

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA E SCIENZE DELLA SALUTE



Dottorato di ricerca in medicina traslazionale e clinica
XXXIV ciclo
Tesi in Microbiologia e Microbiologia Clinica (MED/07)

Approfondimento del potenziale terapeutico di alcuni ceppi di *Cutibacterium acnes* e loro applicabilità alle patologie infiammatorie della pelle associate a disbiosi

Tutor

Chiar.mo Prof.

Roberto Di Marco

Coordinatore:

Chiar.mo Prof.

Giovanni Scapagnini

Dottoranda:

Dott.ssa

Irene Magnifico

Matr. 164364

ANNO ACCADEMICO 2020/2021

A mia mamma

Tutto quello che ho fatto e che farò, sarà sempre per te.

Ovunque sarai.

Ti amo.

INDICE

1. Introduzione	6
1.1 Struttura della cute	6
1.2 La funzione di barriera fisica e immunitaria della cute	10
1.3 Il microbiota cutaneo	13
<i>1.3.1 Interazioni microbiota-ospite</i>	15
<i>1.3.2 Variazione del microbioma cutaneo, disbiosi, nella genesi delle malattie infiammatorie della pelle</i>	18
<i>1.3.3 Staphylococcus aureus</i>	19
1.4 Patologie cutanee	22
<i>1.4.1 Dermatite atopica</i>	24
<i>1.4.2 Psoriasi inversa</i>	26
<i>1.4.3 Acne</i>	27
<i>1.4.4 Ulcere da pressione</i>	30
1.5 Opzioni di trattamento	33
<i>1.5.1 Le potenzialità dell'acido ialuronico</i>	33
<i>1.5.2 Trattamenti basati sul microbiota</i>	34
2. Roadmap del percorso sperimentale	36
3. Materiali e metodi	38
3.1 Studio comparativo sull'attività di derivati batterici di <i>Cutibacterium acnes</i> su patogeni cutanei	38
<i>3.1.1 Preparazione degli "heat-killed bacteria" mediante tindalizzazione (sterilizzazione frazionaria)</i>	38
<i>3.1.2 Preparazione dei surnatanti</i>	39
<i>3.1.3 Estrazione dei frammenti di parete batterica</i>	39
<i>3.1.4 Influenza sulla crescita microbica secondo metodo spettrofotometrico</i>	39

3.2	Attività del frammento c40 e del coniugato HAc40 <i>in vitro</i>	40
3.2.1	<i>Acido ialuronico coniugato al frammento c40 (HAc40)</i>	40
3.2.2	<i>Preparazione delle sospensioni test</i>	41
3.2.3	<i>Allestimento coltura cellulare</i>	41
3.2.4	<i>Preparazione delle sospensioni batteriche</i>	41
3.2.5	<i>Preparazione del surnatante di S. aureus DSM 20491</i>	42
3.2.6	<i>Preincubazione delle sospensioni batteriche con le sospensioni test</i>	42
3.3	Saggio di vitalità cellulare (MTT)	42
3.4	Trattamento delle cellule e saggio di adesione/invasione	43
3.4.1	<i>Giemsa stain</i>	44
3.4.2	<i>Analisi statistica</i>	44
3.5	Trattamento delle cellule e saggio di migrazione	44
3.5.1	<i>Analisi statistica</i>	45
3.6	Attività del frammento c40 e del coniugato HAc40 <i>ex vivo</i>	45
3.6.1	<i>Scelta del modello</i>	45
3.6.2	<i>Preparazione dell'espianto</i>	46
3.6.3	<i>Preparazione dei batteri</i>	46
3.6.4	<i>Preincubazione del tessuto</i>	47
3.6.5	<i>Coincubazione del tessuto</i>	47
3.6.6	<i>Analisi istologica</i>	47
3.6.7	<i>Immunofluorescenza</i>	47
3.6.8	<i>Osservazione al microscopio</i>	48
4.	Risultati	49
4.1	Attività dei derivati di <i>Cutibacterium acnes</i> su patogeni cutanei	49
4.2	Saggio di vitalità cellulare (MTT)	58
4.3	Attività del frammento c40 e del coniugato HAc40 sull'adesione/invasione di <i>Staphylococcus aureus</i> alle cellule HaCaT	60

4.4	Attività del frammento c40 e del coniugato HAc40 sulla migrazione delle cellule HaCaT infettate con <i>Staphylococcus aureus</i>	62
4.5	Valutazione istologica dei tessuti infettati con <i>Staphylococcus aureus</i> e trattati con il frammento c40 e il coniugato HAc40	65
4.6	Valutazione dell'espressione delle proteine Claudina 1 e ZO1 dei tessuti infettati con <i>Staphylococcus aureus</i> e trattati con il frammento c40 e il coniugato HAc40	69
5.	Discussione	76
6.	Conclusioni e prospettive future	78
	<i>Ringraziamenti</i>	79
	Bibliografia	80

1. Introduzione

1.1 Struttura della cute

La pelle, con una superficie di circa 16.000 cm², è l'organo più esteso del corpo e rappresenta circa il 15% del peso totale del corpo adulto. Cellule, fibre e altri componenti formano diversi strati che danno alla pelle una struttura multistrato [1].

La pelle svolge molte funzioni vitali derivanti da reazioni chimiche e fisiche all'interno di questi componenti [2].

La sua funzione primaria è quella di barriera che protegge gli organi interni dall'attacco fisico e chimico, dalle radiazioni ultraviolette (UV), dall'invasione di agenti patogeni e dall'eccessiva perdita d'acqua nonché quella che la vede coinvolta nella termoregolazione [3].

La pelle è divisa in diversi strati: l'epidermide, la membrana basale (conosciuta anche come giunzione dermo-epidermica) che ancora l'epidermide al derma e infine l'ipoderma che consiste in gran parte di grasso [4].

Il livello più esterno, l'epidermide ha la funzione di sintetizzare la cheratina, una proteina fondamentale nel ruolo di protezione. Lo strato intermedio, il derma, contiene tessuto connettivo con cellule dendritiche, mastociti e cellule T di memoria, il cui costituente principale è rappresentato dalla proteina strutturale fibrillare nota come collagene. Il derma giace sul tessuto sottocutaneo, o pannicolo, che contiene piccoli lobi di cellule grasse note come lipociti. Lo spessore di questi strati varia considerevolmente, a seconda della posizione anatomica (fig. 1) [5].

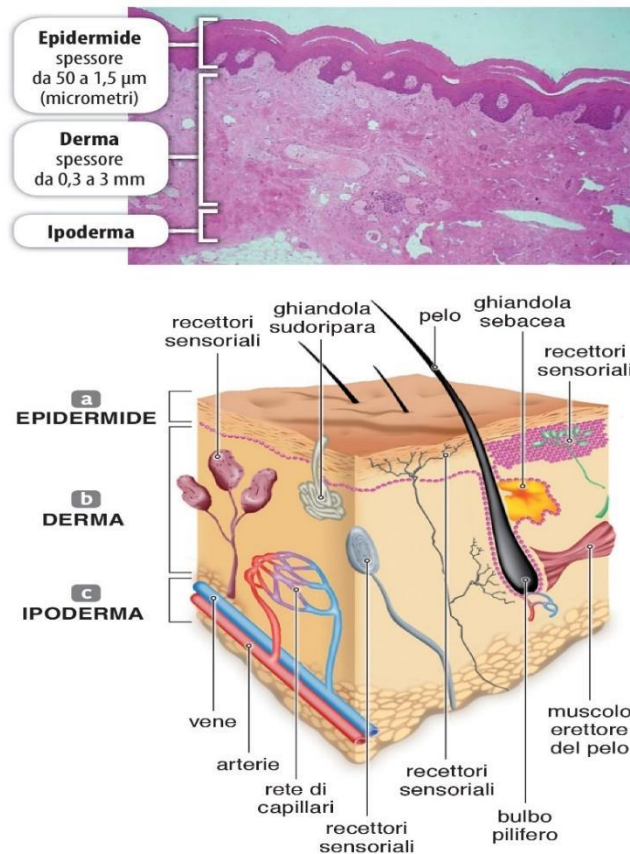


Figura 1 Anatomia della pelle

I vari strati della pelle lavorano di concerto per fornire forza e flessibilità svolgendo le molteplici funzioni sopracitate [6].

L'epidermide è lo strato più esterno della pelle con uno spessore di circa 75~150µm. È composta da diverse popolazioni cellulari: il 95% sono cheratinociti attivi (sintetizzano la cheratina), il restante 5% è rappresentato dai non-cheratinociti (cellule che non sintetizzano cheratina) insieme ai melanociti e le cellule di Langerhans fig. 2 [7, 8].

L'epidermide è uno strato che si rinnova continuamente nel quale risiedono strutture derivate, come gli apparati pilosebacei, le unghie e le ghiandole sudoripare [9].

È divisa in quattro strati secondo la morfologia e la posizione dei cheratinociti a partire dallo strato basale (*stratum germinativum*) appena sopra il derma, lo strato cellulare squamoso (*stratum spinosum*), lo strato di cellule granulari (*stratum granulosum*), e infine lo strato di cellule cornificate o cornee (*stratum corneum*) (fig. 2) [10].

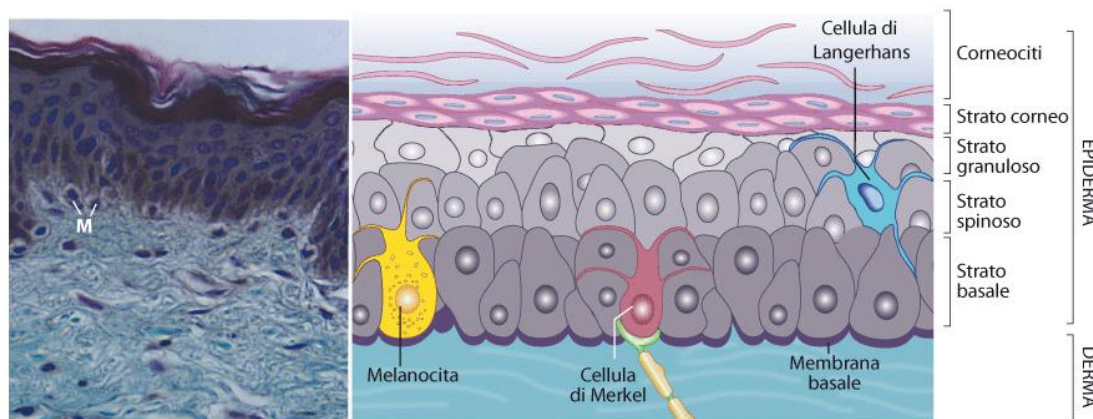


Figura 2 Stratificazione dell'epidermide

Lo strato corneo è lo strato più esterno dell'epidermide, del quale rappresenta i $\frac{3}{4}$ dello spessore complessivo; esso regola il transepidermal water loss (TEWL), blocca la penetrazione di diverse sostanze potenzialmente nocive, ed offre protezione nei confronti di lesioni e abrasioni [11].

Il processo di differenziazione dei cheratinociti avviene per migrazione delle cellule dallo strato basale alla superficie della pelle di concerto al processo di cheratinizzazione; durante questo passaggio il cheratinocita passa da una fase sintetica ad una fase degradativa [12].

Nella fase sintetica, salendo attraverso lo strato spinoso e lo strato granuloso, i cheratinociti si differenziano per formare una struttura interna rigida di cheratina dotata di microfilamenti e microtubuli (cheratinizzazione). Fasci di questi filamenti convergono e terminano sulla membrana plasmatica formando le piastre di attacco intercellulare note come desmosomi. Durante la fase degradativa, gli organelli cellulari vengono persi, il contenuto della cellula si consolida in una miscela di filamenti e involucri cellulari amorfi fino alla trasformazione in cellula cornea o corneocita. In seguito, Quest'ultime vengono eliminate dalla pelle attraverso un processo noto come desquamazione che dura circa 28 giorni [13].

I cheratinociti sintetizzano ed esprimono varie proteine strutturali e lipidi durante la loro maturazione.

Questi lipidi vengono scissi dagli enzimi dei cheratinociti per produrre una miscela di ceramidi (fosfolipidi), acidi grassi e colesterolo. Queste molecole sono disposte in modo altamente organizzato, fondendosi sia tra loro sia con i corneociti per formare la barriera

lipidica della pelle responsabile del mantenimento idrico e dell'effetto barriera contro la penetrazione di allergeni e sostanze irritanti [14].

Insieme alla componente lipidica, le cheratine sono le principali proteine strutturali sintetizzate dai cheratinociti. Si assemblano in un modello simile a una ragnatela diramandosi a partire da un anello perinucleare lungo tutto il citoplasma e terminando nei desmosomi giunzionali. Durante le fasi finali della differenziazione le cheratine sono allineate in matrici altamente ordinate e condensate attraverso le interazioni con la proteina della matrice filaggrina. Questa aggrega i filamenti di cheratina in fasci stretti determinando il collasso del cheratinocita che assume la tipica forma appiattita (caratteristica dei corneociti nello strato corneo). Le cheratine e la filaggrina costituiscono dall'80% al 90% della massa proteica dell'epidermide dei mammiferi [15].

Altre proteine responsabili del processo di cheratinizzazione sono loricrina, involucrina che si dispongono per formare il reticolo della barriera cutanea [16].

Oltre ai cheratinociti sono presenti altri tipi cellulari come i melanociti, ovvero i produttori del pigmento della pelle e dei capelli. Questi si ritrovano in percentuale minore, tuttavia sono maggiormente presenti nello strato basale dell'epidermide, dove producono granuli di pigmento chiamati melanosomi contenenti melanina. I melanosomi sono trasferiti dai melanociti ai cheratinociti dell'epidermide, dove conferiscono una certa protezione al nucleo cellulare dalla luce ultravioletta (UV) e danno alla pelle il suo colore. Il processo di sintesi della melanina e il trasferimento dei melanosomi avviene continuamente quando l'epidermide si rinnova, ma può essere accelerato in risposta all'esposizione ai raggi UV. Un'altra componente cellulare dell'epidermide è la cellula di Langerhans, ossia cellule immunitarie presentatrici di antigeni (microrganismi e proteine estranee) che si trovano nello strato spinoso costantemente alla ricerca di antigeni da intrappolare e presentare ai linfociti T-helper, attivando così una risposta immunitaria [17].

