murphy, A.G.; Wilk, M.; O’Keeffe, K.M.; Geoghegan, J.A.; Lavelle, E.C.; McLoughlin, R.M. Nlrp-3-driven interleukin 17 production by $\gamma\delta$ T cells controls infection outcomes during *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 4478–4489. [CrossRef]
102. Chan, L.C.; Chaili, S.; Filler, S.G.; Barr, K.; Wang, H.; Kupferwasser, D.; Edwards, J.E., Jr.; Xiong, Y.Q.; Ibrahim, A.S.; Miller, L.S.; et al. Nonredundant roles of interleukin-17A (IL-17A) and IL-22 in murine host defense against cutaneous and hematogenous infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 4427–4437. [CrossRef] [PubMed]
103. Dillen, C.A.; Pinsker, B.L.; Marusina, A.I.; Merleev, A.A.; Farber, O.N.; Liu, H.; Archer, N.K.; Lee, D.B.; Wang, Y.; Ortines, R.V.; et al. Clonally expanded $\gamma\delta$ T cells protect against *Staphylococcus aureus* skin reinfection. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 1026–1042. [CrossRef]
104. Clegg, J.; Soldaini, E.; McLoughlin, R.M.; Rittenhouse, S.; Bagnoli, F.; Phogat, S. *Staphylococcus aureus* vaccine research and development: The past, present and future, including novel therapeutic strategies. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 705360. [CrossRef] [PubMed]
105. Rappuoli, R.; De Gregorio, E.; Del Giudice, G.; Phogat, S.; Pecetta, S.; Pizza, M.; Hanon, E. Vaccinology in the post-COVID-19 era. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2020368118. [CrossRef] [PubMed]
106. Gavi, The Vaccine Alliance. Available online: <https://www.gavi.org/our-alliance/about> (accessed on 1 December 2021).
107. World Health Organization. Implementing the Immunization Agenda 2030. Available online: <https://www.who.int/publications/m/item/implementing-the-immunization-agenda-2030> (accessed on 1 December 2021).

108. Medical Countermeasures.gov. Partnering on Vaccines to Counter AMR Threats. Available online: <https://www.medicalcountermeasures.gov/barda/cbrn/mdrvaccines/> (accessed on 1 December 2021).
109. World Health Organization. Call to Action on Antimicrobial Resistance. 2021. Available online: <https://www.who.int/news/item/30-07-2021-call-to-action-on-antimicrobial-resistance-2021> (accessed on 1 December 2021).
110. CIDRAP (Center for Infectious Disease Research and Policy). Stewardship/Resistance Scan for Nov 10, 2021. Available online: <https://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2021/11/stewardship-resistance-scan-nov-10-2021> (accessed on 1 December 2021).
111. FAO. *The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2021–2025*; FAO: Rome, Italy, 2021; pp. 1–46, ISBN 978-92-5-134673-0. [CrossRef]
112. Ford, C.A.; Hurford, I.M.; Cassat, J.E. Antivirulence strategies for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections: A mini review. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 632706. [CrossRef] [PubMed]
113. Klimka, A.; Mertins, S.; Nicolai, A.K.; Rummeler, L.M.; Higgins, P.G.; Günther, S.D.; Tosetti, B.; Krut, O.; Krönke, M. Epitope-specific immunity against *Staphylococcus aureus* coproporphyrinogen III oxidase. *Vaccines* **2021**, *6*, 11. [CrossRef] [PubMed]
114. Bidmos, F.A.; Siris, S.; Gladstone, C.A.; Langford, P.R. Bacterial vaccine antigen discovery in the reverse vaccinology 2.0 era: Progress and challenges. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2315. [CrossRef]
115. Ahmad-Mansour, N.; Loubet, P.; Pouget, C.; Duniach-Remy, C.; Sotto, A.; Lavigne, J.-P.; Molle, V. *Staphylococcus aureus* toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins* **2021**, *13*, 677. [CrossRef]
116. Micoli, F.; Bagnoli, F.; Rappuoli, F.; Serruto, D. The role of vaccines in combating antimicrobial resistance. *Nature Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 287–302. [CrossRef]
117. Vekemans, J.; Hasso-Agopsowicz, M.; Kang, G.; Hausdorff, W.P.; Fiore, A.; Tayler, E.; Klemm, E.J.; Laxminarayan, R.; Srikantiah, P.; Friede, M.; et al. Leveraging vaccines to reduce antibiotic use and prevent antimicrobial resistance: A World Health Organization action framework. *Clin. Infect. Dis.* **2021**, *73*, e1011–e1017. [CrossRef] [PubMed]
118. Medaglini, D.; De Azero, M.R.; Leroy, O.; Bietrix, F.; Denoel, P. Innovation partnership for a roadmap on vaccines in Europe (IPROVE): A vision for the vaccines of tomorrow. *Vaccine* **2018**, *36*, 1136–1145. [CrossRef] [PubMed]
119. Dijksteel, G.S.; Ulrich, M.M.W.; Middelkoop, E.; Boekema, B.K.H.L. Review: Lessons learned from clinical trials using antimicrobial peptides (AMPs). *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 616979. [CrossRef] [PubMed]
120. Lee, J.-K.; Park, Y. All d-Lysine analogues of the antimicrobial Peptide HPA3NT3-A2 increased serum stability and without drug resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5632. [CrossRef]
121. Ryu, S.; Song, P.I.; Seo, C.H.; Cheong, H.; Park, Y. Colonization and infection of the skin by *S. aureus*: Immune system evasion and the response to cationic antimicrobial peptides. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 8753–8772. [CrossRef] [PubMed]
122. Speziale, P.; Pietrocola, G. Monoclonal antibodies targeting surface-exposed and secreted proteins from staphylococci. *Vaccines* **2021**, *9*, 459. [CrossRef]
123. Swolana, D.; Kępa, M.; Kabała-Dzik, A.; Dzik, R.; Wojtyczka, R.D. Sensitivity of staphylococcal biofilm to selected compounds of plant origin. *Antibiotics* **2021**, *10*, 607. [CrossRef]
124. Walsh, L.; Johnson, C.N.; Hill, C.; Ross, R.P. Efficacy of phage- and bacteriocin-based therapies in combating nosocomial MRSA infections. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 654038. [CrossRef]

III.2. Publikacja 2 [P2]

Tytuł: **An *in vitro* study of the effect of *Viburnum opulus* extracts on key processes in the development of staphylococcal infections**

Autorzy: Urszula Wójcik-Bojek, Joanna Rywaniak, Przemysław Bernat, Anna Podsędek, Dominika Kajszczyk, Beata Sadowska

Rodzaj pracy: praca oryginalna

Czasopismo: *Molecules*, 2022; 26(6):1758. doi:10.3390/molecules26061758.

IF₂₀₂₁: **4,927**; punkty MEiN₂₀₂₁: **140**

Preparaty roślinne mogą wykazywać bezpośrednią aktywność biostatyczną/biobójczą w stosunku do drobnoustrojów (najczęściej w wysokich stężeniach), ale także ograniczać wirulencję mikroorganizmów działając na ich czynniki patogenności. Zahamowanie aktywności sortazy A (SrtA) może wpływać na ekspresję szerokiego zakresu adhezyn gronkowcowych, w tym MSCRAMMs, ponieważ enzym ten zaangażowany jest w ich kowalencyjne wiązanie do prekursorów peptydoglikanu. Celem niniejszej pracy było zbadanie *in vitro* właściwości acetonowych, etanolowych i wodnych ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.) jako potencjalnych dodatków do diety zapobiegających infekcjom gronkowcowym. Ekstrakty zostały scharakteryzowane pod względem biochemicznym (HPLC/UPLC-QTOF-MS), a następnie oceniono ich wpływ na aktywność sortazy A (test fluorymetryczny), ekspresję białka A (SpA) gronkowców (swoiste przeciwciała znakowane FITC), skład lipidowy błon komórkowych bakterii (LC-MS/MS, GC/MS) oraz tworzenie biofilmu (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit). Zbadano również cytotoksyczność ekstraktów *V. opulus* wobec linii ludzkich fibroblastów HFF-1 (redukcja MTT). Ekstrakty z kaliny silnie hamowały aktywność SrtA (60,5% inhibicji po zastosowaniu acetonowego ekstraktu z kory kaliny koralowej w stężeniu 500 µg/ml) i ekspresję SpA (aż do 94,9% w przypadku tego samego ekstraktu), powodowały modyfikacje błony komórkowej *S. aureus*, ograniczały tworzenie biofilmu przez gronkowce i nie były cytotoksyczne dla komórek eukariotycznych. Dlatego stwierdzono, że mają potencjał prozdrowotny. Niemniej jednak wskazano, że potrzebne są dalsze badania na modelach zwierzęcych w celu potwierdzenia przydatności tych ekstraktów jako suplementów diety w profilaktyce zakażeń gronkowcowych.

Article

An In Vitro Study of the Effect of *Viburnum opulus* Extracts on Key Processes in the Development of Staphylococcal Infections

Urszula Wójcik-Bojek ¹, Joanna Rywaniak ¹, Przemysław Bernat ², Anna Podśedek ³, Dominika Kajszczak ³ and Beata Sadowska ^{1,*}

- ¹ Department of Immunology and Infectious Biology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland; urszula.wojcik@biol.uni.lodz.pl (U.W.-B.); joanna.rywaniak@biol.uni.lodz.pl (J.R.)
² Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology and Environmental Protection, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland; przemyslaw.bernat@biol.uni.lodz.pl
³ Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Institute of Molecular and Industrial Biotechnology, Lodz University of Technology, Stefanowskiego 4/10, 90-924 Lodz, Poland; anna.podsedek@p.lodz.pl (A.P.); dominika.kajszczak@dokt.p.lodz.pl (D.K.)
 * Correspondence: beata.sadowska@biol.uni.lodz.pl; Tel.: +48-42-635-45-25



Citation: Wójcik-Bojek, U.; Rywaniak, J.; Bernat, P.; Podśedek, A.; Kajszczak, D.; Sadowska, B. An In Vitro Study of the Effect of *Viburnum opulus* Extracts on Key Processes in the Development of Staphylococcal Infections. *Molecules* **2021**, *26*, 1758. <https://doi.org/10.3390/molecules26061758>

Academic Editors: Young-won Chin, Young Hee Choi and Hojun Kim

Received: 6 February 2021

Accepted: 19 March 2021

Published: 21 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Staphylococcus aureus* is still one of the leading causes of both hospital- and community-acquired infections. Due to the very high percentage of drug-resistant strains, the participation of drug-tolerant biofilms in pathological changes, and thus the limited number of effective antibiotics, there is an urgent need to search for alternative methods of prevention or treatment for *S. aureus* infections. In the present study, biochemically characterized (HPLC/UPLC–QTOF–MS) acetic, ethanolic, and water extracts from fruits and bark of *Viburnum opulus* L. were tested in vitro as diet additives that potentially prevent staphylococcal infections. The impacts of *V. opulus* extracts on sortase A (SrtA) activity (Fluorimetric Assay), staphylococcal protein A (SpA) expression (FITC-labelled specific antibodies), the lipid composition of bacterial cell membranes (LC-MS/MS, GC/MS), and biofilm formation (LIVE/DEAD BacLight) were assessed. The cytotoxicity of *V. opulus* extracts to the human fibroblast line HFF-1 was also tested (MTT reduction). *V. opulus* extracts strongly inhibited SrtA activity and SpA expression, caused modifications of *S. aureus* cell membrane, limited biofilm formation by staphylococci, and were non-cytotoxic. Therefore, they have pro-health potential. Nevertheless, their usefulness as diet supplements that are beneficial for the prevention of staphylococcal infections should be confirmed in animal models in the future.

Keywords: biofilm; cell membrane lipids; infections; plant extracts; prevention; sortase A; *Staphylococcus aureus*; staphylococcal protein A; *Viburnum opulus*

1. Introduction

Despite the progress in microbiology, diagnostics, and medicine, *Staphylococcus aureus* is still one of the leading causes of human infections, including skin and soft tissue infections as well as many invasive, life-threatening contagions such as bacteremia; organ ulcers; bone, joint, and bone marrow infections; infective endocarditis; sepsis or toxic shock syndrome [1–6]. Being a component of the human microbiota, a broad panel of virulence factors that allow these bacteria efficient tissue colonization, as well as the avoidance, impairment, and modulation of the host immune response, underlie the success of *S. aureus* as a pathogen [5–8]. Most infections start from microbial adhesion to the host cells and elements of the extracellular matrix (proteoglycans, glycoproteins, tissue fibers) or to inserted/implanted biomaterials (e.g., intravascular catheters, dental implants, prosthetic valves, orthopaedic implants). The next step is the aggregation and multiplication of microorganisms, which very often leads to biofilm formation in host tissues [9–13].

Therefore, staphylococci possess a particularly wide repertoire of adhesins, such as microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs), which mediate staphylococcal attachment, tissue colonization and biofilm formation. Among them, clumping factors A and B (ClfA, ClfB), fibronectin-binding proteins A and B (FnBPA, FnBPB), collagen-binding protein (Cna), vitronectin-binding protein (Vbp), serine-aspartate repeat family proteins (SdrC, SdrD, and SdrE), staphylococcal protein A (SpA), *S. aureus* surface protein G (SasG), and biofilm-associated protein (Bap) have been mentioned. Some secretory factors (Eap, Efb, vWbp) also participate in staphylococcal attachment [6,11,14,15]. *S. aureus* adhesins also play roles in host cell invasion (intracellular persistence), cell activation (blood platelet aggregation and degranulation, cytokine and reactive oxygen species release by immunocompetent cells, extracellular adhesive molecule expression) and in the development of inflammation [6,15,16]. Thus, not only the beginning but also the course of *S. aureus* infections strongly depends on the expression of adhesins and the adhesive properties of these bacteria.

The treatment of staphylococcal infections, especially biofilm-associated infections, is particularly difficult due to the high percentage of multidrug-resistant strains, as well as the biofilm structure and physiology of these bacteria, which give them increased tolerance to environmental conditions, including antibiotics [12,17,18]. Therefore, the idea of blocking the initial adhesion and biofilm formation of *S. aureus* using plant-origin preparations containing biologically active compounds seems to be a reasonable strategy for the prevention of these infections. Many pro-health properties of plant-derived products, including antioxidative, antiallergic, anti-inflammatory, anticancer, antiatherosclerotic, antimicrobial, or topically anesthetic effects are described in the literature [19–22]. With respect to prevention or therapy of the infections, antimicrobial activity is the most attractive mode. However, aside from a direct biostatic/biocidal effect, the impacts on the virulence factors or pathogenic behaviors of microorganisms (e.g., adhesion, biofilm formation, cell invasion, quorum-sensing) can be considered with regard to the activity of plant preparations. Rasamiravaka et al. [23] demonstrated that crude ethyl acetate and dichloromethane extracts from *Platostoma rotundifolium* as well as those from isolated terpenoids disrupted *Pseudomonas aeruginosa* biofilm without affecting bacterial viability. The inhibitory effect of the terpenoids on some virulence factors of these bacteria, as well as on the expression of quorum-sensing-regulated and -regulatory genes was observed [23]. Howell et al. [24] showed that proanthocyanidin-containing powder from cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) inhibited the adhesion of P-fimbriated uropathogenic *E. coli* to epithelial T24 cells. Moreover, urine collected from volunteers following the consumption of cranberry powder was shown to possess the same effect, although this was clearly dose-dependent [24]. In our previous studies, promising data were provided that pointed to a limitation of *S. aureus* aggregation in the plasma, adhesion to abiotic or extracellular matrix protein-coated surfaces, and biofilm formation caused by polyphenol-rich *Leonurus cardiaca* extract [25]; phenolic and nonpolar fractions separated from *Elaeagnus rhamnoides* leaf, twig, and fruit extracts [26]; *Pulmonaria officinalis* extract [27]. Based on data in the literature, one of the most promising mechanisms of antistaphylococcal action is the inhibition of *S. aureus* sortase A (SrtA) activity, which may affect the expression of a wide range of staphylococcal adhesins. The sortase enzymes are highly conserved membrane transpeptidases that catalyze the incorporation of cell surface proteins into the microbial cell wall. SrtA covalently binds surface staphylococcal proteins containing the C-terminal pentapeptide LPXTG motif (Leu-Pro-X-Thr-Gly, with X standing for any amino acid except for cysteine) to peptidoglycan precursors by cleaving the amide bond between threonine and glycine [28–30]. Since the most prominent staphylococcal surface adhesins are MSCRAMMs containing the LPXTG motif, SrtA represents a desirable target for drug development [30–33].

The subjects of the present research were the extracts obtained from *Viburnum opulus* L., known also as European guelder, European cranberry bush, water elder, rose elder, Rose Ebru, cherry-wood, crampbark, snowball tree, or gilaburu, which is a deciduous shrub that is native to Europe, north Africa, and north and central Asia. It belongs to the

Adoxaceae family (formerly Caprifoliaceae) [20,34,35]. The biological activity of *V. opulus* preparations seems to be very broad, including antioxidative effects, direct antimicrobial activity (biostatic effect against many pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as yeast from *Candida* sp.), hypoglycemic activity, hypotensive effect, the prevention of lipid uptake and adipogenesis, an anti-inflammatory effect, anticancer potential, osteogenic activity, uterine relaxant and antispasmodic properties, a diuretic effect, and preventive activity against crystal deposition and stone formation [35–44]. Thus, *V. opulus* is widely used in natural medicine for the relief of asthma, cold, fever, cough, nervousness, rheumatoid diseases, diabetic, menstrual cramps, uterine and urinary tract infections, and to treat high blood pressure [20,45]. Various parts of this plant are used, primarily the fruits (*Viburni fructus recens*) and bark (*Viburni opuli cortex*), which are believed to have anti-inflammatory, diaphoretic, and diuretic properties [46,47].

The aim of this study was to test the antistaphylococcal activity of originally obtained, well biochemically characterized acetonic (a), ethanolic (e), and water (w) extracts from fruits and bark of *Viburnum opulus* L. (VF and VB, respectively) to determine for the first time their effects on the adhesiveness and biofilm formation of *S. aureus*. The impacts of these extracts on staphylococcal virulence factors, such as SrtA activity, SpA surface expression, and the composition of bacterial cell membranes, that can determine the development of biofilm-associated infections, were assessed. A relationship between the observed mode of action of plant preparations and the actual adhesive properties of *S. aureus* cells was considered based on biofilm formation by staphylococci pre-exposed to the extracts. Assuming the final use of *V. opulus* extracts in vivo as pro-health dietary additives, their cytotoxicity to the human foreskin fibroblast line HFF-1 was first tested.

2. Results

2.1. Biochemical Characterization of *V. opulus* Fruit and Bark Extracts

The chemical compositions of crude extracts obtained from *V. opulus* fruit and bark are presented in Table 1. The total protein content varied from 8.64 to 16.13 mg/g, the sugar content varied from 162.38 to 674.69 mg/g, and the organic acid content was in the range of 4.26–86.36 mg/g. It was noted that *V. opulus* fruit extracts were superior to bark extracts in terms of sugar and organic acid contents. On the other hand, bark extracts were more abundant in phenolic compounds, including flavanols and proanthocyanidins. The total content of phenolics, determined by a spectrophotometric method with the Folin–Ciocalteu reagent, varied from 50.64 to 254.97 mg/g, the content of flavanols estimated with the vanillin reagent was from 11.82 to 97.79 mg/g, and the proanthocyanidins level was from 5.81 to 63.38 mg/g. Quantitatively, the main components of the fruit extracts were sugars, followed by organic acids and phenolic compounds, while phenolic compounds and sugars were dominant in the bark extracts. Of the three solvents used for extraction in this study, water showed the highest affinity for proteins, irrespective of plant materials, and for flavanols in the case of bark. The highest sugar and organic acid contents were found in the *V. opulus* extracts separated from both fruit and bark with 70% ethanol. The acetonic fruit and bark extracts were the richest in total phenolic compounds and proanthocyanidins. Quantitative analysis of *V. opulus* fruit and bark extracts using the UPLC method showed that the fruit extracts were dominated by hydroxycinnamic acids (60.37–65.64 mg/g), which accounted for almost 83% of the total content of the determined phenolic groups. In turn, in bark extracts flavanols (119.13–132.15 mg/g) accounted for an average of 74% of the total phenol content determined by the UPLC method. For comparison, flavonols had the lowest concentration in fruit extracts, and flavanols had the lowest concentration in bark extracts. Qualitative analysis of the *V. opulus* fruit and bark extracts by the UPLC-QTOF-MS technique revealed that the phenolic compound composition differed notably. Twenty-one phenolic compounds were detected in fruit extracts and 15 in bark extracts (Table S1 and Figure S1 in Supplementary Materials).

Table 1. Chemical composition of *V. opulus* fruit and bark extracts.

Components	Extraction Solvent	Fruit (VF)	Bark (VB)
Protein (mg/g)	70% acetone	11.38 ± 0.88 Aa	13.14 ± 0.90 Ab
	70% ethanol	9.63 ± 0.88 Aa	8.64 ± 0.01 Aa
	water	14.29 ± 0.15 Ab	16.13 ± 0.93 Bc
Sugars (mg/g)	70% acetone	606.87 ± 9.97 Bb	186.00 ± 0.52 Ab
	70% ethanol	674.69 ± 18.67 Bc	192.95 ± 1.45 Ac
	water	541.79 ± 30.58 Ba	162.38 ± 2.18 Aa
Organic acids (mg/g)	70% acetone	79.05 ± 1.24 Bb	6.26 ± 0.21 Ab
	70% ethanol	86.36 ± 0.48 Bc	7.24 ± 0.04 Ac
	water	71.51 ± 4.89 Ba	4.26 ± 0.09 Aa
Total phenolics ¹ (mg GAE/g)	70% acetone	80.47 ± 3.86 Ac	254.97 ± 1.54 Bc
	70% ethanol	71.76 ± 3.02 Ab	218.53 ± 2.07 Bb
	water	50.64 ± 1.53 Aa	171.02 ± 3.16 Ba
Flavanols ² (mg CE/g)	70% acetone	18.58 ± 0.19 Ac	91.51 ± 2.38 Ba
	70% ethanol	14.44 ± 0.73 Ab	96.69 ± 2.59 Bab
	water	11.82 ± 1.19 Aa	97.79 ± 3.71 Bb
Proanthocyanidins (mg CYE/g)	70% acetone	12.26 ± 0.46 Ac	63.83 ± 4.60 Bc
	70% ethanol	10.06 ± 0.46 Ab	56.67 ± 1.41 Bb
	water	5.81 ± 0.31 Aa	50.29 ± 1.80 Ba
Total hydroxycinnamic acids ⁴ (mg CA/g)	70% acetone	65.04 ± 0.49 Bb	26.20 ± 0.02 Ab
	70% ethanol	65.64 ± 0.29 Bb	26.65 ± 0.01 Ac
	water	60.37 ± 0.04 ba	14.24 ± 0.02 Aa
Total flavanols ⁴ (mg CE/g)	70% acetone	11.58 ± 0.07 Ac	132.15 ± 0.13 Bc
	70% ethanol	10.33 ± 0.07 Ab	127.25 ± 0.12 Bb
	water	8.84 ± 0.02 Aa	119.13 ± 0.08 Ba
Total flavonols ⁴ (mg QG/g)	70% acetone	0.56 ± 0.01 b	-
	70% ethanol	0.61 ± 0.01 c	-
	water	0.48 ± 0.01 a	-
Total flavalignans ⁴ (mg CIN/g)	70% acetone	1.13 ± 0.03 Aa	3.93 ± 0.03 Ba
	70% ethanol	1.92 ± 0.09 Ab	4.07 ± 0.10 Ba
	water	4.30 ± 0.04 Ac	6.04 ± 0.01 Bb
Total iridoids ⁴ (mg QR/g)	70% acetone	-	15.05 ± 0.23 a
	70% ethanol	-	15.44 ± 0.19 a
	water	-	23.66 ± 0.51 b

Values are presented as the means ± SD, $n = 3$, ¹ determined by the Folin–Ciocalteu method; ² determined by the vanillin method; ³ determined after acid depolymerisation; ⁴ determined by UPLC analysis; GAE—gallic acid equivalents; CE—(+)-catechin equivalents; CYE—cyanidin equivalents; CA—chlorogenic acid equivalents; QG—quercetin 3-glucoside equivalents; CIN—cinchonine equivalents; QR—quercetin 3-rutinoside equivalents. The means within the same column with different letters (a, b, c) or within the same row with different letters (A, B, C) are significantly different according to Tukey's test ($p \leq 0.05$).

2.2. Cytotoxicity of *V. opulus* Fruit and Bark Extracts

The HFF-1 cells were exposed to *V. opulus* fruit and bark extracts or chlorogenic acid as a reference compound used at a concentration range of 0.49–500 µg/mL for 24 h. The results are given as percentages of cell viability in comparison with untreated control cells (100% viability) and are presented in Figure 1. It was demonstrated that none of the preparations tested possessed cytotoxic activity up to the concentration of 500 µg/mL. The viability of HFF-1 cells did not fall below 80%. Lower cell viability ($84.33 \pm 4.1\%$) was observed after exposure to water extract from *V. opulus* bark (VBw) at a concentration of 3.9 µg/mL (Figure 1b). Interestingly, the use of this extract at the highest concentration (500 µg/mL), as well as acetonic and water extracts from the fruits (VFw, Figure 1a) and acetonic extract from *V. opulus* bark (VBa, Figure 1b), seemed to slightly support fibroblast growth.

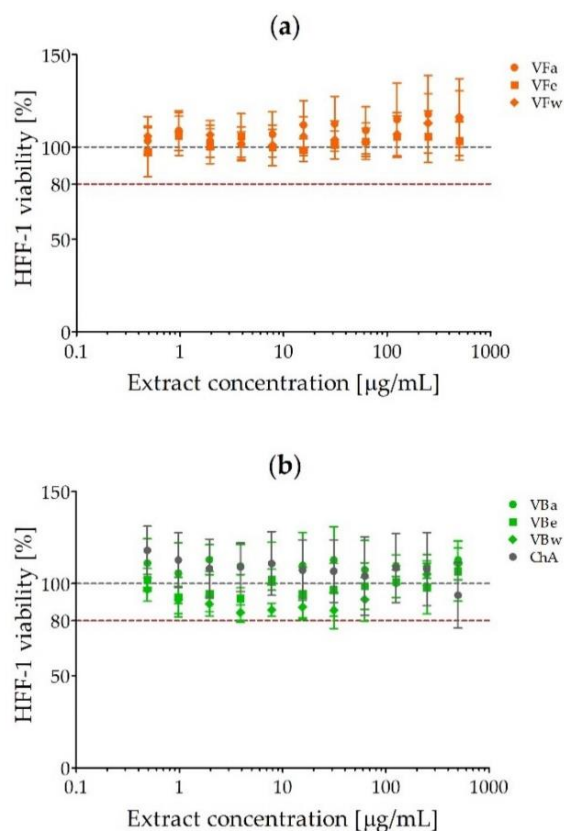


Figure 1. The cytotoxic activity of *V. opulus* extracts on the human foreskin fibroblast line HFF-1: (a) *V. opulus* fruit extracts (VF); (b) *V. opulus* bark extracts (VB); a/e/w—acetonc/ethanolic/water extract; ChA—chlorogenic acid.

2.3. Minimal Inhibitory/Bactericidal Concentration (MIC/MBC) of *V. opulus* Extract against *S. aureus*

The biostatic and biocidal activity of *V. opulus* extract against *S. aureus* ATCC 29213 was assessed using the broth microdilution method. The obtained results are presented in Table 2. Acetonc extract from *V. opulus* bark (VBa) expressed the strongest anti-staphylococcal activity with MIC = MBC = 1000 $\mu\text{g/mL}$. Thus, for the study, subinhibitory concentrations of the extracts were used (100 and 500 $\mu\text{g/mL}$) so as not to disturb microbial growth.

Table 2. MIC/MBC of the extracts from *V. opulus* fruits and bark, and activity of chlorogenic acid against *S. aureus* ATCC 29213.

Concentration [mg/mL]	VF _a	VF _b	VF _w	VB _a	VB _e	VB _w	ChA
MIC	2	2	>2	1	2	2	>2
MBC	>2	2	>2	1	>2	>2	>2

MIC—minimal inhibitory concentration; MBC—minimal bactericidal concentration; VF—*V. opulus* fruit extract; VB—*V. opulus* bark extract; a/e/w—acetonc/ethanolic/water extract; ChA—chlorogenic acid.

2.4. The Effect of *V. opulus* Extracts on SrtA Activity

Staphylococcal sortase A (SrtA) activity was evaluated outside bacterial cells using the SensoLyte 520 Sortase A Activity Assay Fluorimetric Kit. SrtA was exposed to *V. opulus* extracts or ChA at concentrations of 100 and 500 µg/mL. The results were collected after 30 min and 60 min of incubation of treated and control (untreated) SrtA with the substrate and are presented in Figure 2. The results are given as the percentage of SrtA activity calculated from relative fluorescence units (RFU) of test wells compared with the positive control (untreated SrtA), which was considered to represent 100% activity. All of the tested preparations inhibited SrtA activity. However, water extract from *V. opulus* fruits (VFw) showed one of the strongest effects and this was independent of concentration (46.7% and 57.9% of inhibition after exposure to 100 and 500 µg/mL, respectively; 30 min incubation with the substrate). Acetonic and ethanolic *V. opulus* bark extracts (VBa and VBe) possessed similar very strong inhibitory activity against SrtA, but this was limited to the higher concentrations (500 µg/mL) of these extracts (60.5% and 54.2% inhibition caused by VBa and VBe, respectively; 30 min incubation with the substrate). The prolonged 60 min SrtA incubation with the substrate did not change the observed effects (data not shown). Interestingly, chlorogenic acid alone had weaker inhibitory activity than *V. opulus* extracts.

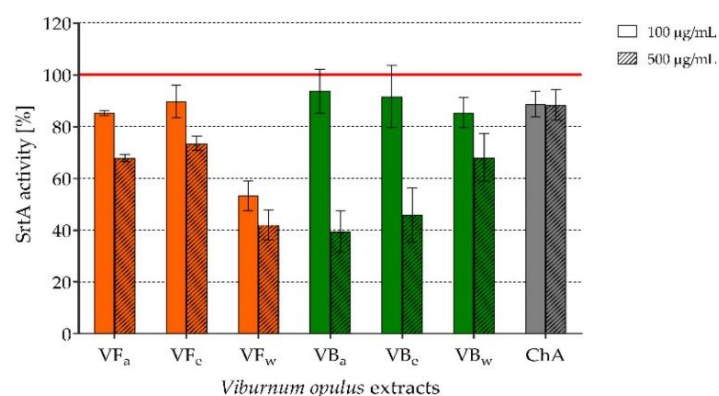


Figure 2. The effect of *V. opulus* extracts on staphylococcal sortase A (SrtA) activity after 30 min incubation with the substrate; VF—*V. opulus* fruit extract; VB—*V. opulus* bark extract; a/e/w—acetonic/ethanolic/water extract; ChA—chlorogenic acid.

2.5. Impact of *V. opulus* Extracts on SpA Expression

To determine the effect of the tested extracts on SrtA activity in living bacterial cells, the expression of SpA (staphylococcal surface protein anchored to peptidoglycan by sortase) was tested using FITC-labelled goat polyclonal anti-SpA antibodies. Based on SpA-related fluorescence, the percentages of protein A expression on *S. aureus* cells exposed to *V. opulus* extracts or ChA compared with that the control (untreated) cells, taken as possessing 100% SpA expression, were calculated. The obtained results are presented in Figure 3. Irrespective of the staphylococcal strain tested, *V. opulus* bark extracts (VB) were the most effective for the inhibition of SpA expression. All types of VB extract used at both concentrations (100 and 500 µg/mL) almost always significantly decreased protein A expression, but higher concentrations of VBa and VBe were extremely active, causing 92.3% and 90.3% inhibition of SpA expression, respectively, on *S. aureus* ATCC 29213 cells (Figure 3a), 78.3% and 78.0% inhibition on *S. aureus* ATCC 43300 cells (Figure 3b), and 94.9% and 90.3% inhibition on *S. aureus* H9 cells (Figure 3c). Quite strong inhibitory activity was also noted for acetonic and ethanolic *V. opulus* fruit extracts (VF_a and VF_e), although this was limited to higher concentrations and mainly occurred with *S. aureus* ATCC 29213 (Figure 3a).

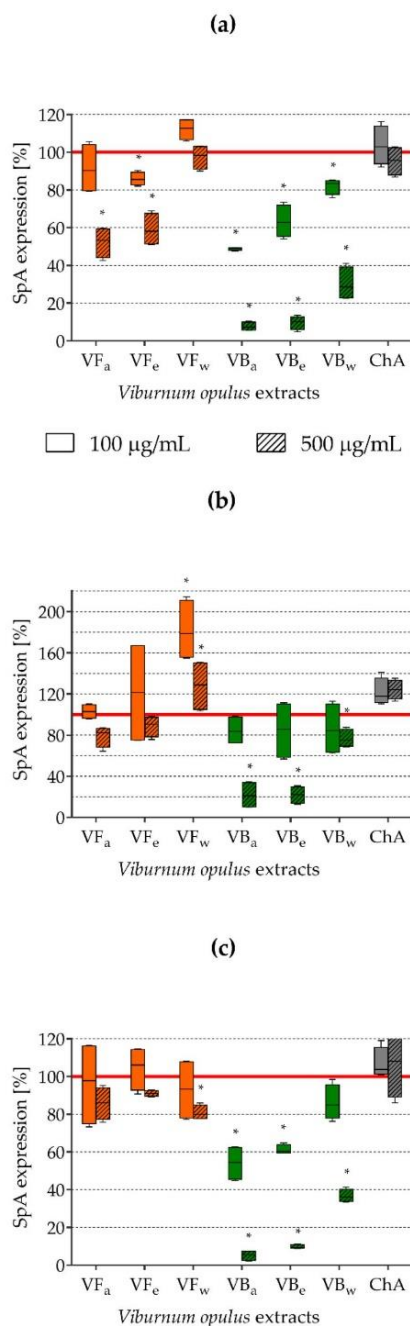


Figure 3. The effects of *V. opulus* extracts on staphylococcal protein A (SpA) expression on the bacterial cell surface: (a) *S. aureus* ATCC 29213; (b) *S. aureus* ATCC 43300; (c) *S. aureus* H9; VF—*V. opulus* fruit extract; VB—*V. opulus* bark extract; a/e/w—acetic/ethanolic/water extract; ChA—chlorogenic acid; * statistically significant differences compared to the control ($p \leq 0.05$).

2.6. The Effects of the Tested Extracts on the Compositions of Phospholipids and Fatty Acids in Staphylococcal Membranes

The impacts of *V. opulus* extracts on neutral lipid, phospholipid, and fatty acid types and their contents in the staphylococcal membrane were tested using LC-MS/MS and GC/MS techniques. Phosphatidylglycerols (PGs) were found to be the predominant lipid type in both *S. aureus* ATCC 43300 control and extract-treated cells. The PG content was from $71.33 \pm 0.21\%$ to $82.36 \pm 0.06\%$ (Figure 4). Among other lipids, lysyl-phosphatidylglycerols (LYSYL-PGs) and diglucosyldiacylglycerols (GLC2-DAGs) were also detected; however, their concentrations were 8.15 ± 0.22 – $21.75 \pm 0.45\%$ and 5.06 ± 0.35 – $9.90 \pm 0.17\%$, respectively (Figure 4). Comparing control and extract-treated cells, clear differences were observed only for *S. aureus* exposed to *V. opulus* bark extracts (VBa and VBe). Interestingly, the PG and GLC2-DAG contents increased in the membranes of staphylococci exposed to VBa and VBe in comparison to control cells, while, at the same time, the concentration of LYSYL-PG was significantly reduced (Figure 4). The analysis of the changes in content of specific types of lipids and fatty acids are presented in Figure S2 and Figure S3, respectively, in Supplementary Materials.

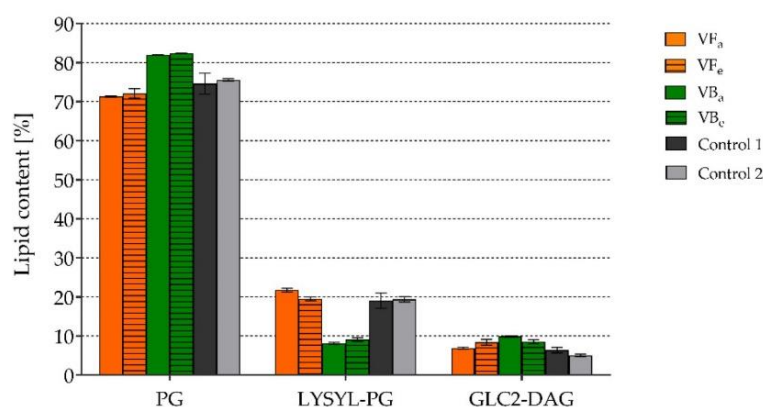


Figure 4. The effects of *V. opulus* extracts on the contents of the main classes of lipids in the cell membrane of *S. aureus* ATCC 43300; PG—phosphatidylglycerols; LYSYL-PG—lysyl-phosphatidylglycerols; GLC2-DAG—diglucosyldiacylglycerols; VF—*V. opulus* fruit extract; VB—*V. opulus* bark extract; a/e—acetonic/ethanolic extract; Control 1—bacteria in medium alone; Control 2—bacteria in medium containing 2.5% ethanol.

2.7. Assessment of Biofilm Formation by Staphylococci Pre-exposed to *V. opulus* Extracts

Attempts to limit staphylococcal adhesive properties using *V. opulus* extracts influencing SrtA activity and MSCRAMMs expression should be reflected in the process of biofilm formation. Therefore, biofilm biomass accumulation on abiotic polystyrene plates by staphylococci pre-exposed to *V. opulus* extracts was tested fluorometrically using the LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit. As demonstrated in Figure 5, biofilm formation by *S. aureus* pre-exposed to all types of tested extracts used at both lower (100 µg/mL) and higher concentrations (500 µg/mL) as well as by chlorogenic acid at a higher concentration was inhibited. The observed effects were statistically significant for *S. aureus* ATCC 43300 (Figure 5b) and *S. aureus* H9 (Figure 5c) but not for *S. aureus* ATCC 29213 (Figure 5a). VFe seemed to be the most potent biofilm inhibitor, decreasing *S. aureus* ATCC 43300 biofilm biomass by $20.4 \pm 1.3\%$ ($p = 0.000016$) and $19.4 \pm 6.5\%$ ($p = 0.00004$), and *S. aureus* H9 biofilm biomass by $23.2 \pm 4.8\%$ ($p = 0.000311$) and $19.5 \pm 2.4\%$ ($p = 0.000311$) when it was used at 100 and 500 µg/mL, respectively.

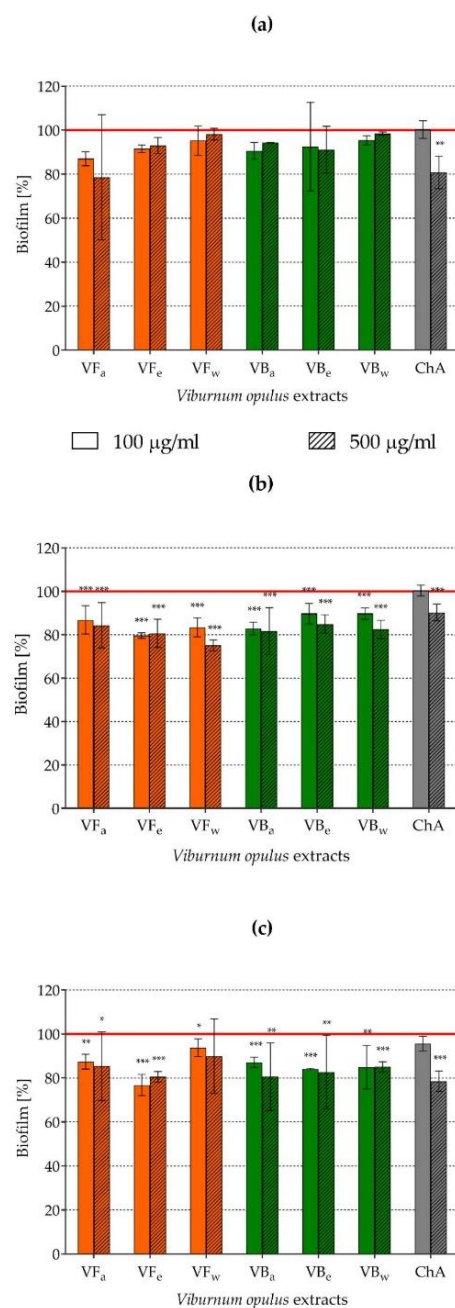


Figure 5. The effects of *V. opulus* extracts on the ability of staphylococci to form biofilm: (a) *S. aureus* ATCC 29213; (b) *S. aureus* ATCC 43300; (c) *S. aureus* H9; VF—*V. opulus* fruit extract; VB—*V. opulus* bark extract; a/e/w—acetonc/ethanolic/water extract; ChA—chlorogenic acid; statistically significant differences compared with the control: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

3. Discussion

In the present study, the effects of originally obtained acetonetic, ethanolic, and water extracts from *Viburnum opulus* fruits and bark on *S. aureus* virulence factors determining the development of staphylococcal biofilm-associated infections were investigated to establish the anti-infective potential of these extracts. The activity of *V. opulus*-derived products results mainly from the presence of phenolic compounds [20]. As reported by several authors, hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids (mainly chlorogenic, gallic and ferulic acid), flavanols (catechin, epicatechin, procyanidin), flavonols (quercetin and isorhamnetin glycosides), and anthocyanins (mainly cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-arabinosyl-glucoside, cyanidin 3-rutinoside, and cyanidin 3-sambubioside) have been identified in *V. opulus* fruits and fruit juice [35,48–51]. The qualitative composition of the extracts analyzed in the present study depended on the morphological part of the plant used for the extraction process, while the quantitative composition also depended on the type of extraction solvent used. The crude extracts tested here were highly heterogeneous and were composed of macronutrients (sugars, proteins, and organic acids) and a large variety of phytochemicals, such as phenolic compounds. The bark extracts exceeded the fruit extracts approximately three times, seven times, and more than six times in terms of the total phenolics, flavanols, and proanthocyanidins, respectively (Table 1). Eleven hydroxycinnamic acids, four flavonols, three flavanols, and three flavalignans were identified in *V. opulus* fruit extracts. As a comparison, five hydroxycinnamic acids, eight flavanols, and two flavalignans were identified in *V. opulus* bark extracts. A previous study [51] showed that hydroxycinnamic acids are dominant in *V. opulus* fruits, while flavanols are dominant in bark. The results obtained for the extracts tested in the present study are consistent with the cited data. Hydroxycinnamic acids comprised almost 83% of the total content of the different phenolic groups in fruit extracts, while flavanols accounted for an average of 74% of the total phenols determined by the UPLC method in bark extracts. Chlorogenic acid, as the compound present in all tested extracts, was used as a reference compound in the present study. Data on the compositions of individual phenolic compounds are greatly important, because their structures significantly affect their properties. All *V. opulus* extracts tested were not cytotoxic to human fibroblasts up to a concentration of 500 µg/mL. However, considering the usually weak bioavailability of phenolic compounds after oral administration and their poor tissue distribution, we decided to test the effects when the extracts were used at a low concentration of 100 µg/mL. It is also worth emphasizing that the MIC/MBC of these extracts against staphylococci did not go below 1000 µg/mL (Table 2); thus, the concentrations chosen for the research did not disturb bacterial growth.

As we explained before, both the initiation and course of staphylococcal infections strongly depend on the adhesive properties of these bacteria. Therefore, we assumed that the inhibition of the expression of bacterial adhesins could limit staphylococcal adhesion and biofilm formation and thus prevent the development of *S. aureus* infections. Sortase A (SrtA), a membrane-localized cysteine transpeptidase, which catalyzes the covalent bonding of staphylococcal surface adhesive proteins, called MSCRAMMs, to peptidoglycan, seems to be a good candidate for use as an antimicrobial drug target [7,33]. It has been demonstrated that a lack of SrtA causes the defective anchoring of about 20 staphylococcal surface proteins (including ClfA and SpA), which may reduce *S. aureus* binding to the von Willebrand factor (vWF), the vWF-binding protein (vWbp), and finally to endothelial cells through protein bridges [7]. Based on data presented in the literature, in which some secondary plant metabolites, including flavonols (e.g., morin, myricetin, and quercetin) as well as chalcones (intermediate products in flavonoid biosynthesis), are shown to exhibit strong sortase inhibitory activity [30,31], we hypothesized that *V. opulus* extracts, which are rich in phenolic compounds, may also have such an effect. Here, it was demonstrated that all of the tested extracts inhibited SrtA activity, but the strongest effect (above 50% of inhibition) was associated with the water extract from *V. opulus* fruits (VFw) as well as acetonetic and ethanolic bark extracts (VBa and VBe) used at a concentration of 500 µg/mL (Figure 2). The use of chlorogenic acid alone as a reference compound was associated with

inhibitory activity, although this was not as strong as that of the extracts, which indicates the possibility of a synergistic effect among their various compounds. Wang et al. [52] showed that chlorogenic acid binds to the active site of SrtA and thus blocks the attachment of the substrates containing the LPXTG motif. Five other hydroxycinnamic acids—caffeic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, and ferulic and isoferulic acids—were also identified as potent inhibitors of this Gram-positive bacteria transpeptidase. Chlorogenic acid exhibited the best sortase-inhibitory activity with an IC_{50} of 34 $\mu\text{g/mL}$, followed by caffeic acid (IC_{50} 155 $\mu\text{g/mL}$), ferulic acid (IC_{50} 257 $\mu\text{g/mL}$), and neo- and cryptochlorogenic acids with IC_{50} values of 300 $\mu\text{g/mL}$ [53]. All three chlorogenic acids were identified in both *V. opulus* fruit and bark extracts, while caffeic acid was only present in fruit extracts (Table S1 in Supplementary Materials). The inhibitory activity of fruit extracts against SrtA could have also resulted from the presence of flavonols, which were not found in bark extracts. According to Kang et al. [31], quercetin reduced the activity of SrtA by half at a concentration of 52.70 μM . Four quercetin glycosides were identified in all *V. opulus* fruit extracts. Of course, the addition of a sugar molecule to aglycone can influence the inhibitory activity of quercetin. However, Liu et al. [32] observed that quercitrin (quercetin 3-rhamnoside), present in *V. opulus* fruit extracts, could inhibit the catalytic activity of SrtA by binding directly to the active region of the enzyme.

Since the impact of *V. opulus* extracts on SrtA activity was tested on commercially available free enzyme, to test the effect on real cell-associated enzyme we also studied the expression of staphylococcal protein A (SpA) on the surface of *S. aureus* cells pre-exposed to the tested extracts. SpA contains the LPXTG motif; thus, its surface expression in metabolically active bacteria depends mainly on SrtA activity [29]. Of course, it is possible that compounds that are able to interfere with protein synthesis (e.g., antibiotics such as macrolides, tetracyclines, and aminoglycosides) [54] and the general metabolic activity of bacteria (biostatic compounds) may also limit the surface expression of bacterial proteins. However, in a preliminary study, we determined the minimum inhibitory/biocidal/fungicidal concentrations (MIC/MBC/MFC) of the tested *V. opulus* extracts against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as fungi, and their MIC/MBC against *S. aureus* did not go below 1 mg/mL (Table 2). Thus, the sub-inhibitory concentrations of *V. opulus* extracts used in the present research avoided any metabolic influences. The results obtained for SpA expression on the surface of staphylococcal cells corresponded well with free SrtA activity. We demonstrated that all types of VB extract (especially VBa and VBe) significantly reduced SpA expression on the surfaces of all three tested *S. aureus* strains (reference ATCC 29213, ATCC 43300, and clinical H9). The percentage of inhibition of SpA expression achieved was 78.0–94.9% for VB extracts used at a concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 3). The obtained results are relevant in the context of staphylococcal infections, since SpA participates not only in the adhesion of *S. aureus* to surfaces and host cells, aggregation and biofilm formation, it is also involved in the evasion of host defense mechanisms. SpA is able to bind to immunoglobulins (nonspecific reaction), vWF, and complement proteins, and through binding to cellular receptors such as Fc γ R, TNFR1, and GPIIb α , as well as the activation of MAPK signaling, SpA induces the production of pro-inflammatory cytokines and participates in the development of pathological changes, e.g., during infective endocarditis, chronic wound infections, or osteomyelitis [29,55–57]. Moreover, its ability to bind Fc γ of IgG (type 1, 2, 4) and the V_H3 heavy chains (Fab region) in IgG, IgM, or IgA plays an important role in host immune response evasion by blocking so-called opsonophagocytosis and a complement activation, as well as by stimulating the clonal expansion of lymphocytes B (Spa acts as superantigen), leading to their apoptosis [29,58]. Thus, the impressive inhibition of SpA expression on the surface of *S. aureus* cells demonstrated here using *V. opulus* extracts seems to be a promising way to prevent staphylococcal infections. Interestingly, chlorogenic acid used alone did not exhibit such inhibitory activity, which corresponds well with its much weaker impact on SrtA activity than the effect demonstrated for *V. opulus* extracts. ChA in the literature is presented as one of the main polyphenol compounds in the human diet. A great number of pro-health

activities of ChA, including antioxidant, anti-inflammatory, antilipidemic, antidiabetic, antihypertensive, anticancer, antineurodegenerative, and antimicrobial effects have been described based on both in vitro and in vivo studies [59]. ChA antimicrobial activity, the most important, due to the purpose of this study, is very diverse with MIC values against *S. aureus* ranging from 0.016 to even 10 mg/mL, depending on the tested strain [59,60]. In the present research, the MIC and MBC values of ChA were above 2 mg/mL. Considering all of our results, it can be assumed that the antimicrobial activity of ChA is a consequence of its direct biostatic/biocidal effects, rather than its inhibitory impacts on microbial virulence factors, such as enzymatic activity or adhesin expression. The exact mechanism of ChA antimicrobial activity is not fully understood, but the inhibition of *S. aureus* proliferation and damage to the bacterial cell membrane followed by its increased permeability leading to microbial cell death are indicated as being the most likely modes of ChA action [59,61].

Bacterial membranes are the structures responsible for cell homeostasis, interaction with external factors and participation in microbial response to environmental changes; thus, they cannot be stable structures. Their lipid composition is constantly being modified depending on the living conditions, such as temperature, osmolarity or pH [62,63]. There is no doubt that modifications to the membrane composition and, thus, cell surface stabilization, membrane-associated protein topology, surface hydrophobicity and charge, and finally bacterial cell resistance [62–64] play an important role in microbial adhesion and biofilm formation [25]. Moreover, SrtA is a membrane-localized enzyme, so these changes may also determine its expression and activity. Therefore, the effects of *V. opulus* extracts used at 500 µg/mL on the profile of lipids and fatty acids in the *S. aureus* ATCC 43300 cell membrane were assessed using qualitative and quantitative tests. According to literature data, phosphatidylglycerols (PG) are predominant in *S. aureus* membranes; however, other phospholipids, such as lysyl-phosphatidylglycerols (LYSYL-PG) and diacylglycerols, as well as other glycosylated or conjugated lipids, such as diglucosyldiacylglycerols (GLC2-DAG) and monoglucosyldiacylglycerols, are also present [62,63]. Our results confirm this, since the PG content in both control and extract-treated staphylococcal cells was above 70%, while the content of LYSYL-PG and GLC2-DAG did not exceed 22% and 10%, respectively. By analyzing the impacts of *V. opulus* extracts on the general composition of the staphylococcal membrane, clear differences were only observed for *S. aureus* exposed to bark extracts (VBa and VBe). Both extracts increased PG and GLC2-DAG contents and caused a significant reduction in the LYSYL-PG content, compared with that in the control cells. PG is a precursor of LYSYL-PG, and, in a reaction mediated by a membrane protein called the multiple peptide resistance factor F (MprF), an aminoacyl group from lysine-tRNA is transferred to PG [62–64]. This reaction stabilizes the microbial membrane and modulates its charge, since anionic PG is converted to cationic LYSYL-PG. The described modification is recognized as one of the staphylococcal virulence factors that prevents membrane perturbation in the presence of cationic antimicrobials, such as antimicrobial peptides; thus, it is an important component of human and animal innate immunity or cationic antibiotics (e.g., daptomycin) [25,63–65]. In this study, we observed an increased content of PG but not LYSYL-PG in the membranes of staphylococci exposed to VBa and VBe, which may indicate the ability of these extracts to block a transformation of PG to LYSYL-PG. Since the single-nucleotide polymorphisms in *mprF* correlated with the changes in the LYSYL-PG profile were demonstrated for clinical *S. aureus* strains exposed to daptomycin [64], the influence of *V. opulus* extracts on MprF activity could be a possible mechanism responsible for the inhibitory effect observed in our study. Although this hypothesis needs to be confirmed in future, *V. opulus* bark extracts, in contrast to the previously tested *Leonurus cardiac* extract [25], seem to have additional promise as preparations to prevent the activation of some mechanisms of staphylococcal resistance.

We assumed that exposure to *V. opulus* fruits and bark extracts that influence SrtA activity, MSCRAMMs expression, and the lipid composition of *S. aureus* cell membranes would change the adhesive properties of those bacteria and, thus, the process of biofilm formation. Indeed, differences in biofilm biomass between control and extract-exposed

S. aureus were observed, but the significant inhibitory effect mainly concerned *S. aureus* ATCC 43300 and did not exceed 24%. This means that staphylococci, despite their exposure to *V. opulus* preparations disturbing some mechanisms responsible for bacterial adhesion, are still able to form a biofilm. Staphylococci are known to be extremely efficient at aggregation and biofilm formation, in which many different factors participate. The general steps of building these complex structures are similar in all bacteria, including staphylococci, and comprise microbial adhesion (classic settled biofilms) or cell aggregation (free-floating biofilm aggregates), multiplication, microcolony formation and extracellular polymeric substances (EPS) production, and finally, biofilm maturation (phenotypic and functional cell differentiation) and dispersion (detachment of single cells or small aggregates) [9,12,13]. The initial adhesion of bacteria mediated by unspecific physico-chemical interactions, such as electrostatic bonds, hydrophobic interactions, or van der Waals forces, is then strengthened by specific adhesins. Staphylococci possess a wide range of surface adhesins, including the previously described MSCRAMM proteins that are covalently linked to peptidoglycan subunits thanks to SrtA activity; nevertheless, polysaccharide intercellular adhesin (PIA), being a homopolymer of partially deacetylated β -1,6-linked N-acetyl-glucosamine (PNAG), plays a pivotal role in cell-to-cell interactions, leading to the accumulation of staphylococcal biomass. PIA/PNAG is encoded by the intercellular adhesion operon *ica*, which contains *icaADBC* genes [12,54,66,67]. Thus, the inhibition of SrtA activity limiting the expression of surface adhesive proteins by *V. opulus* extracts demonstrated in this study may not be as strongly reflected in biofilm formation by staphylococci, as expected. Moreover, *S. aureus* strains that do not possess the *ica* operon are also able to form a biofilm. It has been revealed that some components or products of staphylococcal cells, such as teichoic acids, adhesive proteins (mainly SasG and Bap), extracellular DNA (eDNA), β -hemolysin, or even bacterial metabolites may participate in bacterial adhesion, forming a framework that stabilizes staphylococcal biofilm and also replace PIA/PNAG in its role as a mediator of intercellular interactions [12,54,66,68,69]. Thus, *V. opulus* fruit and bark extracts may limit biofilm formation by staphylococci, but the effect is strongly strain-dependent. Moreover, full inhibition of the development of these structures cannot be assumed using *V. opulus* extracts as the only preventive preparations. Since these conclusions were drawn on the basis of in vitro research, in vivo studies on animal models of staphylococcal infections with *V. opulus* extracts as dietary supplements should be done in the future.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material Preparation and Chemical Analysis

4.1.1. Standards and Reagents

Hypergrade acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany) and formic acid (Sigma, Steinheim, Germany) were used for LC-MS. Reference compounds were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) ((+)-catechin, caffeic acid, (–)-epicatechin, gallic acid, quercetin 3-rhamnoside, and quercetin 3-rutinoside), Extrasynthese (Lyon, France) (chlorogenic acid and quercetin 3-glucoside), and Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany) (neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, procyanidin B1 and B2, and procyanidin C1). Ultrapure water (SimplicityTM Water Purification System, Millipore, Marlborough, MA, USA) was used to prepare all solutions.

4.1.2. Extract Preparation

Commercially available dried bark and fruits of *V. opulus* were purchased from “Farm Vit” (Szczecin, Poland) and “Natura Wita Ltd.” (Kopernia, Poland), respectively. Powdered plant materials (coffee grinder) were extracted with 70% acetone or 70% ethanol (1:20, w/v) on a magnetic stirrer for 3 h at room temperature. Then, the mixtures were incubated for 18 h at room temperature in the dark followed by the re-extraction on a magnetic stirrer for 3 h. After centrifugation at 5000 rpm for 10 min (MPW-351R, MPW Med. Instruments, Warszawa, Poland) the supernatants were evaporated at 40 °C (vacuum rotary evaporator

RII, Büchi, Switzerland) in order to remove organic solvents. The aqueous phases were lyophilized to obtain the ethanolic extract and acetonic extract. Aqueous extracts of *V. opulus* bark and fruit were obtained by mixing powdered plant materials (10 g) with 200 mL of boiling water. Then, the mixture was simmered for 5 min and kept at room temperature for 15 min. The supernatants obtained after centrifugation were concentrated and then lyophilized. As a result of the described procedure, six extracts were obtained, including three from bark (VBa, VBe, VBw) and three from fruit (VFa, VFe, VFw). The abbreviations (a), (e), and (w) denote acetonic, ethanolic, and water extracts, respectively. For chemical analysis, stock solution of each extract was prepared at a concentration of 25 mg/mL in water, followed by centrifugation before analysis.

4.1.3. Analysis of Chemical Composition of Extracts

The crude protein content was analysed by the Kjeldhal method with a conversion factor of 6.25. Total sugar and organic acid contents in the extracts were determined by the HPLC system with a refractive index (RI) detector and a photodiode array detector (210 nm) connected in series (Waters Corp., Milford, MA, USA), as described previously [51]. The total phenolic content of the extracts was determined spectrophotometrically with Folin–Ciocalteu reagent and expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of extract (mg GAE/g). The total proanthocyanidin content was determined after acid depolymerisation in butanol–HCl solution with the corresponding anthocyanidins and is expressed as cyanidin equivalents per gram of extract (CYE/g). The analytical procedures for determining the contents of total phenolic compounds and proanthocyanidins were described in previous work [51]. The total flavanol content was estimated using the vanillin–sulfuric acid method, and results are expressed as milligrams of (+)-catechin equivalents per gram of extract (CE/g) [70].

4.1.4. Analysis of Phenolic Compounds Using Ultra-Performance Liquid Chromatography–Quadrupole–Time of Flight Mass Spectrometry (UPLC–QTOF–MS)

Phenolic compounds were identified using the Acquity ultraperformance liquid chromatography (UPLC) system coupled with a quadrupole-time of flight mass spectrometry (Q-TOF-MS) instrument (Waters Corp., Milford, MA, USA) equipped with an electrospray ionization (ESI) source. Separation of individual phenolics was carried out using a Acquity UPLC[®] HSS T3 C18 column (150 × 2.1 mm², 1.8 µm; Corp., Milford, MA, USA) at 30 °C according to the method presented by Zakłós-Szyda et al. [44] with some modifications. The mobile phase was a mixture of 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B). The gradient program was as follows: initial conditions—99% (A), 12 min 65% (A), 12.5 min 0% (A), 13.5 min 99% (A). The flow rate was 0.45 mL/min, and the injection volume was 5 µL. The mass spectrometer was operated in negative mode for a mass range of 150–1500 Da, the fixed source temperature was 100 °C, the desolvation temperature was 250 °C, the desolvation gas flow was 600 L/h, the cone voltage was 45 V, the capillary voltage was 2.0 kV, and the collision energy was 50 V. Leucine enkephalin was used as a lock mass. The instrument was controlled by Mass-Lynx[™] V 4.1 software. Phenolic compounds were identified using their UV-Vis characteristics. MS and MS² properties were determined using data gathered in house and from the literature. Based on the qualitative analysis of phenolic compounds, the total contents of flavanols, flavonols, flavalignans, hydroxycinnamic acids and iridoids were calculated. The contents are expressed in mg/g of extract for equivalents of (+)- catechin, quercetin 3-glucoside, cinchonine, chlorogenic acid, and quercetin 3-rutinoside, respectively.

4.2. Stock Solutions for Biological Tests

Stock solutions of *V. opulus* extracts (10 mg/mL or 50 mg/mL) were prepared in sterile-filtered water (the extracts from fruits, water extract from bark) or 50% ethanol (ethanolic and acetonic extracts from bark) and kept frozen at −20 °C. Further dilutions of each stock were prepared in a medium adapted to the requirements of the test. Since ethanol was used as initial solvent for ethanolic and acetonic bark extracts, finally reaching

the highest concentration of 2.5% in chosen samples, two types of control sample were prepared for each experiment: bacterial/eukaryotic cells in medium alone (control 1) or in medium containing 2.5% ethanol (control 2). The reference compound, chlorogenic acid (SERVA Feinbiochemica, Heidelberg, Germany), was dissolved in 50% ethanol and diluted in the appropriate medium.