Ultime per numero, ma non per importanza sono le cellule di Merkel presenti nello strato basale. Queste sono strettamente associate ai filamenti terminali dei nervi cutanei e sembrano avere un ruolo nella percezione sensoriale [18].

In questo scenario si evince che la funzione principale dell'epidermide è quella di fungere da barriera fisica e biologica nei confronti dell'ambiente esterno, impedendo la penetrazione di sostanze irritanti e allergeni. Allo stesso tempo, impedisce la perdita di acqua e mantiene l'omeostasi interna [19].

1.2 La funzione di barriera fisica e immunitaria della cute

La barriera cutanea è localizzata nella zona più alta dell'epidermide dove si trova lo strato corneo.

L'epidermide esercita un effetto barriera a più livelli, sia di tipo fisico, chimico-biochimico (antimicrobico ed immunità innata) sia immunologico adattativo [20].

Le barriere fisiche sono costituite dallo strato corneo (SC) e dalle giunzioni strette, Tight Junction [21].

Mentre la barriera chimica è costituita principalmente dai peptidi antimicrobici secreti dai cheratinociti e dal pH acido della pelle.

Infine la barriera immunologica innata è costituita dai lipidi, acidi, enzimi idrolitici e peptidi antimicrobici prodotti dai cheratinociti mentre quella adattativa da costituenti umorali e cellulari del sistema immunitario (fig. 3) [19].

Barriera FISICA	
Epidermide	è strato corneo <ul style="list-style-type: none">• corneociti• corneodesmosomi• matrice lipidica idrofobica
	è strati nucleati <ul style="list-style-type: none">• cheratinociti• giunzioni cellulari

Barriera CHIMICA	
pH acido	

Barriera IMMUNOLOGICA	
Immunità innata	è fattori solubili (lipidi, acidi, enzimi idrolitici, peptidi antimicrobici)
	è fattori cellulari (monociti/macrofagi)
Immunità adattativa	è elementi umorali (anticorpi)
	è elementi cellulari (linfociti T)

Figura 3 Componenti della barriera cutanea [11]

Lo strato corneo, che costituisce una delle due barriere fisiche dell'epidermide, svolge la sua funzione principalmente grazie ai corneociti. 10-20 strati di corneociti si dispongono a formare uno scudo protettivo assieme ai lipidi inter-corneocitari proteggendo l'epidermide dalla perdita d'acqua e regolando la permeabilità [22]. I cambiamenti non fisiologici nella differenziazione epidermica e nella composizione lipidica portano a una barriera cutanea disturbata, permettendo l'ingresso di xenobiotici con eventuale innesco di reazioni immunologiche e infiammazione [23, 24].

Per decenni si è pensato che le TJ non avessero un ruolo importante nella funzione di barriera dell'epidermide dei mammiferi. Studi recenti hanno rivelato il loro ruolo nella funzione di barriera, infatti le TJ sono specifiche giunzioni cellula-cellula che sigillano lo spazio intercellulare. Tra le principali proteine che compongono le TJ si ricordano claudina e occludina, che sono proteine transmembrana e ZO-1, ZO-2 and ZO-3 che sono invece intracellulari [25-27]. Diversi agenti patogeni sono noti per utilizzare le proteine TJ come recettori per l'adesione e la successiva internalizzazione, oppure come bersaglio diretto o ancora come un target della cascata infiammatoria utile per l'accesso al tessuto sottostante (fig. 4) [28, 29].

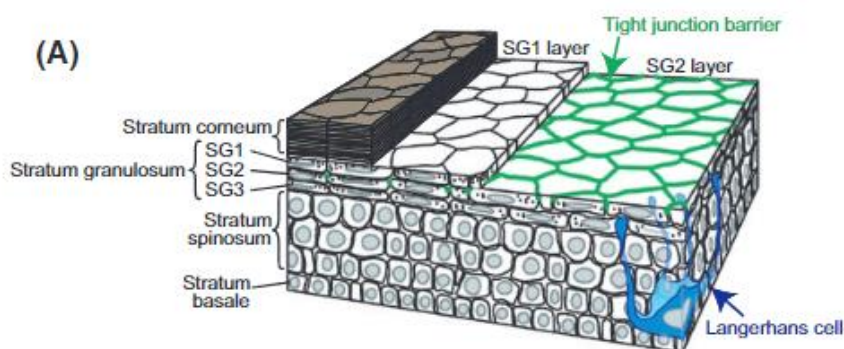


Figura 4 Barriere fisiche dell'epidermide sono costituite dallo strato corneo (SC) e dalle tight junction [27]

Oltre alle barriere fisiche, la pelle è dotata di un sistema di difesa chimica composto dagli AMPs (peptidi antimicrobici) che formano uno scudo protettivo candidandoli ad essere una componente di prima linea rapida e diretta nell'immunità innata contro l'attacco dei microrganismi. Sono principalmente piccoli peptidi antimicrobici cationici attivi nei confronti di un ampio spettro di batteri, funghi e virus che consentono anche l'attivazione di meccanismi dell'immunità cellulare e adattativa [30].

Tra questi peptidi, quelli più conosciuti sono le catelicidine e le defensine. I peptidi antimicrobici, sintetizzati nella pelle nei siti di potenziale ingresso microbico fungono da barriera che impedisce l'infezione. In caso di lesione, l'espressione dei peptidi antimicrobici nella pelle è aumentata a causa di una maggiore sintesi da parte dei cheratinociti e della degranolazione dei neutrofili reclutati. L'espressione costitutiva e

inducibile della catelicidina umana (hCAP-18/LL-37), così come le β -defensine umane 1 (hBD-1), hBD-2 e hBD-3, sono state osservate nei cheratinociti [31].

In aggiunta alla barriera fisica e chimica, per mantenere l'integrità del compartimento cutaneo, è presente anche una barriera immunologica garantita dalle cellule del sistema immunitario. Cellule dendritiche, macrofagi e neutrofili sono dotate di specifici recettori denominati PRR (*Pattern Recognition Receptors*), deputati al riconoscimento delle molecole presenti sui microrganismi patogeni. I PRR si legano a strutture microbiche conservate chiamate PAMP (*Patterns Molecolari associati ai Patogeni*) promuovendo la risposta pro-infiammatoria [32].

Tra i PRR si ricordano i TLR2 e TLR4 che riconoscono vari PAMP. TLR2 riconosce i componenti dei batteri Gram-positivi e dei lieviti, come l'acido lipoteico, il peptidoglicano (anche se prove recenti suggeriscono che potrebbe trattarsi di acido lipoteico contaminante), le lipoproteine o lo zymosan, mentre i PAMP rilevati da TLR4 includono il componente batterico tipico dei batteri Gram-negativi, il lipopolisaccaride [33].

Il riconoscimento dei PAMP da parte dei TLR avvia una cascata di segnalazione che porta alla produzione di citochine pro-infiammatorie, chemochine, peptidi antimicrobici ed enzimi inducibili nella pelle attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione, proteina attivatrice-1 e fattore nucleare-Kb [34]. Il corretto funzionamento della barriera epidermica dipende dalla sua struttura morfologica e dalla composizione biochimica. Questa barriera non è una struttura fissa, al contrario, si adatta in modo molto interattivo ai cambiamenti ambientali [35].

1.3 Il microbiota cutaneo

Fin dalla nascita, la pelle è densamente colonizzata da una complessa comunità microbica. L'insieme di questi microrganismi è oggi comunemente denominato "microbiota". Negli adulti sani, vi è una notevole diversità nella composizione del microbiota commensale [36]. Supponendo che su una superficie cutanea di $\sim 2 \text{ m}^2$ vi sia una densità massima di cellule microbiche (batteriche) di $\sim 10^6 \text{ cm}^{-2}$, allora si può stimare che la pelle degli adulti sani sia colonizzata da un massimo di $\sim 10^{10}$ microrganismi in totale [37].

Nell'ultimo decennio, le tecnologie di sequenziamento hanno notevolmente facilitato l'analisi tassonomica del microbiota cutaneo. Ad oggi è ben noto che questo comprenda procarioti, eucarioti (funghi, parassiti metazoici parassiti) e virus (fig. 5) [38-40]. La comunità procariotica è dominata da batteri, tuttavia, anche gli *Archaea* sono presenti [41]. Così, il microbiota della pelle comprende tutti e tre domini della vita compresi i parassiti metazoici (per lo più artropodi, ad esempio gli acari) [42].

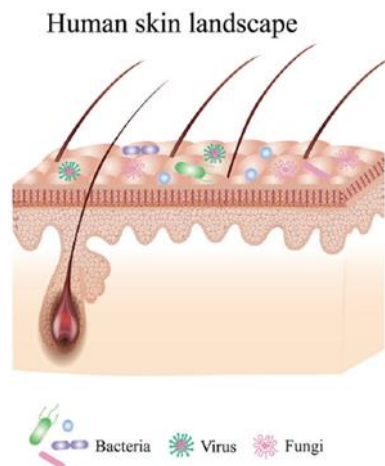


Figura 5 Composizione del microbiota della pelle umana [43]

Sulla base del sequenziamento del gene del RNA ribosomiale 16S, la maggior parte dei "normali" abitanti batterici della pelle rientrano in quattro phyla: *Actinobacterium* (*Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Cutibacterium*, *Micrococcus*, *Actinomyces*, *Brevibacterium*), *Bacteroidetes* (*Prevotella*, *Porphyromonas*, *Chryseobacterium*), *Firmicutes* (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Finegoldia*), e *Proteobacteria* (*Paracoccus*, *Haematobacter*) (fig. 6).

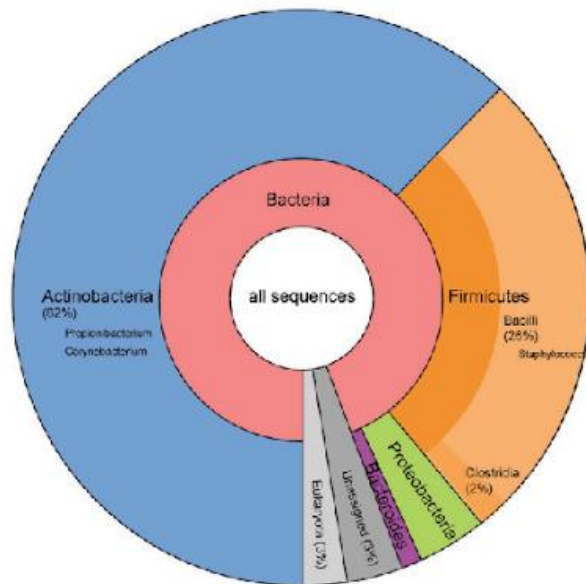


Figura 6 Composizione microbica [41]

La prevalenza dell'uno o dell'altro *phylum* dipende principalmente dal sito corporeo investigato, quindi l'abbondanza relativa può variare a seconda della diversa localizzazione anatomica secondo numerosi fattori fisiologici come la presenza di sebo o pieghe cutanee (fig. 7) [42].

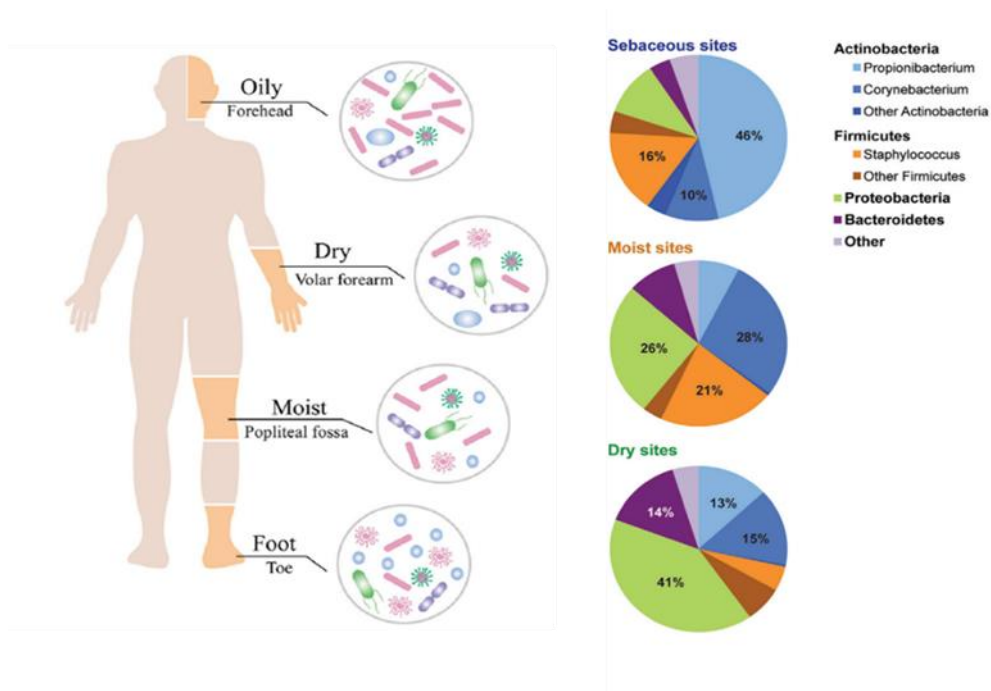


Figura 7 La composizione del microbiota della pelle umana è plasmata dalla biogeografia del sito cutaneo che include siti oleosi, umidi, secchi [43]

Le pieghe cutanee corrispondono spesso ad aree umide colonizzate principalmente dai microrganismi appartenenti alle specie *Staphylococcus* e *Corynebacterium* [44]. Viceversa *Propionibacterium spp* colonizzano le aree sebacee, probabilmente a causa della loro capacità di sopravvivere in questi ambienti anaerobici e ricchi di lipidi. Infine, le aree secche, sono quelle rappresentate dalla maggiore diversità microbica, con presenze variabili dei quattro principali *phyla* (fig. 7).