4.3. Cytotoxicity of *V. opulus* Fruit and Bark Extracts

A monolayer of human foreskin fibroblasts (HFF-1, ATCC-SCRC-104, LGC Standards, Lomianki, Poland) was cultured as previously described [26]. Briefly, a detached cell suspension (2.5×10^5 cell/mL) was seeded (100 μ L) into 96-well tissue culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark) for 24 h at 37 °C/5%CO₂. The culture medium was replaced with 100 μ L of medium containing *V. opulus* extracts at a concentration range of 0.49–500 μ g/mL for 24 h. Appropriate growth controls (the cells in culture medium alone and in medium containing 2.5% ethanol) were set up at the same time. The cytotoxic activity of the extracts was measured by MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] reduction assay. After exposure, the medium containing extracts were removed, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS; BioWest, Nuaille, France), and then fresh cell culture (100 μ L/well) and MTT (1.5 mg/mL, 50 μ L/well) were added for 2 h of incubation under the above conditions. Finally, the MTT solution was removed and replaced with 75 μ L/well of 20% sodium dodecyl sulfate (SDS; Sigma, St. Louis, MO, USA) for 24 h (room temperature) to dissolve the blue formazan produced by living cells. The absorbance of the samples was read at 550 nm with a microplate reader (Victor2, Wallac, Turku, Finland), and the percentage of viable cells was calculated based on the absorbance of appropriate growth controls considered to represent 100% cell viability. The experiment was carried out twice in duplicate each.

4.4. Staphylococcal Strains and Culture Conditions

The reference strains *S. aureus* ATCC 29213 (methicillin-sensitive *S. aureus*—MSSA) and *S. aureus* ATCC 43300 (methicillin-resistant *S. aureus*—MRSA), as well as the clinical isolate *S. aureus* H9 (MRSA), were used in the study. Bacteria from the stock suspensions kept frozen at −80 °C were grown for 24 h at 37 °C in tryptic soy agar (TSA; BTL Sp. z o.o., Łódź, Poland) to check the typical morphology and purity. Before setting up each experiment, cultures were freshly prepared in tryptic soy broth (TSB; BTL Sp. z o.o., Łódź, Poland) with 0.25% glucose (TSB/Glu) (for 24 h at 37 °C). The suspension density was adjusted to the appropriate value for the given test.

4.5. Minimal Inhibitory/Bactericidal Concentration (MIC/MBC)

The MICs of *V. opulus* extracts tested at a final concentration range of 15.6–2000 μ g/mL against *S. aureus* ATCC 29213 were determined with a microdilution broth assay according to the EUCAST recommendations [71]. The MIC was defined as the lowest concentration of the extract that inhibited bacterial growth after 24 h of incubation at 37 °C compared to a positive growth control. If the MIC was established, 10 μ L from the wells marked as having the MIC and from the wells having higher concentration or if the MIC was above the tested range, 10 μ L from two wells with the highest concentration of the extract, were subcultured in TSA for 24 h at 37 °C to evaluate the MBC value. The MBC refers to the lowest concentration of the extract required to kill 99.9% of the bacteria.

4.6. SrtA Activity Testing

The effect of *V. opulus* extracts or chlorogenic acid (ChA; reference compound) used at 100 μ g/mL and 500 μ g/mL on SrtA activity was evaluated using Sensolyte 520 Sortase A Activity Assay Kit Fluorimetric (AnaSpec Inc., Fremont, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. SrtA was exposed to the extracts/ChA for 10 min at 37 °C before substrate adding. Untreated SrtA as positive control and substrate alone was added. After 30 and 60 min ongoing incubation with the substrate the fluorescence of test

and control samples at $490_{\text{ex}}/520_{\text{em}}$ was read using a Spectra Max i3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) in the Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques at the Faculty of Biology and Environmental Protection University of Lodz. The fluorescence reading from the substrate alone was used as a background and was subtracted from the fluorescence of the samples. The results are given as the percentage of SrtA activity calculated from relative fluorescence units (RFU) of test wells compared to the positive control of untreated SrtA, taken as 100% activity. The experiment was repeated twice.

4.7. Assessment of SpA Expression

The reference *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300, and clinical *S. aureus* H9 strain suspensions ($\text{OD}_{535} = 0.5$) were exposed to *V. opulus* extracts or ChA at concentrations of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (sample total volume 1 mL) for 24 h at 37 °C on an orbital shaker type TR-250/CH-4103 (Bottmingen, Switzerland). Bacterial suspensions in TSB/Glu medium alone served as the positive control. After incubation, bacteria were centrifuged at 3000 rpm for 10 min, washed twice with PBS (BioWest, Nuaille, France) in a final volume of 5 mL, and finally, resuspended in 1 mL of PBS. To exclude the possible influence of a rinsing step on the number of bacterial cells, new suspensions were prepared at $\text{OD}_{535} = 1.5$. FITC-labelled goat polyclonal anti-SpA antibodies (Ab; GeneTex Inc., Irvine, CA, USA) diluted 1:100 in PBS with 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma, St. Louis, MO, USA) were used for the detection of SpA expression on bacterial cells (the final Ab dilution 1:500). The SpA-related fluorescence was measured by Victor2 (Wallac, Turku, Finland), and based on relative fluorescence units (RFU), the percentage of SpA expression in comparison with that of the positive control (untreated bacteria taken as 100% SpA expression) was calculated. Two independent experiments were run for each strain in duplicate.

4.8. Extraction and Examination of the Composition of Glycolipids, Phospholipids, and Fatty Acids in Staphylococcal Membranes

4.8.1. Chemicals

Standards of phospholipids were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). The other chemicals were acquired from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany) and Avantor (Gliwice, Poland). All chemicals used were high-purity-grade reagents.

4.8.2. Exposure of *S. aureus* to *V. opulus* Extracts

A suspension of *S. aureus* ATCC 43300 ($\text{OD}_{535} = 1.8$) in TSB/Glu prepared from fresh 24 h old culture was added (6 mL) to bacteriological Falcon-like tubes (Medlab, Raszyn, Poland) and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Bacteria in the sediment were then exposed to acetonic and ethanolic extracts from *V. opulus* fruits and bark at a concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tested samples) for a 24 h at 37 °C with gentle shaking. Bacteria in culture medium alone (TSB/Glu) were prepared as control 1 and bacteria in culture medium TSB/Glu containing 2.5% ethanol were used as control 2. After exposure, the samples were centrifuged as described above, bacteria were suspended in 6 mL TSB/Glu, and each sample was added (2 mL) to three Eppendorf tubes (Medlab, Raszyn, Poland) for lipid and fatty acid extraction and analysis. The whole experiment was conducted twice.

4.8.3. Extraction of the Lipids

Lipids from *S. aureus* cells were extracted according to our previous method [25] with modifications. The bacterial biomass was moved into 2 mL Eppendorf tubes containing glass beads, 0.33 mL methanol, and 0.66 mL chloroform. Then, the samples were homogenized for 1 min with the use of FastPrep (MP Biomedicals, Shanghai, China). After, the samples had been centrifuged ($2000 \times g$, 2 min), the supernatants were transferred into 1.5 mL Eppendorf tubes, and 0.2 mL of saline was added. The lower layer of each sample was collected and evaporated. The obtained extracts were dissolved in 0.75 mL methanol.

4.8.4. Staphylococcal Lipid Analysis

The lipid content was determined using an Agilent 1200 HPLC (Santa Clara, CA, USA) and a 4500 QTRAP mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA) equipped with an ESI source operated in positive or negative ion mode. Ten microliters of the lipid extract were injected onto a Kinetex C18 column (50 mm × 2.1 mm, particle size: 5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) at a flow rate of 0.5 mL/min and a temperature of 40 °C. The gradient elution was applied with mobile phases of water (A) and methanol (B) (both consisted of 5 mM ammonium formate). The solvent gradient was initiated at 70% B, increased to 95% B over 1.25 min, and maintained at 95% B for 6 min before returning to the initial solvent composition over 3 min. The data analysis was performed with Analyst™ v1.6.2 software (Sciex, Framingham, MA, USA).

At first, the untargeted approach was performed with precursor ion scanning at m/z 153 (in negative mode) or neutral loss scanning of m/z 300 (in positive ion mode) to detect PG and Lysyl-PG, respectively, triggering enhanced product ion experiments. Sodium adducts of glycolipids were searched using enhanced mass spec experiments. On the basis of the untargeted analysis, a comprehensive list of the multiple reaction monitoring (MRM) transitions was generated, and a quantitative analysis was performed.

4.8.5. Staphylococcal Fatty Acid Analysis

To Eppendorfs with bacterial lipid extract (0.375 mL), toluene (0.05 mL) and 8.0% HCl solution in methanol (0.075 mL) were added [72]. The tubes were vortexed and then incubated at 45 °C for 16 h. After cooling to room temperature, 0.5 mL hexane and 0.5 mL water were added for the extraction of fatty acid methyl esters (FAMES). One microliter of each extract sample was analyzed using a gas chromatography system (Agilent Model 7890 gas chromatograph, equipped with a 5975C mass detector). The separation was carried out in a HP 5 MS methyl polysiloxane capillary column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 mm ft). The column temperature was maintained at 60 °C for 3 min, and then increased to 212 °C at a rate of 6 °C/min, followed by an increase to 245 °C at a rate of 2 °C/min, and finally, to 280 °C at a rate of 20 °C/min for 10 min. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The injection port temperature was 250 °C. Bacterial fatty acids were identified by comparison with the retention times of the authentic standards (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), and the results are expressed as a percentage of the total amount of fatty acids.

4.9. Assessment of Biofilm Formation by *S. aureus*

The suspensions of all tested bacteria at a density of $OD_{535} = 0.5$ in TSB/Glu were exposed to *V. opulus* extracts or chlorogenic acid (reference compound) at final concentrations of 100 and 500 µg/mL (sample total volume 1 mL) for 24 h at 37 °C on an orbital shaker (TR-250/CH-4103, Bottmingen, Switzerland). Control bacteria were incubated in TSB/Glu alone. After incubation, the bacteria were harvested by centrifugation at 3000 rpm/10 min, washed twice with PBS in a volume of 5 mL, and finally resuspended in 1 mL of TSB/Glu. To exclude possible influence of a rinsing step on the number of bacterial cells, new suspensions at a density of $OD_{535} = 0.9$ were prepared in TSB/Glu and seeded (100 µL) into the wells of 96-well polystyrene culture microtiter plates (Nunc, Denmark) for 24 h at 37 °C to develop a biofilm. Proper negative control (medium alone) and positive controls (bacteria untreated with the extracts) were included. The effects of *V. opulus* extracts were assessed with the LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to the manufacturer's recommendations. Finally, the fluorescence of the samples was measured at 485_{ex}/535_{em} nm for green Syto-9 and 485_{ex}/620_{em} nm for red PI using a Spectra Max i3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) in the Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques at the Faculty of Biology and Environmental Protection University of Lodz. Each variant used for the experiment was tested twice in quadruplicate. The results are given as the percentage

of biofilm biomass calculated from the mean fluorescence values $\pm$ SD of test wells in comparison with the positive control (untreated bacteria, taken as 100% biofilm).

4.10. Statistics

Data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). The differences in biochemical composition of the extracts were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. The differences in biological activity of the extracts were evaluated using the Mann–Whitney *U* test and one-way ANOVA. STATISTICA 13.1 (StatSoft Polska Sp. Z o.o., Kraków, Poland) software was used for the calculations. Differences with $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

5. Conclusions

In summary, the consumption of *V. opulus* fruit and bark extracts may be beneficial for the prevention of staphylococcal infections due to their negative impacts on some *S. aureus* virulence factors, such as SrtA activity, SpA expression, and cell membrane modification conditioning proper homeostasis and increased resistance. These extracts may also limit biofilm formation by staphylococci. Nevertheless, full inhibition of the development of these structures cannot be assumed using *V. opulus* extracts as the only preventive preparations. Although we have recognized several limitations of the present study, the results obtained reveal novel insights regarding the pro-health use of *V. opulus* extracts to prevent staphylococcal infections.

Supplementary Materials: The following are available online. Figure S1: UPLC chromatograms of phenolic compounds in *V. opulus* fruit or bark ethanolic extract at 280 nm, Figure S2: The effects of *V. opulus* extracts on the contents of specific types of lipids in the cell membrane of *S. aureus* ATCC 43300: (a) PG—phosphatidylglycerols; (b) LYSYL-PG—lysyl-phosphatidylglycerols; (c) GLC2-DAG—diglucoyl-diacylglycerols, Figure S3: The effects of *V. opulus* extracts on the contents of specific types of fatty acids in the cell membrane of *S. aureus* ATCC 43300, Table S1: Characterization of phenolic compounds in different *V. opulus* fruit and bark extracts by LC-QTOF-MS analysis in negative ion mode.

Author Contributions: Conceptualization, B.S., U.W.-B.; methodology, U.W.-B., P.B., A.P., B.S.; validation, U.W.-B., D.K.; formal analysis, B.S., U.W.-B., A.P.; investigation, U.W.-B., J.R., P.B., A.P., D.K.; resources, U.W.-B., A.P., D.K.; data curation, U.W.-B., P.B., A.P., B.S.; writing—original draft preparation and editing, B.S.; draft description of materials and methods, U.W.-B., P.B., A.P.; visualization, U.W.-B., J.R., D.K.; supervision, B.S.; project administration, B.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank Marzena Więckowska-Szakiel for help in assessing MIC/MBC of the extracts, and former students Katarzyna Kalinowska and Katarzyna Karolewska for help in assessing MIC/MBC of chlorogenic acid.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

- Chan, L.C.; Chaili, S.; Filler, S.G.; Miller, L.S.; Solis, N.V.; Wang, H.; Johnson, C.W.; Lee, H.K.; Diaz, L.F.; Yeaman, M.R. Innate immune memory contributes to host defense against recurrent skin and skin structure infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **2017**, *85*, e00876–16. [\[CrossRef\]](#)
- Herrera, A.; Kulhankova, K.; Sonkar, V.K.; Dayal, S.; Klingelutz, A.J.; Salgado-Pabón, W.; Schlievert, P.M. Staphylococcal β -Toxin modulates human aortic endothelial cell and platelet function through sphingomyelinase and biofilm ligase activities. *mBio* **2017**, *8*, e00273–17. [\[CrossRef\]](#)
- Saxena, S.; Gumber, C. Surmounting antimicrobial resistance in the Millennium superbug: *Staphylococcus aureus*. *Cent. Eur. J. Med.* **2010**, *5*, 12–29. [\[CrossRef\]](#)
- Strauß, L.; Stegger, M.; Akpaka, P.E.; Alabi, A.; Breurec, S.; Coombs, G.; Egyir, B.; Larsen, A.R.; Laurent, F.; Monecke, S.; et al. Origin, evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus aureus* ST8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *20*, E10596–E10604. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Thammavongsa, V.; Kim, H.K.; Missiakas, D.; Schneewind, O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 529–543. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tong, S.Y.C.; Davis, J.S.; Eichenberger, E.; Holland, T.L.; Fowler, V.G. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 603–661. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Claes, J.; Liesenborghs, L.; Peetermans, M.; Veloso, T.R.; Missiakas, D.; Schneewind, O.; Mancini, S.; Entenza, J.M.; Hoylaerts, M.F.; Heying, R.; et al. Clumping factor A, von Willebrand factor-binding protein and von Willebrand factor anchor *Staphylococcus aureus* to the vessel wall. *J. Thromb Haemost.* **2017**, *15*, 1009–1019. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Vlaeminck, J.; Raafat, D.; Surmann, K.; Timbermont, L.; Normann, N.; Sellman, B.; van Wamel, W.; Malhotra-Kumar, S. Exploring virulence factors and alternative therapies against *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Toxins* **2020**, *12*, 721. [\[CrossRef\]](#)
- Hiltunen, A.K.; Savijoki, K.; Nyman, T.A.; Miettinen, I.; Ihalainen, P.; Peltonen, J.; Fallarero, A. Structural and functional dynamics of *Staphylococcus aureus* biofilms and biofilm matrix proteins on different clinical materials. *Microorganisms* **2019**, *7*, 584. [\[CrossRef\]](#)
- Hoiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Intern. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 322–332. [\[CrossRef\]](#)
- Moormeier, D.E.; Bayles, K.W. *Staphylococcus aureus* biofilm: A complex developmental organism. *Mol. Microb.* **2017**, *104*, 365–376. [\[CrossRef\]](#)
- Otto, M. Staphylococcal biofilms. *Microbiol. Spectr.* **2018**, *6*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zheng, Y.; He, L.; Asiamah, T.K.; Otto, M. Colonization of medical devices by staphylococci. *Environ. Microbiol.* **2018**, *20*, 3141–3153. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Iwamoto, K.; Moriwaki, M.; Miyake, R.; Hide, M. *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: Strain-specific cell wall proteins and skin immunity. *Allergol. Int.* **2019**, *68*, 309–315. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Paharik, A.E.; Horswill, A.R. The staphylococcal biofilm: Adhesins, regulation, and host response. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*. [\[CrossRef\]](#)
- Askarian, F.; Uchiyama, S.; Valderrama, J.A.; Ajayi, C.; Sollid, J.; van Sorge, N.M.; Nizet, V.; van Strijp, J.; Johannessen, M. Serine-aspartate repeat protein D increases *Staphylococcus aureus* virulence and survival in blood. *Infect. Immun.* **2016**, *85*, e00559–16. [\[CrossRef\]](#)
- Bhattacharya, M.; Wozniak, D.J.; Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2015**, *13*, 1499–1516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Raafat, D.; Otto, M.; Reppschläger, K.; Iqbal, J.; Holtfreter, S. Fighting *Staphylococcus aureus* biofilms with monoclonal antibodies. *Trends Microbiol.* **2019**, *27*, 303–322. [\[CrossRef\]](#)
- Brglez Mojzer, E.; Knez Hrncić, M.; Škerget, M.; Knez, Ž.; Bren, U. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules* **2016**, *21*, 901. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kajszczak, D.; Zakłos-Szyda, M.; Podsedek, A. *Viburnum opulus* L.—A review of phytochemistry and biological effects. *Nutrients* **2020**, *12*, 3398. [\[CrossRef\]](#)
- Lutz, M.; Fuentes, E.; Ávila, F.; Alarcón, M.; Palomo, I. Roles of phenolic compounds in the reduction of risk factors of cardiovascular diseases. *Molecules* **2019**, *24*, 366. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Polka, D.; Podsedek, A. Phenolics composition and antioxidant capacity of guelder rose fruit, flower and bark extracts. *Biotechnol. Food Sci.* **2019**, *83*, 37–46. [\[CrossRef\]](#)
- Rasamiravaka, T.; Ngezahayo, J.; Pottier, L.; Ribeiro, S.O.; Souard, F.; Hari, L.; Stévigny, C.; Jaziri, M.E.; Duez, P. Terpenoids from *Platostoma rotundifolium* (Briq.) A. J. Paton alter the expression of quorum sensing-related virulence factors and the formation of biofilm in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1–22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Howell, A.B.; Botto, H.; Combescure, C.; Blanc-Potard, A.B.; Gausa, L.; Matsumoto, T.; Tenke, P.; Sotto, A.; Lavigne, J.-P. Dosage effect on uropathogenic *Escherichia coli* anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: A multicentric randomized double blind study. *BMC Infect. Dis.* **2010**, *10*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sadowska, B.; Laskowski, D.; Bernat, P.; Micota, B.; Więckowska-Szakiel, M.; Podsedek, A.; Różalska, B. Molecular mechanisms of *Leonurus cardiaca* L. extract activity in prevention of staphylococcal endocarditis—Study on in vitro and ex vivo models. *Molecules* **2019**, *24*, 1–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

26. Różalska, B.; Sadowska, B.; Żuchowski, J.; Więckowska-Szakiel, M.; Budzyńska, A.; Wójcik, U.; Stochmal, A. Phenolic and nonpolar fractions of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson extracts as virulence modulators—In vitro study on bacteria, fungi, and epithelial cells. *Molecules* **2018**, *23*, 1–19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Sadowska, B.; Wójcik, U.; Krzyżanowska-Kowalczyk, J.; Kowalczyk, M.; Stochmal, A.; Rywaniak, J.; Burzyńska, J.; Różalska, B. The pros and cons of cystic fibrosis (CF) patient use of herbal supplements containing *Pulmonaria officinalis* L. extract: The evidence from an in vitro study on *Staphylococcus aureus* CF clinical isolates. *Molecules* **2019**, *24*, 1–15. [\[CrossRef\]](#)
28. Suliman, M.; Santosh, V.; Seegar, T.; Dalton, A.C.; Schultz, K.M.; Klug, C.S.; Barton, W.A. Directed evolution provides insight into conformational substrate sampling by SrtA. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184271. [\[CrossRef\]](#)
29. Schneewind, O.; Missiakas, D. Sortases, surface proteins, and their roles in *Staphylococcus aureus* disease and vaccine development. *Microbiol. Spectr.* **2019**, *7*. [\[CrossRef\]](#)
30. Zhang, B.; Teng, Z.; Xianhe, L.; Lu, G.; Deng, X.; Niu, X.; Wang, J. Chalcone attenuates *Staphylococcus aureus* virulence by targeting sortase A and alpha-hemolysin. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1715. [\[CrossRef\]](#)
31. Kang, S.S.; Kim, J.-G.; Lee, T.-H.; Oh, K.-B. Flavonols inhibit sortases and sortase-mediated *Staphylococcus aureus* clumping to fibrinogen. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 1751–1755. [\[CrossRef\]](#)
32. Liu, B.; Chen, F.; Bi, C.; Wang, L.; Zhong, X.; Cai, H.; Deng, X.; Niu, X.; Wang, D. Quercitrin, an inhibitor of sortase A, interferes with the adhesion of *Staphylococcus aureus*. *Molecules* **2015**, *20*, 6533–6543. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Ouyang, P.; He, X.; Yuan, Z.W.; Yin, Z.Q.; Fu, H.; Lin, J.; He, C.; Liang, X.; Lv, C.; Shu, G.; et al. Erianin against *Staphylococcus aureus* infection via inhibiting sortase A. *Toxins* **2018**, *10*, 385. [\[CrossRef\]](#)
34. Sariözkan, S.; Türk, G.; Eken, A.; Bayram, L.; Baldemir, A.; Doğan, G. Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) fruit extract alleviates testis and sperm damages induced by taxane-based chemotherapeutics. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *95*, 1284–1294. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Zaklos-Szyda, M.; Pawlik, N.; Polka, D.; Nowak, A.; Koziolkiewicz, M.; Podśedek, A. *Viburnum opulus* fruit phenolic compounds as cytoprotective agents able to decrease free fatty acids and glucose uptake by Caco-2 cells. *Antioxidants* **2019**, *8*, 262. [\[CrossRef\]](#)
36. Barak, T.H.; Celep, E.; İnan, Y.; Yesilada, E. Influence of in vitro human digestion on the bioavailability of phenolic content and antioxidant activity of *Viburnum opulus* L. (European cranberry) fruit extracts. *Ind. Crop. Prod.* **2019**, *131*, 62–69. [\[CrossRef\]](#)
37. Bujor, A.; Miron, A.; Luca, S.V.; Skalicka-Wozniak, K.; Silion, M.; Ancuceanu, R.; Dinu, M.; Girard, C.; Demougeot, C.; Totoson, P. Metabolite profiling, arginase inhibition and vasorelaxant activity of *Cornus mas*, *Sorbus aucuparia* and *Viburnum opulus* fruit extracts. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *133*, 1–2. [\[CrossRef\]](#)
38. Cam, M.; Hisil, Y.; Kescu, A. Organic acid, phenolic content and antioxidant capacity of fruit flesh and seed of *Viburnum opulus*. *Chem. Nat. Compd.* **2007**, *43*, 379–380. [\[CrossRef\]](#)
39. Ceylan, D.; Aksoy, A.; Ertekin, T.; Yay, A.H.; Nisari, M.; Karatoprak, G.Ş.; Ülger, H. The effects of gilaburu (*Viburnum opulus*) juice on experimentally induced Ehrlich ascites tumor in mice. *J. Cancer Res. Ther.* **2018**, *14*, 314–320. [\[CrossRef\]](#)
40. İlhan, M.; Ergene, B.; Süntar, I.; Özbilgin, S.; Çitoğlu, G.S.; Demirel, M.A.; Keleş, H.; Altun, L.; Akkol, E.K. Preclinical evaluation of antiurolithiatic activity of *Viburnum opulus* L. on sodium oxalate-induced urolithiasis rat model. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2014**, *2014*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Paşayeva, L.; Arslan, A.K.K.; Kararenk, A.C. *Viburnum opulus* L. fruit extracts protect human neuroblastoma SH-SY5Y cells against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Proceedings* **2019**, *40*, 5. [\[CrossRef\]](#)
42. Podśedek, A.; Zaklos-Szyda, M.; Polka, D.; Sosnowska, D. Effects of *Viburnum opulus* fruit extracts on adipogenesis of 3T3-L1 cells and lipase activity. *J. Funct. Foods* **2020**, *73*, 104111. [\[CrossRef\]](#)
43. Ülger, H.; Ertekin, T.; Karaca, O.; Canoz, O.; Nisari, M.; Unur, E.; Elmalı, F. Influence of gilaburu (*Viburnum opulus*) juice on 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced colon cancer. *Toxicol. Ind. Health* **2013**, *29*, 824–829. [\[CrossRef\]](#)
44. Zaklos-Szyda, M.; Pietrzyk, N.; Szustak, M.; Podśedek, A. *Viburnum opulus* L. juice phenolics inhibit mouse 3T3-L1 cells adipogenesis and pancreatic lipase activity. *Nutrients* **2020**, *12*, 2003. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Sagdic, O.; Ozturk, I.; Yapar, N.; Yetim, H. Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit drink. *Food. Res. Internat.* **2014**, *64*, 537–545. [\[CrossRef\]](#)
46. Shikov, A.N.; Tsitsilin, A.N.; Pozharitskaya, O.N.; Makarov, V.G.; Heinrich, M. (2017) Traditional and Current Food Use of Wild Plants Listed in the Russian Pharmacopoeia. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 841. [\[CrossRef\]](#)
47. Shikov, A.N.; Narkevich, I.A.; Flisyuk, E.V.; Luzhanin, V.G.; Pozharitskaya, O.N. Medicinal plants from the 14th edition of the Russian Pharmacopoeia, recent updates. *J. Ethnopharm.* **2021**, *268*, 113685. [\[CrossRef\]](#)
48. Kraujalyte, V.; Venskutonis, P.R.; Pukalskas, A.; Cesoniene, L.; Daubaras, R. Antioxidant properties and polyphenolic compositions of fruits from different European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) genotypes. *Food Chem.* **2013**, *141*, 3695–3702. [\[CrossRef\]](#)
49. Özrenk, M.; Gündoğdu, N.; Keskin, N.; Kaya, T. Some physical and chemical characteristics of gilaburu (*Viburnum opulus* L.) fruits in Erzincan region. *Iğdır Univ. J. Inst. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 9–14.
50. Perova, I.B.; Zhogova, A.A.; Cherkashin, A.V.; Éller, K.I.; Ramenskaya, G.V.; Samylina, I.A. Biologically active substances from European guelder berry fruits. *Pharm. Chem. J.* **2014**, *48*, 332–339. [\[CrossRef\]](#)
51. Polka, D.; Podśedek, A.; Koziolkiewicz, M. Comparison of chemical composition and antioxidant capacity of fruit, flower and bark of *Viburnum opulus*. *Plant. Foods Hum. Nutr.* **2019**, *74*, 436–442. [\[CrossRef\]](#)

52. Wang, L.; Bi, C.; Cai, H.; Liu, B.; Zhong, X.; Deng, X.; Wang, T.; Xiang, H.; Niu, X.; Wang, D. The therapeutic effect of chlorogenic acid against *Staphylococcal aureus* infections through sortase A inhibition. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1031. [CrossRef]
53. Bi, C.; Wang, L.; Niu, X.; Cai, H.; Zhong, X.; Deng, X.; Wang, T.; Wang, D. The use of chlorogenic acid and its analogues as inhibitors: An investigation of the inhibition of sortase A of *Staphylococcal aureus* using molecular docking and dynamic simulation. *Biotechnol. Lett.* **2016**, *38*, 1341–1347. [CrossRef]
54. Arenz, S.; Wilson, D.N. Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, a025361. [CrossRef]
55. Hoppenbrouwers, T.; Sultan, A.R.; Abraham, T.E.; Lemmens-den Toom, N.A.; Hansenová Maňásková, S.; van Cappellen, W.A.; Houtsmuller, A.B.; van Wamel, W.; de Maat, M.; van Neck, J.W. Staphylococcal protein A is a key factor in neutrophil extracellular traps formation. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 165. [CrossRef] [PubMed]
56. Graf, A.C.; Leonard, A.; Schäuble, M.; Rieckmann, L.M.; Hoyer, J.; Maass, S.; Lalk, M.; Becher, D.; Pané-Farré, J.; Riedel, K. Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity. *Mol. Cell Proteomics* **2019**, *18*, 1036–1053. [CrossRef]
57. Wang, Y.; Liu, X.; Dou, C.; Cao, Z.; Liu, C.; Dong, S.; Fei, J. Staphylococcal protein A promotes osteoclastogenesis through MAPK signaling during bone infection. *J. Cell Physiol.* **2017**, *232*, 2396–2406. [CrossRef] [PubMed]
58. Becker, S.; Frankel, M.B.; Schneewind, O.; Missiakas, D. Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2014**, *111*, 1574–1579. [CrossRef]
59. Santana-Gálvez, J.; Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D.A. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules* **2017**, *22*, 358. [CrossRef] [PubMed]
60. Özçelik, B.; Kartal, M.; Orhan, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceut. Biol.* **2011**, *49*, 396–402. [CrossRef] [PubMed]
61. Li, G.; Wang, X.; Xu, Y.; Zhang, B.; Xia, X. Antimicrobial effect and mode of action of chlorogenic acid on *Staphylococcus aureus*. *Eur. Food Res. Technol.* **2014**, *238*, 589–596. [CrossRef]
62. Hewelt-Belka, W.; Nakonieczna, J.; Belka, M.; Bączek, T.; Namieśnik, J.; Kot-Wasik, A. Untargeted lipidomics reveals differences in the lipid pattern among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* resistant and sensitive to antibiotics. *J. Proteome Res.* **2016**, *15*, 914–922. [CrossRef]
63. Young, S.A.; Desbois, A.P.; Coote, P.J.; Smith, T.K. Characterisation of *Staphylococcus aureus* lipids by nano-electrospray ionisation tandem mass spectrometry (nESI-MS/MS). *bioRxiv* **2019**. [CrossRef]
64. Bayer, A.S.; Mishra, N.N.; Chen, L.; Kreiswirth, B.N.; Rubio, A.; Yang, S.-J. Frequency and distribution of single-nucleotide polymorphisms within mprF in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates and their role in cross-resistance to daptomycin and host defense antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 4930–4937. [CrossRef] [PubMed]
65. Kilelee, E.; Pokorny, A.; Yeaman, M.R.; Bayer, A.S. Lysyl-phosphatidylglycerol attenuates membrane perturbation rather than surface association of the cationic antimicrobial peptide 6W-RP-1 in a model membrane system: Implications for daptomycin resistance. *Antim. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4476–4479. [CrossRef]
66. Diamond-Hernández, B.; Solórzano-Santos, F.; Leañós-Miranda, B.; Peregrino-Bejarano, L.; Miranda-Navales, G. Production of icaADBC-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. *BMC Infect. Dis.* **2010**, *10*, 68–74. [CrossRef]
67. Nguyen, H.; Nguyen, T.H.; Otto, M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA-biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2020**, *18*, 3324–3334. [CrossRef]
68. Nasr, R.A.; AbuShady, H.M.; Hussein, H.S. Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* **2012**, *13*, 269–274. [CrossRef]
69. Rohde, H.; Frankerberger, R.H.; Zähringer, U.; Mack, D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesion (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur. J. Cell Biol.* **2010**, *89*, 103–111. [CrossRef] [PubMed]
70. Swain, T.; Hillis, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I- the quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **1959**, *10*, 63–68. [CrossRef]
71. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing—EUCAST. Available online: <http://www.eucast.org> (accessed on 27 January 2021).
72. Ichihara, K.; Fukubayashi, Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 635–640. [CrossRef] [PubMed]

SUPPLEMENTARY MATERIALS

An in vitro study of the effect of *Viburnum opulus* extracts on key processes in the development of staphylococcal infections

Urszula Wójcik-Bojek¹, Joanna Rywaniak¹, Przemysław Bernat², Anna Podśedek³, Dominika Kajszczak³, Beata Sadowska^{1,*}

¹ Department of Immunology and Infectious Biology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland; urszula.wojcik@biol.uni.lodz.pl (U.W.-B.); joanna.rywaniak@biol.uni.lodz.pl (J.R.); beata.sadowska@biol.uni.lodz.pl (B.S.)

² Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha 12/16, 90-237 Lodz, Poland; przemyslaw.bernat@biol.uni.lodz.pl

³ Institute of Molecular and Industrial Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Lodz University of Technology, Stefanowskiego 4/10, 90-924 Lodz, Poland; anna.podsedek@p.lodz.pl (A.P.); dominika.kajszczak@dokt.p.lodz.pl (D.K.)

Correspondence: beata.sadowska@biol.uni.lodz.pl; Tel.: +48 42 635 45 25 (B.S.)

2. Results

2.1. Biochemical characterization of *V. opulus* fruit and bark extracts

Qualitative analysis of the *V. opulus* fruit and bark extracts by the UPLC-QTOF-MS technique revealed that the phenolic compound composition differed notably (Table S1 and Figure S1). It has been observed that bark phenols include hydroxycinnamic acids (peaks 1, 11, 12, 27, 30), flavanols (monomeric and oligomeric forms; peaks 4, 6, 8, 10, 14-16, 19), and flavalignans (peaks 18, 22), while fruit phenols include hydroxycinnamic acids (peaks 1-3, 5, 7, 9, 11-13, 17, 20), flavalignans (peaks 25, 26, 28), flavanols (peaks 15, 19, 31), and flavonols (peaks 21, 23, 24, 29). Additionally, based on molecular ions in the MS spectra and fragmentation patterns published by Dienaitė et al. [1], a viburtinioside derivative was identified in bark extracts.

Table S1. Characterization of phenolic compounds in different *V. opulus* fruit and bark extracts by LC-QTOF-MS analysis in negative ion mode.

No	R _t (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	Identification	Fruit			Bark		
						VF _a	VF _e	VF _w	VB _a	VB _e	VB _w
1	4.11	324	353	191,135	Neochlorogenic acid ^s	+	+	+	+	+	+
2	4.18	326	515	191,135	Dicaffeoylquinic acid I ^r	+	+	+	-	-	-
3	4.60	325	515	191,135	Dicaffeoylquinic acid II ^r	+	+	+	-	-	-
4	4.70	279	577	125,161,255	Procyanidin B1 ^s	-	-	-	+	+	+
5	5.02	326	515	191,135	Dicaffeoylquinic acid III ^r	+	+	+	-	-	-

6	5.23	281	865	407,289,125	Procyanidin trimer I ^r	-	-	-	+	+	+
7	5.27	326	515	191,135	Dicaffeoylquinic acid IV ^r	+	+	+	-	-	-
8	5.35	278	289	109,159,173	(+)-Catechin ^s	-	-	-	+	+	+
9	5.38	326	515	191,135	Dicaffeoylquinic acid V ^r	+	+	+	-	-	-
10	5.54	279	865	407,289,125	Procyanidin trimer II ^r	-	-	-	+	+	+
11	5.78	325	353	191,133	Chlorogenic acid ^s	+	+	+	+	+	+
12	5.97	326	353	191,135	Cryptochlorogenic acid ^s	+	+	+	+	+	+
13	6.15	324	179	132,108	Caffeic acid ^s	+	+	+	-	-	-
14	6.17	279	577	125,161,203,255	Procyanidin B2 ^s	-	-	-	+	+	+
15	6.55	341	1153	287,407,125,243	Procyanidin tetramer ^r	+	+	+	+	+	-
16	6.99	279	289	109,159,173	(-)-Epicatechin ^s	-	-	-	+	+	+
17	7.31	311	337	119,191	Coumaroylquinic acid ^r	+	+	+	-	-	-
18	7.50	279	739	177,289,161,245	Cinchonain IIx ^r	-	-	-	+	+	+
19	7.62	278	865	407,289,125	Procyanidin C1 ^s	+	+	+	+	+	+
20	9.03	326	367	135	Feruloylquinic acid ^r	+	+	-	-	-	-
21	9.21	354	595	271,300,255,243	Quercetin pentoside hexoside ^s	+	+	+	-	-	-
22	9.32	279	451	176,191,269	Cinchonain Ix ^r	-	-	-	+	+	+
23	9.81	352	609	271,300,255,243	Quercetin 3-rutinoside ^s	+	+	+	-	-	-
24	10.10	343	463	271,255,243,227	Quercetin 3-glucoside ^s	+	+	+	-	-	-
25	10.77	343	451	189,161	Cinchonin Ix ^r	+	+	+	-	-	-
26	10.85	283	451	189,161	Cinchonin Ix ^r	+	+	+	-	-	-
27	10.87	326	515	191,135	3,5-Dicaffeoylquinic acid ^s	-	-	-	+	+	+
28	10.95	281	451	189,161	Cinchonin Ix ^r	+	+	+	-	-	-
29	11.33	343	447	227,255,183,299	Quercetin 3-rhamnoside ^s	+	+	+	-	-	-
30	11.82	326	515	191,135	Dicaffeoylquinic acid VI ^r	-	-	-	+	+	+
31	12.94	279	613	242,393,189,309	(Epi)-catechin hexoside ^r	+	+	+	-	-	-
32	12.95	281	607	231,339,181	Viburtinoside derivative ^r	-	-	-	+	+	+

+ compound present in extract; - compound not detected; superscript letters with the compound name: ^s confirmed by a standard; ^r confirmed by a reference [1–3]; VF—*V. opulus* fruit extract; VB—*V. opulus* bark extract; a/e/w—acetonitrile/ethanol/water extract.

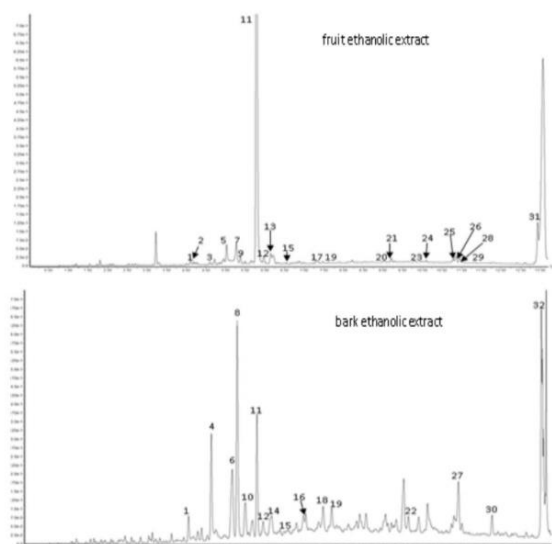


Figure S1. UPLC chromatograms of phenolic compounds in *V. opulus* fruit or bark ethanolic extract at 280 nm. Refer to Table S1 for the identification of each numbered peak.

2.6. The effects of the tested extracts on the compositions of phospholipids and fatty acids in staphylococcal membranes

The analysis of the changes in content of specific types of lipids (Figure S2) showed pronounced rises in PG 18:0/15:0, PG 16:0/15:0, and PG 15:0/14:0 (Figure S2a) as well as GLC2-DAG 17:0/15:0 and GLC2-DAG 16:0/15:0 (Figure S2b) after VBa and VBe treatment. Under the same conditions, drops in content of LYSYL-PG 20:0/15:0, LYSYL-PG 19:0/15:0, and LYSYL-PG 17:0/15:0 were detected (Figure S2c). On the other hand, decreases in PG 19:0/15:0 and GLC2-DAG 19:0/15:0 and an increase in LYSYL-PG 16:0/15:0 were also noted but with no influence on general changes to the percentage contents of these phospholipid groups. Otherwise, there were no significant differences in the level of branched fatty acids (BCFAs) with isomerism in terms of both iso (C20:0, C18:0, C16:0, and C14:0) and anteiso (aiC15:0) compounds in the membranes of *S. aureus* exposed to *V. opulus* extracts in comparison with control cells (Figure S3).

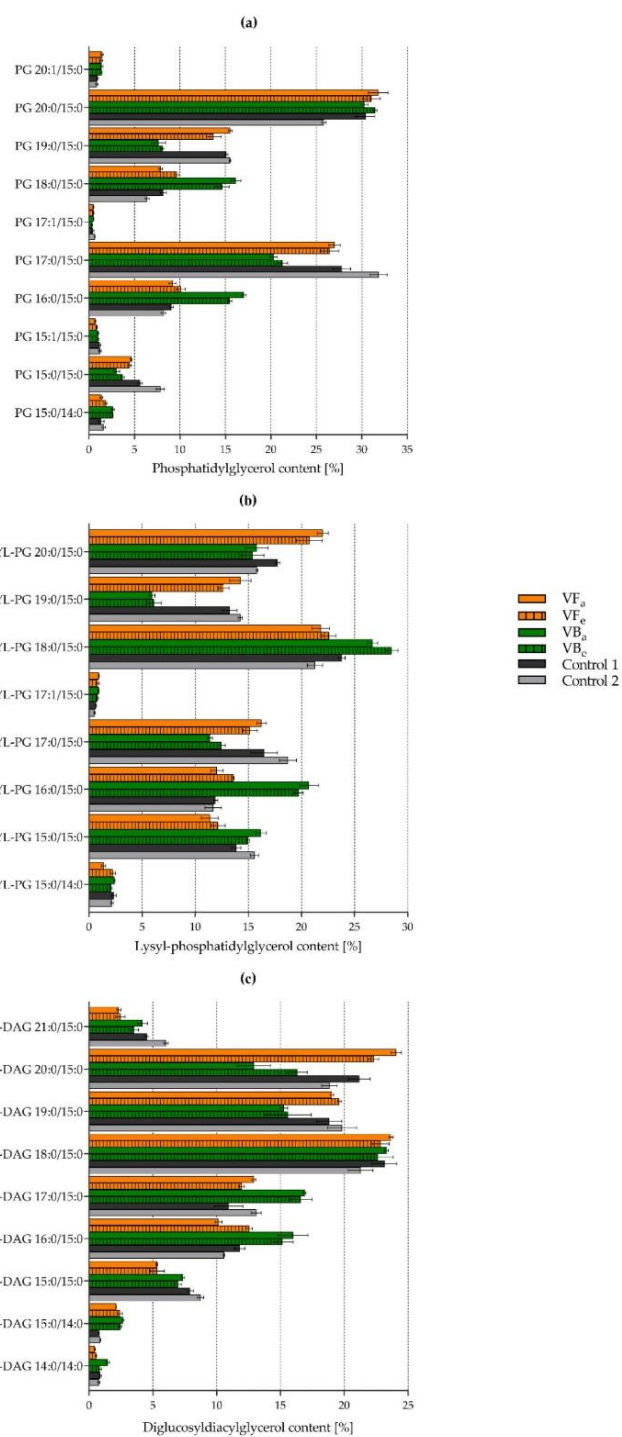


Figure S2. The effects of *V. opulus* extracts on the contents of specific types of lipids in the cell membrane of *S. aureus* ATCC 43300: (a) PG—phosphatidylglycerols; (b) I.YSYL-PG—lysyl-phosphatidylglycerols; (c) GLC2-DAG—diglucosyldiacylglycerols; VF—*V. opulus* fruit extract; VB—*V. opulus* bark extract; a/e—acetonic/ethanolic extract; Control 1—bacteria in medium alone; Control 2—bacteria in medium containing 2.5% ethanol.

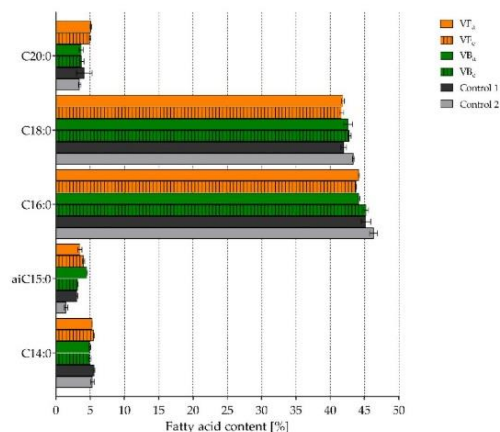


Figure S3. The effects of *V. opulus* extracts on the contents of specific types of fatty acids in the cell membrane of *S. aureus* ATCC 43300; VF—*V. opulus* fruit extract; VB—*V. opulus* bark extract; a/e—acetonic/ethanolic extract; Control 1—bacteria in medium alone; Control 2—bacteria in medium containing 2.5% ethanol.

5. References

1. Dienaitė, L.; Pukalskienė, M.; Pereira, C.V.; Matias, A.A.; Venskutonis, P.R. Valorization of European cranberry bush (*Viburnum opulus* L.) berry pomace extracts isolated with pressurized ethanol and water by assessing their phytochemical composition, antioxidant, and antiproliferative activities. *Foods* **2020**, *9*, 1413, doi:10.3390/foods9101413.
2. Senica, M.; Stampar, F.; Veberic, R.; Mikulic-Petkovsek, M. Fruit seeds of the *Rosaceae* family: a waste, new life, or a danger to human health? *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 10621–10629, doi:10.1021/acs.jafc.7b03408.
3. Wojdyło, A.; Oszmiański, J.; Bielicki, P. Polyphenolic composition, antioxidant activity, and polyphenol oxidase (PPO) activity of quince (*Cydonia oblonga* Miller) varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2762–2772, doi:10.1021/jf304969b.

IV. Wyniki nieopublikowane

Wyniki części badań stanowiących podstawę prezentowanej pracy doktorskiej nie zostały jeszcze opublikowane, choć na ich podstawie przygotowano manuskrypt pt. „Modulation and priming of the macrophages against and by staphylococci – indirect effect of natural plant extracts”, autorstwa: Urszula Wójcik-Bojek, Joanna Rywaniak, Beata Sadowska (stosowne oświadczenie dotyczące współautorstwa manuskryptu zostało zamieszczone w Rozdziale X). Manuskrypt przygotowano w języku angielskim, ale do czasu przyjęcia do recenzji w wydawnictwie naukowym nie może on zostać upubliczniony w formie gotowego manuskryptu, dlatego poniżej przedstawiono najważniejsze założenia tych badań, zastosowane materiały i metody, wyniki oraz ich podsumowanie i wnioski.

IV.1. Założenia - podstawy teoretyczne przeprowadzonych badań

Podczas infekcji, gronkowce z gatunku *Staphylococcus aureus* potrafią unikać mechanizmów obronnych gospodarza, co często prowadzi do szybkiego namnożenia się drobnoustrojów i inwazji tkanek. Zakłada się, że skuteczna odpowiedź fagocytów w tzw. wrotach zakażenia jest w stanie zatrzymać rozprzestrzenianie się *S. aureus*. Dlatego w prezentowanych badaniach zaproponowano nowe rozwiązanie w celu stymulacji makrofagów przeciwko tym bakteriom - „priming” komórek wrodzonych mechanizmów odporności przy użyciu gronkowców będących częścią ludzkiego mikrobiomu i naturalnych ekstraktów roślinnych jako czynników wyzwalających uwalnianie antygenów gronkowcowych. Pomysł został oparty na wiedzy o stałej obecności gronkowców koagulazoujemnych na skórze i błonach śluzowych człowieka i wysokim stanie nosicielstwa *S. aureus*, które sięga 20-30% populacji ludzkiej (Balato i wsp. 2019, Howden i wsp. 2023) oraz na założeniu, że preparaty roślinne, przyjmowane przykładowo jako suplementy diety, mogą w niskich stężeniach działać podobnie, jak antybiotyki w stężeniach subinhibicyjnych, prowadząc do uwalniania biologicznie aktywnych składników komórek drobnoustrojów. Udowodniono bowiem, że antybiotyki działające na osłony komórkowe bakterii, takie jak β -laktamy czy glikopeptydy, uwalniają prozapalne komponenty z komórek gronkowców: peptydoglikan (PG), kwas lipotejchowy (LTA) czy gronkowcowe białko A (SpA) (Hodille i wsp. 2017, Evans and Bolz 2019, Chen i wsp. 2021, Gao i wsp. 2022). Komponenty te po uwolnieniu w organizmie gospodarza mogą zatem wywierać istotny wpływ na działanie mechanizmów jego układu odpornościowego. Możliwość takiej pośredniej

immunomodulacji aktywności komórek fagocytarnych przez ekstrakty roślinne stała się przesłanką do prowadzenia badań w tym kierunku.

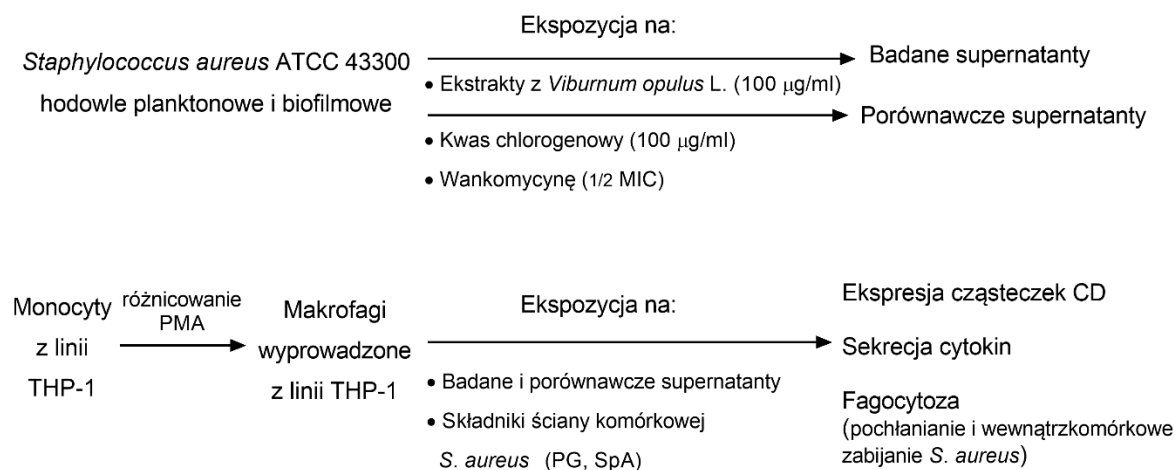
Celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy dotyczącej pośredniego działania immunomodulującego otrzymanych, scharakteryzowanych biochemicznie ekstraktów etanolowych (e) i wodnych (w) z owoców i kory *Viburnum opulus* L. (odpowiednio VF i VB) na ludzkie makrofagi, stosowanych jako czynniki wyzwalające uwalnianie prozapalnych składników komórek *S. aureus* z planktonowych i biofilmowych hodowli tych bakterii. Oceniano „priming” makrofagów wyprowadzonych z monocytów linii THP-1 po ekspozycji na supernatanty z planktonowych i biofilmowych hodowli *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), które wcześniej eksponowano na działanie ekstraktów z *V. opulus* (supernatanty badane). W celach porównawczych hodowle planktonowe i biofilmowe *S. aureus* były również wstępnie traktowane kwasem chlorogenowym (ChA) jako związkiem referencyjnym wykrytym we wszystkich testowanych ekstraktach *V. opulus* (Publikacja [P2]) oraz wankomycyną (VAN) stosowaną w stężeniu subinhibicyjnym ($1/2$ MIC - połowa minimalnego stężenia hamującego) jako przykładowy antybiotyk celujący w ścianę komórkową bakterii (Ślusarz i wsp. 2022) (supernatanty porównawcze). Tym samym makrofagi pochodzące z THP-1 były eksponowane zarówno na badane, jak i porównawcze supernatanty z hodowli *S. aureus*. Komórki były również wystawione na działanie komercyjnie dostępnych, oczyszczonych składników ściany komórkowej *S. aureus*: PG i SpA. Jako kontrole nastawiano makrofagi wyprowadzone z linii THP-1 w samym podłożu do hodowli komórkowej (K1) lub w podłożu do hodowli komórkowej zawierającym TSB/Glu - podłoże wzrostowe dla bakterii (K2).

W badaniach oceniano modulację fenotypu i stymulację aktywności makrofagów wyprowadzonych z linii ludzkich komórek monocytarnych THP-1. Badano polaryzację makrofagów do fenotypu prozapalnego M1 lub regulatorowego M2 w oparciu o ocenę ekspresji powierzchniowych cząsteczek CD (ang. *cluster of differentiation*) za pomocą cytometrii przepływowej oraz produkcji cytokin (TNF- α , IL-10) z zastosowaniem metody immunoenzymatycznej ELISA. Oceniano także aktywność fagocytarną makrofagów (pochłanianie *S. aureus* przy użyciu bakterii znakowanych FITC i ich wewnątrzkomórkowe zabijanie z użyciem barwienia Alamar Blue), po ekspozycji komórek na supernatanty hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* wcześniej traktowanych ekstraktami z kory i owoców kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.).

IV.2. Materiały i metody

IV.2.1. Protokół ogólny

Ogólną koncepcję badań przedstawiono na Ryc. 3.



Ryc. 3. Schemat przeprowadzonych badań

IV.2.2. Przygotowanie materiału roślinnego i analiza biochemiczna

Komercyjnie dostępne suszona kora i owoce kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.) zostały zakupione odpowiednio w "FarmVit" (Szczecin, Polska) i "NaturaWita Ltd." (Kopernia, Polska). Ekstrakty acetonowe (a), etanolowe (e) i wodne (w) z owoców oraz kory kaliny koralowej przygotowano w formie liofilizatów w Instytucie Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej. W tej samej Jednostce przeprowadzono również analizę biochemiczną składu otrzymanych ekstraktów. Sposób przygotowania, analizy biochemicznej i skład ekstraktów zostały szczegółowo opisane w Publikacji [P2], stanowiącej część niniejszej rozprawy. Ostatecznie do obecnych badań wykorzystano VBw - wodny ekstrakt z kory *V. opulus*, VFw - wodny ekstrakt z owoców *V. opulus* oraz VFe - etanolowy ekstrakt z owoców *V. opulus*.

IV.2.3. Przygotowanie roztworów wyjściowych ekstraktów i składników ściany komórkowej *S. aureus*

Roztwory wyjściowe badanych ekstraktów *V. opulus* (10 mg/ml) przygotowano w sterylnej, filtrowanej wodzie i przechowywano w temperaturze -20°C. Dalsze rozcieńczenia każdego roztworu wyjściowego przygotowywano w podłożu odpowiednim do rodzaju eksperymentu. Związek referencyjny - kwas chlorogenowy (ChA; SERVA Feinbiochemica, Niemcy) rozpuszczono w 50% etanolu (Et-OH) w celu uzyskania roztworu wyjściowego (10 mg/ml), który przechowywano w temperaturze -20°C i rozcieńczano w odpowiednim podłożu dla każdego eksperymentu (końcowe stężenie Et-OH w hodowli bakteryjnej ekspozowanej na ChA wynosiło 0,5%). Peptydoglikan *S. aureus* (PG; Sigma Aldrich, USA) i gronkowcowe białko A (SpA; Pharmacia Fine Chemicals, Szwecja) rozpuszczono w sterylnej, wolnej od pirogenów wodzie do iniekcji (Sigma Aldrich, USA) w stężeniu odpowiednio 1 mg/ml i 2,5 mg/ml. Roztwory podstawowe PG i SpA przechowywano zamrożone w temperaturze -20°C i rozcieńczano w odpowiednim podłożu dla każdego eksperymentu.

IV.2.4. Warunki hodowli *Staphylococcus aureus*

Badania prowadzono na szczepie referencyjnym *S. aureus* ATCC 43300 (szczep MRSA). Zawiesinę wyjściową *S. aureus* ATCC 43300 w bulionie tryptozowo-sojowym (TSB; BTL Sp. z o.o., Polska) zawierającym 15% glicerolu (POCH, Polska) przechowywano w temperaturze -80°C. Na początku zawiesinę wyjściową rozmrażano, wysiewano na agar tryptozowo-sojowy (TSA; BTL Sp. z o.o., Polska) i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Hodowle *S. aureus* w TSB z dodatkiem 0,25% glukozy (TSB/Glu) i/lub zawiesiny w buforowanym fosforanem roztworze soli fizjologicznej (PBS, Biowest, Francja) były świeżo przygotowywane przed rozpoczęciem eksperymentów. Gęstość zawiesiny dostosowywano do odpowiedniej wartości dla danego testu.

IV.2.5. Ocena minimalnego stężenia hamującego (MIC) i minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) wankomycyny

MIC wankomycyny (VAN; Sigma Aldrich, USA) wyznaczono za pomocą metody mikrorozcieńczeń zgodnie z zaleceniami EUCAST. Zawiesinę *S. aureus* ATCC 43300 (10^5 CFU/ml) poddawano działaniu VAN (w zakresie stężeń ostatecznych 4-0,06 µg/ml) przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Przygotowywano także kontrolę dodatnią, czyli bakterie w podłożu hodowlanym. MIC definiowano jako najniższe stężenie antybiotyku, które hamowało widoczny wzrost bakterii. W celu wyznaczenia wartości MBC, 10 µl ze studzienek oznaczonych jako MIC i z dwóch studzienek z wyższym stężeniem antybiotyku hodowano na płytkach TSA przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Wartość MBC odnosi się do najniższego stężenia antybiotyku wymaganego do zabicia 99,9% bakterii w dodanym inokulum. Do dalszych eksperymentów stosowano stężenie ½ MIC VAN.

IV.2.6. Ekspozycja hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* na ekstrakty roślinne, kwas chlorogenowy lub wankomycynę i zebranie supernatantów

W celu zebrania supernatantów hodowli planktonowych, zawiesinę *S. aureus* ATCC 43300 w TSB/Glu ($OD_{535}=0.5$) poddawano działaniu ekstraktów *V. opulus* (100 µg/ml), ChA (100 µg/ml) lub VAN (½ MIC) przez 24 godziny w temperaturze 37°C na wytrząsarce orbitalnej typu TR-250/CH-4103 (Bottmingen, Szwajcaria) w całkowitej objętości próbki 1 ml. W przypadku supernatantów z hodowli biofilmowej, zawiesinę *S. aureus* ATCC 43300 w TSB/Glu ($OD_{535}=1.0$) najpierw umieszczano w studzienkach (1 ml/studzienkę) 24-studzienkowych polistyrenowych płytek mikrotitracyjnych (Corning Incorporated, USA) na 24 godziny w temperaturze 37°C w celu utworzenia biofilmu. Równocześnie przygotowywano dwa rodzaje kontroli: bakterie w samym podłożu TSB/Glu (kontrola K1) i w TSB/Glu z 0,5% Et-OH (kontrola K2), aby wykluczyć wpływ Et-OH jako rozpuszczalnika dla ChA. Po ekspozycji, bakterie z hodowli planktonowych odwirowywano przy 3000 rpm/10 min. i zbierano supernatanty. Natomiast studzienki z utworzonym biofilmem *S. aureus* delikatnie przemywano PBS i dodawano przygotowane stymulatory na kolejne 24 godziny w temperaturze 37°C. Następnie płytki odwirowywano przy 3000 rpm/10 min. i zbierano supernatanty. Supernatanty z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* filtrowano przy użyciu sterylnych filtrów strzykawkowych

(rozmiar porów 0,22 μm) z membraną Durapore PVDF o niskim poziomie wiązania białek (Merck Millipore Ltd., Irlandia) i przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych eksperymentów. Zebrano supernatanty z pięciu niezależnych eksperymentów (zwanych dalej eksperymentami przygotowawczymi). Supernatanty z hodowli traktowanych ekstraktami z kaliny nazywano dalej supernatantami badanymi, natomiast supernatanty z hodowli traktowanych kwasem chlorogenowym (ChA) lub wankomycyną (VAN) nazywano supernatantami porównawczymi.

IV.2.7. Ocena uwalniania PG i SpA do supernatantów hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* przy użyciu testu ELISA

Do oceny obecności PG i SpA w supernatantach z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* wykorzystywano komercyjne testy ELISA (Mybiosource, USA) zgodnie z instrukcjami producenta. Supernatant z kontroli K1 (bakterie w samym TSB/Glu) był kontrolą dla wszystkich prób, z wyjątkiem prób ekspozycyjnych na ChA, podczas gdy supernatant z kontroli K2 (bakterie w TSB/Glu z 0,5% Et-OH) był kontrolą tylko dla supernatantu po ekspozycji bakterii na ChA. Przeprowadzono dwa niezależne eksperymenty z użyciem supernatantów z czterech eksperymentów przygotowawczych.

IV.2.8. Warunki hodowli komórek linii THP-1 i ich różnicowanie do makrofagów

Ludzkie monocyty linii THP-1 (ATCC TIB-202™) zakupiono w LGC Standards Sp. z o.o. (Polska). Komórki hodowano zgodnie z instrukcją producenta w podłożu RPMI-1640 z L-glutaminą (Sigma Life Science, USA) uzupełnionym 10% (v/v) płodową surowicą bydlęcą (FBS; Biowest, Francja), 1% (v/v) roztworem penicyliny i streptomycyny (P/S; Biowest, Francja) i 0,05 mM 2-merkaptotanołem (Bio-Rad, USA) w temperaturze 37°C z dodatkiem 5% CO_2 . W celu zróżnicowania monocytów THP-1 w makrofagi, do zawiesiny 5×10^5 komórek/ml dodawano forbol-12-mirystynian-13-octanu (PMA; InvivoGen, USA) w końcowym stężeniu 200 nM i umieszczano w 24-studzienkowych ($2,5 \times 10^5$ komórek/studzienkę) lub 96-studzienkowych (1×10^5 komórek/studzienkę) płytkach mikrotitracyjnych (Corning Incorporated, Corning, USA) na 72 godziny w $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Następnie usuwano podłoże z PMA, a komórki przemywano PBS bez jonów wapnia

i magnezu (Biowest, Francja) lub zbalansowanym roztworem soli Hanksa z HEPES (HHBS; Sigma Life Science, USA), gdy badano aktywność fagocytarną makrofagów. Następnie dodawano pełne podłoże do hodowli komórkowych, w którym komórki odpoczywały przez kolejne 72 godziny w 37°C/5% CO₂ przed rozpoczęciem eksperymentów.