I miceti più comunemente identificati appartengono al genere *Malassezia* anche se sono stati identificati *Aspergillus spp*, *Cryptococcus spp.*, *Rhodotorula spp.* e *Epicoccum spp.* [45-47]. Il viroma è forse quello meno studiato tra tutti i componenti del microbiota cutaneo, anche se analisi recenti hanno iniziato a esplorare questo argomento. È infatti probabile che questi virus giochino un ruolo importante ruolo nell'immunità cutanea [48, 49]. Rispetto ad altre nicchie ecologiche (orale, intestinale o vaginale), il microbiota della pelle mostra la maggiore variabilità tra i soggetti nel tempo [50, 51]. Difatti, la presenza di numerosi taxa meno abbondanti e transitori porta ad un aumento della variabilità microbica sia interpersonale sia temporale, inoltre molteplici fattori specifici dell'ospite, come l'età, l'etnia e il sesso, contribuiscono alla variabilità microbica della pelle. Identificare microbi commensali e patogeni determinandone le loro interazioni con l'ospite, aiuterà a decifrarne il contributo sia nella pelle sana, così come nei disturbi dermatologici [52, 53].

1.3.1 Interazioni microbiota-ospite

La presenza di un microbiota equilibrato è generalmente riconosciuta come benefica. I batteri residenti svolgono una serie di funzioni essenziali, come l'inibizione e il controllo degli agenti patogeni e di altri batteri transitori attraverso la produzione di metaboliti antimicrobici, e la regolazione del sistema immunitario [54].

In questo contesto, il microbiota cutaneo svolge un ruolo di protezione contro le infezioni e le infiammazioni garantendo le normali funzioni della barriera cutanea.

I batteri residenti nella pelle devono competere per mantenere la colonizzazione della loro nicchia e l'accesso ai nutrienti. Come in ogni ecosistema, le interazioni competitive si verificano continuamente tra i microrganismi. Nella pelle, virus, funghi e batteri residenti proteggono la pelle da microbi patogeni o opportunisti metabolizzando le proteine e i lipidi e producendo molecole bioattive. Queste includono acidi grassi liberi, peptidi

antimicrobici ciclici (cAMP), moduline solubili in fenolo (PSM), componenti della parete cellulare microbica e antibiotici come le batteriocine, utili nell'inibire l'invasione dei patogeni [55].

Le interazioni microbico-microbiche tra il microbioma della pelle e gli agenti patogeni dimostrano il potente beneficio che il microbioma della pelle può avere per l'ospite (fig. 8).

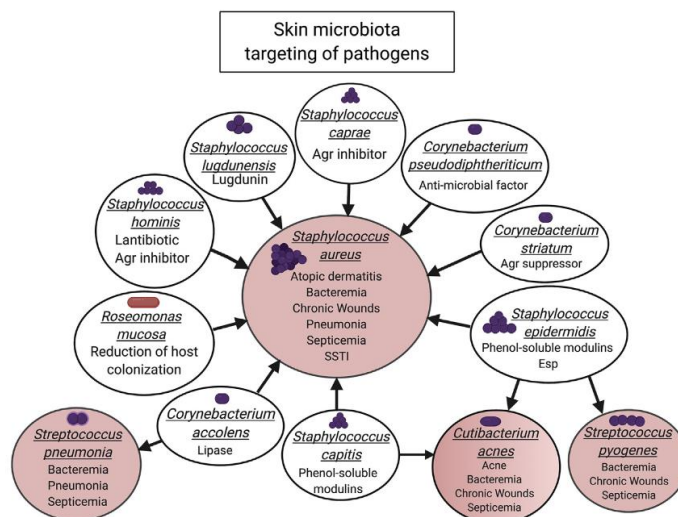


Figura 8 Le interazioni tra i membri del microbiota cutaneo (cerchi bianchi) e gli agenti patogeni (cerchi rosa) dimostrano il potente beneficio che il microbioma cutaneo può avere per l'ospite [56]

Sebbene la piena entità di queste interazioni sia ancora sconosciuta, il meccanismo d'azione più studiato è quello di inibizione da parte degli stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS) verso il patogeno *Staphylococcus aureus*. Le specie CoNS sono molto abbondanti nel microbioma della pelle e comprendono diverse specie come *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. hominis*, *S. lugdunensis* e *S. haemolyticus*. Alcune specie di CoNS inibiscono direttamente *S. aureus* mediante la secrezione di un cAMP. Inoltre, alcuni ceppi di *S. hominis* secernono antibiotici contro la colonizzazione di *S. aureus* in modelli murini e soggetti umani affetti da dermatite atopica [57]. Ceppi nasali di *S. lugdunensis* producono la lugdunina, un peptide ciclico contenente tiazolidina che ha una potente attività anti-*S. aureus* [58].

Le AMP prodotte dai batteri possono migliorare o sinergizzare con le risposte immunitarie dell'ospite, lavorando di concerto con il peptide antimicrobico LL-37 derivato dall'ospite per migliorare la difesa immunitaria [59]. Allo stesso modo, la combinazione dei peptidi antimicrobici prodotti da *S. hominis* con LL-37 aumenta

l'attività antimicrobica contro *S. aureus* [57]. Tra tutti i CoNS, *S. epidermidis*, è considerato il migliore produttore di batteriocine [38].

Infine, diverse specie di CoNS tra cui *S. epidermidis*, *S. capitis*, sono in grado di produrre PMS che promuovono l'inibizione di *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* e *C. acnes*, [59, 60].

Gli anaerobi facoltativi, come il *Cutibacterium acnes* (precedentemente denominato *Propionibacterium acnes*) contribuiscono al mantenimento del pH acido della pelle mediante la secrezione di enzimi lipolitici che favoriscono la liberazione di acidi grassi dal sebo acidificando il pH cutaneo [51].

Analisi recenti suggeriscono che i microbi vitali si trovano anche negli strati più profondi della pelle, cioè il derma e il tessuto adiposo sottostante, in contrasto con quanto si sosteneva in precedenza ovvero che sulla pelle sana la vita microbica fosse limitata all'epidermide, ai follicoli piliferi e alle ghiandole sebacee e sudoripare. Questa scoperta suggerisce una comunicazione diretta tra l'ospite e le cellule microbiche in un tessuto precedentemente ritenuto sterile con importanti risvolti immunologici [61]. Infatti, similmente all'intestino umano, si è ipotizzato che il microbiota della pelle sia coinvolto nello sviluppo e nella regolazione del sistema immunitario innato e adattativo così come nel mantenimento dell'omeostasi cutanea [62, 63].

In questo contesto, numerosi studi suggeriscono che commensali della pelle come *S. epidermidis* sono importanti motori e amplificatori dell'immunità della pelle umana. Questa specie batterica è in grado di sopprimere l'infiammazione inducendo la secrezione di interleuchina-10 dalle cellule presentanti l'antigene [64]. Inoltre, mediante la secrezione di un acido lipoteico unico sopprime sia le citochine infiammatorie dei cheratinociti che l'infiammazione attraverso un meccanismo TLR2-dipendente [65, 66]. Infine, è in grado di regolare la funzione dei linfociti T cutanei residenti contribuendo all'immunità protettiva contro gli agenti patogeni (fig. 10).

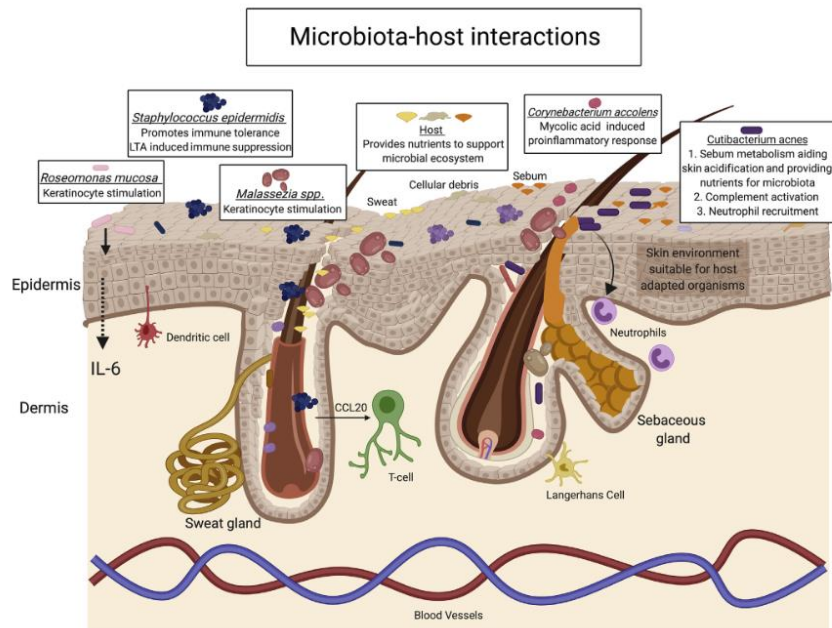


Figura 10 Le interazioni microbiota-ospite promuovono l'omeostasi della pelle e la risposta immunitaria. *Staphylococcus epidermidis* può sia stimolare che sopprimere l'infiammazione. Altre specie come *Roseomonas mucosa*, *Malassezia spp.* o *Corynebacterium accolens* possono regolare le risposte immunitarie dei cheratinociti e dell'ospite in un modo dipendente dal contesto. Infine, anche *Cutibacterium acnes*, ha interazioni benefiche con l'ospite poiché metabolizza le secrezioni di sebo, che a sua volta aiuta a mantenere un pH acido della pelle rendendola inadatta alla colonizzazione da parte dei microrganismi patogeni [51].

1.3.2 Variazione del microbioma cutaneo, disbiosi, nella genesi delle malattie infiammatorie della pelle

Sebbene la patogenesi delle malattie infiammatorie della pelle non sia stata ancora completamente chiarita, fattori convenzionalmente associati alla genesi di questi disturbi sono l'ereditarietà, l'ambiente, l'immunità e la disfunzione della barriera epidermica. Negli ultimi anni, è stato dimostrato che la variazione nella composizione del microbiota cutaneo, disbiosi, svolge anch'essa un ruolo importante nella patogenesi di queste patologie [67].

Sebbene vi siano delle variazioni nella composizione del microbiota cutaneo nella popolazione, la composizione microbica individuale sembra rimanere relativamente costante. Al contrario, le disbiosi che alterano le interazioni ospite-microbioma sono state associate con l'insorgenza delle patologie [68-70]. Difatti la composizione del microbiota cutaneo può cambiare drasticamente durante la progressione della malattia [69]. Anche se non è ancora noto se queste alterazioni siano una causa o una conseguenza delle malattie cutanee, alcune specie o ceppi specifici sono stati collegati con disturbi specifici come l'eczema, la psoriasi e l'acne vulgaris [71-73].

La maggior parte delle specie batteriche sulla pelle sono saprofiti solo alcune possono essere considerate patogene opportuniste in relazione al contesto dell'ospite (es.

immunodeficit) [4]. Sebbene non sia ancora del tutto elucidato con chiarezza il ruolo del microbiota cutaneo nel mantenimento dell'omeostasi, sembra ormai certo che in qualche misura l'equilibrio tra i membri delle comunità microbiche gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi di molte malattie della pelle [74].

Il patogeno opportunisto *Staphylococcus aureus* colonizza asintomaticamente più del 30% degli individui con livelli di abbondanza relativa molto bassi ciò fa supporre che i batteri potenzialmente patogeni colonizzanti la pelle degli individui sani possano essere influenzati dalla comunità microbica residente [75]. Ciononostante, l'aumento dell'abbondanza relativa di questo patogeno in determinati contesti patologici è in grado di contrastare prontamente lo stato di equilibrio dando luogo a disbiosi cutanea [76].

Staphylococcus epidermidis, il più importante tra i CoNS è generalmente benefico per l'ospite, tuttavia appare inaspettatamente nelle eruzioni di AD e diventa predominante in quelle meno gravi [77, 78]. Ciò può implicare che la disbiosi del microbiota cutaneo possa portare alla malattia senza la presenza di un patogeno prevalente all'interno della comunità microbica; a sostegno di ciò è stato riscontrato che i ceppi di *S. epidermidis* associati ai casi meno gravi di AD sono genomicamente simili ai ceppi nosocomiali causa di mortalità della sepsi nei neonati [79]. Oltre alla disbiosi batterica, molti studi hanno suggerito che anche la disbiosi del microbiota fungino e virale possa avere un impatto sulla salute della pelle, ad esempio la disbiosi dei miceti appartenenti al genere *Malassezia* è associata all'eczema oppure la disbiosi dell'herpesvirus alla varicella [55, 80]. Pertanto, è importante verificare lo stato di disbiosi cutanea poiché questa condizione può incidere sulla gravità o la suscettibilità della malattia o facilitare le transizioni da opportunistiche o commensali a patogeno.

1.3.3 *Staphylococcus aureus*

L'adesione e la colonizzazione di *S. aureus* alla pelle umana svolge un ruolo cruciale nella patogenesi e nell'esacerbazione di diverse malattie dermatologiche [81]. *S. aureus* è un patogeno cutaneo molto diffuso, responsabile della maggior parte delle infezioni batteriche cutanee [77].

In condizioni normali, la sua colonizzazione non turba l'eubiosi dell'ospite. Tuttavia, nelle malattie infiammatorie della pelle, la sua incontrollata proliferazione è mediata da un'ampia varietà di fattori di virulenza che promuovono l'adesione batterica alle cellule eucariotiche e alle molecole della matrice extracellulare da un lato e dall'altro la

produzione di tossine che causano direttamente danni ai tessuti con una conseguente risposta infiammatorie elevata (fig. 16).