IV.2.9. Ekspozycja makrofagów na supernatanty z hodowli gronkowców i oczyszczone składniki ściany komórkowej *S. aureus*

Makrofagi THP-1 w stanie spoczynku hodowano przez 24 godziny w 37°C/5% CO₂ w podłożu hodowlanym zawierającym: badane i porównawcze supernatanty z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* ATCC 43300 (10%, v/v) lub czyste składniki ściany komórkowej gronkowców: PG (10 i 20 µg/ml), SpA (10 i 100 µg/ml). Odpowiednie układy kontrolne: komórki w samym podłożu hodowlanym (K1) oraz w podłożu hodowlanym zawierającym 10% (v/v) TSB/Glu (K2) były nastawiane w tym samym czasie. Po ekspozycji, supernatanty wolne od komórek zbierano i przechowywano w temperaturze -80°C w celu oceny obecności TNF-α i IL-10, natomiast komórki wykorzystywano do dalszych analiz.

IV.2.10. Ocena produkcji TNF-α i IL-10 przy użyciu testu ELISA

Obecność TNF-α i IL-10 w supernatantach pohodowlanych makrofagów ekspozowanych na badane preparaty oraz makrofagów kontrolnych sprawdzano przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) zgodnie z instrukcjami producenta. Niezbędne bufony zostały przygotowane oddzielnie z wykorzystaniem: chlorku potasu (Standard Sp. z o.o., Polska), chlorku sodu (Standard Sp. z o.o., Polska), wodorofosforanu disodu (POCH, Polska), diwodorofosforanu potasu (POCH, Polska), Tween 20 (Merck, Niemcy), albuminy surowicy bydlęcej (BSA; Sigma Life Science, USA) i dodecylosiarczanu sodu (SDS; Sigma Aldrich, USA). Do wywołania barwnej reakcji stosowano gotowy do użycia substrat kwas 2,2'-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy (ABTS; Sigma Aldrich, USA). Przeprowadzono cztery oddzielne eksperymenty w dwóch powtórzeniach każdy, wykorzystując supernatanty z czterech eksperymentów przygotowawczych.

IV.2.11. Ocena ekspresji markerów CD na makrofagach pochodzących z linii THP-1 przy użyciu cytometrii przepływowej

Makrofagi wyprowadzone z monocytów linii THP-1 po ekspozycji (24 godz.) na badane i porównawcze supernatanty hodowli gronkowców oraz składniki ściany komórkowej *S. aureus*, a także nieeksponowane komórki kontrolne (K1 i K2) odwirowywano (1200 obr./min., 5 min.) i delikatnie przemywano 15 mM roztworem EDTA (POCH, Polska) w PBS. Następnie komórki odklejono od płytek hodowlanych za pomocą roztworu 15 mM EDTA/0,5% BSA w PBS (30 min., na lodzie), przenoszono do probówek typu Eppendorf i odwirowywano (3000 obr./min., 5 min.). Uzyskane osady komórkowe zawieszono w 200 μ l buforu barwiącego (0,5% BSA/0,1% azydku sodu w PBS), a następnie 50 μ l zawiesiny komórkowej przenoszono do probówek cytometrycznych i barwiono mieszaniną przeciwciał znakowanych fluorochromem: mysie przeciwciała anti-CD45 znakowane PerCP-CyTM5.5, mysie przeciwciała anti-CD11c znakowane V450, mysie przeciwciała anti-CD206 znakowane FITC i mysie przeciwciała anti-CD62L znakowane BV605 (Becton Dickinson, USA). Jednocześnie przygotowywano kontrole FMO (ang. *Fluorescence Minus One*; fluorescencja minus jeden). Wszystkie próbki inkubowano przez 30 minut na lodzie, a następnie dodawano 1 ml buforu do barwienia i wirowano (3000 obr./min., 5 min.). Na koniec osady komórek ponownie zawieszono w buforze barwiącym i mierzono fluorescencję na cytometrze przepływowym BD LSRII (Becton Dickinson, USA). Ustawienia cytometru i korekty kompensacyjne zostały wykonane przy użyciu zestawu cząstek kompensacyjnych BD[®] CompBeads (Becton Dickinson, USA) i przeciwciał znakowanych fluorochromem, które zostały użyte w eksperymentach. Ekspresję CD11c, CD206 i CD62L oceniano na komórkach CD45-dodatnich przy użyciu oprogramowania BD FACSDIVA (Becton Dickinson, USA). Komórki odróżniano od zanieczyszczeń na podstawie profilu rozproszenia światła (FSC-A vs. SSC-A). Następnie ustawiano bramkowanie pojedynczych komórek (singletów) (FSC-H vs. FSC-A) w celu rozróżnienia dubletów i zlepów komórek. Makrofagi były bramkowane na podstawie ekspresji CD45 (obiekty CD45+). Ekspresja wybranych receptorów (CD11c, CD206 i CD62L) na makrofagach (obiekty CD45+) była bramkowana względem kontroli FMO. Eksperyment powtórzono czterokrotnie, wykorzystując supernatanty hodowli gronkowców z czterech eksperymentów przygotowawczych.

IV.2.12. Ocena pochłaniania *S. aureus* przez makrofagi wyprowadzone z linii THP-1 po ekspozycji na supernatanty z hodowli gronkowców i oczyszczone składniki ściany komórkowej gronkowców

Makrofagi wyprowadzone z monocytów linii z THP-1 po ekspozycji (24 godz.) na badane i porównawcze supernatanty oraz składniki ściany komórkowej gronkowców, a także nieeksponowane komórki kontrolne (K1 i K2) przemywano HHBS. W celu przygotowania bakterii znakowanych FITC, zawiesinę *S. aureus* ATCC 43300 w PBS ($OD_{535}=1.0$) wirowano (3000 obr./min., 10 min.), a do osadu bakterii dodawano 1 mg/ml izotiocyjanianu fluoresceiny (FITC; Sigma Aldrich, USA) w PBS w objętości równej początkowej objętości zawiesiny gronkowców. Bakterie z FITC inkubowano przez 20 minut na wytrząsarce orbitalnej, w ciemności, w temperaturze pokojowej, a następnie trzykrotnie przemywano 4% BSA w PBS, za każdym razem odwirowując w warunkach jak wyżej. Na koniec, osad bakterii znakowanych FITC był zawieszany w podłożu do hodowli komórkowych bez antybiotyków i dodawany do komórek w MOI 1:10 na 1 godzinę w 37°C/5% CO₂. Jednocześnie prowadzono hodowlę makrofagów bez bakterii w celu oceny autofluorescencji komórek. Po inkubacji usuwano wolnopływające bakterie poprzez delikatne przemywanie monowarstwy komórek za pomocą HHBS, zaś fluorescencję bakterii przylegających do komórek (F1) mierzono przy 485_{ex}/535_{em} nm za pomocą SpectraMax i3 (Molecular Devices, USA) w Laboratorium Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Następnie dodawano 0,2% Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA) w PBS na 10 minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce orbitalnej w celu lizy komórek i uwolnienia pochłoniętych gronkowców. Fluorescencję prób - bakterii przylegających do komórek i pochłoniętych (F2) mierzono ponownie jak wyżej. Obliczenia: najpierw średnią wartość autofluorescencji komórek odejmowano od wartości F1 i F2; następnie różnica wartości fluorescencji [F2 - F1] dla każdej próbki została wykorzystana do obliczenia odsetka fagocytozy (pochłaniania) *S. aureus* w stosunku do fagocytozy w odpowiednich próbach kontrolnych uznanej za 100% (K1 dla komórek eksponowanych na oczyszczone składniki ściany komórkowej *S. aureus* i K2 dla komórek eksponowanych na supernatanty z hodowli gronkowców). Eksperyment powtórzono pięciokrotnie w czterech powtórzeniach, wykorzystując supernatanty z pięciu eksperymentów przygotowawczych.

IV.2.13. Ocena wewnątrzkomórkowego zabijania pochłoniętych *S. aureus* przez makrofagi wyprowadzone z linii THP-1 po ekspozycji na supernatanty z hodowli gronkowców i oczyszczone składniki ściany komórkowej gronkowców

Makrofagi wyprowadzone z monocytów linii THP-1 po ekspozycji (24 godz.) na badane i porównawcze supernatanty oraz składniki ściany komórkowej gronkowców, a także nieeksponowane komórki kontrolne (K1 i K2), jak opisano powyżej, przemywano HHBS. Zawiesinę *S. aureus* ATCC 43300 w PBS ($OD_{535}=1.0$) rozcieńczano dziesięciokrotnie w PBS i wirowano (3000 obr./min., 10 min.). Następnie bakterie ponownie zawieszano w podłożu do hodowli komórkowej bez antybiotyków w objętości równej początkowej objętości zawiesiny gronkowców i dodawano do komórek w MOI 1:10 na 1 godz. w 37°C/5% CO₂. Równocześnie zakładano hodowle makrofagów bez bakterii w celu oceny autofluorescencji komórek. Po inkubacji usuwano niezadherowane bakterie, a komórki poddawano działaniu 50 µg/ml gentamycyny (Sigma Aldrich, USA) w podłożu do hodowli komórkowych przez 1 godzinę w temperaturze 37°C/5% CO₂. Następnie jednokrotnie płukano komórki za pomocą HHBS. Komórki do oceny początkowego pochłaniania *S. aureus* natychmiast poddawano lizie za pomocą 0,2% Triton X-100 w PBS (10 minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce orbitalnej), a uwolnione bakterie barwiono odczynnikiem Alamar Blue™ Cell Viability Reagent zgodnie z instrukcjami producenta (Invitrogen, USA). Do komórek przeznaczonych do badania wewnątrzkomórkowego zabijania *S. aureus* dodawano podłoże do hodowli komórkowej (200 µl/studzienkę), inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C/5% CO₂, a następnie traktowano analogicznie. Fluorescencję (RFU) prób mierzono przy 550_{ex}/585_{em} nm przy użyciu SpectraMax i3 w Laboratorium Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Obliczenia: najpierw średnią wartość autofluorescencji komórek odejmowano od wszystkich wartości fluorescencji próbek (po 1 godz. i 24 godz.); następnie obliczano procent przeżywalności *S. aureus* wewnątrz komórek (przez 24 godz. po pochłonięciu) dla każdej próbki, porównując RFU po 24 godzinach do RFU po 1 godzinie uznanej za 100% pochłoniętych bakterii. Eksperyment powtórzono czterokrotnie w czterech powtórzeniach, wykorzystując supernatanty z czterech eksperymentów przygotowawczych.

IV.2.14. Statystyka

Dane zostały przedstawione jako wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Uzyskane wyniki analizowano za pomocą testu *U* Manna-Whitneya, a różnice przy $p \leq 0,05$ uznano za istotne statystycznie. Do obliczeń i wizualizacji wykorzystano oprogramowanie GraphPad Prism w wersji 8.0.1 dla Windows (GraphPad Software, USA).

IV.3. Wyniki

IV.3.1. Wpływ ekstraktów z *V. opulus* na uwalnianie peptydoglikanu i gronkowcowego białka A do supernatantów z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus*

Uwalnianie peptydoglikanu (PG) i gronkowcowego białka A (SpA) z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* ATCC 43300 poddanych działaniu ekstraktów z *V. opulus*, kwasu chlorogenowego (ChA) lub wankomycyny (VAN) w stężeniach sub-MIC oceniano w supernatantach pochodzących z użyciem metody ELISA. Przygotowano również dwa rodzaje prób kontrolnych, osobno dla form planktonowych i biofilmowych: K1 - bakterie w samym podłożu, kontrola do porównania wyników wszystkich prób z wyjątkiem tych po traktowaniu ChA, oraz K2 - bakterie w podłożu zawierającym 0,5% etanolu (EtOH), który był rozpuszczalnikiem dla ChA, kontrola do porównania wyników z prób po traktowaniu bakterii ChA. Wyniki jako wartości średnie z 4 niezależnych eksperymentów przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wpływ ekstraktów z *V. opulus* L. na uwalnianie peptydoglikanu (PG) i gronkowcowego białka A (SpA) z komórek *S. aureus* ATCC 43300 rosnących w formie planktonowej i biofilmowej.

		Stężenie [ng/ml]	
		PG	SpA
hodowle planktonowe	K1	47,97±24,94	6,34±2,82
	K2	30,93±4,22	5,94±1,11
	VBw	66,58±23,60	8,23±1,16
	VFw	62,03±30,74	6,84±2,86
	VFe	67,97±21,05	7,35±2,31
	ChA	33,83±26,80	5,22±3,60
	VAN	54,07±23,12	6,50±2,57
hodowle biofilmowe	K1	18,83±8,68	5,32±1,13
	K2	22,81±11,07	5,23±2,21
	VBw	31,28±9,68	5,45±2,11
	VFw	28,04±9,49	4,91±1,77
	VFe	27,46±9,88	5,21±1,02
	ChA	22,31±9,08	4,45±2,41
	VAN	24,80±7,12	5,90±0,42

Stężenie PG i SpA przedstawiono jako wartości średnie ± SD (n=4). VF - ekstrakt z owoców *V. opulus*; VB - ekstrakt z kory *V. opulus*; e/w/ - ekstrakt etanolowy/wodny; ChA - kwas chlorogenowy (100 µg/ml); VAN - wankomycyna (½ MIC); K1 - bakterie kontrolne w samym podłożu, K2 - bakterie kontrolne w podłożu zawierającym 0,5% etanolu (Et-OH).

Obecność PG i SpA odnotowano we wszystkich badanych układach. Poziom SpA był bardzo niski (nie przekraczał 9 ng/ml), podczas gdy zawartość PG osiągnęła 68 ng/ml. Zgodnie

z oczekiwaniami, uwalnianie składników ściany komórkowej bakterii było bardziej nasilone w przypadku gronkowców rosnących w formie planktonowej niż w formie biofilmu. Ekspozycja *S. aureus* na ekstrakty *V. opulus*, ChA lub VAN spowodowała nasilone uwalnianie PG zarówno z hodowli planktonowych, jak i biofilmowych, w porównaniu z odpowiednimi kontrolami (Tabela 1.). Różnice te nie były jednak istotne statystycznie. Co ciekawe, zawartość PG w supernatantach bakterii eksponowanych na ekstrakty *V. opulus* była wyższa niż w tych eksponowanych na antybiotyk stosowany w stężeniu $\frac{1}{2}$ MIC. Podobne efekty zaobserwowano w przypadku uwalniania SpA z hodowli planktonowej *S. aureus*, podczas gdy ekstrakty *V. opulus*, ChA lub VAN nie powodowały nasilonego w stosunku do kontroli uwalniania SpA z biofilmu *S. aureus* (Tabela 1).

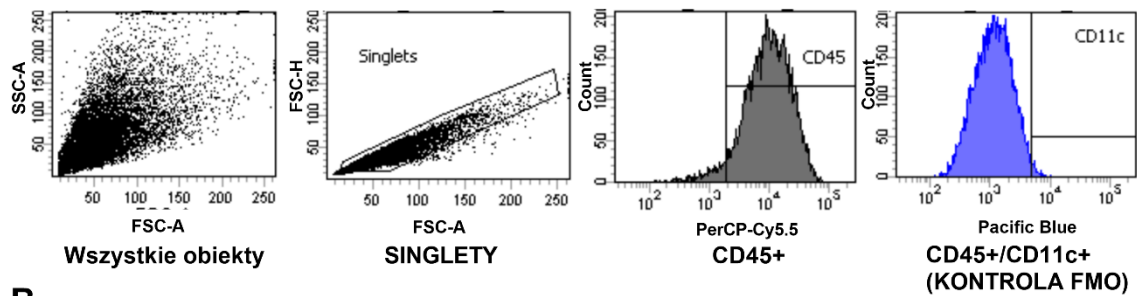
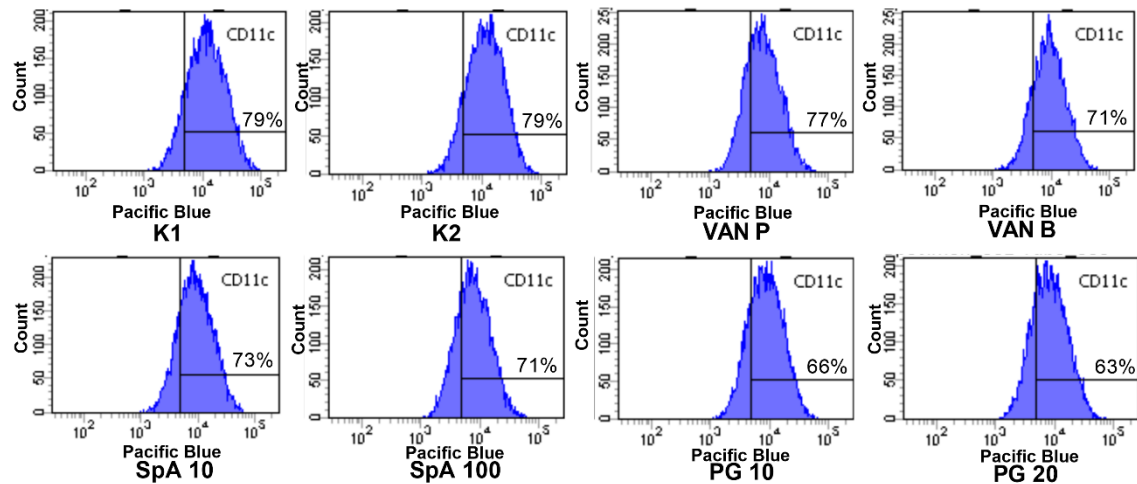
IV.3.2. Wpływ badanych i porównawczych supernatantów z hodowli *S. aureus* oraz składników ściany komórkowej gronkowców na zmiany w powierzchniowej ekspresji markerów CD na makrofagach zróżnicowanych z THP-1

W celu analizy polaryzacji makrofagów na dwa główne fenotypy: prozapalny M1 lub regulatorowy M2, w odpowiedzi na supernatanty z hodowli *S. aureus* poddanych działaniu ekstraktów z kaliny koralowej lub składniki ściany komórkowej gronkowców, zbadano ekspresję wybranych markerów CD na powierzchni makrofagów pochodzących z linii THP-1 z użyciem cytometrii przepływowej. Oceniano ekspresję CD45 (wspólny antygen leukocytów; bramkowanie komórek), CD11c (integryna αX ; marker makrofagów fenotypu M1), CD206 (receptor mannozy C typu 1; marker makrofagów fenotypu M2) i CD62L (selektyna L eksponowana na aktywowanych leukocytach). Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 2 i na Rycinie 4.

Tabela 2. Ekspresja wybranych markerów CD na makrofagach pochodzących z THP-1 (komórki CD45+) poddanych działaniu (24 godz.) badanych i porównawczych supernatantów z hodowli *S. aureus* ATCC 43300 lub składników ściany komórkowej *S. aureus*.

		CD45+ [%]		
		CD11c+	CD206+	CD62L+
P	K1	81,18±3,10	5,53±2,50	1,35±0,60
	K2	78,50±1,44	3,95±2,02	2,50±1,40
	PG 10	69,30±2,35*	2,63±1,36	1,63±0,87
	PG 20	68,98±4,19*	3,18±1,65	2,53±1,30
	SpA 10	80,10±5,01	4,60±2,32	1,13±0,64
	SpA 100	77,13±4,41	3,40±1,74	1,23±0,78
	VBw	77,05±3,83	2,80±1,28	2,03±1,23
	VFw	77,95±3,11	2,88±1,35	1,98±1,08
	VFe	78,25±3,70	3,03±1,35	2,18±1,35
	ChA	77,73±2,36	2,45±1,37	1,55±1,24
	VAN	75,73±5,58	2,83±1,57	1,88±1,45
	VBw	75,98±4,72	2,88±1,70	2,30±1,59
	VFw	75,53±7,35	3,40±1,93	2,80±1,67
	VFe	75,15±7,85	3,25±1,55	2,48±1,63
	ChA	77,05±4,90	3,18±1,56	2,53±1,77
	VAN	74,55±2,64*	3,28±1,75	2,50±1,51

Badane supernatanty hodowlane: VBw - ekstrakt wodny z kory *V. opulus*, VFw - ekstrakt wodny z owoców *V. opulus*, VFe - ekstrakt etanolowy z owoców *V. opulus*; porównawcze supernatanty hodowlane: ChA - kwas chlorogenowy (100 µg/ml), VAN - wankomycyna (½ MIC); B - supernatanty z hodowli biofilmowej *S. aureus*, P - supernatanty z hodowli planktonowej *S. aureus*; składniki ściany komórkowej *S. aureus*: PG - peptydoglikan (10 i 20 µg/ml), SpA (10 i 100 µg/ml). * $p \leq 0,05$ statystycznie istotne różnice w porównaniu do K1 (dla komórek traktowanych PG i SpA) lub K2 (dla komórek traktowanych supernatantami z hodowli *S. aureus*).

A**B**

Ryc. 4. Reprezentatywne histogramy z cytofluorometru przepływowego dla ekspresji CD11c na makrofagach pochodzących z THP-1 eksponowanych (24 godz.) na badane i porównawcze supernatanty z hodowli *S. aureus* ATCC 43300 lub składniki ściany komórkowej *S. aureus*.

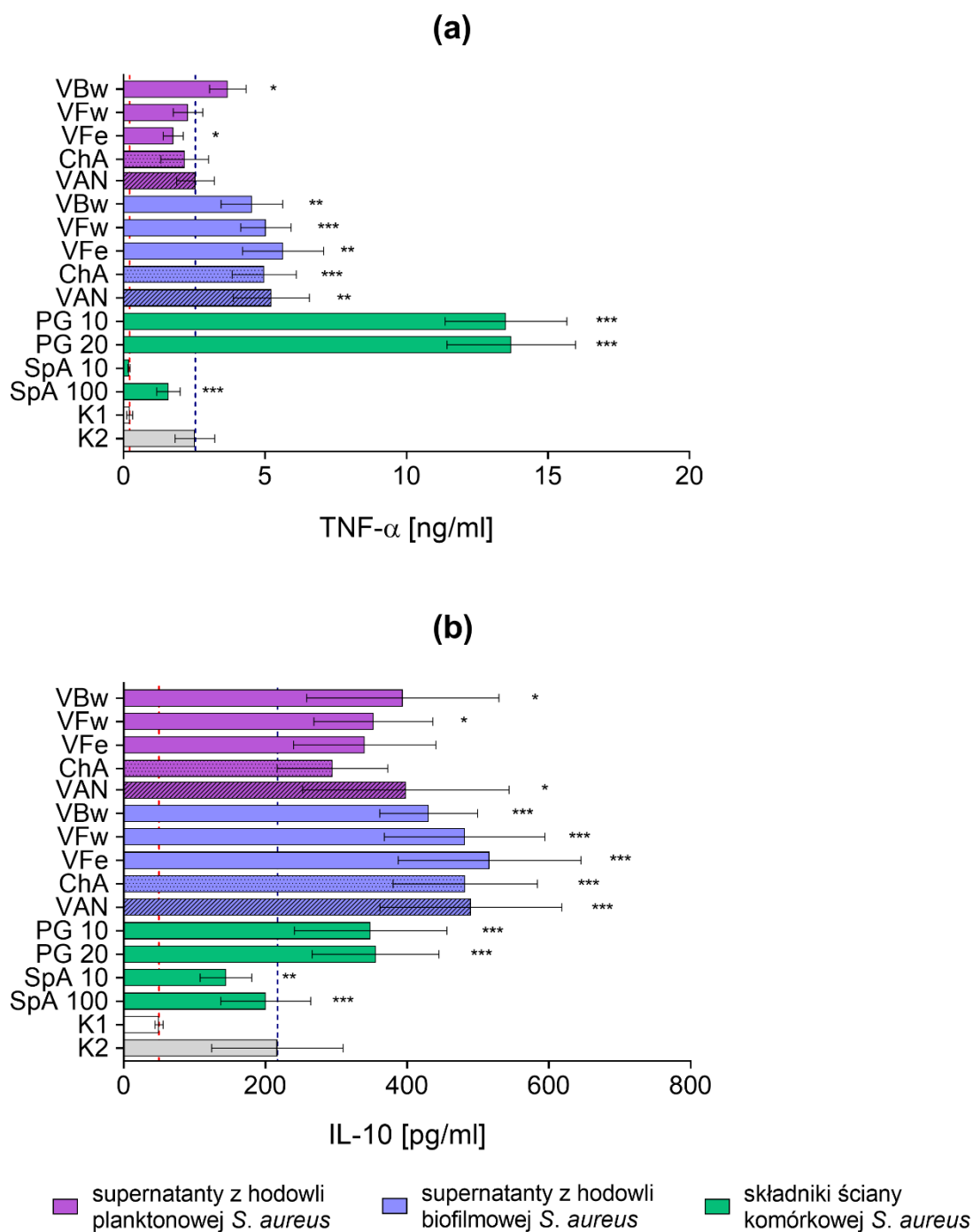
(A) Schemat bramkowania do pomiarów ekspresji CD11c na powierzchni makrofagów (obiekty CD45+). W pierwszej kolejności makrofagi rozróżniane były na podstawie wielkości mierzonych obiektów (profil rozproszenia światła rejestrowany na detektorach (FSC-A) i (SSC-A)). Bramkowanie pojedynczych komórek (singletów) przeprowadzono na podstawie wykresów dot-plot FSC-H vs. FSC-A (region bramkowania został ustawiony w celu rozróżnienia dubletów komórek). Makrofagi były następnie bramkowane na podstawie ekspresji CD45 (obiekty CD45+). Ekspresja CD11c na makrofagach (obiekty CD45+) była bramkowana względem kontroli FMO (ang. *Fluorescence Minus One*). (B) Histogramy cytometryczne, przedstawiające poziom ekspresji CD11c na makrofagach (obiekty CD45+): K1 - komórki kontrolne w samym podłożu hodowlanym; K2 - komórki kontrolne w podłożu hodowlanym zawierającym podłoże dla bakterii (TSB/Glu); VAN P/B - supernatanty z hodowli planktonowej/biofilmowej *S. aureus* po traktowaniu wankomycyną; SpA 10/100 - gronkowcowe białko A [10/100 µg/ml]; PG 10/20 - peptydoglikan [10/20 µg/ml].

Ekspresja CD11c na nietraktowanych (kontrolnych) komórkach CD45+ była bardzo wysoka - ponad 81% kontrolnych komórek K1 i prawie 80% kontrolnych komórek K2 posiadało CD11c na powierzchni. Supernatanty z hodowli *S. aureus* (zarówno badane, jak i porównawcze), a także składniki ściany komórkowej gronkowców ogółem zmniejszały ekspresję CD11c na makrofagach pochodzących z monocytów THP-1 (Tabela 2). Obserwowane zmiany w większości nie były istotne statystycznie w porównaniu do odpowiednich komórek kontrolnych (K1 dla komórek eksponowanych na składniki ściany komórkowej *S. aureus*, K2 dla komórek eksponowanych na supernatanty z hodowli *S. aureus*). Jedynie komórki eksponowane na PG *S. aureus* i supernatant z hodowli biofilmowej *S. aureus* po ekspozycji na wankomycynę (VAN) wykazywały znacząco niższą ekspresję CD11c (spadek o 11,9%, 12,2% i 4% odpowiednio dla PG 10 µg/ml, PG 20 µg/ml i VAN, w porównaniu do odpowiednich kontroli). Ekspresja receptora CD206 na makrofagach CD45+ pod wpływem badanych preparatów również uległa niewielkim zmianom w porównaniu do odpowiednich kontroli i była na stosunkowo niskim poziomie, osiągając najwyższą wartość dla komórek kontrolnych ($5,53 \pm 2,5\%$ K1) i nie przekraczając 3,5% dla komórek badanych (z wyjątkiem komórek eksponowanych na SpA stosowanym w stężeniu 10 µg/ml) (Tabela 2). Co ciekawe, w przeciwieństwie do CD11c i CD206, obecność podłoża hodowlanego dla bakterii (TSB/Glu) w podłożu do hodowli komórkowej przyczyniła się do niemal podwojenia poziomu ekspresji cząsteczki CD62L na nietraktowanych (kontrolnych) komórkach CD45+. Ekspozycja komórek na badane preparaty (np. PG, supernatanty z hodowli biofilmowej *S. aureus* traktowane ekstraktem wodnym z owoców *V. opulus* lub kwasem chlorogenowym) również zwiększała ekspozycję CD62L na powierzchni komórek (Tabela 2). Zmiany te nie były jednak istotne statystycznie.

IV.3.3. Wpływ badanych i porównawczych supernatantów z hodowli *S. aureus* oraz składników ściany komórkowej gronkowców na produkcję cytokin przez makrofagi pochodzące z THP-1

Jednym ze wskaźników stymulacji makrofagów i ich zmienności fenotypowej jest aktywność wydzielnicza. W związku z tym zbadano produkcję i uwalnianie wybranych cytokin: czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α) i interleukiny 10 (IL-10) przez makrofagi THP-1 eksponowane na supernatanty z hodowli planktonowych i biofilmowych

S. aureus ATCC 43300 lub składniki ściany komórkowej gronkowców za pomocą testu ELISA. Otrzymane wyniki przedstawiono na Ryc. 5.



Ryc. 5. Cytokiny: TNF- α (a) i IL-10 (b) wydzielane przez makrofagi THP-1 eksponowane (24 godz.) na badane i porównawcze supernatanty z hodowli *S. aureus* ATCC 43300 lub składniki ściany komórkowej gronkowców.