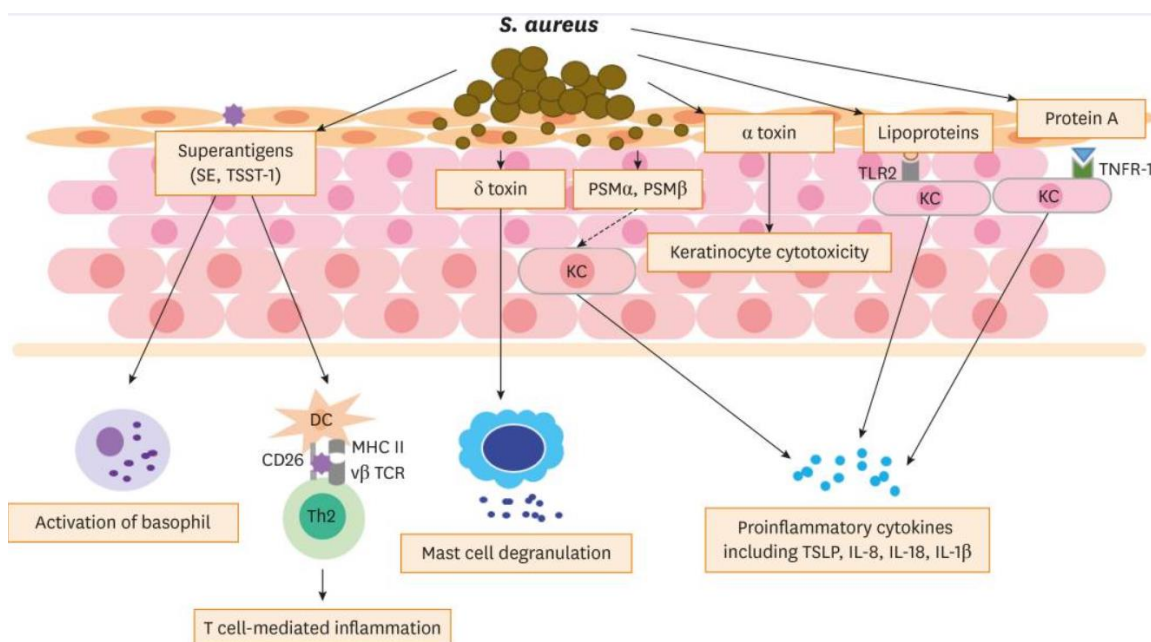


Figura 16 *S. aureus* esprime una pletera di superantigeni, come SE e TSST-1, che attivano i basofili e causano l'infiammazione mediata dalle cellule T. PSM α e PSM β stimolano il rilascio di citochine proinfiammatorie dai cheratinociti. L' α -tossina e δ -tossina inducono rispettivamente la citotossicità dei cheratinociti e la degranulazione dei mastociti. La proteina A e le lipoproteine di *S. aureus* portano a risposte proinfiammatorie attivando TNFR 1 e TLR2 sui cheratinociti, rispettivamente [82]

I fattori di virulenza di *Staphylococcus aureus* includono: antigeni, adesine, enzimi, coagulasi, lipasi, ialuronidasi, staphylococchinasi, nucleasi, tossine (α , β , δ , enterotossina, esfoliativa, da sindrome di shok tossico) e P-V leukocidina [83]. Le lipoproteine e l'acido lipoteichoico di *S. aureus* sono in grado di legarsi al recettore TLR2I presente sulla superficie dei cheratinociti. Il riconoscimento tra il recettore e i ligandi porta all'attivazione del fattore nucleare- κ B e di altri fattori di trascrizione che inducono la trascrizione di mediatori proinfiammatori (citochine, chemochine e molecole di adesione) [84] Anche il ruolo dei superantigeni nelle malattie della pelle è di grande importanza, recenti studi hanno dimostrato che l'applicazione dei superantigeni stafilococcici sulla superficie cutanea intatta, porta allo sviluppo un quadro clinico di patologia [85]. Nel contesto delle infezioni cutanee le tossine hanno guadagnato grande interesse, poiché sono in grado di indurre danni ai desmosomi attraverso la scissione della desmogleina 1. Questi fattori di virulenza contribuiscono all'infiammazione e alla disfunzione della barriera cutanea [82]. Nell'ambito delle tossine, L' α tossina è stata la prima esotossina batterica ad essere identificata come un formatore di pori ed è il principale agente citotossico di *S. aureus* (fig. 17).

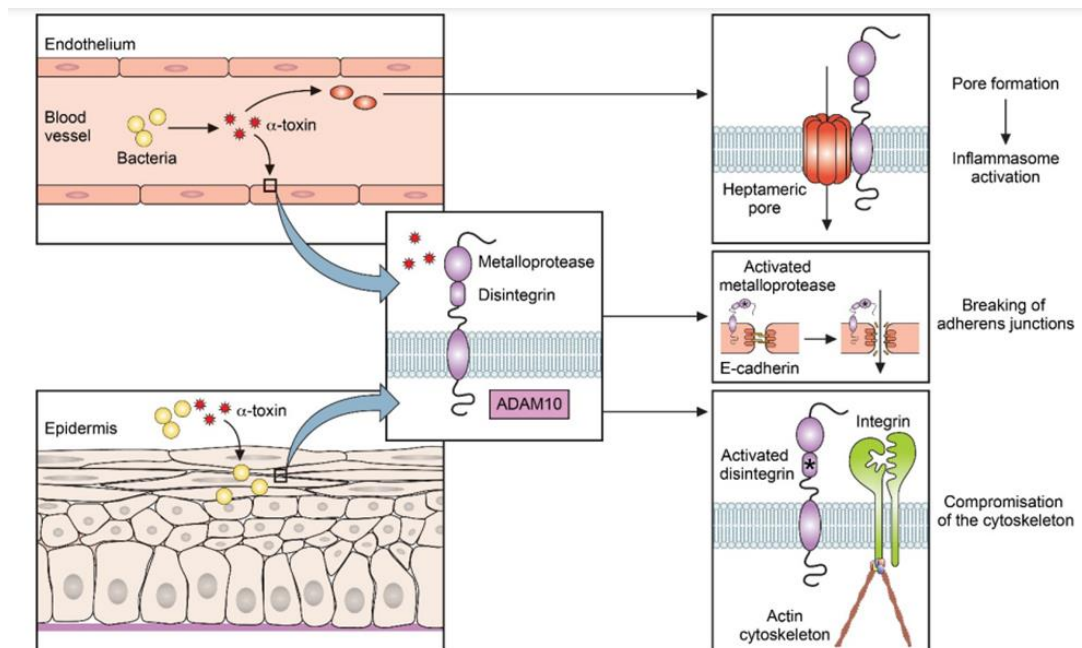


Figura 17 Ruolo della α -tossina nell'infezione da *S. aureus*. L' α -tossina causa la formazione di pori in una serie di cellule bersaglio attraverso la formazione di un poro eptamerico. In secondo luogo, provoca la rottura dell'epitelio e dell'endotelio attraverso la rottura delle giunzioni di aderenza e la compromissione del citoscheletro [86]

Sebbene sia stato dimostrato che l' α tossina, attivi il sistema acido sfingomielinasi/ceramide agendo sulle giunzioni endoteliali recenti indagini condotte *in vitro* hanno evidenziato una *down-regolazione* delle principali proteine delle TJ tra cui ZO-1, occludina e claudina-1 [87]. Ciò dimostra che la patogenicità di questo microrganismo non è legata solo alla sua capacità di produrre tossine, ma anche ai fattori di adesione tramite i quali attacca le TJ distruggendo la barriera cutanea; quindi l'espressione delle tossine non è una condizione *sine qua non* per provocare danni a livello cutaneo (fig. 18) [88].

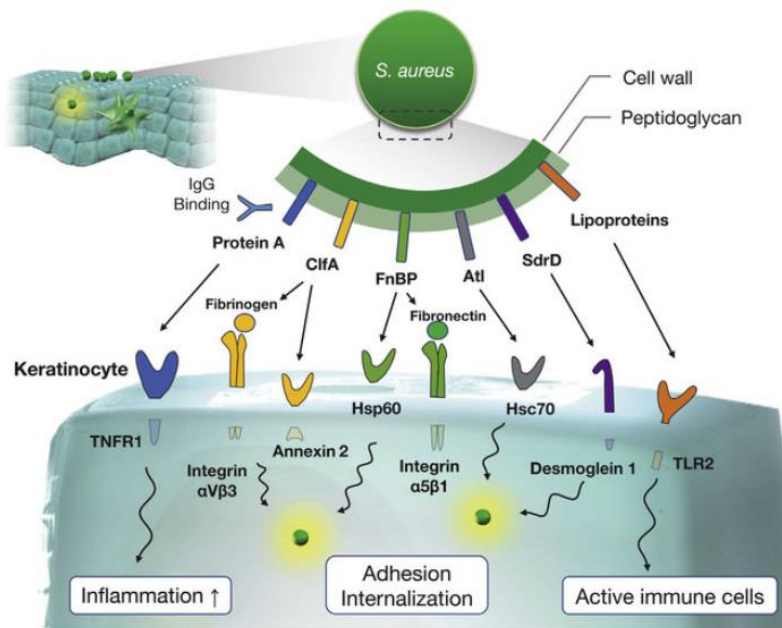


Figura 18 Proteine della parete cellulare di *S. aureus* che interagiscono con i cheratinociti. Le proteine della parete cellulare di *S. aureus* (ClfA, FnBP, Atl e SdrD) sono coinvolte nell'adesione e nell'internalizzazione nei cheratinociti [89]

La capacità dello *S. aureus* di aderire alle cellule è ben nota ed è stata dimostrata *in vitro* sia per le cellule primarie che per le linee cellulari di vari tessuti [90]. L'adesione è il primo passo del processo infettivo che si completa mediante l'espressione di un repertorio di proteine batteriche di superficie chiamate adesine che riconoscono le molecole della matrice adesiva (FnBP-Fn- $\alpha 5\beta 1$ integrina).

La comprensione di questi meccanismi, ed in particolare la possibilità di interferire con i sistemi di adesione di *S. aureus*, può rappresentare una linea di intervento per la riduzione della virulenza di questo germe. Diversi studi hanno dimostrato che membri del microbiota endogeno possono essere utilizzati come bio-terapeutici nell'attenuazione dei fattori di virulenza da *S. aureus* [91].

1.4 Patologie cutanee

Le malattie cutanee sono tra i problemi di salute più comuni in tutto il mondo perché la pelle funge da interfaccia tra l'organismo e l'ambiente circostante e questo la espone più di tutti gli altri organi al rischio di danneggiamento. Il problema delle malattie della pelle è un concetto multidimensionale che comprende le conseguenze psicologiche, sociali e finanziarie sui pazienti, sulle loro famiglie e sulla società. Per tale ragione sono associate a una significativa morbilità sotto forma di disagio fisico e di compromissione della qualità della vita [92].

La Classificazione Internazionale delle malattie della pelle ha attualmente individuato più di 1000 condizioni patologiche eppure, nonostante l' elevata diffusione, queste malattie continuano a ricevere relativamente poca attenzione nel dibattito sanitario nazionale o globale [93, 94]

Nei paragrafi successivi saranno descritti nel dettaglio: l'eczema (dermatite atopica), la psoriasi e psoriasi inversa, acne vulgaris e le ulcere da decubito, tutti caratterizzati da un uno stato di disbiosi che è alla base dell'eziopatogenesi della malattia o in altri casi del meccanismo di riesacerbazione (fig.11).

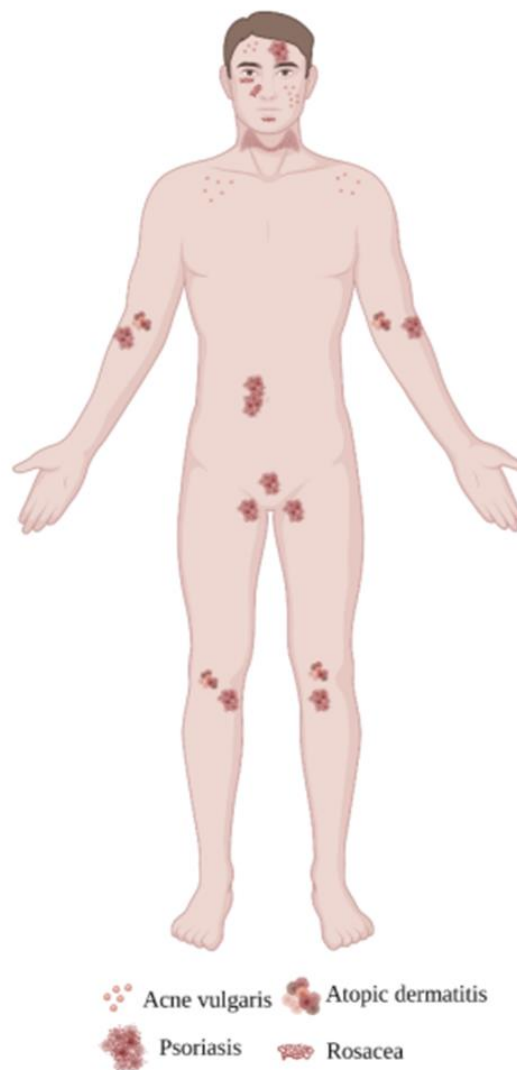


Figura 11 Manifestazioni cliniche delle più diffuse patologie cutanee [54]

Le patologie della pelle possono interessare tutti gli individui indipendentemente dall'etnia, con un tasso di incidenza che oscilla tra il 30% e il 70% che nelle sottopopolazioni a rischio può raggiungere percentuali più elevate [95].

Le informazioni riguardanti la prevalenza locale possono aiutare lo sviluppo di politiche socio-sanitarie utili nella gestione di questo tipo di patologie [94].

1.4.1 Dermatite atopica

La dermatite atopica (AD) è un disturbo infiammatorio cronico recidivante della pelle che colpisce il 7-10% della popolazione adulta e il 15-30% dei bambini, associata a una significativa morbilità e a una ridotta qualità della vita [96]. Il termine generale 'eczema' è stato inizialmente usato per descrivere tale stato di salute. Successivamente, la correlazione tra l'eczema e altri disturbi atopici ha portato Wise e Sulzberger a coniare nel 1933 il termine "dermatite atopica" [97]. Il modello clinico dell'AD include sia lesioni pruritiche che lesioni eczematose [98-100].

La gravità clinica è valutata utilizzando l'indice oggettivo SCORAD (scoring AD), sviluppato dalla European Task Force on Atopic Dermatitis (ETFAD) come metodo univoco per la valutazione della AD. Questo sistema considera sia i segni oggettivi (gravità ed estensione) che i segni soggettivi (prurito e perdita del sonno). Lo SCORAD permette una classificazione in lieve, moderata o grave. Una diagnosi completa è affiancata dalla valutazione dell'intensità del prurito [101]. Dal punto di vista clinico l'AD si manifesta con pelle secca, prurito e chiazze da rosse a grigio-brunastre, specialmente su mani, piedi, caviglie, polsi, collo, parte superiore del torace, palpebre, all'interno della piega dei gomiti e delle ginocchia. Nei neonati si manifesta con protuberanze in rilievo su viso e cuoio capelluto, nonché pelle ispessita, screpolata e squamosa [102].