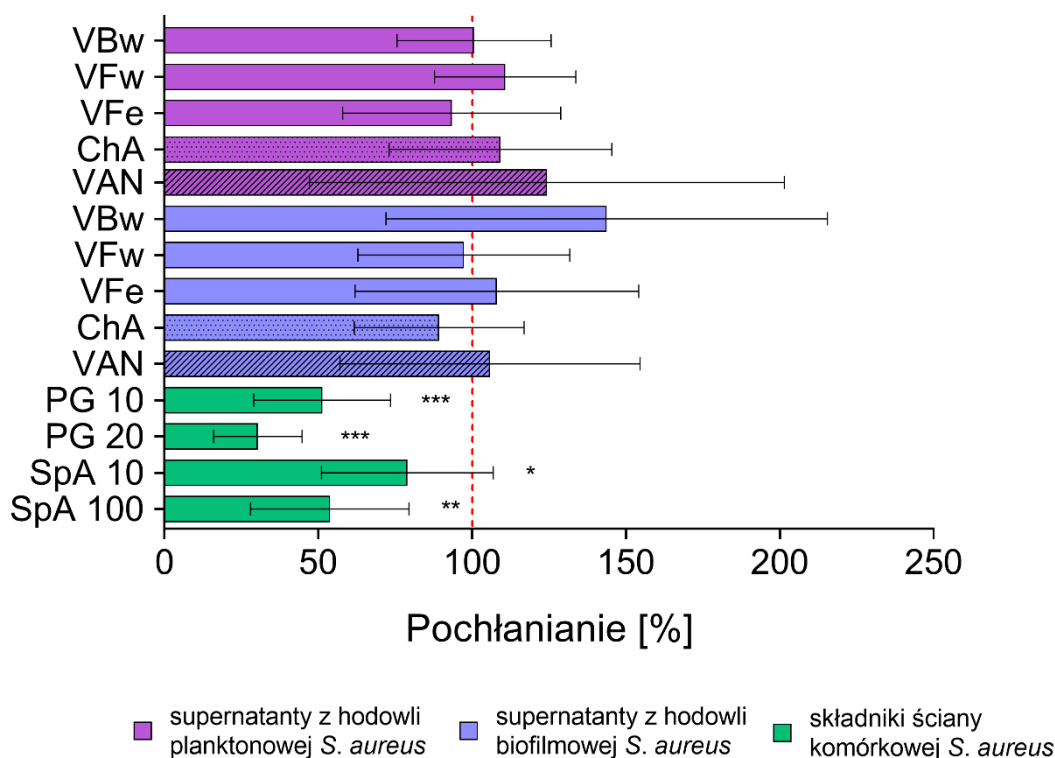
Badane supernatanty hodowlane: VBw - ekstrakt wodny z kory *V. opulus*, VFw - ekstrakt wodny z owoców *V. opulus*, VFe - ekstrakt etanolowy z owoców *V. opulus*; porównawcze supernatanty hodowlane: ChA - kwas chlorogenowy (100 µg/ml), VAN - wankomycyna (½ MIC); składniki ściany komórkowej *S. aureus*: PG - peptydoglikan (10 i 20 µg/ml), SpA (10 i 100 µg/ml). Statystycznie istotne różnice w porównaniu do K1 (dla komórek traktowanych PG i SpA) lub K2 (dla komórek traktowanych supernatantami z hodowli *S. aureus*): * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Zaobserwowano znaczne nasilenie produkcji TNF- α przez komórki eksponowane na supernatanty z hodowli biofilmowych *S. aureus* ATCC 43300 (zarówno w układach badanych - biofilmu traktowanego ekstraktami *V. opulus*, jak i układach porównawczych - biofilmu traktowanego VAN lub ChA), a także na składniki ściany komórkowej *S. aureus* (Ryc. 5a). Stężenie TNF- α wzrosło 1,8-2,2-krotnie pod wpływem badanych supernatantów z hodowli biofilmowych *S. aureus* i około 2-krotnie w przypadku porównawczych supernatantów z hodowli biofilmowych. Najbardziej intensywny wzrost wykazano dla makrofagów pochodzących z THP-1 wystawionych na działanie PG (61-62 razy). Co ciekawe, w przypadku supernatantów z hodowli planktonowych *S. aureus* ATCC 43300, znaczący wzrost produkcji TNF- α odnotowano tylko dla komórek eksponowanych na supernatant VBw uzyskany z bakterii planktonowych traktowanych wodnym ekstraktem z kory *V. opulus* (Ryc. 5a). Podczas gdy produkcja IL-10 wzrosła we wszystkich badanych próbkach, w tym w komórkach eksponowanych na supernatanty z hodowli planktonowych *S. aureus* ATCC 43300 (Ryc. 5b). Podobnie, najbardziej intensywny wzrost wykazano dla makrofagów pochodzących z THP-1 eksponowanych na PG (7 razy). Stężenie IL-10 wzrosło do 2,4 razy pod wpływem supernatantów z hodowli biofilmowych i do 1,8 razy w przypadku supernatantów z hodowli planktonowych *S. aureus*.

IV.3.4. Wpływ „primingu” supernatantami z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* oraz składnikami ściany komórkowej gronkowców na modulację funkcji makrofagów pochodzących z THP-1 w zakresie ich aktywności fagocytarnej przeciwko gronkowcom

W celu oceny zmiany w funkcjonowaniu makrofagów po „primingu” supernatantami hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* ATCC 43300 oraz składnikami ściany komórkowej gronkowców, zbadano aktywność fagocytarną komórek, rozumianą jako

zdolność do pochłaniania i wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii. Wyniki pochłaniania *S. aureus* ATCC 43300 przez makrofagi THP-1 eksponowane na supernatanty hodowlane tego samego szczepu gronkowca lub składniki ściany komórkowej *S. aureus* przedstawiono na Rycinie 6.



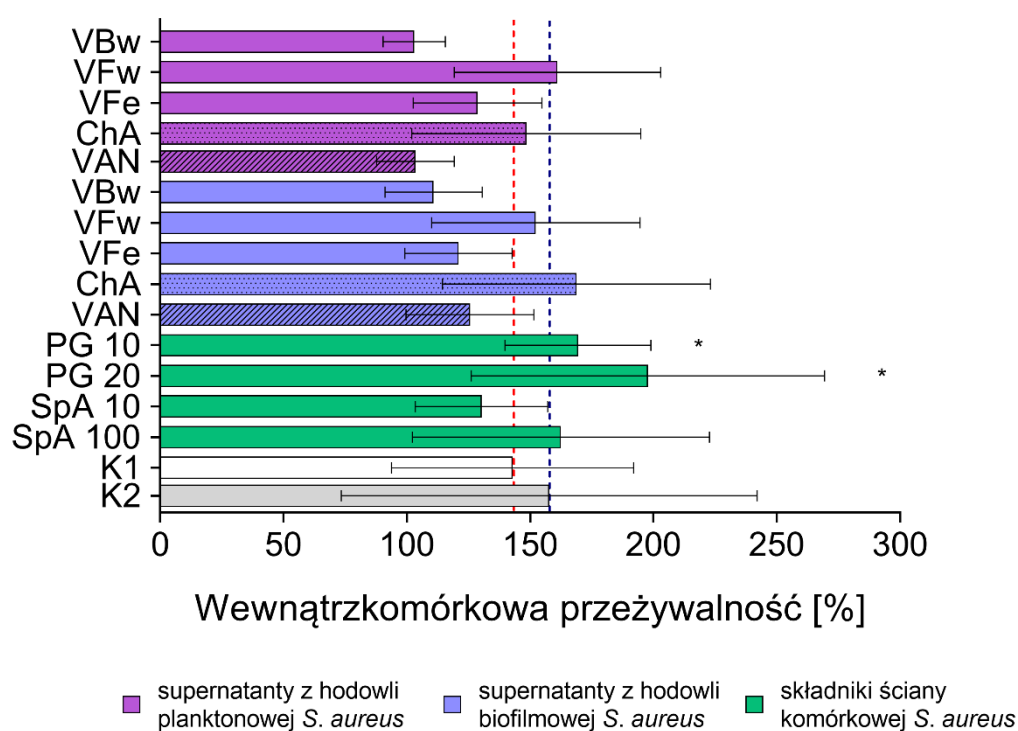
Ryc. 6. Pochłanianie *S. aureus* ATCC 43300 przez makrofagi wyprowadzone z linii THP-1 eksponowane (24 godz.) na działanie badanych i porównawczych supernatantów hodowlanych *S. aureus* lub składników ściany komórkowej gronkowców.

Badane supernatanty hodowlane: VBw - wodny ekstrakt z kory *V. opulus*, VFw - wodny ekstrakt z owoców *V. opulus*, VFe - etanolowy ekstrakt z owoców *V. opulus*; porównawcze supernatanty hodowlane: ChA - kwas chlorogenowy (100 µg/ml), VAN - wankomycyna (½ MIC); składniki ściany komórkowej *S. aureus*: PG - peptydoglikan (10 i 20 µg/ml), SpA (10 i 100 µg/ml). Statystycznie istotne różnice w porównaniu do K1 (dla komórek traktowanych PG i SpA) lub K2 (dla komórek traktowanych supernatantami z hodowli *S. aureus*), których wyniki uznano za 100%: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Zaobserwowano istotny statystycznie spadek pochłaniania *S. aureus* ATCC 43300 przez makrofagi THP-1 eksponowane na składniki ściany komórkowej gronkowców

złocistych (Ryc. 6). PG zastosowany w stężeniu 20 µg/ml spowodował największy spadek pochłaniania bakterii o 69,6% ($p \leq 0,001$). Podobny efekt był również konsekwencją ekspozycji komórek na SpA (spadek fagocytozy do 47%). Natomiast ekspozycja komórek na supernatanty z hodowli *S. aureus* (zarówno planktonowych, jak i biofilmowych) uzyskane po traktowaniu bakterii ekstraktami z *V. opulus*, kwasem chlorogenowym lub wankomycyną nie miała znaczącego wpływu na pochłanianie *S. aureus*. Supernatant z hodowli biofilmowej *S. aureus* traktowanej wodnym ekstraktem z kory *V. opulus* (VBw) wydawał się nawet stymulować makrofagi THP-1 do fagocytozy gronkowców (Ryc. 6), jednak różnica w porównaniu z komórkami kontrolnymi nie była istotna statystycznie.

Wyniki wewnątrzkomórkowego zabijania gronkowców przez makrofagi pochodzące z THP-1 wystawione na działanie supernatantów hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* ATCC 43300 lub składników ściany komórkowej gronkowców przedstawiono na Rycinie 7, jako przeżywalność wewnątrz makrofagów w ciągu 24 godzin wstępnie zinternalizowanych *S. aureus*.



Ryc. 7. Zdolność makrofagów wyprowadzonych z linii THP-1 eksponowanych (24 godz.) na działanie badanych i porównawczych supernatantów z hodowli *S. aureus* lub składników ściany komórkowej gronkowców do wewnątrzkomórkowego zabijania pochłoniętych *S. aureus* ATCC 43300.

Badane supernatanty hodowlane: VBw - wodny ekstrakt z kory *V. opulus*, VFw - wodny ekstrakt z owoców *V. opulus*, VFe - etanolowy ekstrakt z owoców *V. opulus*; porównawcze supernatanty hodowlane: ChA - kwas chlorogenowy (100 µg/ml), VAN - wankomycyna (½ MIC); składniki ściany komórkowej *S. aureus*: PG - peptydoglikan (10 i 20 µg/ml), SpA (10 i 100 µg/ml). Statystycznie istotne różnice w porównaniu do K1 (dla komórek traktowanych PG i SpA) lub K2 (dla komórek traktowanych supernatantami hodowli *S. aureus*), których wyniki uznano za 100%: * $p \leq 0.05$.

Przede wszystkim stwierdzono, że *S. aureus* ATCC 43300 przeżywał i namnażał się wewnątrz makrofagów pochodzących z THP-1 w ciągu 24 godzin po internalizacji. Liczba żywych bakterii wzrosła o około 43% i 58%, odpowiednio w komórkach kontrolnych K1 i K2, w porównaniu do liczby pochłoniętych bakterii uznanych za 100% (Ryc. 7). Ekspozycja komórek na PG znacząco ($p \leq 0,05$) zwiększyła przeżywalność gronkowców (o 25,5% i 54,8% po zastosowaniu PG w stężeniu odpowiednio 10 i 20 µg/ml) w porównaniu do komórek kontrolnych (K1), podczas gdy wstępna ekspozycja na SpA nie miała znaczącego wpływu na przeżywalność wewnątrzkomórkową *S. aureus*. Co ciekawe, ekspozycja komórek na większość badanych i porównawczych supernatantów hodowlanych uzyskanych z planktonowych i biofilmowych hodowli *S. aureus* ATCC 43300 spowodowała zmniejszenie liczby żywych bakterii wewnątrz komórek wystawionych na działanie tych supernatantów w porównaniu z właściwą kontrolą (K2) (Ryc. 7). Wskazuje to na większą zdolność stymulowanych w ten sposób makrofagów do ograniczania wzrostu i/lub zabijania pochłoniętych gronkowców. Spośród badanych supernatantów, te uzyskane z planktonowych i biofilmowych hodowli *S. aureus* ATCC 43300 traktowanych wodnym ekstraktem z kory *V. opulus* (VBw na Ryc. 7) najlepiej stymulowały makrofagi THP-1 do ograniczania wewnątrzkomórkowego namnażania się gronkowców. Jednak różnice w liczbie bakterii pozostających przy życiu po 24 godzinach inkubacji komórek w porównaniu z kontrolą nie były statystycznie istotne.

IV.4. Podsumowanie wyników nieopublikowanych i wnioski

Udowodniliśmy dodatkowy potencjał immunomodulacyjny ekstraktów z kaliny koralowej (*V. opulus* L.), które mogą oddziaływać pośrednio na komórki układu odpornościowego, modulując ich aktywność poprzez składniki uwalniane z mikroorganizmów tymczasowo lub trwale zasiedlających tkanki gospodarza, takich jak

gronkowce. Należy podkreślić, że stężenie i skład (złożona mieszanina) biologicznie aktywnych składników *S. aureus* uwalnianych zarówno z hodowli planktonowych, jak i biofilmowych gronkowców przez ekstrakty *V. opulus* były wystarczające, aby nasilić aktywność wydzielniczą makrofagów wyprowadzonych z monocytów linii THP-1 w zakresie produkcji cytokin ważnych dla odpowiedzi immunologicznej przeciwko infekcjom gronkowcowym (TNF- α , IL-10). Pozytywnie wpłynęły także na zdolność tych komórek do ograniczania wewnątrzkomórkowego namnażania się pochłoniętych gronkowców. Podczas gdy oczyszczone (komercyjnie dostępne) składniki ściany komórkowej *S. aureus* stosowane w wyższych stężeniach (PG, SpA) wydawały się powodować anergię badanych makrofagów, hamując fagocytozę bakterii na obu poziomach: pochłaniania i wewnątrzkomórkowego zabijania. Może to być jedna z przyczyn niepowodzeń w rozwoju podjednostkowych szczepionek przeciwgronkowcowych, w których zastosowano tylko kilka antygenów, podczas gdy według Askarian i wsp. (2018) *S. aureus* wykazuje ekspresję ponad 100 czynników wirulencji. Nasze badania sugerują nową możliwość stymulacji komórek wrodzonego układu odpornościowego przeciwko infekcjom gronkowcowym przy użyciu naturalnej mikrobioty i roślinnych suplementów diety. Proponowane rozwiązanie ma również pewne ograniczenia. Jednym z nich są przewlekłe choroby zapalne. Pacjenci z rozregulowanym układem odpornościowym, w tym nie zrównoważoną adaptacyjną odpowiedzią immunologiczną Th1/Th2, nie mogą być dodatkowo narażani na składniki lub produkty komórek gronkowców, takie jak superantygeny, które są odpowiedzialne za nasiloną reakcję zapalną, w tym nadmierną aktywację komórek układu odpornościowego i burzę cytokinową (Matsuoka i wsp. 2015, Guan 2019, Iwamoto i wsp. 2019). Co więcej, prezentowane przez nas dane pochodzą jedynie z badań *in vitro* i dopiero przyszłe badania na modelach zwierzęcych pozwolą określić rzeczywistą przydatność takiego rozwiązania.

V. Podsumowanie i wnioski

Najważniejsze wyniki uzyskane w ramach realizacji celów szczegółowych pracy doktorskiej zostały podsumowane poniżej.

- I. Ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych i cytotoksycznych ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej w działaniu bezpośrednim przeciwko *S. aureus* [Publikacja P2].

Wykazano, że:

- Najsilniejsze bezpośrednie działanie przeciwgronkowcowe posiada acetonowy ekstrakt z kory kaliny koralowej (VBa), dla którego stężenie MIC jest równe MBC i wynosi 1 mg/ml w stosunku do *S. aureus* ATCC 29213.
- Wartość MIC oraz MBC pozostałych ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej w stosunku do *S. aureus* ATCC 29213 jest większa bądź równa 2 mg/ml.
- Ekstrakty z owoców i kory kaliny koralowej nie są cytotoksyczne dla ludzkich fibroblastów linii HFF-1 w pełnym zakresie badanych stężeń 0,49-500 µg/ml.

WNIOSKI:

1. Ekstrakty z owoców i kory kaliny koralowej wykazują słabą bezpośrednią aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec gronkowców złocistych.
2. Brak cytotoksyczności w stosunku do fibroblastów ludzkich wskazuje na możliwość bezpiecznego stosowania u ludzi ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej w zakresie stężeń do 500 µg/ml.
3. Do dalszych badań wybrano stężenia subinhibicyjne ekstraktów z kaliny: 100 i 500 µg/ml, z uwagi na bezpieczeństwo ich stosowania dla komórek eukariotycznych oraz brak wpływu hamującego na wzrost gronkowców złocistych.

II. Ocena możliwości zastosowania sortazy A jako celu molekularnego dla preparatów przeciwdrobnoustrojowych i potencjalnego składnika szczepionek przeciwgronkowcowych [Publikacja P2].

Wykazano, że:

- Ekstrakty z kaliny koralowej silnie hamują aktywność sortazy A w testach z wolnym enzymem. Najsilniejszy efekt wywierał wodny ekstrakt z owoców *V. opulus* (VFw; hamowanie aktywności SrtA w zakresie 46,7-57,9%), acetonowy ekstrakt z kory (VBa; 60,5% zahamowanie aktywności SrtA w stężeniu 500 µg/ml) i etanolowy ekstrakt z kory (VBe; 54,2% inhibicji aktywności SrtA w stężeniu 500 µg/ml).
- Ekstrakty z kory kaliny koralowej w działaniu bezpośrednim na *S. aureus* (badane szczepy *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* H9) powodują w większości przypadków istotne zmniejszenie ekspresji SpA na powierzchni komórek gronkowców.
- Ekstrakty z kory kaliny koralowej wywołują zmiany w składzie lipidów i kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych *S. aureus* (badany szczep *S. aureus* ATCC 43300; wzrost zawartości fosfatydylogliceroli i diglukozyl-diacylgliceroli oraz znaczący spadek zawartości lizylo-fosfatydylogliceroli).
- Ekstrakty z kaliny koralowej istotnie hamują tworzenie biofilmu przez gronkowce, w tym: *S. aureus* ATCC 43300 w zakresie 10,2-25,0% i *S. aureus* H9 w zakresie 6,3-23,2%.

WNIOSKI:

1. Zmniejszenie ekspresji białka SpA na powierzchni komórek *S. aureus* po ekspozycji na ekstrakty z kaliny koralowej wynika prawdopodobnie z zahamowania u tych bakterii aktywności enzymu błonowego sortazy A (SrtA).
2. Zmiany w składzie lipidów i kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych *S. aureus* pod wpływem ekstraktów z kory kaliny koralowej wskazują na destabilizację błon komórkowych gronkowców, która może uwrażliwiać te bakterie na działanie kationowych substancji przeciwdrobnoustrojowych. Zmiany

te mogą także wpływać na aktywność SrtA oraz intensywność tworzenia biofilmu przez gronkowce złociste.

3. Pomimo hamowania przez ekstrakty z kaliny koralowej aktywności SrtA i ekspresji SpA na powierzchni komórek gronkowców złocistych, bakterie te nadal skutecznie tworzyły biofilmy w obecności badanych ekstraktów. Proces tworzenia biofilmów przez gronkowce, jako zależny od wielu różnych cząsteczek adhezyjnych, produkcji zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych, aktywacji systemów *quorum-sensing* i sensorycznych systemów dwuskładnikowych, nie podlega zatem prostej regulacji przez wpływ na pojedyncze czynniki wirulencji gronkowców.
4. Sortaza A rozpatrywana samodzielnie nie jest wystarczającym celem molekularnym dla preparatów przeciwdrobnoustrojowych i szczepionek przeciwgronkowcowych, by skutecznie ograniczyć rozwój zakażeń z udziałem *S. aureus* lub im zapobiegać.

III. Analiza właściwości immunomodulujących ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej przez ocenę wpływu czynników uwalnianych z planktonowych i biofilmowych hodowli *S. aureus* po ekspozycji na ww. ekstrakty na polaryzację makrofagów w subpopulacje M1 lub M2 [wyniki nieopublikowane].

Wykazano, że:

- Ekspozycja hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* ATCC 43300 na ekstrakty z kaliny koralowej powoduje uwalnianie PG i SpA z powierzchni komórek gronkowców.
- Ekspozycja makrofagów wyprowadzonych z monocytów linii THP-1 na supernatanty z hodowli planktonowych lub biofilmowych *S. aureus* ATCC 43300 poddanych działaniu ekstraktów z kaliny nie wpłynęła w sposób istotny na zmianę ekspresji badanych markerów CD (CD11c, CD206, CD62L) w populacji komórek CD45+.
- Ekspozycja makrofagów wyprowadzonych z monocytów linii THP-1 na supernatanty z hodowli planktonowych lub biofilmowych *S. aureus* ATCC

43300 poddanych działaniu ekstraktów z kaliny powodowała istotne nasilenie produkcji TNF- α i IL-10. Wyjątek stanowiły makrofagi ekspozowane na supernatant z hodowli planktonowej *S. aureus* poddanej działaniu etanolowego ekstraktu z owoców kaliny (VFe), które produkowały istotnie mniej TNF- α , ale nie IL-10.

WNIOSKI:

1. Aktywne składniki ściany komórkowej *S. aureus* uwalniane do środowiska z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* pod wpływem działania ekstraktów z kaliny koralowej stosowanych w stężeniach subinhibicyjnych mogą modulować produkcję cytokin przez makrofagi, lecz nie wpływają na zmianę ekspozycji powierzchniowej markerów CD na tych komórkach.
2. Nasiloną produkcja TNF- α przez makrofagi ekspozowane na supernatanty z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* po działaniu ekstraktów z kaliny koralowej sugeruje polaryzację makrofagów w kierunku komórek prozapalnych M1, ale brak istotnych zmian w powierzchniowej ekspozycji markerów CD uniemożliwia jednoznaczne określenie fenotypu tych komórek.

IV. Analiza właściwości immunomodulujących ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej przez ocenę wpływu czynników uwalnianych z planktonowych i biofilmowych hodowli *S. aureus* po ekspozycji na ekstrakty owoców i kory kaliny koralowej na wybrane parametry aktywności przeciwwakażnej komórek fagocytarnych [wyniki nieopublikowane].

Wykazano, że:

- Supernatanty z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* ATCC 43300 ekspozowanych na ekstrakty z kaliny nie wywierały istotnego wpływu na pochłanianie gronkowców przez makrofagi wyprowadzone z monocytów linii THP-1.
- Gronkowce złociste po pochłonięciu przez makrofagi wyprowadzone z linii THP-1, namnażały się wewnątrz tych komórek.

- Stymulacja makrofagów wyprowadzonych z linii THP-1 supernatantami z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* ATCC 43300 eksponowanych na ekstrakty z kaliny spowodowała ograniczenie wewnątrzkomórkowego przeżywania i namnażania się *S. aureus* ATCC 43300 w ciągu 24 godzin od pochłonięcia tych drobnoustrojów.

WNIOSKI:

1. Ekstrakty z owoców i kory kaliny koralowej mają potencjał modulujący aktywność przeciwważną makrofagów w zakresie zdolności do ograniczania wewnątrzkomórkowego namnażania się pochłoniętych gronkowców. Należy podkreślić, że oceniano ich działanie pośrednie przez aktywne składniki uwalniane z komórek gronkowców pod wpływem badanych ekstraktów stosowanych w stężeniach subinhibicyjnych, które następnie wpływały na makrofagi.
2. Wykazano możliwość „primingu” komórek wrodzonego układu odpornościowego przez składniki uwalniane z gronkowców tymczasowo lub trwale zasiedlających tkanki gospodarza pod wpływem działania ekstraktów roślinnych. Ponieważ jednak prezentowane wyniki pochodzą z badań prowadzonych *in vitro*, należy przeprowadzić dalsze badania na modelach zwierzęcych, by określić rzeczywistą przydatność takiego rozwiązania.

VI. Dyskusja

Pomimo rozległej wiedzy na temat gronkowców, *S. aureus* jest wciąż wiodącym patogenem zakażeń szpitalnych i pozaszpitalnych u ludzi (Tong i wsp. 2015, Kourtis i wsp. 2019, Cheung i wsp. 2021). Wyczerpywanie się zasobów skutecznych antybiotyków, trudne w leczeniu zakażenia z udziałem biofilmów tych drobnoustrojów, a także brak szczepionki przeciwko gronkowcom złocistym to główne powody poszukiwań alternatywnych metod zapobiegania rozwojowi i leczenia zakażeń gronkowcowych, także przy użyciu ekstraktów roślinnych. Problemy te szeroko omówiono w publikacji przeglądowej [P1], która wchodzi w skład prezentowanej rozprawy. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była weryfikacja możliwości zastosowania naturalnych ekstraktów roślinnych na przykładzie ekstraktów z kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.) do zapobiegania zakażeniom wywoływanym przez *S. aureus* oraz ich rozwojowi do trudnych w leczeniu zakażeń biofilmowych.

Poszukiwanie związków pochodzenia roślinnego, które wykazują bezpośrednie działanie bakteriostatyczne i/lub bakteriobójcze na gronkowce złociste, prowadzące do eliminacji patogenów powodujących infekcję jest głównym kierunkiem działań (Różalska i wsp. 2018, Nasim i wsp. 2022). Dlatego też, w ramach pierwszego etapu pracy dokonano oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych acetonowych, etanolowych i wodnych ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej przeciwko *S. aureus* ATCC 29213 oraz oceny aktywności cytotoksycznej badanych ekstraktów w stosunku do komórek eukariotycznych (publikacja [P2]). Wykazano, że badane ekstrakty nie są cytotoksyczne dla ludzkich fibroblastów linii HFF-1 w zakresie stężeń 0,49-500 µg/ml oraz wykazują bezpośrednią aktywność biostatyczną/biobójczą wobec gronkowców. Jednakże minimalne stężenie hamujące wzrost tych drobnoustrojów (MIC, ang. *minimum inhibitory concentration*) oraz minimalne stężenie bójcze (MBC, ang. *minimum bactericidal concentration*) dla większości badanych ekstraktów było większe bądź równe 2 mg/ml. Jedynie dla acetonowego ekstraktu z kory kaliny koralowej (VBa) wartość MIC była równa MBC i wyniosła 1 mg/ml (publikacja [P2]). Dla porównania, w badaniach Speck i wsp. (2020) wykazano, że MIC oksacyliny dla *S. aureus* ATCC 29213 (szczepu wrażliwego na ten antybiotyk) wynosiło 0,25 mg/l, czyli 4000 razy mniej niż MIC VBa w stosunku do tego samego szczepu gronkowca złocistego. Ekstrakty z kaliny koralowej wykazują zatem słabą bezpośrednią aktywność biostatyczną/biobójczą w stosunku do gronkowców. Aktywność biologiczna ekstraktów *V. opulus* wynika głównie z obecności związków fenolowych (Kajszczak i wsp. 2020), których wysoką zawartość potwierdzono w ekstraktach za pomocą analizy

biochemicznej (publikacja [P2]). Związki fenolowe charakteryzuje jednak niska biodostępność po podaniu doustnym oraz słaba dystrybucja tkankowa (Rein i wsp. 2013, Cosme i wsp. 2020, Pietrzyk i wsp. 2021). Biorąc pod uwagę te właściwości oraz wskazane wysokie stężenie MIC/MBC konieczne do osiągnięcia aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych ekstraktów, stwierdzono, że zastosowanie ekstraktów z kaliny koralowej w celu bezpośredniego działania biobójczego/biostatycznego przeciwko gronkowcom złocistym jest w proponowanej formie suplementów diety niemożliwe.

Zarówno inicjacja, jak i przebieg infekcji gronkowcowych w dużym stopniu zależą od właściwości adhezyjnych tych bakterii. Dlatego drugi etap badań oparto na założeniu, że zahamowanie ekspresji adhezyn tych bakterii może ograniczać ich adhezję i tworzenie biofilmu, a tym samym zapobiegać rozwojowi infekcji *S. aureus*. Jako potencjalny cel molekularny dla preparatu przeciwdrobnoustrojowego wybrano sortazę A – enzym błonowy katalizujący kowalencyjne wiązanie białek adhezyjnych z grupy MSCRAMMs z peptydoglikanem w ścianie komórkowej bakterii. Brak SrtA powoduje bowiem nieprawidłowe zakotwiczenie ponad 20 gronkowcowych białek powierzchniowych, w tym gronkowcowego białka A (SpA), czynnika skupiania A (ClfA) i białka wiążącego fibrynektynę A (FnBPA) (Mazmanian i wsp. 2000, Claes i wsp. 2017, Ouyang i wsp. 2018). Wykazano, że wszystkie badane ekstrakty hamowały aktywność SrtA w zakresie 6,4-60,5% a obserwowany efekt był zależny od stężenia i rodzaju ekstraktu (publikacja [P2]). Najsilniejsze właściwości hamujące wykazywał ekstrakt wodny z owoców kaliny koralowej (VFw) – 46,7% i 57,9% inhibicji w stężeniu odpowiednio 100 i 500 µg/ml. Ekstrakty z kory kaliny koralowej wykazywały równie silną aktywność hamującą wobec SrtA, ale była ona ograniczona do ich wyższego stężenia (500 µg/ml) i wyniosła odpowiednio 60,5% dla ekstraktu acetonowego (VBa) i 54,2% dla ekstraktu etanolowego (VBe). Uzyskane wyniki znajdują odzwierciedlenie w danych literaturowych, które wskazują na silne działanie hamujące aktywność sortazy A w przypadku wielu wtórnych metabolitów roślinnych, w tym flawonoli (np. moryna, mirycetyna i kwercetyna), chalkonów oraz kwasu chlorogenowego (Kang i wsp. 2006, Wang i wsp. 2015, Zhang i wsp. 2017). Warto podkreślić, iż w badanych ekstraktach z owoców i kory kaliny koralowej zidentyfikowano odpowiednio 21 i 15 różnych związków fenolowych, w tym także flawonoli (np. kwercetynę) (publikacja [P2]). Ponadto analiza biochemiczna wykazała obecność kwasu chlorogenowego we wszystkich ekstraktach z kaliny i na tej podstawie został on wybrany jako związek referencyjny do badań (publikacja [P2]).

Wpływ ekstraktów *V. opulus* na aktywność SrtA oceniono przy pomocy komercyjnego zestawu odczynników z wolnym enzymem, dlatego aby sprawdzić, w jaki sposób ekstrakty oddziałują na enzym związany z komórką, postanowiono pośrednio ocenić aktywność tego enzymu przez ocenę ekspresji gronkowcowego białka A (SpA) na powierzchni komórek *S. aureus* eksponowanych na badane ekstrakty. Wykazano, że wszystkie rodzaje ekstraktów z kory kaliny koralowej (VB) znacząco zmniejszały ekspresję SpA na powierzchni wszystkich trzech badanych szczepów *S. aureus* (*S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300 i *S. aureus* H9). Ekstrakty VBa i VBe w stężeniu 500 µg/ml były wyjątkowo aktywne, powodując zahamowanie ekspresji SpA odpowiednio o 78,3-94,9% oraz 78,0-90,3%, w zależności od badanego szczepu gronkowca. Otrzymane wyniki pokrywają się z zaobserwowanymi zmianami w aktywności wolnego enzymu SrtA w obecności ekstraktów z kaliny koralowej. Tym samym dowiedziono, że ekstrakty z *V. opulus* hamują ekspozycję SpA na powierzchni komórek gronkowców złocistych, co pośrednio sugeruje także zahamowanie aktywności SrtA w komórkach tych drobnoustrojów.

Sortaza A jest zlokalizowana w błonie komórkowej gronkowców, dlatego ekspresja i aktywność tego enzymu może zależeć od zmian w składzie błony. Wszelkie modyfikacje składu lipidowego błony bakteryjnej wpływają na stabilizację powierzchni komórek, hydrofobowość i ładunek powierzchniowy, a parametry te są istotne w procesie adhezji i tworzenia biofilmu (Bayer i wsp. 2015, Hewelt-Belka i wsp. 2016, Young i wsp. 2019). W związku z tym, oceniano zmiany w profilu lipidów i kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej *S. aureus* ATCC 43300 pod wpływem badanych ekstraktów. Wyraźne różnice w składzie błony komórkowej gronkowców zaobserwowano w przypadku *S. aureus* poddanego działaniu ekstraktów z kory kaliny koralowej (VBa i VBe) - zwiększenie zawartości fosfatydylogliceroli (PG) i diglukozylu-diacylogliceroli (GLC2-DAG), przy jednoczesnym zmniejszeniu zawartości lizylu-fosfatydylogliceroli (LYSYL-PG) w porównaniu do błon bakterii kontrolnych (publikacja [P2]). Przekształcanie anionowego PG do kationowego LYSYL-PG jest jednym z mechanizmów oporności gronkowców, który pozwala na stabilizację błony bakteryjnej, co zapobiega jej zaburzeniom w obecności kationowych środków przeciwdrobnoustrojowych, takich jak peptydy przeciwdrobnoustrojowe (Bayer i wsp. 2015, Hewelt-Belka i wsp. 2016, Young i wsp. 2019). Zaobserwowane zwiększenie zawartości PG, ale nie LYSYL-PG w błonach gronkowców wystawionych na działanie VBa i VBe może wskazywać na zdolność tych ekstraktów do blokowania transformacji PG do LYSYL-PG. Można więc przypuszczać, że

ekstrakty z *V. opulus* mogą zapobiegać aktywacji niektórych mechanizmów oporności gronkowców, choć ta hipoteza wymaga potwierdzenia w przyszłości.

Ostateczne stwierdzenie, czy SrtA może stanowić potencjalny cel molekularny dla preparatów przeciwdrobnoustrojowych wymagało sprawdzenia, czy udowodnione wcześniej zahamowanie aktywności tego enzymu, objawiające się m.in. zmianą ekspresji białek adhezyjnych *S. aureus*, wpłynie na proces tworzenia biofilmu gronkowców. Wykazano, że ekspozycja gronkowców złocistych na ekstrakty z kaliny koralowej powoduje w prawdzie istotne statystycznie osłabienie tworzenia biofilmu (zwłaszcza w przypadku etanolowego ekstraktu z owoców kaliny VFe w stosunku do *S. aureus* ATCC 43300 i *S. aureus* H9), jednak zaobserwowane różnice w biomasie biofilmu *S. aureus* między próbami kontrolnymi a poddanymi działaniu ekstraktów nie przekraczały 25%. Oznacza to, że pomimo ekspozycji na preparaty *V. opulus* hamujące aktywność SrtA i ekspresję SpA, gronkowce nadal skutecznie tworzą biofilmy. Drobnoustroje te posiadają szeroką gamę adhezyn powierzchniowych, także poza wcześniej wspomnianymi MSCRAMMs. Przykładowo, polisacharydowa adhezyna międzykomórkowa (PIA), będąca homopolimerem częściowo deacetylowanej N-acetylo-glukozaminy (PNAG), która jest głównym składnikiem EPS, odgrywa kluczową rolę w interakcjach między komórkami gronkowców, prowadząc do agregacji tych bakterii i wspomagając tworzenie biofilmu. Co więcej, w badaniach wykazano, że szczepy *S. aureus* bez operonu *ica*, który koduje PIA/PNAG, także były zdolne do tworzenia biofilmu (Otto i wsp. 2018, Nguyen i wsp. 2020). Wracając do wyników niniejszej rozprawy, dowiedziono, że SrtA rozpatrywana samodzielnie nie jest wystarczającym celem molekularnym dla preparatów przeciwdrobnoustrojowych oraz do konstrukcji szczepionek przeciwegronkowcowych, by zatrzymać rozwój zakażeń z udziałem *S. aureus*.

Ekstrakty roślinne poza bezpośrednim działaniem biostatycznym/biobójczym oraz wpływem na ekspresję czynników wirulencji drobnoustrojów, mogą również modulować aktywność układu odpornościowego gospodarza (Yahfoufi i wsp. 2018, Sadowska i wsp. 2020, Shakoor i wsp. 2021). Dlatego w trzecim etapie badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej skupiono się na prześledzeniu działania immunomodulacyjnego ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej. Założono, że oprócz bezpośredniego działania immunomodulującego, które udowodniono we wcześniejszych badaniach Zespołu (Sadowska i wsp. 2020), biologicznie aktywne związki z produktów roślinnych mogą także powodować uwalnianie antygenów z komórek drobnoustrojów stanowiących mikrobiotę

naturalną lub będących w danym okresie czasu przyczyną zakażeń, a w konsekwencji pośrednio aktywować komórki odpornościowe gospodarza. W tym celu oceniano polaryzację, aktywność sekrecyjną oraz fagocytarną makrofagów wyprowadzonych z monocytów linii THP-1 po ekspozycji na supernatanty z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* ATCC 43300, które wcześniej poddawano działaniu ekstraktów z *V. opulus*. Na początku udowodniono, że ekspozycja komórek gronkowców złocistych na badane ekstrakty faktycznie powoduje uwalnianie z ich powierzchni składników ściany komórkowej - peptydoglikanu (PG) oraz SpA. Następnie badano polaryzację makrofagów do fenotypu prozapalnego (M1) lub regulatorowego (M2) w oparciu o ekspresję powierzchniową markerów CD (CD11c, CD206, CD62L na komórkach CD45+) oraz uwalnianie wybranych cytokin (TNF- α i IL-10). Ekspozycja komórek na supernatanty hodowli planktonowych lub biofilmowych *S. aureus* poddanych działaniu ekstraktów z kaliny koralowej nie wpłynęła w sposób istotny na ekspresję badanych markerów CD. Stwierdzono natomiast istotny wpływ supernatantów pohodowlanych bakterii na aktywność wydzielniczą makrofagów. W większości układów badanych zaobserwowano wzmożoną produkcję TNF- α i IL-10 przez makrofagi z THP-1 poddane ekspozycji na supernatanty w porównaniu do komórek kontrolnych. Zarówno skład jakościowy supernatantów, jak i stężenie poszczególnych składników mogły wpływać na profil produkowanych cytokin. Potwierdzają to badania Choi i wsp. (2022), w których zaobserwowano, że makrofagi pochodzące z THP-1 wystawione na działanie enterotoksyny gronkowcowej (SEB) w niskim i wysokim stężeniu (2 i 20 $\mu\text{g/ml}$) wykazywały zróżnicowaną produkcję cytokin. Nasiloną produkcja TNF- α wskazywałaby na polaryzację makrofagów w kierunku fenotypu prozapalnego M1. W tej sytuacji dziwić może nasilenie także produkcji przeciwzapalnej cytokiny IL-10. Jednak Zielinski i wsp. (2012) wykazali, że ludzkie limfocyty krwi obwodowej po stymulacji *in vitro* inaktywowanymi komórkami *S. aureus* rozwijały profil Th1/Th17 i także były zdolne do produkcji IL-10 po ponownej stymulacji tymi bakteriami. Taka aktywność sekrecyjna wydawała się specyficzna dla patogenu, ponieważ nie zaobserwowano jej w komórkach indukowanych *Candida albicans* (Zielinski i wsp. 2012). Podsumowując tą część badań, udowodniono, że aktywne składniki komórek *S. aureus* uwalniane przez ekstrakty z kaliny koralowej do supernatantów pohodowlanych mogą modulować produkcję cytokin w modelu *in vitro* makrofagów pochodzących z THP-1, ale ich potencjał immunomodulacyjny nie jest wystarczający, aby zmienić ekspresję powierzchniową markerów CD na tych komórkach.

W celu oceny możliwości pośredniej stymulacji komórek odpornościowych przez ekstrakty z *V. opulus* poprzez uwalnianie składników komórek gronkowców, zbadano również aktywność fagocytarną makrofagów pochodzących z THP-1 eksponowanych na supernatanty z hodowli *S. aureus* poddanych działaniu tych ekstraktów. Stwierdzono, że supernatanty z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* nie wywierały znaczącego wpływu na etap pochłaniania bakterii przez makrofagi THP-1. Powodem tego mogły być bardzo niskie stężenia produktów użytych jako „wyzwalacze” uwalniania aktywnych składników z komórek *S. aureus* (100 µg/ml ekstraktów *V. opulus* lub ChA oraz ½ MIC VAN), co skutkowało niższą zawartością immunomodulujących składników bakteryjnych w supernatantach. Ponadto wykazano, że *S. aureus* ATCC 43300 po pochłonięciu przez makrofagi wyprowadzone z linii THP-1 ma zdolność przeżywania i namnażania się wewnątrz fagocytów. Podobnie Flannagan i wsp. (2016) zaobserwowali wzrost i proliferację *S. aureus* wewnątrz dojrzałych fagolizosomów makrofagów RAW 264.7. Z drugiej strony, zaobserwowano ograniczenie wewnątrzkomórkowego przeżywania i namnażania się *S. aureus* w ciągu 24 godzin po pochłonięciu w makrofagach eksponowanych na supernatanty z hodowli gronkowców złocistych poddanych działaniu ekstraktów z kaliny, co wskazuje na aktywację tych komórek. Tym samym udowodniono, że czynniki uwalniane z planktonowych i biofilmowych hodowli *S. aureus* po ekspozycji na ekstrakty z owoców i kory kaliny koralowej wpływają na aktywność fagocytarną makrofagów, lecz objawia się to bardziej ograniczaniem wewnątrzkomórkowego namnażania już pochłoniętych gronkowców, aniżeli ingerencją w sam proces ich pochłaniania.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej są próbą kompleksowej oceny *in vitro* możliwości zastosowania ekstraktów roślinnych w prewencji oraz leczeniu zakażeń gronkowcowych. Udowodniono, że ekstrakty z owoców i kory kaliny koralowej posiadają pewne właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz immunomodulujące, lecz żaden z zaobserwowanych efektów nie byłby wystarczający, aby znacząco ograniczyć rozwój ewentualnie toczącego się już w organizmie zakażenia gronkowcowego. Niemniej jednak, wykazana aktywność immunomodulacyjna ekstraktów z *V. opulus* L. pozwala na sugestię zastosowania tych preparatów w prewencji zakażeń gronkowcowych. Ponieważ jednak wnioski te zostały wyciągnięte na podstawie badań prowadzonych *in vitro*, w przyszłości należy przeprowadzić dalsze badania na modelach zwierzęcych z użyciem ekstraktów z kaliny koralowej jako suplementów diety.

VII. Streszczenie w języku polskim

Pomimo rozległej wiedzy na temat gronkowców, *Staphylococcus aureus* jest nadal jednym z najczęstszych patogenów odpowiedzialnych za rozwój zakażeń szpitalnych i pozaszpitalnych u ludzi. Zakażenia gronkowcowe obejmują szeroki zakres zmian patologicznych – od miejscowych infekcji skóry i tkanek miękkich aż po choroby zagrażające życiu, takie jak bakteremia i sepsa. Sukces *S. aureus* jako patogenu opiera się na wykorzystaniu licznych czynników wirulencji ważnych dla przebiegu infekcji oraz zdolności tych bakterii do tworzenia biofilmów na powierzchniach abiotycznych (np. biomateriałach medycznych) czy w zainfekowanych tkankach. Dzięki temu drobnoustroje te z łatwością unikają mechanizmów obronnych gospodarza oraz zyskują ochronę przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi, w tym ukierunkowanym działaniem środków przeciwdrobnoustrojowych. Leczenie zakażeń o etiologii gronkowcowej jest trudne także z uwagi na stale rosnącą lekooporność gronkowców na dostępne antybiotyki. Jak dotąd nie udało się również stworzyć w pełni skutecznej szczepionki przeciwko *S. aureus*. Niniejsza praca doktorska poświęcona jest problemom związanym z zapobieganiem i leczeniem zakażeń o etiologii gronkowcowej, które stały się podstawą poszukiwania alternatywnych strategii ich prewencji, ograniczania rozwoju oraz eliminacji. Założono, że wśród metod prewencji zakażeń można wyróżnić trzy główne kierunki: rozwój szczepień ochronnych, działanie bezpośrednie na drobnoustroje i blokowanie ich czynników wirulencji oraz immunomodulacja odpowiedzi obronnej gospodarza.

Nadrzędnym celem pracy doktorskiej była weryfikacja możliwości zastosowania naturalnych ekstraktów roślinnych, na przykładzie ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.) w zapobieganiu zakażeniom wywoływanym przez gronkowce złociste (*S. aureus*) oraz ich rozwojowi z zakażeń miejscowych do trudnych w eliminacji zakażeń uogólnionych i biofilmowych.

Biorąc pod uwagę cel nadrzędny oraz założone kierunki rozwiązań w zakresie prewencji zakażeń, w pracy zbadano właściwości przeciwdrobnoustrojowe ekstraktów z kaliny koralowej w działaniu bezpośrednim przeciwko *S. aureus*, oceniono możliwość zastosowania bakteryjnego enzymu - sortazy A jako celu molekularnego dla preparatów przeciwdrobnoustrojowych i potencjalnego składnika szczepionki przeciwgronkowcowej oraz dokonano analizy właściwości immunomodulujących badanych ekstraktów przez

ocenę wpływu czynników uwalnianych z planktonowych i biofilmowych hodowli *S. aureus* po ekspozycji na ww. ekstrakty na polaryzację makrofagów wyprowadzonych z monocytów linii THP-1 w subpopulacje M1 (fenotyp prozapalny) lub M2 (fenotyp regulatorowy) i wybrane parametry aktywności przeciwważnej komórek fagocytarnych.

W pierwszym etapie prowadzonych badań wykazano, że ekstrakty z owoców i kory kaliny koralowej mogą być bezpiecznie stosowane u ludzi do stężenia 500 µg/ml, lecz wykazują słabą bezpośrednią aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec gronkowców złocistych. W związku z tym, do dalszych badań wybrano stężenia subinhibicyjne badanych ekstraktów (100 i 500 µg/ml). W drugim etapie pracy oceniano, czy hamowanie aktywacji enzymu błonowego sortazy A (SrtA) wykazane dla ekstraktów z kaliny koralowej ograniczy ekspresję adhezyn na powierzchni komórek gronkowców, a tym samym adhezję i tworzenie biofilmu przez te drobnoustroje. Stwierdzono zmniejszenie ekspresji białka A (SpA) na powierzchni komórek *S. aureus* oraz zmiany w składzie lipidów i kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych tych bakterii po ekspozycji na ekstrakty z kaliny koralowej. Pomimo tego, bakterie te nadal skutecznie tworzyły biofilmy w obecności badanych ekstraktów. Tym samym stwierdzono, że sortaza A rozpatrywana samodzielnie nie jest wystarczającym celem molekularnym dla preparatów przeciwdrobnoustrojowych i szczepionek przeciwgronkowcowych.

W kolejnych etapach badań przeanalizowano właściwości immunomodulujące ekstraktów z kaliny koralowej (mechanizm prewencji zakażeń z zakresu immunomodulacji pośredniej), oceniając polaryzację makrofagów w subpopulacje M1/M2 oraz aktywność przeciwważną komórek fagocytarnych. Wykazano, że aktywne składniki ściany komórkowej *S. aureus* uwalniane do środowiska z hodowli planktonowych i biofilmowych *S. aureus* pod wpływem działania ekstraktów z kaliny koralowej stosowanych w stężeniach subinhibicyjnych modulują produkcję cytokin przez makrofagi (wzmożona sekrecja TNF-α i IL-10), lecz nie wpływają na zmianę ekspozycji powierzchniowej markerów CD (CD11c, CD206, CD62L) w populacji komórek CD45+. W związku z tym, jednoznaczne określenie zmian fenotypu tych komórek po ekspozycji jest niemożliwe. Równocześnie zaobserwowano aktywację makrofagów przez ekspozycję na składniki uwalniane z komórek gronkowców pod wpływem badanych ekstraktów w zakresie ograniczania wewnątrzkomórkowego namnażania się pochłoniętych przez te komórki gronkowców. Ekstrakty z kaliny koralowej mogą więc pośrednio modulować aktywność wydzielniczą i fagocytarną makrofagów.

Podsumowując, w niniejszej pracy doktorskiej udowodniono, że ekstrakty z owoców i kory kaliny koralowej posiadają właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz immunomodulujące, lecz żaden z zaobserwowanych efektów nie byłby wystarczający, aby znacząco ograniczyć rozwój ewentualnie toczącego się już w organizmie zakażenia gronkowcowego. Jednakże, uzyskane wyniki pozwalają na sugestię wykorzystania ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej w prewencji zakażeń gronkowcowych. Ponieważ wnioski te zostały wyciągnięte na podstawie badań prowadzonych *in vitro*, warto dodać, że w przyszłości należy przeprowadzić dalsze badania na modelach zwierzęcych z użyciem ekstraktów z kaliny koralowej jako suplementów diety.

VIII. Streszczenie w języku angielskim

Despite the extensive knowledge of staphylococci, *Staphylococcus aureus* is still one of the most common pathogen responsible for the development of nosocomial and non-hospital infections in humans. Staphylococcal infections include a wide range of pathological changes - from skin and soft tissue infections to life-threatening diseases such as bacteraemia and sepsis. The success of *S. aureus* as a pathogen is based on its ability to use multiple virulence factors important to the course of infection and to form biofilms on abiotic surfaces (e.g. medical biomaterials) and infected tissues. This allow these bacteria to easily evade host defence mechanisms and gain protection from adverse environmental conditions, including targeted antimicrobials. Treatment of staphylococcal infections is also difficult due to the constantly increasing drug resistance of staphylococci to available antibiotics. To date, it has also not been possible to develop a fully effective vaccine against *S. aureus*. Presented doctoral thesis is devoted to the problems associated with the prevention and treatment of staphylococcal infections, which became the basis for the search for alternative strategies of their prevention, reduction and elimination. It was assumed that among the infection prevention methods, three main directions can be distinguished: the development of preventive vaccination, direct effect against the microorganisms and blocking their virulence factors, and immunomodulation of the host defence response.

The overarching aim of the dissertation was to verify the applicability of natural plant extracts, based on the extracts from the fruits and bark of *Viburnum opulus* L. in the prevention of *S. aureus* infections and their progression from local infections to systemic and biofilm infections that are difficult to eradicate.

Considering the overarching goal and the assumed directions for infection prevention, this study investigated direct antimicrobial activities of *V. opulus* extracts against *S. aureus*, the feasibility of using microbial enzyme - sortase A as a molecular target for antimicrobials and a potential component of the anti-staphylococcal vaccine, and the immunomodulatory properties of the tested extracts by evaluating the effect of biologically active substances released from planktonic and biofilm cultures of *S. aureus* after exposure to the *V. opulus* extracts on THP-1 derived macrophage polarization into M1 (pro-inflammatory phenotype) or M2 (regulatory phenotype) subpopulations and selected parameters of anti-infective activity of the cells.

In the first stage of the ongoing research, it was shown that the *V. opulus* fruits and bark extracts can be safely used in humans up to a concentration of 500 µg/ml, but show weak direct antimicrobial activity against *S. aureus*. Therefore, subinhibitory concentrations of the tested extracts (100 and 500 µg/ml) were chosen for further studies. In the second stage of the study, it was assessed whether the inhibition of membrane enzyme sortase A (SrtA) activity demonstrated for *V. opulus* extracts may limit surface expression of *S. aureus* adhesins and thus could reduce adhesion and biofilm formation by staphylococci. Decreased expression of protein A (SpA) on the surface of *S. aureus* cells and changes in the composition of lipids and fatty acids in *S. aureus* cell membranes after exposure to *V. opulus* extracts were demonstrated. Despite this, these bacteria still successfully formed biofilms in the presence of the tested extracts. Thus, it was concluded that sortase A considered alone is not a sufficient molecular target for antimicrobial preparations and anti-staphylococcal vaccines.

The immunomodulatory properties of *V. opulus* extracts (an indirect immunomodulatory mechanism to prevention of infections) by assessing the polarization of macrophages into M1/M2 subpopulations and the phagocytic activity of macrophages were analyzed in the next stages of the study. It was shown that active components of the *S. aureus* cell wall released into the supernatants from planktonic and biofilm cultures of *S. aureus* after exposure to *V. opulus* extracts used at subinhibitory concentrations modulate cytokine production by the macrophages (increased secretion of TNF- α and IL-10) but did not alter the surface exposure of CD markers (CD11c, CD206, CD62L) in the CD45⁺ cell population. Therefore, an unambiguous determination of the phenotype changes of these cells after exposure is not possible. At the same time, the macrophage activation after exposure to the components released from staphylococcal cells under the influence of the tested extracts with regards to reducing of intracellular proliferation of engulfed staphylococci was observed. Thus, *V. opulus* extracts may indirectly modulate the secretory and phagocytic activity of the macrophages.

In conclusion, this dissertation demonstrates that the extracts from fruits and bark of *V. opulus* possess antimicrobial and immunomodulatory properties, but none of the observed effects would be sufficient to significantly reduce the development of a possibly already ongoing staphylococcal infection in the body. However, the results obtained allow the suggestion of the use of *V. opulus* extracts in the prevention of staphylococcal infections.

Since these conclusions were drawn on the basis of *in vitro* studies, further studies on animal models using tested extracts as dietary supplements should be conducted.

IX. Literatura

1. Abedon ST, Danis-Włodarczyk KM, Wozniak DJ. Phage cocktail development for bacteriophage therapy: toward improving spectrum of activity breadth and depth. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(10):1019. doi:10.3390/ph14101019.
2. Akhtar F, Khan AU. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) against vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) biofilm disruption: a putative role of phagocytosis in infection control. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2021;36:102552. doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102552.
3. Akhtar MA, Raju R, Beattie KD, Bodkin F, Münch G. Medicinal plants of the Australian Aboriginal Dharawal people exhibiting anti-inflammatory activity. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016;2016:1-8. doi:10.1155/2016/2935403.
4. Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(8):2003-2020. doi:10.1093/jac/dky042.
5. Aroso RT, Schaberle FA, Arnaut LG, Pereira MM. Photodynamic disinfection and its role in controlling infectious diseases. *Photochem Photobiol Sci*. 2021;20(11):1497-1545. doi:10.1007/s43630-021-00102-1.
6. Askarian F, Wagner T, Johannessen M, Nizet V. *Staphylococcus aureus* modulation of innate immune responses through Toll-like (TLR), (NOD)-like (NLR) and C-type lectin (CLR) receptors. *FEMS Microbiol Rev*. 2018;42(5):656-671. doi:10.1093/femsre/fuy025
7. Assefa M, Amare A. Biofilm-associated multi-drug resistance in hospital-acquired infections: a review. *Infect Drug Resist*. 2022;15:5061-5068. doi:10.2147/IDR.S379502.
8. Atshan SS, Hamat RA, Aljaberi MA, Chen JS, Huang SW, Lin CY, et al. Phage therapy as an alternative treatment modality for resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(2):286. doi:10.3390/antibiotics12020286.
9. Balato A, Cacciapuoti S, Di Caprio R, Marasca C, Raimondo A, Fabbrocini G. Human microbiome: composition and role in inflammatory skin diseases. *Arch Immunol Ther Exp*. 2019;67:1-18. doi:10.1007/s00005-018-0528-4.
10. Barak TH, Celep E, İnan Y, Yesilada E. Influence of *in vitro* human digestion on the bioavailability of phenolic content and antioxidant activity of *Viburnum opulus* L. (European cranberry) fruit extracts, *Ind Crops Prod*. 2019;131:62-69. doi:10.1016/j.indcrop.2019.01.037.

11. Bayer AS, Mishra NN, Chen L, Kreiswirth BN, Rubio A, Yang SJ. Frequency and distribution of single-nucleotide polymorphisms within *mprF* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates and their role in cross-resistance to daptomycin and host defense antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(8):4930-4937. doi:10.1128/AAC.00970-15.
12. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):870-926. doi:10.1128/CMR.00109-13.
13. Bello-Chavolla OY, Bahena-Lopez JP, Garciadiego-Fosass P, Volkow P, Garcia-Horton A, Velazquez-Acosta C, et al. Bloodstream infection caused by *S. aureus* in patients with cancer: a 10-year longitudinal single-center study. *Support Care Cancer*. 2018;26(12):4057-4065. doi:10.1007/s00520-018-4275-1.
14. Branco TM, Valério NC, Jesus VIR, Dias CJ, Neves MGPMS, Faustino MAF, et al. Single and combined effects of photodynamic therapy and antibiotics to inactivate *Staphylococcus aureus* on skin. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;21:285-293. doi:10.1016/j.pdpdt.2018.01.001.
15. Braz M, Salvador D, Gomes ATPC, Mesquita MQ, Faustino MAF, Neves MGPMS, et al. Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on skin using a porphyrinic formulation. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;30:101754. doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101754.
16. Brives, C., Pourraz, J. Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures. *Palgrave Commun*. 2020;6:100. doi:10.1057/s41599-020-0478-4.
17. Bubulica, MV, Anghel I, Grumezescu AM, Saviuc C, Anghel GA, Chifriuc MC, et al. A. *In vitro* evaluation of bactericidal and antibiofilm activity of *Lonicera tatarica* and *Viburnum opulus* plant extracts on *Staphylococcus* strains. *Farmacia* 2012, 60, 80–91.
18. Ceylan D, Aksoy A, Ertekin T, Yay AH, Nisari M, Karatoprak GŞ, et al. The effects of gilaburu (*Viburnum opulus*) juice on experimentally induced Ehrlich ascites tumor in mice. *J Cancer Res Ther*. 2018;14(2):314-320. doi:10.4103/0973-1482.181173.
19. Chaves-Moreno D, Wos-Oxley ML, Jáuregui R, Medina E, Oxley AP, Pieper DH. Exploring the transcriptome of *Staphylococcus aureus* in its natural niche. *Sci Rep*. 2016;6:33174. doi:10.1038/srep33174.

20. Chen J, Zhou H, Huang J, Zhang R, Rao X. Virulence alterations in *Staphylococcus aureus* upon treatment with the sub-inhibitory concentrations of antibiotics. *J Adv Res.* 2021;31:165-175. doi:10.1016/j.jare.2021.01.008.
21. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence.* 2021;12(1):547-569. doi:10.1080/21505594.2021.1878688.
22. Choi JP, Losol P, Ayoub G, Ji M, Kim SH, Cho SH, et al. Cytokine inductions and intracellular signal profiles by stimulation of dsRNA and SEB in the macrophages and epithelial cells. *Immune Netw.* 2022;22(2):e15. doi:10.4110/in.2022.22.e15.
23. Claes J, Liesenborghs L, Peetermans M, Veloso TR, Missiakas D, Schneewind O, et al. Clumping factor A, von Willebrand factor-binding protein and von Willebrand factor anchor *Staphylococcus aureus* to the vessel wall. *J Thromb Haemost.* 2017;15(5):1009-1019. doi:10.1111/jth.13653.
24. Cong Y, Yang S, Rao X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: a review of case updating and clinical features. *J Adv Res.* 2019;21:169-176. doi:10.1016/j.jare.2019.10.005.
25. Cosme P, Rodríguez AB, Espino J, Garrido M. Plant phenolics: bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(12):1263. doi:10.3390/antiox9121263.
26. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284(5418):1318-1322. doi:10.1126/science.284.5418.1318.
27. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009;6(3-4):170-188. doi:10.1016/j.pdpdt.2009.10.008.
28. Dayan GH, Mohamed N, Scully IL, Cooper D, Begier E, Eiden J, et al. *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. *Expert Rev Vaccines.* 2016;15(11):1373-1392. doi:10.1080/14760584.2016.1179583.
29. Dryden M. Reactive oxygen species: a novel antimicrobial. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;51(3):299-303. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.08.029.
30. Ersoy N, Ercisli S, Gundogdu M. Evaluation of European Cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) genotypes for agro-morphological, biochemical and bioactive characteristics in Turkey. *Folia Horticulturae* 2017;29(2):181-188. doi:10.1515/fhort-2017-0017.

31. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST. <http://www.eucast.org> (dostęp 26 maja 2023).
32. Evans JJ, Bolz DD. Regulation of virulence and antibiotic resistance in Gram-positive microbes in response to cell wall-active antibiotics. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32(3):217-222. doi:10.1097/QCO.0000000000000542.
33. Fish R, Kutter E, Bryan D, Wheat G, Kuhl S. Resolving digital staphylococcal osteomyelitis using bacteriophage-a case report. *Antibiotics (Basel).* 2018;7(4):87. doi:10.3390/antibiotics7040087.
34. Flannagan RS, Heit B, Heinrichs DE. Intracellular replication of *Staphylococcus aureus* in mature phagolysosomes in macrophages precedes host cell death, and bacterial escape and dissemination. *Cell Microbiol.* 2016;18(4):514-535. doi:10.1111/cmi.12527.
35. Flemming HC, van Hullebusch ED, Neu TR, Nielsen PH, Seviour T, Stoodley P, et al. The biofilm matrix: multitasking in a shared space. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(2):70-86. doi:10.1038/s41579-022-00791-0.
36. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(9):563-575. doi:10.1038/nrmicro.2016.94.
37. Flouchi R, Elmnai A, Hibatallah A, Fahsi K, Touzani I, Fikri-Benbrahim K. The relationship between nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and surgical site infections in a hospital center in Morocco. *Int J Microbiol.* 2021;2021:5585588. doi:10.1155/2021/5585588.
38. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(1):49-62. doi:10.1038/nrmicro3161.
39. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):430-449. doi:10.1093/femsre/fux007.
40. Fu XJ, Fang Y, Yao M. Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Biomed Res Int.* 2013;2013:159157. doi:10.1155/2013/159157.
41. Gao P, Wei Y, Wan RE, Wong KW, Iu HTV, Tai SSC, et al. Subinhibitory concentrations of antibiotics exacerbate staphylococcal infection by inducing bacterial virulence. *Microbiol Spectr.* 2022;10(4):e0064022. doi:10.1128/spectrum.00640-22.

42. GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2022;400(10369):2221-2248. doi:10.1016/S0140-6736(22)02185-7.
43. Gherardi G, Di Bonaventura G, Savini, V. Chapter one: Staphylococcal taxonomy. In: V. Savini, ed. *Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress*. Academic Press; 2018:1-10. doi: 10.1016/B978-0-12-813547-1.00001-7.
44. González-Martín M, Corbera JA, Suárez-Bonnet A, Tejedor-Junco MT. Virulence factors in coagulase-positive staphylococci of veterinary interest other than *Staphylococcus aureus*. *Vet Q*. 2020;40(1):118-131. doi:10.1080/01652176.2020.1748253
45. Gorlenko CL, Kiselev HY, Budanova EV, Zamyatnin AA Jr, Ikryannikova LN. Plant secondary metabolites in the battle of drugs and drug-resistant bacteria: New heroes or worse clones of antibiotics?. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(4):170. doi:10.3390/antibiotics9040170.
46. Guan Q. A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Immunol Res*. 2019;2019:1-16 . doi:10.1155/2019/7247238
47. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:107. doi:10.3389/fcimb.2020.00107.
48. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(3):276-301. doi:10.1093/femsre/fux010.
49. Hewelt-Belka W, Nakonieczna J, Belka M, Bączek T, Namieśnik J, Kot-Wasik A. Untargeted lipidomics reveals differences in the lipid pattern among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* resistant and sensitive to antibiotics. *J Proteome Res*. 2016;15(3):914-922. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00915.
50. Hodille E, Rose W, Diep BA, Goutelle S, Lina G, Dumitrescu O. The role of antibiotics in modulating virulence in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(4):887-917. doi:10.1128/CMR.00120-16.
51. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(4):322-332. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.