La fisiopatologia è complessa e multifattoriale anche se le conoscenze attuali indicano che i principali fattori patogenetici risiedono nella disfunzione della barriera cutanea e nella disbiosi del microbiota residente, insieme alla dis-regolazione immunologica [103]. La disfunzione della barriera cutanea, la dis-regolazione immunitaria e la disbiosi microbica sono fattori strettamente correlati ed interdipendenti, tutti alla base del peggioramento della malattia [104-106].

In questo contesto, la disbiosi cutanea è spesso accompagnata da un aumento dell'abbondanza relativa del patogeno *S. aureus* insieme alla variazione nella composizione e numero di batteri commensali della pelle [107]. Una recente analisi ha evidenziato una prevalenza di *S. aureus* sulla pelle di soggetti con AD, con un tasso di

abbondanza del 70% rispetto al 39% nel gruppo di controllo [75]. Lo squilibrio tra *S. aureus* e il microbiota cutaneo residente può generare uno stato di disbiosi che induce un'alterazione della risposta immunitaria compromettendo la barriera cutanea [108]. Oltre a *S. aureus*, la disbiosi cutanea può verificarsi attraverso un aumento dell'abbondanza relativa di altre specie del genere *Staphylococcus*, come *S. haemolyticus*. Inoltre, è stata osservata la riduzione dell'abbondanza relativa di *Streptococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Corynebacterium spp.* e *Prevotella spp.*, [69]. Anche il *P. acnes* è stato trovato meno frequentemente sulla pelle di pazienti con AD ed è stato inversamente correlato alla gravità della malattia [93]. Tuttavia, l'abbondanza relativa delle specie microbiche rilevata durante gli episodi di eruzione non rimane costante durante il decorso della malattia. Difatti, dopo l'eruzione le medesime specie dapprima ridotte, sono state riscontrate con livelli di abbondanza relativa più elevati [109]. Anche il microbiota fungino sembra avere un ruolo al pari di quello batterico, una riduzione dell'abbondanza relativa di *Malassezia spp.* e un aumento dell'arricchimento di *M. dermatis* e dei funghi non appartenenti al genere *Malassezia*, come *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus spp.* è stata osservata nei pazienti affetti da AD (fig. 12) [110]

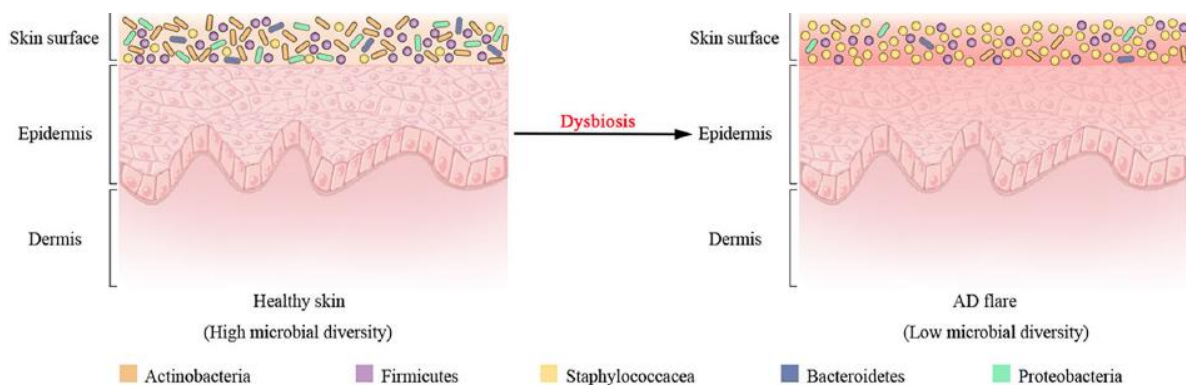


Figura 12 Variazione delle comunità batteriche durante la progressione della dermatite atopica (AD). La disbiosi è caratterizzata da una riduzione della diversità batterica e dal drammatico aumento dell'abbondanza relativa delle Staphylococcaceae [43]

In ragione di ciò, la ricostituzione dello stato di eubiosi, attraverso l'inibizione dello *S. aureus* permette alla pelle di ripopolarsi con il microbiota fisiologico, ripristinando la funzione protettiva e promuovendo il processo di guarigione [111].

La mancanza di un trattamento terapeutico definitivo ha portato alla ricerca di terapie alternative e/o complementari. La terapia microbica può aiutare a ripristinare lo stato eubiotico del microbiota cutaneo sano [112].

1.4.2 Psoriasi inversa

La psoriasi è una malattia infiammatoria cronica della pelle con una forte predisposizione genetica e tratti autoimmuni. La prevalenza mondiale è di circa il 2%, ma varia a seconda delle regioni. Le manifestazioni dermatologiche della psoriasi sono varie; la psoriasi *vulgaris* è anche chiamata psoriasi a placche, ed è il tipo più prevalente (90% dei casi) [113]. La psoriasi inversa (IP) rappresenta una variante clinica della psoriasi conosciuta anche come psoriasi flessurale o intertriginosa, ed è una variante della psoriasi a placche che coinvolge le pieghe del corpo, più spesso quelle ascellari, anogenitali e inframammaria [114]. Secondo diversi studi di popolazione, la prevalenza dell'IP è altamente variabile e va dal 3 al 36%, tale variabilità è spesso correlata alla mancanza di criteri diagnostici univoci [115].

Il sistema di punteggio quantitativo l'impatto sulla qualità della vita include il calcolo del PASI (Psoriasis Area and Severity Index), della BSA (Body Surface Area) e del DLQI (Dermatology Life Quality Index) [116]. Dal punto di vista clinico le lesioni si presentano spesso come placche eritematose ben definite, sottili, senza desquamazione, che possono interessare sia la pelle che la mucosa genitale, e possono essere accompagnate da fessure, ulcere e/o erosioni [117].

L'eziopatogenesi dell'IP coinvolge un'interazione dis-regolata tra cellule immunitarie, cheratinociti e trigger ambientali, in aggiunta alla disbiosi del microbiota [118].

Il ruolo del microbiota e della sua composizione nella patogenesi della psoriasi non è ancora del tutto chiarito, sebbene numerosi studi abbiano dimostrato la presenza di alterazioni nella composizione del microbiota cutaneo degli individui normali e dei pazienti psoriasici con una diminuzione dei *Firmicutes* e un aumento dei *Proteobacteria* nella pelle di quest'ultimi [119]. L'esacerbazione della psoriasi potrebbe essere interconnessa alla colonizzazione epidermica o mucosale di *Streptococcus spp* , *Malassezia spp*, *Staphylococcus aureus*, e *Candida albicans* (fig. 13) [120-124].

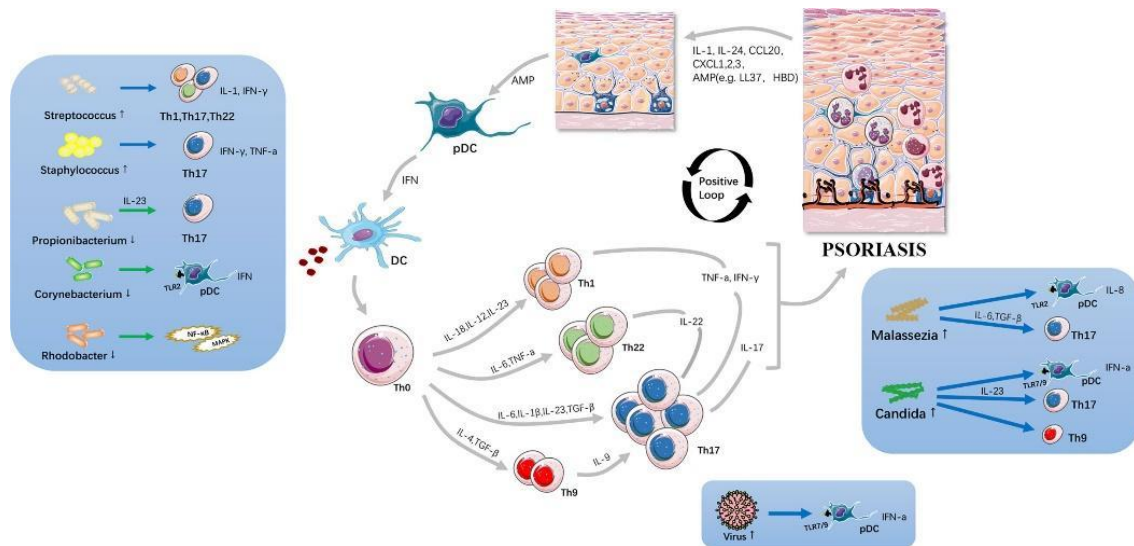


Figura 13 Il microbiota cutaneo alterato causa la distruzione della barriera cutanea e agisce sul sistema immunitario innato, compresi i recettori Toll-like, ecc e, successivamente, guida le cascate infiammatorie associate ai Th17. Vengono secrete grandi quantità di citochine, con conseguente infiltrazione di immunociti, angiogenesi e proliferazione dei cheratinociti, che provoca la progressione della patologia [125]

Si ipotizza che *Candida* spp. possano produrre fattori superantigenici e, come le infezioni da *Staphylococcus aureus*, possano scatenare ed esacerbare la psoriasi [126].

Il trattamento dei sintomi più gravi rappresenta attualmente un limite nella pratica clinica, infatti la piena comprensione della patogenesi rimane una priorità per la ricerca futura. Sebbene gli studi sul microbioma siano attualmente molto diffusi, ad oggi deve ancora essere completamente chiarito se la disbiosi cutanea abbia un significato eziologico primario o sia secondaria alla psoriasi (o entrambi) [125].

1.4.3 Acne

L'acne vulgaris (AV) è un comune disturbo infiammatorio cronico dell'unità pilosebacea che comprende il follicolo pilifero e la ghiandola sebacea [127].

La prevalenza globale di AV nella popolazione mondiale è stimata a circa 9,4% l'insorgere della patologia è associato alla pubertà e alla produzione degli ormoni sessuali, con la crescita si osserva una progressiva riduzione della prevalenza della malattia nella popolazione, sebbene questa possa persistere o addirittura svilupparsi nel tempo fino a colpire il 50% degli adulti di età superiore ai 20 anni [128, 129].

La manifestazione clinica è caratterizzata dallo sviluppo cronico o ricorrente di comedoni, papule eritematose e pustole, più comunemente sul viso, ma anche sul collo, tronco e le estremità superiori prossimali [127].

La classificazione della severità dell'acne si basa su una scala globale che è composta da tre categorie:

- lieve (meno di venti comedoni o meno di quindici lesioni infiammatorie o un numero totale di lesioni inferiore a trenta;
- moderata (tra venti e duecento comedoni, o tra quindici e cinquanta lesioni infiammatorie o un numero totale di lesioni compreso tra trenta e centoventicinque);
- severa (più di cinque cisti o un numero di comedoni maggiore a cento, o un numero di lesioni infiammatorie maggiore di cinquanta o un numero totale di lesioni maggiore di centoventicinque)[129].

L'AV è causata principalmente da un aumento della produzione di sebo, ipercheratinizzazione del follicolo, colonizzazione batterica e infiammazione. L'aumento della produzione degli androgeni causa l'ipertrofia della ghiandola sebacea con conseguente aumento della produzione di sebo e della proliferazione dei cheratinociti che determinano in ultima istanza la formazione di un tappo follicolare (ipercheratosi follicolare) e formazione di un comedone [130]. Il terzo fattore scatenante la patologia è la disbiosi del microbiota residente soprattutto relativamente al *Cutibacterium acnes*. Il *C. acnes* è un membro del microbiota residente nei follicoli sebacei. La perdita di diversità microbica soprattutto a livello del filotipo è un fattore scatenante l'attivazione del sistema immunitario innato e l'infiammazione cutanea. La predominanza del filotipo di *C.acnes* IA1 determina l'up-regolazione dei marcatori immunitari innati (interleuchina [IL]-6, IL-8, IL-10, IL-17), così come la produzione di vescicole extracellulari causando una iperproliferazione dei cheratinociti e modulando l'espressione di diversi marcatori epidermici (l'antigene Ki67, la cheratina 10 (KRT10), la desmocollina1 (DSC1) e la filaggrina [131]. Inoltre, il mantenimento dello stato di malattia è garantito dall'inibizione di *S. epidermidis* da parte di *C. acnes*, e dalla sua capacità di acidificare il pH del follicolo pilosebaceo, mediante idrolisi dei trigliceridi del sebo e secrezione acido propionico (fig. 14) [132].

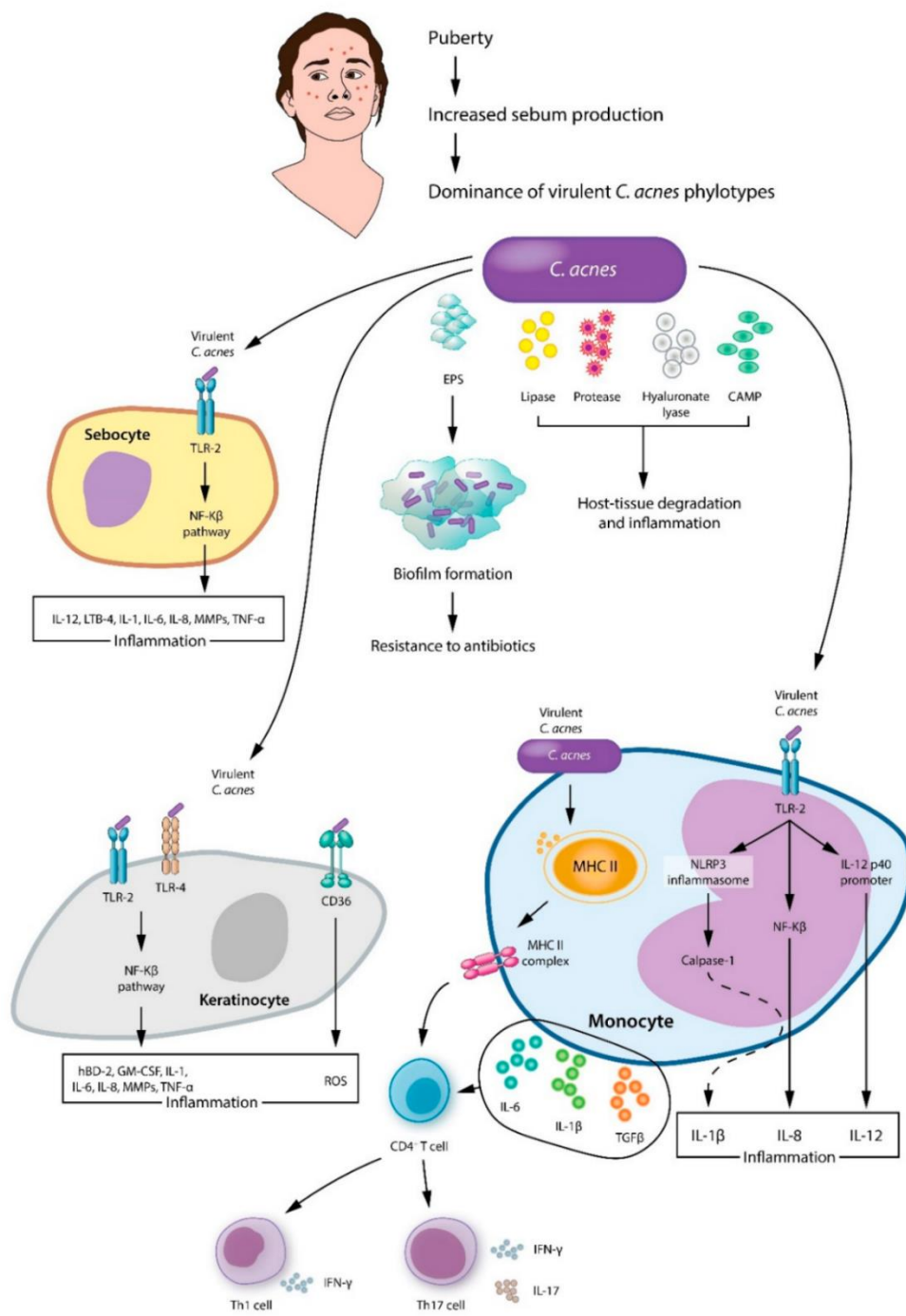


Figura 14 Principali processi patologici indotti da *C. acnes* [133]

Anche la *Malassezia spp.* sembra essere coinvolta nella patogenesi dell'acne mediante produzione di lipasi che attirando i neutrofili promuovono il rilascio di citochine pro-infiammatorie dai monociti e dai cheratinociti. Tuttavia, il suo ruolo esatto nella fisiopatologia dell'acne rimane da investigare [133]. Gli antibiotici e l'isotretinoina sono stati a lungo i principali trattamenti per l'acne. Tuttavia, l'isotretinoina sistemica provoca cambiamenti qualitativi e quantitativi del microbioma intestinale e cutaneo, con marcati aumenti nell'abbondanza relativa di *S. aureus* [134] viceversa gli antibiotici topici portano alla selezione di ceppi resistenti di *C. acnes*, *Streptococcus* e *Staphylococcus spp.* [135,

136]. La diffusione della resistenza antimicrobica e la disbiosi suggeriscono quindi un uso limitato degli antibiotici sistemici e topici, così come i regimi di monoterapia a lungo termine nel trattamento dell'acne. Quindi l'obiettivo terapeutico nel trattamento dell'acne dovrebbe essere quello di prevenire o trattare la disbiosi e non l'eliminazione diretta di *C. acnes*, a tal fine risulta di primaria importanza lo studio di nuovi approcci terapeutici che favoriscano l'eubiosi cutanea aumentando ad esempio i processi fermentativi legati a *S. epidermidis* a discapito di *C. acnes* o integrando il microbiota della pelle con ceppi probiotici [131].

1.4.4 *Ulcere da pressione*

Le ulcere da pressione (PUs), comunemente indicate anche come piaghe da decubito o decubito, sono lesioni cutanee gravi [137]. La prevalenza globale delle ulcere da pressione nei pazienti ospedalizzati è stata stimata dal 5% al 15%, ma può essere significativamente più alta nelle unità di terapia intensiva e in alcune strutture di assistenza a lungo termine [138]. Sono stati sviluppati sistemi di classificazione per determinarne la gravità includendo descrittori che vanno dall'eritema della pelle intatta (sbiancamento e non sbiancamento), alla perdita di tessuto a tutto spessore. In ragione di ciò, sono stati individuati sei stadi della patologia:

1. eritema su pelle intatta;
2. perdita di pelle a spessore parziale con derma esposto;
3. perdita di pelle a tutto spessore;
4. perdita di pelle a tutto spessore e di tessuto;
5. lesione da pressione non visibile a tutto spessore perdita di pelle e tessuto;
6. lesione fino ai tessuti profondi.

La manifestazione clinica è caratterizzata da un danno localizzato alla pelle e ai tessuti molli sottostanti generalmente sopra una prominenza ossea, associata ad un dispositivo medico o come risultato di una pressione intensa e/o prolungata o in combinazione con taglio [137]. La pressione sostenuta su una prominenza ossea innesca un loop di eventi che, partendo da una ischemia del tessuto porta alla necrosi. In sintesi la forza pressoria, accompagnata da un eccesso di umidità o dalla combinazione di taglio e attrito innesca la macerazione con conseguente rottura della integrità dello strato corneo ma influenzando anche sui letti capillari sottostanti, Tutti ciò causa ipossia locale del tessuto e necrosi conseguente [139]. Le condizioni fisico-chimiche dei tessuti cutanei sottoposti a

pressione causano un'alterazione della via di segnalazione molecolare e la concomitante modulazione del microbiota. Tale alterazione del pool microbico rappresenta allo stesso tempo un fattore scatenante e aggravante per le ulcere da pressione, poiché anche la temperatura e l'umidità dei siti colpiti favoriscono la proliferazione microbica non commensale e l'infezione delle ferite da parte di agenti opportunistici e principalmente patogeni [140, 141].

Il mantenimento dell'eubiosi cutanea gioca un ruolo importante nel mantenimento dello stato di salute ed è cruciale nella prevenzione delle malattie, in particolare delle PU.

Inoltre, lo sviluppo di biofilm all'interno dei PU compromette la guarigione delle ferite [142, 143]. Il microbiota delle PU è solitamente polimicrobico e complesso, e la prevalenza e la varietà delle specie microbiche dipendono dalla durata, dalla localizzazione e dallo stadio della PU (fig. 15) [144].

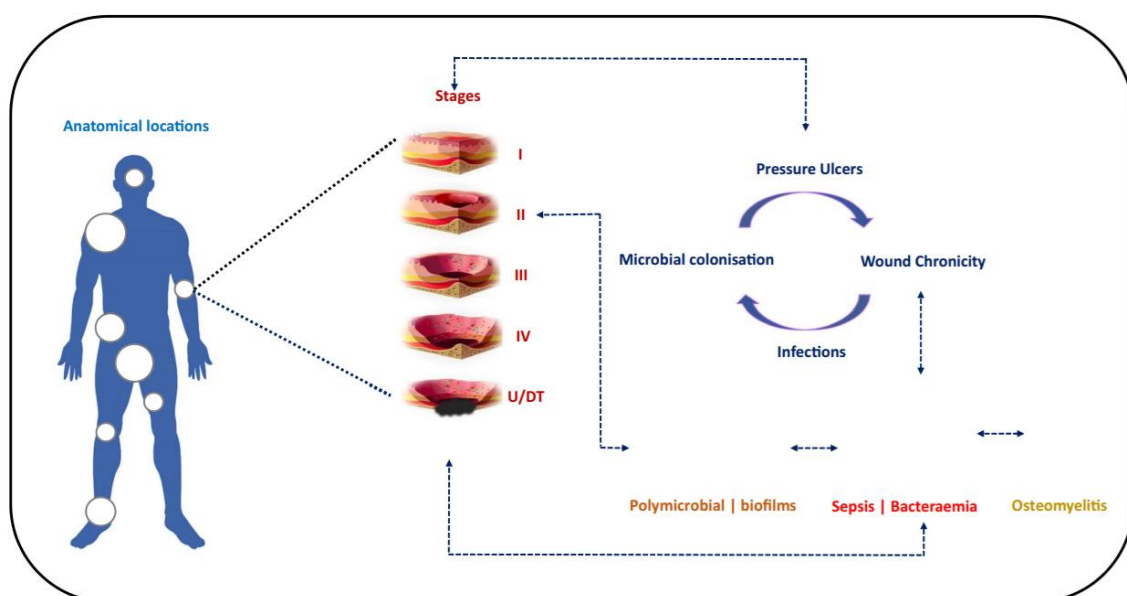


Figura 15 Ciclo dell'ulcera da pressione infetta; le ulcere da pressione sono più inclini alla colonizzazione dalla fase 2. La colonizzazione delle PU è solitamente di origine polimicrobica e da biofilm. Tra le principali complicazioni associate agli stadi più avanzati e alla cronicità delle PU sono la batteriemia, la sepsi e l'osteomielite. La colonizzazione microbica delle PU contribuisce alla cronicizzazione di questo tipo di ferite e all'insorgenza di complicazioni infettive e di ritardi nella guarigione, che a loro volta contribuiscono al mantenimento della colonizzazione dei PUs diventando un ciclo [141]

Batteri quali *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterococcus faecalis* sono i microrganismi più frequentemente isolati nelle PU. Oltre a questi, anche *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium spp*, *Bacteroides spp* e alcuni miceti, tra cui *Candida spp*. sono stati riscontrati [145]. Anche se sia stata fatta poca menzione del loro legame con le infezioni legate alle PU, è stato dimostrato che i funghi giocano un ruolo importante come patogeni opportunistici delle ferite [146]. Nuove misure preventive

basate anche sulla modulazione del microbiota possono offrire una nuova strategia diagnostica per identificare i pazienti a maggior rischio di ulcere da pressione [147]. Poiché molti aspetti dello sviluppo delle ulcere da pressione sono ancora ancora poco chiari, lo scopo principale della ricerca in questo campo è quello di trovare farmaci o trattamenti che, insieme all'adozione di adeguate procedure di assistenza, possano aiutare a prevenire lo sviluppo delle lesioni e/o accelerare la loro guarigione. La vasta gamma di prodotti cosmetici/farmaceutici ad oggi in commercio è costituita principalmente da preparazioni topiche a base di agenti emollienti utili a preservare o ripristinare l'omeostasi cutanea [148].

1.5 Opzioni di trattamento

Le linee guida per la gestione delle patologie infiammatorie della pelle prevedono trattamenti di prima e seconda linea. La terapia di prima linea si basa principalmente sull'utilizzo di emollienti che promuovono l'idratazione dello strato corneo e riducono la perdita di acqua transepidermica [149]. Viceversa, quella di seconda linea, utilizza principalmente steroidi somministrati per via topica il cui scopo è quello di ridurre l'infiammazione a cui segue, nei casi più gravi, una terapia sistemica con corticosteroidi o antibiotici [150-152]. La fototerapia realizzata attraverso l'irradiazione con i raggi UV è spesso utilizzata come trattamento adiuvante per alleviare i sintomi e ridurre la colonizzazione batterica. Recentemente, sono stati introdotti farmaci biologici (rappresentati in massima parte da anticorpi) che rappresentano l'ultima linea di terapia laddove il paziente abbia fallito le terapie tradizionali [153-155]. Tutti i farmaci precedentemente elencati sono legati alla possibilità di indurre gravi effetti collaterali. Per esempio, l'uso di corticosteroidi topici può migliorare le condizioni dei pazienti, ma un uso prolungato può causare alcuni effetti collaterali come ipertensione, atrofia e tachifilassi, con conseguente tossicità cumulativa [149]. Stesse considerazioni devono essere fatte per gli antibiotici topici che determinano una selezione di ceppi resistenti con ulteriori complicanze nella guarigione dalla condizione patologica [135, 136].

L'uso esclusivo di emollienti se non accompagnato da un'adeguata terapia farmacologica aumenta il rischio di infezione batterica e virale [151]. Viceversa, anche se l'uso di agenti farmacologici supportato dall'uso di creme emollienti è ampiamente impiegato per migliorare la sintomatologia, non assicura la completa guarigione della patologia [156].

1.5.1 *Le potenzialità dell'acido ialuronico*

L'acido ialuronico (HA): è un eteropolisaccaride lineare (glucosaminoglicano, mucopolisaccaride) ad alto peso molecolare formato da residui regolarmente ripetuti di N-acetil-D-glucosamina e acido D-glucuronico. In una molecola di acido ialuronico, l'acido D-glucuronico è associato all'amminozucchero tramite un legame β -(1 \rightarrow 3)-glicosidico, e l'amminozucchero è collegato all'acido D-glucuronico tramite un legame β -(1 \rightarrow 4)-glicoside [157]. Essendo l'HA un componente naturale della pelle, è stato uno degli umettanti preferiti utilizzati in quasi tutti i prodotti nutricosmetici con proprietà idratanti. Aiuta ad attirare e trattenere i fluidi e a riparare la barriera cutanea [158]. Gli effetti biologici dell'acido ialuronico dipendono fortemente dal peso molecolare. L'acido

ialuronico a medio peso molecolare (>500 kDa) conferisce tono e turgore alla pelle, ha un'attività anti-angiogenica e può funzionare anche come soppressore immunologico naturale [159]. L'esistenza di segmenti polari e apolari nella struttura del polimero permette all'acido ialuronico di interagire chimicamente con vari agenti chimici. I derivati dell'HA possono essere supporti ideali per l'incapsulamento e la consegna di farmaci idrofobici. Attraverso modifiche chimiche, gli HA possono formare assemblaggi supermolecolari che possono essere utilizzati per specifiche applicazioni farmaceutiche. Gli HA modificati sembrano avere un grande potenziale come nuovi trasportatori di farmaci sotto forma di coniugati [160].

1.5.2 Trattamenti basati sul microbiota

Considerato il ruolo che la disbiosi del microbiota cutaneo occupa nella patogenesi della patologie della pelle, recuperare lo stato di eubiosi rappresenta un'importante opzione di trattamento [67]. Infatti gli stati patologici della pelle sono caratterizzati da una specifica composizione alterata del microbiota, spesso associata all'aumento dei microrganismi "patogeni" [43].