52. Hommes JW, Surewaard BGJ. Intracellular habitation of *Staphylococcus aureus*: molecular mechanisms and prospects for antimicrobial therapy. *Biomedicines*. 2022;10(8):1804. doi:10.3390/biomedicines10081804.
53. Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, Baines SL, Sharkey LK, Lee JYH, et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nat Rev Microbiol*. 2023;27:1-16. doi: 10.1038/s41579-023-00852-y.
54. Iwamoto K, Moriwaki M, Miyake R, Hide M. *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: strain-specific cell wall proteins and skin immunity. *Allergol. Int*. 2019;68(3):309-315. doi:10.1016/j.alit.2019.02.006.
55. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc*. 2018;81(1):7-11. doi:10.1016/j.jcma.2017.07.012.
56. Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol Spectr*. 2019;7(2):10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018.
57. Kajszyk D, Zakłós-Szyda M, Podśędek A. *Viburnum opulus* L.-a review of phytochemistry and biological effects. *Nutrients*. 2020;12(11):3398. doi:10.3390/nu12113398.
58. Kalinkevich K, Karandashov VE, Ptitsyn LR. *In vitro* study of the anti-inflammatory activity of some medicinal and edible plants growing in Russia. *Russ. J. Bioorganic Chem*. 2014;40:752-761. doi:10.1134/S106816201407005X.
59. Kang SS, Kim JG, Lee TH, Oh KB. Flavonols inhibit sortases and sortase-mediated *Staphylococcus aureus* clumping to fibrinogen. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(8):1751-1755. doi:10.1248/bpb.29.1751.
60. Kornienko M, Kuptsov N, Gorodnichev R, Bespiatykh D, Guliaev A, Letarova M, et al. Contribution of *Podoviridae* and *Myoviridae* bacteriophages to the effectiveness of anti-staphylococcal therapeutic cocktails. *Sci Rep*. 2020;10(1):18612. doi:10.1038/s41598-020-75637-x.
61. Kourtis AP, Hatfield K, Baggs J, Mu Y, See I, Epton E, et al. Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections - United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2019;68(9):214-219. doi:10.15585/mmwr.mm6809e1.
62. León M, Bastías R. Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria. *Front Microbiol*. 2015;6:343. doi:10.3389/fmicb.2015.00343.

63. Li J, Wen Q, Gu F, An L, Yu T. Non-antibiotic strategies for prevention and treatment of internalized *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol.* 2022;13:974984. doi:10.3389/fmicb.2022.974984.
64. Lu HY, Turvey SE. Human MALT1 deficiency and predisposition to infections. *Curr Opin Immunol.* 2021;72:1-12. doi:10.1016/j.coi.2021.02.008.
65. Lu L, Hu W, Tian Z, Yuan D, Yi G, Zhou Y, et al. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chin Med.* 2019;14:11. doi:10.1186/s13020-019-0232-2.
66. Maisch T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. *Photochem Photobiol Sci.* 2015;14(8):1518-1526. doi:10.1039/c5pp00037h.
67. Malachowa N, Kobayashi SD, Porter AR, Braughton KR, Scott DP, Gardner DJ, et al. Contribution of *Staphylococcus aureus* coagulases and clumping factor A to abscess formation in a rabbit model of skin and soft tissue infection. *PLoS One.* 2016;11(6):e0158293. doi:10.1371/journal.pone.0158293.
68. Matilla-Cuenca L, Gil C, Cuesta S, Rapún-Araiz B, Žiemytė M, Mira A, et al. Antibiofilm activity of flavonoids on staphylococcal biofilms through targeting BAP amyloids. *Sci Rep.* 2020;10(1):18968. doi:10.1038/s41598-020-75929-2.
69. Matsuoka K, Kanai T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Semin Immunopathol.* 2015;37:47-55. doi:10.1007/s00281-014-0454-4.
70. Mazmanian SK, Liu G, Jensen ER, Lenoy E, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(10):5510-5515. doi:10.1073/pnas.080520697.
71. Mendes LF, Gaspar VM, Conde TA, Mano JF, Duarte IF. Flavonoid-mediated immunomodulation of human macrophages involves key metabolites and metabolic pathways. *Sci Rep.* 2019;9(1):14906. doi:10.1038/s41598-019-51113-z.
72. Ming D, Wang D, Cao F, Xiang H, Mu D, Cao J, et al. Kaempferol inhibits the primary attachment phase of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol.* 2017;8:2263. doi:10.3389/fmicb.2017.02263.
73. Morozova VV, Vlassov VV, Tikunova NV. Applications of bacteriophages in the treatment of localized infections in humans. *Front Microbiol.* 2018;9:1696. doi:10.3389/fmicb.2018.01696.

74. Mu D, Xiang H, Dong H, Wang D, Wang T. Isovitexin, a potential candidate inhibitor of sortase A of *Staphylococcus aureus* USA300. *J Microbiol Biotechnol*. 2018;28(9):1426-1432. doi:10.4014/jmb.1802.02014.
75. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Front Microbiol*. 2019;10:539. doi:10.3389/fmicb.2019.00539.
76. Nasim N, Sandeep IS, Mohanty S. Plant-derived natural products for drug discovery: current approaches and prospects. *Nucleus (Calcutta)*. 2022;65(3):399-411. doi:10.1007/s13237-022-00405-3.
77. Newsom SW. Ogston's coccus. *J Hosp Infect*. 2008;70(4):369-372. doi:10.1016/j.jhin.2008.10.001.
78. Nguyen HTT, Nguyen TH, Otto M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA - Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020;18:3324-3334. doi:10.1016/j.csbj.2020.10.027.
79. Niu X, Gao Y, Yu Y, Yang Y, Wang G, Sun L, et al. Molecular modelling reveals the inhibition mechanism and structure-activity relationship of curcumin and its analogues to Staphylococcal aureus sortase A. *J Biomol Struct Dyn*. 2019;37(5):1220-1230. doi:10.1080/07391102.2018.1453380.
80. Oduor JMO, Kadija E, Nyachio A, Mureithi MW, Skurnik M. Bioprospecting *Staphylococcus* phages with therapeutic and bio-control potential. *Viruses*. 2020;12(2):133. doi:10.3390/v12020133.
81. Oechslin F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*. 2018;10(7):351. doi:10.3390/v10070351.
82. Ogston A. Report upon micro-organisms in surgical diseases. *Br Med J*. 1881;1(1054):369.b2-369.b375. doi:10.1136/bmj.1.1054.369.
83. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Microbiol Spectr*. 2018;6(4):10.1128/microbiolsp ec.GPP3-0023-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018.
84. Ouyang P, He X, Yuan ZW, Yin ZQ, Fu H, Lin J, et al. Erianin against *Staphylococcus aureus* infection via inhibiting sortase A. *Toxins (Basel)*. 2018;10(10):385. doi:10.3390/toxins10100385.
85. Pantò F, Adamo L, Giordano C, Licciardello C. Efficacy and safety of photodynamic therapy with RLP068 for diabetic foot ulcers: a review of the literature and clinical experience. *Drugs Context*. 2020;9:2019-10-3. doi:10.7573/dic.2019-10-3.

86. Pérez C, Zúñiga T, Palavecino CE. Photodynamic therapy for treatment of *Staphylococcus aureus* infections. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2021;34:102285. doi:10.1016/j.pdpdt.2021.102285.
87. Pérez VKC, Costa GMD, Guimarães AS, Heinemann MB, Lage AP, Dorneles EMS. Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;22:792-802. doi:10.1016/j.jgar.2020.06.010.
88. Petrovic Fabijan A, Lin RCY, Ho J, Maddocks S, Ben Zakour NL, Iredell JR, et al. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Microbiol.* 2020;5(3):465-472. doi:10.1038/s41564-019-0634-z.
89. Pietrocola G, Campoccia D, Motta C, Montanaro L, Arciola CR, Speziale P. Colonization and infection of indwelling medical devices by *Staphylococcus aureus* with an emphasis on orthopedic implants. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11):5958. doi:10.3390/ijms23115958.
90. Pietrzyk N, Zakłos-Szyda M, Redzynia M, Podsędek A. The effect of simulated in vitro digestion on biological activity of *Viburnum opulus* fruit juices. *Molecules.* 2021;26(13):4086. doi:10.3390/molecules26134086.
91. Pongbangli N, Oniem N, Chaiwarith R, Nantsupawat T, Phrommintikul A, Wongcharoen W. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal carriage and surgical site infection rate among patients undergoing elective cardiac surgery. *Int J Infect Dis.* 2021;106:409-414. doi:10.1016/j.ijid.2021.03.024.
92. Principi N, Silvestri E, Esposito S. Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. *Front Pharmacol.* 2019;10:513. doi:10.3389/fphar.2019.00513.
93. Pucelik B, Dąbrowski JM. Photodynamic inactivation (PDI) as a promising alternative to current pharmaceuticals for the treatment of resistant microorganisms. *Adv Inorg Chem.* 2022;79:65-103. doi:10.1016/bs.adioch.2021.12.003.
94. Quave CL, Estévez-Carmona M, Compadre CM, Hobby G, Hendrickson H, Beenken KE, et al. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PLoS One.* 2012;7(1):e28737. doi:10.1371/journal.pone.0028737.
95. Raineri EJM, Altulea D, van Dijk JM. Staphylococcal trafficking and infection-from 'nose to gut' and back. *FEMS Microbiol Rev.* 2022; 46(1):fuab041. doi:10.1093/femsre/fuab041.

96. Rein MJ, Renouf M, Cruz-Hernandez C, Actis-Goretta L, Thakkar SK, da Silva Pinto M. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;75(3):588-602. doi:10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x.
97. Różalska B, Sadowska B, Żuchowski J, Więckowska-Szakiel M, Budzyńska A, Wójcik U, et al. Phenolic and nonpolar fractions of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson extracts as virulence modulators-*in vitro* study on bacteria, fungi, and epithelial cells. *Molecules*. 2018;23(7):1498. doi:10.3390/molecules23071498.
98. Rumbaugh KP, Sauer K. Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(10):571-586. doi:10.1038/s41579-020-0385-0.
99. Sadowska B, Rywaniak J, Cichocka A, Cichocka K, Żuchowski J, Wójcik-Bojek U, et al. Phenolic and non-polar fractions of the extracts from fruits, leaves, and twigs of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson – the implications for human barrier cells. *Molecules*. 2020; 25(2238):1-19. doi:10.3390/molecules25092238.
100. Sadowska B, Wójcik U, Krzyżanowska-Kowalczyk J, Kowalczyk M, Stochmal A, Rywaniak J, et al. The *pros* and *cons* of cystic fibrosis (CF) patient use of herbal supplements containing *Pulmonaria officinalis* L. extract: the evidence from an *in vitro* study on *Staphylococcus aureus* CF clinical isolates. *Molecules*. 2019;24(6):1151. doi:10.3390/molecules24061151.
101. Sakr A, Brégeon F, Mège JL, Rolain JM, Blin O. *Staphylococcus aureus* nasal colonization: An update on mechanisms, epidemiology, risk factors, and subsequent infections. *Front Microbiol*. 2018;9:2419. doi:10.3389/fmicb.2018.02419.
102. Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal biofilm development: Structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2020;84(3):e00026-19. doi:10.1128/MMBR.00026-19.
103. Shakoor H, Feehan J, Apostolopoulos V, Platat C, Al Dhaheri AS, Ali HI, et al. Immunomodulatory effects of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2021;13(3):728. doi:10.3390/nu13030728.
104. Shettigar K, Murali TS. Virulence factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(12):2235-2246. doi:10.1007/s10096-020-03984-8.
105. Speck S, Wenke C, Feßler AT, Kacza J, Geber F, Scholtzek AD, et al. Borderline resistance to oxacillin in *Staphylococcus aureus* after treatment with sub-lethal

- sodium hypochlorite concentrations. *Heliyon*. 2020;6(6):e04070. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04070.
106. Suh GA, Lodise TP, Tamma PD, Knisely JM, Alexander J, Aslam S, et al. Considerations for the use of phage therapy in clinical practice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022;66(3):e0207121. doi:10.1128/AAC.02071-21.
 107. Suresh MK, Biswas R, Biswas L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Int J Med Microbiol*. 2019;309(1):1-12. doi:10.1016/j.ijmm.2018.11.002.
 108. Swolana D, Kępa M, Kabała-Dzik A, Dzik R, Wojtyczka RD. Sensitivity of staphylococcal biofilm to selected compounds of plant origin. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(5):607. doi:10.3390/antibiotics10050607.
 109. Ślusarz R, Dmochowska B, Samaszko-Fiertek J, Brzozowski K, Madaj J. NMR and MD analysis of the bonding interaction of vancomycin with muramyl pentapeptide. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1146. doi:10.3390/ijms23031146.
 110. Tam K, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiol Spectr*. 2019;7(2):10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018.
 111. Taylor TA, Unakal CG. *Staphylococcus aureus*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/> (dostęp 26.05.2023)
 112. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603-661. doi:10.1128/CMR.00134-14.
 113. Tran NN, Morrisette T, Jorgensen SCJ, Orench-Benvenuti JM, Kebriaei R. Current therapies and challenges for the treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections. *Pharmacotherapy*. 2023;10.1002/phar.2806. doi:10.1002/phar.2806.
 114. Tsouklidis N, Kumar R, Heindl SE, Soni R, Khan S. Understanding the fight against resistance: hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vs. community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Cureus*. 2020;12(6):e8867. doi:10.7759/cureus.8867.
 115. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic

- and clinical research. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(4):203-218. doi:10.1038/s41579-018-0147-4.
116. Vallejo MCS, Moura NMM, Gomes ATPC, Joaquineto ASM, Faustino MAF, Almeida A, et al. The role of porphyrinoid photosensitizers for skin wound healing. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):4121. doi:10.3390/ijms22084121.
 117. Vanegas JM, Salazar-Ospina L, Roncancio GE, Jiménez JN. *Staphylococcus aureus* colonization increases the risk of bacteremia in hemodialysis patients: a molecular epidemiology approach with time-dependent analysis. *Am J Infect Control.* 2021;49(2):215-223. doi:10.1016/j.ajic.2020.05.031.
 118. Verhoeven PO, Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Grattard F, Carricajo A, Lucht F, et al. Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(1):75-89. doi:10.1586/14787210.2014.859985.
 119. Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(2):59. doi:10.3390/antibiotics9020059.
 120. Walsh L, Johnson CN, Hill C, Ross RP. Efficacy of phage- and bacteriocin-based therapies in combatting nosocomial MRSA infections. *Front Mol Biosci.* 2021;8:654038. doi:10.3389/fmolb.2021.654038.
 121. Wang K, Conlon M, Ren W, Chen BB, Bączek T. Natural products as targeted modulators of the immune system. *J Immunol Res.* 2018;2018:7862782. doi:10.1155/2018/7862782.
 122. Wang L, Bi C, Cai H, Liu B, Zhong X, Deng X, et al. The therapeutic effect of chlorogenic acid against *Staphylococcus aureus* infection through sortase A inhibition. *Front Microbiol.* 2015;6:1031. doi:10.3389/fmicb.2015.01031.
 123. Wang LJ, Yang X, Qian SY, Liu YC, Yao KH, Dong F, et al. Identification of hemolytic activity and hemolytic genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. *Chin Med J (Engl).* 2020;133(1):88-90. doi:10.1097/CM9.0000000000000571.
 124. Wójcik-Bojek U, Różalska B, Sadowska B. *Staphylococcus aureus*-a known opponent against host defense mechanisms and vaccine development-do we still have a chance to win?. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2):948. doi:10.3390/ijms23020948.
 125. Wójcik-Bojek U, Rywaniak J, Bernat P, Podsędek A, Kajszyk D, Sadowska B. An *in vitro* study of the effect of *Viburnum opulus* extracts on key processes in the

- development of staphylococcal infections. *Molecules*. 2021;26(6):1758. doi:10.3390/molecules26061758.
126. Wu SC, Liu F, Zhu K, Shen JZ. Natural products that target virulence factors in antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Agric Food Chem*. 2019;67(48):13195-13211. doi:10.1021/acs.jafc.9b05595.
 127. Xue L, Chen YY, Yan Z, Lu W, Wan D, Zhu H. Staphyloxanthin: a potential target for antivirulence therapy. *Infect Drug Resist*. 2019;12:2151-2160. doi:10.2147/IDR.S193649.
 128. Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*. 2018;10(11):1618. doi:10.3390/nu10111618.
 129. Young SA, Desbois AP, Coote PJ, Smith TK. Characterisation of *Staphylococcus aureus* lipids by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry (nESI-MS/MS). *bioRxiv*. 2019;593483. doi: 10.1101/593483.
 130. Zaragozá C, Villaescusa L, Monserrat J, Zaragozá F, Álvarez-Mon M. Potential therapeutic anti-inflammatory and immunomodulatory effects of dihydroflavones, flavones, and flavonols. *Molecules*. 2020; 25(4):1017. doi:10.3390/molecules25041017.
 131. Zayachkivska O, Gzhegotsky M, Terletska O, Lutsyk D, Yaschenko A, Dzhura O. Influence of *Viburnum opulus* proanthocyanidins on stress-induced gastrointestinal mucosal damage. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57:155-167.
 132. Zhang B, Teng Z, Li X, Lu G, Deng X, Niu X, et al. Chalcone attenuates *Staphylococcus aureus* virulence by targeting sortase A and alpha-hemolysin. *Front Microbiol*. 2017;8:1715. doi:10.3389/fmicb.2017.01715.
 133. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β . *Nature*. 2012;484(7395):514-518. doi:10.1038/nature10957.

X. Oświadczenia współautorów

Oświadczenia współautorów dotyczące udziału w dwóch opublikowanych pracach naukowych oraz manuskrypcie przygotowanym do czasopisma znajdują się na kolejnych stronach.

Oświadczenie współautorów o udziale w publikacji

Staphylococcus aureus—A known opponent against host defense mechanisms and vaccine development—Do we still have a chance to win?

Urszula Wójcik-Bojek, Barbara Różalska, Beata Sadowska

International Journal of Molecular Sciences 2022, 23, 948 (DOI: 10.3390/ijms23020948)

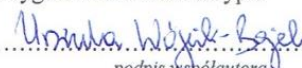
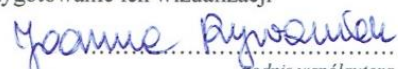
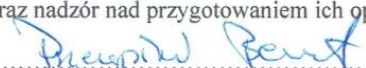
Autor	Szacunkowy udział [%]	Opis działań
mgr Urszula Wójcik-Bojek	40	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - współudział w przygotowaniu koncepcji pracy - analiza literatury naukowej z zakresu charakterystyki i chorobotwórczości gronkowców oraz ich interakcji z mechanizmami obronnymi organizmu gospodarza - współudział w przygotowaniu manuskryptu (rozdział 2 wraz z podrozdziałem, edycja referencji) <i>Urszula Wójcik-Bojek</i>..... podpis współautora
prof. dr hab. Barbara Różalska	30	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - przygotowanie koncepcji pracy - analiza literatury naukowej z zakresu immunoprofilaktyki i immunoterapii zakażeń gronkowcowych - współudział w przygotowaniu manuskryptu (wstęp, rozdział 4 i podsumowanie) <i>Barbara Różalska</i>..... podpis współautora
dr hab. Beata Sadowska, prof. UŁ	30	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - współudział w przygotowaniu koncepcji pracy - analiza literatury naukowej dotyczącej rozwoju szczepionek przeciwko gronkowcom - współudział w przygotowaniu manuskryptu (rozdział 3, edycja całego manuskryptu) - pełnienie roli autora korespondującego, w tym przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów <i>B. Sadowska</i>..... podpis współautora

Oświadczenie współautorów o udziale w publikacji

An *in vitro* study of the effect of *Viburnum opulus* extracts on key processes in the development of staphylococcal infections

Urszula Wójcik-Bojek, Joanna Rywaniak, Przemysław Bernat, Anna Podśedek, Dominika Kajszczyk, Beata Sadowska

Molecules, 2021, 26, 1758: 1-21 (DOI: 10.3390/molecules26061758)

Autor	Szacunkowy udział [%]	Opis działań
mgr Urszula Wójcik-Bojek	40	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - współudział w przygotowaniu koncepcji pracy - planowanie i przeprowadzenie badań eksperymentalnych z zakresu: oceny wpływu badanych ekstraktów roślinnych na aktywność SrtA (test fluorymetryczny), oceny ekspresji SpA na komórkach gronkowców (spektrofluorymetria), oceny tworzenia biofilmu <i>S. aureus</i> po ekspozycji na badane ekstrakty (test fluorymetryczny), wstępne przygotowanie próbek badanych do oceny składu lipidowego błon komórkowych gronkowców - analizę wyników ww. wymienionych badań eksperymentalnych - przygotowanie wizualizacji wyników prac badawczych - współudział w przygotowaniu manuskryptu  podpis współautora
dr Joanna Rywaniak	10	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - przeprowadzenie badań eksperymentalnych z zakresu oceny cytotoksyczności badanych ekstraktów roślinnych dla fibroblastów linii HFF-1 (test MTT) - analizę wyników ww. badań eksperymentalnych i przygotowanie ich wizualizacji  podpis współautora
dr hab. Przemysław Bernat, prof. UŁ	10	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: oznaczenie składu lipidowego błon komórkowych gronkowców z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS i GC/MS, współudział w interpretacji uzyskanych wyników oraz nadzór nad przygotowaniem ich opisu  podpis współautora

dr hab. inż. Anna Podsędek, prof. PŁ	10	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: • przygotowanie ekstraktów <i>V. opulus</i> L. • wykonanie analizy składu biochemicznego badanych ekstraktów roślinnych z wykorzystaniem HPLC/UPLC-QTOF-MS • przygotowanie opisu ww. badań biochemicznych do manuskryptu Anna.....Podsędek..... podpis współautora
dr inż. Dominika Kajszczak	5	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: • przygotowanie ekstraktów <i>V. opulus</i> L. • wykonanie analizy składu biochemicznego badanych ekstraktów roślinnych z wykorzystaniem HPLC/UPLC-QTOF-MS Dominika.....Kajszczak..... podpis współautora
dr hab. Beata Sadowska, prof. UŁ	25	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: • przygotowanie koncepcji pracy • współudział w planowaniu badań • nadzór nad postępami pracy badawczej • przeprowadzenie badań z zakresu oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych preparatów (MIC/MBC) • współudział w interpretacji uzyskanych wyników • przygotowanie i edycję manuskryptu • pełnienie roli autora korespondującego, w tym przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów B. Sadowska..... podpis współautora

Oświadczenie współautorów o udziale w publikacji

Modulation and priming of the macrophages against and by staphylococci – indirect effect of natural plant extracts

Urszula Wójcik-Bojek, Joanna Rywaniak, Beata Sadowska

Manuskrypt przygotowany w języku angielskim do publikacji (praca oryginalna)

Autor	Szacunkowy udział [%]	Opis działań
mgr Urszula Wójcik-Bojek	50	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - współudział w przygotowaniu koncepcji pracy - planowanie i przeprowadzenie badań eksperymentalnych z zakresu: oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej wankomycyny (MIC/MBC), przygotowania i zebrania supernatantów do badań, oceny wydzielania PG i SpA w supernatantach gronkowcowych (ELISA), oceny wydzielania TNF-α i IL-10 w supernatantach komórkowych (ELISA), oceny ekspresji cząsteczek CD na makrofagach M0 z linii THP-1 (cytometria przepływowa), oceny pochłaniania i wewnątrzkomórkowego przeżywania gronkowców w komórkach THP-1 (spektrofluorymetria) - analizę wyników ww. wymienionych badań eksperymentalnych - przygotowanie wizualizacji wyników prac badawczych - współudział w przygotowaniu manuskryptu <i>Urszula Wójcik-Bojek</i>..... podpis współautora
dr Joanna Rywaniak	15	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - przeprowadzenie badań eksperymentalnych z zakresu: oceny wydzielania TNF-α i IL-10 w supernatantach komórkowych (ELISA), oceny ekspresji cząsteczek CD na makrofagach z linii THP-1 (cytometria przepływowa) - analizę wyników ww. badań eksperymentalnych i przygotowanie ich wizualizacji <i>Joanna Rywaniak</i>..... podpis współautora
dr hab. Beata Sadowska, prof. UŁ	35	Oświadczam, że mój udział w niniejszej pracy obejmował: - przygotowanie koncepcji pracy - współudział w planowaniu badań - nadzór nad postępami pracy badawczej - interpretację uzyskanych wyników - przygotowanie i edycję manuskryptu - pełnienie roli autora korespondującego <i>B. Sadowska</i>..... podpis współautora

XI. Dorobek naukowy

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

1. **Wójcik-Bojek U**, Różalska B, Sadowska B. *Staphylococcus aureus* – a known opponent against host defense mechanisms and vaccine development – do we still have a chance to win? *Int J Mol Sci.* 2022; 23(2):948. doi: 10.3390/ijms23020948.
2. **Wójcik-Bojek U**, Rywaniak J, Bernat P, Podsędek A, Kajszyk D, Sadowska B. An *in vitro* study of the effect of *Viburnum opulus* extracts on key processes in the development of staphylococcal infections. *Molecules.* 2021; 26(6):1758. doi: 10.3390/molecules26061758.

Pozostałe publikacje

1. Stochmal A, Skalski B, Pietukhov R, Sadowska B, Rywaniak J, **Wójcik-Bojek U**, Grabarczyk Ł, Żuchowski J, Olas B. Evaluation of antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activity of phenolic preparations of diverse composition, obtained from *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson leaf and twig extracts. *Molecules.* 2021; 26(10):2835. doi: 10.3390/molecules26102835.
2. Sadowska B, Rywaniak J, Cichocka A, Cichocka K, Żuchowski J, **Wójcik-Bojek U**, Więckowska-Szakiel M, Różalska B. Phenolic and non-polar fractions of the extracts from fruits, leaves, and twigs of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson – the implications for human barrier cells. *Molecules.* 2020; 25(9):2238. doi: 10.3390/molecules25092238.
3. Sadowska B, Rywaniak J, **Wójcik-Bojek U**, Więckowska-Szakiel M, Różalska B. Alternatywne sposoby terapii i profilaktyki zakażeń biofilmowych. Część 1. [Alternative ways of therapy and prophylaxis of biofilm-associated infections. Part 1] *Forum Zakażeń.* 2019; 10(6):355-363. doi: 10.15374/FZ2019053.
4. Sadowska B, Rywaniak J, **Wójcik-Bojek U**, Więckowska-Szakiel M, Różalska B. Alternatywne sposoby terapii i profilaktyki zakażeń biofilmowych. Część 2. [Alternative ways of therapy and prophylaxis of biofilm-associated infections. Part 2] *Forum Zakażeń.* 2019; 10(6):365-372. doi: 10.15374/FZ2019054.

5. Sadowska B, **Wójcik U**, Krzyżanowska-Kowalczyk J, Kowalczyk M, Stochmal A, Rywaniak J, Burzyńska J, Różalska B. The *Pros* and *Cons* of cystic fibrosis (CF) patient use of herbal supplements containing *Pulmonaria officinalis* L. extract: the evidence from an *in vitro* study on *Staphylococcus aureus* CF clinical isolates. *Molecules*. 2019; 24(6):1151. doi: 10.3390/molecules24061151.
6. Karolewska K, **Wójcik U**, Sadowska B, Różalska B. Przegląd nowoczesnych technik obrazowych i analitycznych w badaniu cech biofilmów. [Overview of modern microscope and analytical techniques in the study of biofilm features.] *Forum Zakazeń*. 2018; 9(2):63-71. doi: 10.15374/FZ2018010.
7. Różalska B, Sadowska B, Żuchowski J, Więckowska-Szakiel M, Budzyńska A, **Wójcik U**, Stochmal A. Phenolic and nonpolar fractions of *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson extracts as virulence modulators—*in vitro* study on bacteria, fungi, and epithelial cells. *Molecules*. 2018; 23(7):1498. doi: 10.3390/molecules23071498.

Doniesienia konferencyjne

1. Rywaniak J, **Wójcik-Bojek U**, Fabiańska P, Więckowska-Szakiel M, Sadowska B. Przeciwdrobnoustrojowe i immunomodulujące właściwości ekstraktów z kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.). XXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Warszawa, 15-17 września 2022 r.
2. **Wójcik-Bojek U**, Rywaniak J, Więckowska-Szakiel M, Kajszcak D, Sadowska B. Can we modulate the macrophage polarization by indirect activity of plant extracts? The International Union of Microbiological Societies 2022 Congress, online, 20-22 lipca 2022 r.
3. **Wójcik-Bojek U**, Więckowska-Szakiel M, Karolewska K, Kalinowska K, Kajszcak D, Sadowska B. Can we minimize the risk of staphylococcal biofilm associated infections? An *in vitro* study. 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, online, 9-12 lipca 2021 r.
4. **Wójcik-Bojek U**, Polka D, Żuchowski J, Sadowska B. Naturalne ekstrakty roślinne jako inhibitory gronkowcowej sortazy A. XI Ogólnopolskie Sympozjum „Biofilm

tworzony przez drobnoustroje w patogenezie zakażeń”, Kudowa Zdrój, 14-16 listopada 2019 r.

5. **Wójcik U**, Polka D, Żuchowski J, Sadowska B. Naturalne ekstrakty roślinne jako inhibitory gronkowcowej sortazy A. III Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego, Łódź, 7 czerwca 2019 r.
6. **Wójcik U**, Józefiak A, Więckowska-Szakiel M, Żuchowski J, Stochmal A, Sadowska B. Wpływ fenolowych i hydrofobowych frakcji ekstraktów z rokitnika zwyczajnego (*Elaeagnus rhamnoides* L. A. Nelson) na adhezję gronkowców i tworzenie biofilmu na powierzchniach kondycjonowanych białkami zewnątrzkomórkowej macierzy. II Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego, Łódź, 8 czerwca 2018 r.
7. **Wójcik U**. Anti-biofilm activity of plant extracts: a minireview. 21st Century Medicine International Medical Congress for Students and Young Doctors, Lublin, 7 kwietnia 2018 r.
8. **Wójcik U**, Burzyńska J, Jundziłł M, Sadowska B. Anti-biofilm activity of the extract from *Pulmonaria officinalis* L. in the context of lung infections in patients with cystic fibrosis. The 4th Workshop “Microbiology in Health Care and Environmental Protection” —MIKROBIOT 2017, Łódź, 19-21 września 2017 r.

Granty

1. **Wójcik-Bojek U**. Składniki ściany komórkowej *Staphylococcus aureus* jako modulatory różnicowania i aktywności wydzielniczej makrofagów. Doktoranckie Granty Badawcze 2021 (2021-2022 r.)
2. **Wójcik U**. Przeciwbiofilmowa aktywność ekstraktu z miodunki plamistej (*Pulmonaria officinalis* L.) w kontekście zakażeń płuc u chorych na mukowiscydozę. Studenckie Granty Badawcze 2017 (2017 r.)