Recenti studi hanno dimostrato che la terapia microbica può aiutare a ripristinare lo stato di eubiosi ristabilendo quelle specie responsabili del mantenimento del ruolo di barriera. La terapia microbica è realizzata attraverso l'uso di batteri (vivi o inattivati), parti di essi, sostanze derivate e trapianto del microbiota cutaneo. Tutti insieme, questi trattamenti, possono essere considerati il nuovo panorama terapeutico per le patologie cutanee poiché ristabilendo la condizione di omeostasi, si promuove anche il corretto funzionamento della barriera cutanea [111, 156].

L'attuale evidenza scientifica mostra il ruolo dei probiotici nel migliorare il decorso clinico delle patologie cutanee attraverso l'omeostasi del microbiota cutaneo, ed il ripristino delle funzioni della barriera lipidica e la modulazione il sistema immunitario [161].

Inoltre, alcuni derivati batterici come i frammenti della parete cellulare o i metaboliti dimostrano una maggiore stabilità rispetto alle cellule vitali quando mantenuti a temperatura ambiente, rendendoli più adatti alla preparazione di formulazioni topiche. Inoltre, anche i surnatanti privi di microbi sono ancora in grado di esercitare un'attività antimicrobica e immunomodulatoria nello stesso modo delle forme vitali a causa dei metaboliti batterici rilasciati in soluzione durante la crescita [162]. Infine, gli studi sugli

effetti del trapianto di pelle trapianto (SBT), un trattamento intrigante per il ripristino di un microbioma cutaneo sano, hanno dato risultati promettenti in modelli umani e animali [163]. Questi approcci hanno il vantaggio di avere bassi costi, pochi effetti collaterali e una maggiore compliance del paziente senza avere la necessità di un'assunzione periodica o un'applicazione quotidiana con un effetto più duraturo.

In questo scenario, un cambiamento concettuale e sostanziale verso le comunità microbiche della pelle e il loro ruolo nella patogenesi è già in atto, in particolar modo i membri del microbiota cutaneo possono essere definiti commensali o opportunistici piuttosto che necessariamente patogeni [67].

2. Roadmap del percorso sperimentale

Questo progetto di dottorato è il risultato dalla collaborazione scientifico-tecnica tra l'Università degli Studi del Molise ed Aileens pharma, una startup innovativa proprietaria di un ceppo brevettato di *Cutibacterium acnes* (DSM28251) non patogeno e di una formula brevettata costituita da un suo frammento di parete batterica (c40) coniugato chimicamente con una matrice mucopolisaccaridica (HAc40).

Aileens pharma pur avendo finanziato l'intera borsa di dottorato incluso il costo dei materiali non ha avuto nessun'altro ruolo nell'elaborazione dei dati di questo elaborato e la loro interpretazione.

Lo scopo della ricerca è stato quello di elucidare il potenziale di alcuni ceppi di *C. acnes*, valutando inoltre la applicabilità di alcuni derivati quali agenti terapeutici utili per il trattamento di patologie infiammatorie della pelle associate a disbiosi.

Il progetto è stato sviluppato a partire da esperienze *in vitro*, successivamente corroborate da ulteriori prove *ex vivo* in fine traslate *in vivo*. A nostro avviso tale approccio è necessario per assicurare la piena transizione del dato sperimentale alla sua applicazione industriale.

In primis sono stati messi a punto una serie di esperimenti *in vitro* sul ceppo brevettato di *Cutibacterium acnes* DSM 28251. In particolare, sono stati analizzati tre derivati: *heat killed bacteria*, surnatante di coltura e il frammento di parete c40. Una volta ottenuti tutti questi derivati, ne è stata testata la potenziale attività sui principali patogeni coinvolti nelle patologie infiammatorie della pelle.

Ogni componente analizzata è stata confrontata con gli stessi derivati ottenuti da altri ceppi della stessa specie (stessa composizione del peptidoglicano) o specie molto vicine da un punto di vista evolutivo (vicinanza filogenetica) per stabilire se il ceppo *C. acnes* fosse caratterizzato da proprietà peculiari.

Tra i derivati studiati, abbiamo deciso di utilizzare per tutti gli esperimenti successivi il frammento c40 da solo e coniugato ad un acido ialuronico a medio peso molecolare (HAc40). Sono stati improntate delle prove *in vitro* ed *ex vivo* volte a verificare l'azione di contrasto nei confronti del patogeno *S. aureus*.

In prima istanza si è indagata l'interferenza nell'adesione *in vitro* di due ceppi *Staphylococcus aureus* (DSM 20491 e ATCC 29213) alla linea cellulare HaCaT (Human Keratinocyte Cells) da parte dei due prodotti da testare: c40 e HAc40.

Successivamente è stata misurata la capacità proliferativa dei cheratinociti infettati con entrambi i ceppi *S. aureus* in presenza di c40 e HAc40 in un esperimento di migrazione *in vitro*.

Inoltre, la compromissione della cute in seguito al danno indotto dall'infezione con *S. aureus* e la capacità c40 e HAc40 di preservarne l'integrità, sono stati valutati mediante la messa a punto di un modello *ex vivo* su cute suina (*Sus scrofa domesticus*). Grazie alla estrema somiglianza, sia dal punto di vista istologico che fisiologico alla cute umana, questo modello è stato validato nei test di tollerabilità ai cosmetici e/o dispositivi medici [164]. Le biopsie di cute suina infettate con due ceppi di *S. aureus* ATCC 29213 e DSM 20491 e trattate con c40 e HAc40 sono state colorate per la valutazione istologica.

Inoltre poiché le tight junction sono hanno un ruolo predominante nella patogenesi di *S. aureus*, le medesime biopsie sono state analizzate in immunofluorescenza per evidenziare l'espressione delle principali proteine delle TJ claudina1 e ZO1.

Infine per avviare il processo di traslazione, sono in corso diversi studi *in vivo*. Di questi uno appena concluso in collaborazione con l'Istituto Europeo di Riabilitazione GEA medica di Isernia ha dimostrato l'azione preventiva dei derivati sullo sviluppo di ulcere da pressione (data not shown).

3. Materiali e metodi

3.1 Studio comparativo sull'attività di derivati batterici di *Cutibacterium acnes* su patogeni cutanei

E' stata comparata l'attività inibente di tre derivati (surnatante, heat-killed bacteria e frammento di parete) del ceppo *C. acnes* DSM 28251 sulla crescita microbica dei patogeni cutanei rispetto ai medesimi derivati ottenuti da altri ceppi simili di *Cutibacterium*. Il *C. acnes* DSM 28251 è coperto dal brevetto Italiano... "CEPPO BATTERICO E SUOI USI MEDICI" n. 102020000003233 recentemente esteso da richiesta PTC "BACTERIAL STRAIN AND MEDICAL USES THEREOF" Appl. Nat.Appl.No. 1020200003233.

Sono stati selezionati tre *Cutibacterium acnes* e un *Cutibacterium granulosum* che differiscono dal ceppo DSM 28251 o per appartenenza al filotipo o per distanza filogenetica *C. acnes* ATCC 11828, *C. acnes* DSM 1897, *C. acnes* DSM 16379 e *C. granulosum* DSM 20458. I patogeni sui quali sono stati testati i tre derivati sono stati selezionati sulla base del loro coinvolgimento nelle patologie cutanee: *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC BAA-1680, *S. aureus* DSM 20491, *S. epidermidis* ATCC 12228 e *Candida albicans* ATCC 90028.

3.1.1 Preparazione degli "heat-killed bacteria" mediante tindalizzazione (sterilizzazione frazionaria)

I ceppi di *Cutibacterium* sono stati coltivati in brodo BHI (Brain Heart Infusion) addizionato del 20% ad una temperatura di 37°C ed in condizioni di microaerofila fino al raggiungimento della fase esponenziale massima di crescita verificata mediante lettura spettrofotometrica (O.D. 600 nm). Successivamente il terreno è stato rimosso per centrifugazione e processato per il test dei surnatanti. Il pellet batterico è stato dapprima sottoposto ad una serie di lavaggi in soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) per rimuovere l'eventuale presenza di surnatante residuo e successivamente diluito fino al raggiungimento di una concentrazione pari a 0,5McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL).

L'inoculo titolato è stato sottoposto a tindalizzazione. Il processo ha previsto il riscaldamento ad 80° C per 30 minuti per uccidere le forme vegetative, seguito da un periodo di incubazione a 37°C per 24 ore al fine di promuovere la germinazione delle cellule vegetative residue non uccise dal trattamento termico, successivamente il materiale così trattato è stato nuovamente riportato a una temperatura di 80° C per 30 minuti. L'intero ciclo termico è stato ripetuto 3 volte. Per verificare la corretta

realizzazione del processo, un'aliquota del tindalizzato è stata seminata su Columbia Agar Sangue ed incubata a 37°C in aerobiosi per 24 ore per verificare l'assenza di crescita microbica. Le cellule batteriche tindalizzate hanno una capacità di replicazione ed enzimatica inattivata pur mantenendo inalterata la loro struttura cellulare e la parete, quindi fisiologicamente intatte e, per questo motivo, immunologicamente attive.

3.1.2 Preparazione dei surnatanti

I surnatanti batterici precedentemente ottenuti dai ceppi di *Cutibacterium* sono stati sottoposti a filtrazione (filtri da 0,22µm) per eliminare eventuali residui cellulari, la sterilità è stata confermata dall'assenza di crescita batterica dopo semina su Columbia Agar Sangue ed incubazione a 37°C in aerobiosi per 24 ore di una aliquota di ciascun surnatante in esame. Al fine di escludere un eventuale interferenza dovuta alla produzione di sostanze acide tipiche di alcuni ceppi di *Cutibacterium* spp., il pH di ogni surnatante è stato accuratamente misurato e, ove necessario, neutralizzato con una soluzione di idrossido di sodio 1M.

3.1.3 Estrazione dei frammenti di parete batterica

Il ceppo *C. acnes* DSM 28251 e gli altri ceppi di *Cutibacterium* sono stati cresciuti in batch in scala fino ad ottenere una consistente massa cellulare. I pellet batterici sono poi stati sottoposti alla medesima procedura di estrazione del frammento di parete in accordo al brevetto "BACTERIAL STRAIN AND MEDICAL USES THEREOF" Appl. Nat. Appl. No. 1020200003233.

Tutti i frammenti estratti e recuperati dai diversi pellet sono stati denominati utilizzando il codice di catalogazione dei rispettivi ceppi di origine. Di qui in poi, pertanto, si farà riferimento ai frammenti di parete estratti indicandoli con i codici suddetti. I frammenti estratti sono stati sottoposti a liofilizzazione ed infine sterilizzati con una procedura *multi-step ad-hoc* (ultracongelamento (-80°), riscaldamento 80°C, sterilizzazione UV

3.1.4 Influenza sulla crescita microbica secondo metodo spettrofotometrico

E' stata valutata mediante metodo spettrofotometrico in piastre di polistirene a 96 pozzetti la capacità dei tre derivati (heat-killed bacteria, surnatanti e frammenti di parete) ottenuti dai ceppi di *Cutibacterium* in esame nell'interferire o inibire la crescita microbica di 4 ceppi di *Staphylococcus* ed di un ceppo di *Candida albicans* (vedi tab ceppi saggiati). I tre derivati sono stati testati usando il medesimo terreno di crescita (BHI brodo addizionato del 20%) secondo la seguente procedura.

- I surnatanti sono stati diluiti 1:10 in brodo e ed inoculati con i microrganismi da saggiare.
- Gli *heat-killed bacteria* sono stati diluiti ad una concentrazione di 10^5 CFU/ml ed inoculati con i microrganismi da saggiare.
- I frammenti di parete sono stati emulsionati in brodo alla concentrazione finale di 10mg/ml ed inoculati con i microrganismi da saggiare.
- Tutti gli agenti microbici sono testati secondo le condizioni previste dal CLSI (*Clinical Standard Laboratory Institute*), così come le condizioni di incubazione.
- Le piastre sono state allestite in triplicato e in ciascuna piastra sono stati predisposti i controlli per la crescita del ceppo in assenza di derivati e i “bianchi” per la taratura spettrofotometrica.
- È stata registrata al tempo zero (T0) la carica microbica di ciascun ceppo nei pozzetti di inoculo mediante lettura spettrofotometrica alla lunghezza d’onda di 600 nm, con sistema VICTOR Multilabel Plate Reader (PerkinElmer). La misurazione è stata effettuata per successivi altri sei tempi di misurazione nell’arco di 24 ore di crescita (2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 e 24 ore). I valori di assorbanza ottenuti (*Optical Density*, 600 nm) sono stati normalizzati ed quindi analizzati per valutare la crescita dei diversi germi in presenza e assenza (CTR) dei frammenti di parete.
- I risultati sono stati espressi come media \pm DS e le curve sono state ottenute mediante analisi di regressione non lineare usando una funzione Sigmoidale idonea per la crescita batterica. Tutte i grafici sono stati realizzati con il software GraphPad Prism Version 7.0a.

3.2 Attività del frammento c40 e del coniugato HAc40 *in vitro*

3.2.1 Acido ialuronico coniugato al frammento c40 (HAc40)

HAc40 è un composto costituito dal frammento di parete batterica c40 coniugato con acido ialuronico (HA) a medio peso molecolare $0,50 \times 10^6$ DA. Il processo che consente la coniugazione HA al frammento c40 è protetto da brevetto. Inoltre, anche il *Cutibacterium acnes* DSM 28251, da cui viene isolato il frammento c40, di proprietà di Aileens è protetto da brevetto (paragrafo 3.1) e da Safe Deposit e conservato presso la Collezione di microrganismi e colture cellulari (DSMZ).

3.2.2 Preparazione delle sospensioni test

l'HA, l'HAc40 e il c40 sono stati risospesi in acqua distillata alle concentrazioni di 0,5mg/mL (HA e HAc40) e 25µg/mL (c40) e sottoposti ad un processo di tindalizzazione (tre cicli da 80°C per un'ora).

3.2.3 Allestimento coltura cellulare

È stata selezionata per tutti gli esperimenti *in vitro* la linea cellulare di cheratinociti immortalizzati HaCaT donati dal laboratorio di anatomia umana del Prof. Antonio De Luca (Università della Campania, Luigi Vanvitelli, Napoli). Questa linea cellulare è stata usata perché presenta caratteristiche simili alle colture primarie di cheratinociti ed è stata usata in precedenza negli studi sulle interazioni tra *S. aureus* e cheratinociti [81, 165-167]. I cheratinociti HaCaT sono stati coltivati in Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM (Invitrogen), addizionato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), l'1% di pen/strep e l'1% di L-glutamine (2 mM), in un'atmosfera umidificata al 95% contenente 5% di CO₂. Le colture sono state allestite in fiasche T75 fino a quando le cellule hanno raggiunto circa il 95% di confluenza. Il tappeto cellulare è stato poi staccato con tripsina-EDTA, risospeso in terreno di coltura seminato in una piastra da 6 well (superficie 9.6 cm²) e incubate per 48h alle stesse condizioni di crescita [168].

Infine i pozzetti sono stati lavati per due volte con tampone fosfato salino PBS e risospesi con 900µL DMEM senza antibiotici per due ore fino al momento dell'infezione con i batteri e con le sospensioni test (HA, HAc40 E c40).

3.2.4 Preparazione delle sospensioni batteriche

Sono stati selezionati due ceppi test : *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213™ acquistato dalla American Type Culture Collection (Rockville, MD) e *Staphylococcus aureus* DSM® 20491™ acquistato dalla German Collection of Microorganisms and cell cultures GMBH. Il primo è stato scelto perché ampiamente utilizzato nella letteratura scientifica come ceppo test per lo studio di svariate condizioni patologiche della pelle [88]. Il secondo, invece, è stato selezionato perché secerne l'α tossina responsabile del danno ai cheratinociti [169]. Entrambi i ceppi sono stati coltivati in TSB (tryptic soy broth) overnight a 37°C. Dopo 24 ore di crescita le colture sono state centrifugate a 5000 RPM per cinque minuti. Il pellet cellulare ottenuto è stato lavato 3 volte con una soluzione salina di tampone fosfato e risospeso nello stesso mezzo. Le sospensioni cellulari sono state

normalizzate mediante misurazione della densità ottica (O.D 600nm) e le unità vitali formanti colonie (CFU/mL) sono state confermate dalla conta su piastra

3.2.5 Preparazione del surnatante di *S. aureus* DSM 20491

S. aureus DSM20491 ceppo produttore di α emolisina è stato coltivato in TSB fino alla fase post esponenziale di crescita. In questa fase questo microrganismo secerne nel mezzo di coltura la tossina [170]. La coltura è stata centrifugata (5000 rpm per 7min) e il surnatante cell-free, filtrato con filtro 45 μ m e aggiunto al mezzo di coltura delle cellule ad una percentuale pari al 10% [171].

3.2.6 Preincubazione delle sospensioni batteriche con le sospensioni test

Al fine di valutare l'effetto post-biotico, le colture dei due ceppi di *S. aureus* sono state standardizzate alla concentrazione di 10^8 CFU /mL e incubate per due ore a 37 ° C con le sospensioni test (HA, HAc40 e40) in rapporto 1:1 v/v.

3.3 Saggio di vitalità cellulare (MTT)

Per valutare la tossicità dell'HA, dell'Hac40 e del c40 è stato condotto un saggio MTT sulla linea cellulare HaCaT.

I cheratinociti HaCaT (6×10^3 /pozzetto) sono stati coltivati per 24 h in piastre da 96 pozzetti a 37°C al 5% CO₂.

Successivamente le cellule sono state trattate con sospensioni a concentrazioni crescenti HA e HAc40 (da 0,05 a 1mg/mL) e c40 (da 3.125 μ g/mL a 25 μ g/mL) e incubate per 24h a 37°C.

Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 10 μ l di MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (5 mg/ml). Le piastre sono state nuovamente incubate per 2 ore alle stesse condizioni di crescita fino al viraggio del medium da giallo a viola, dovuto alla riduzione, da parte degli enzimi mitocondriali, del 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio a formazano.

Da ogni pozzetto è stato prelevato il surnatante e sono stati aggiunti 100 μ l di DMSO per pozzetto per solubilizzare i cristalli e le piastre sono state incubate al buio e in agitazione per 10 minuti.

Infine l'assorbanza di ogni pozzetto è stata letta mediante l'utilizzo dello spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 540-595 nm [172].

Per ogni condizione sono stati allestiti tre replicati e la vitalità relativa delle cellule è stata espressa in percentuale rispetto alle cellule di controllo non trattate.

3.4 Trattamento delle cellule e saggio di adesione/invasione

Il mezzo colturale è stato rimosso da ogni pozzetto della 6 well e le cellule sono state lavate tre volte con PBS al fine di eliminare gli antibiotici presenti nel terreno di crescita. Nell'esperimento di preincubazione i pozzetti sono stati inoculati con 100µl delle sospensioni batteriche preincubate (come descritto nel paragrafo 3.2.4).

Nell'esperimento test di co-incubazione le cellule immediatamente dopo l'infezione con i due ceppi di *S. aureus* sono state trattate con HA, HAc40 e c40 alle concentrazioni di 0,5mg/mL e 25µg/mL precedentemente preparate (come descritto nel paragrafo 3.2.2).

Tutti i gruppi di trattamento sono stati infettati con colture di *S. aureus* standardizzate alla concentrazione di 5×10^6 CFU/mL e preparati come descritto nel paragrafo (3.2.4.)

Per determinare la carica batterica iniziale a contatto con le cellule le diluizioni seriali delle sospensioni sono state piastrate in MH agar.

Come controlli sono stati utilizzati i due ceppi di *S. aureus* inoculati nei pozzetti alla concentrazione di 5×10^6 CFU/ mL. Anche l'HA, l'HAc40 e il c40 sono stati inoculati nei pozzetti come controllo alle stesse concentrazioni utilizzate per gli esperimenti di preincubazione e co-incubazione.

Le piastre sono state poi incubate per 1 ora a 37°C, 5% CO₂. Ogni condizione è stata ripetuta tre volte.

Seguendo la metodica di [173] dopo un'ora di incubazione il surnatante è stato rimosso da ogni pozzetto, il tappeto cellulare è stato lavato 3 volte con PBS per rimuovere i batteri che non hanno aderito.

Ad ogni pozzetto è stato addizionato 1 mL di PBS e le cellule sono state staccate con l'ausilio di un raschietto cellulare. Infine, è stato prelevato 1 mL da ciascun pozzetto, contenente i batteri che hanno aderito o invaso i cheratinociti, e sono state effettuate delle diluizioni seriali. 100 µL di ciascuna diluizione sono stati seminati su piastre di MH agar. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C è stato effettuato il conteggio delle colonie su piastra per determinare il grado di adesione e invasione batterica

3.4.1 Giemsa stain

Questa metodica è stata utilizzata per la visualizzazione al microscopio dei batteri adesi ai cheratinociti consentendo una visione qualitativa dell'adesione. La colorazione è stata effettuata per tutti i gruppi dell'esperimento di adesione. Dopo aver rimosso i batteri non adesi mediante lavaggi in PBS i pozzetti sono stati fissati 10 minuti con 3mL di metanolo. Al termine di questa fase di fissazione le cellule sono state colorate con 3mL di Giemsa stain modified (GS500 Sigma Aldrich™). Le piastre sono state incubate a temperatura ambiente per 20 minuti e i pozzetti risciacquati abbondantemente con acqua distillata. Infine le piastre sono state asciugate all'aria ed esaminate al microscopio invertito ad ingrandimento 40x [174].

3.4.2 Analisi statistica

Tutti i saggi sono stati effettuati in triplicato e sono stati ripetuti in maniera indipendente per tre volte. I dati espressi come media \pm deviazione standard (SD) sono stati analizzati con il software GraphPad Prism 8.0. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi a $p < 0.05$. I dati dei saggi di adesione sulla linea cellulare HaCaT sono stati analizzati mediante analisi della varianza a una via seguito dal test post-hoc Bonferroni.

3.5 Trattamento delle cellule e saggio di migrazione

La coltura cellulare, ad una confluenza del 75%, è stata staccata con una soluzione 1X di tripsina-EDTA allo 0,25% (per 5 minuti) e le cellule in sospensione sono state osservate a microscopio invertito. La sospensione cellulare è stata preparata in modo da ottenere una concentrazione pari a $3-7 \times 10^5$ cellule/mL.

Le cellule sono state piastrate in μ -Dish (diametro 35 mm) contenenti l'inserito di coltura nel quale vengono inoculate le cellule (70 μ L/pozzetto). Dopo aver rimosso l'inserito di coltura si crea uno spazio libero da cellule (canale) di circa 500 μ m (fig. 19)

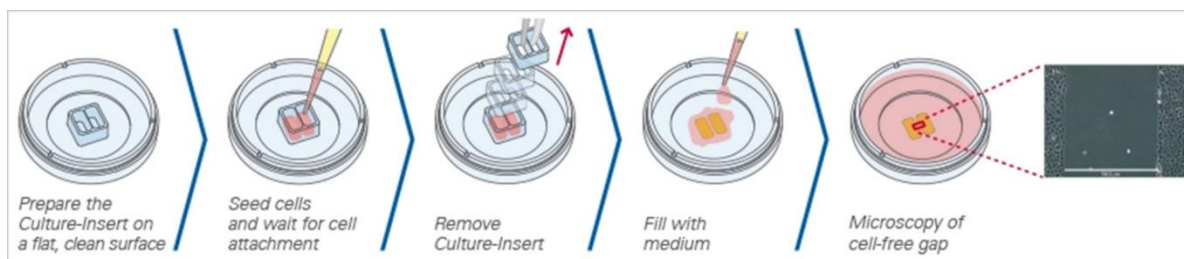


Figura 19 allestimento della coltura cellulare nelle piastre μ -Dish

Le cellule sono state coltivate in queste piastre per 24 ore a seguito delle quali l'inserito di coltura è stato rimosso utilizzando pinzette sterili e il μ -Dish è stato riempito con DMEM preparato senza antibiotici (2 mL).

Le cellule sono state infettate con 5×10^6 CFU/mL della coltura di *S. aureus* ATCC29213 (preparato come descritto nel paragrafo 3.2.4.) o sono state trattate con il surnatante di *S. aureus* DSM20491 (preparato come descritto nel paragrafo 3.2.5.) addizionato al mezzo di coltura al 10%. Contestualmente all'infezione i pozzetti sono stati co-incubati con le sospensioni test di HA, HAc40 (0,5mg/mL) e c40 (25 μ g/ml). Cellule non infettate o trattate solamente con le sospensioni test sono state utilizzate come controllo. Le piastre sono state incubate per 24h.

L'estensione della migrazione delle cellule è stata fotografata t0, t4, t8, 16 e t24. con la fotocamera (MODEL ISH 300 OPTTECH) e misurata utilizzando il software di analisi delle immagini, Image J (V 1.45s, fornito dal National Institute of Health, USA) [175, 176]

3.5.1 *Analisi statistica*

Tutti i saggi sono stati effettuati in triplicato e sono stati ripetuti in maniera indipendente per tre volte. I dati espressi come media \pm deviazione standard (SD) sono stati analizzati con il software GraphPad Prism 8.0. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi a $p < 0.05$. I dati dei saggi di adesione sulla linea cellulare HaCaT sono stati analizzati mediante analisi della varianza a una via seguito dal test post-hoc Bonferroni.

3.6 **Attività del frammento c40 e del coniugato HAc40 *ex vivo***

3.6.1 *Scelta del modello*

Negli anni, la ricerca dermatologica è stata eseguita su topi ratti e conigli [177, 178]. Tuttavia, da quando l'UE ha annunciato il divieto di sperimentazione animale nel 2013, gli esperimenti *in vivo* per i cosmetici sono stati vietati, richiedendo lo sviluppo di alternative valide. Equivalenti di pelle, come l'epidermide umana ricostruita (RHE), la pelle umana ricostruita a tutto spessore (FT) e modelli di organi cutanei (SOC) sono stati studiati come alternative agli esperimenti sugli animali per testare l'efficacia e la sicurezza di nuovi ingredienti cosmetici. Tali prodotti hanno dimostrato di essere strumenti

efficienti, informativi e predittivi per lo *screening*, la biodisponibilità e i test di efficacia dei principi attivi e possono servire come modello preclinico di sicurezza, che è molto informativo nella progettazione di test clinici. La somiglianza della cute suina con quella umana sia dal punto di vista istologico che fisiologico è stata ben stabilita [179]. La cute suina può essere ottenuta in modo relativamente economico come sottoprodotto dei macelli senza sacrificare altri animali e non contraddice il divieto di sperimentazione animale, come i test di opacità corneale dei bovini o i test oculari dei pulcini [164]. È anche possibile controllare l'età degli animali così come il sito corporeo da cui è stata prelevata la biopsia cutanea, che è fondamentale per garantire la riproducibilità [180]. A questo proposito, il modello di pelle suina *ex vivo* può essere un sostituto ideale per i modelli di pelle umana [181].

3.6.2 Preparazione dell'espianto

Le orecchie di *Sus scrofa domesticus* reperite da un macello locale, sono state prelevate da carcasse animali immediatamente dopo il sacrificio e trasportate, a temperatura controllata (4°C) in laboratorio entro 1ora. Il tessuto è stato sgrassato, accuratamente pulito con etanolo 70% e PBS e sezionato fino ad ottenere delle biopsie di circa 6mm. Il tessuto che presentava anomalie come edema, abrasione o striature pesanti è stato scartato [181]. Ogni biopsia è stata poi posizionata in piastre da coltura di 35mm ponendo il derma a contatto con i nutrienti del terreno e l'epidermide nell'interfaccia aria-liquido in termostato a 37°C e al 10% di CO₂. Il DMEM di mantenimento è stato addizionato al 5% di FBS, 2% P/S, gentamicina (50mg/ml), amfotericina 1x e desametasone 35µg/mL. Dopo 24h il tessuto è stato pulito, lavato 2volte con PBS e risospeso in terreno fresco per altre 24h in modo da rimuovere i contaminanti [88]. Trascorse 48h i tessuti sono stati preparati per l'infezione. Il tessuto è stato lavato per 3volte con PBS e poi risospeso in 1mL di DMEM addizionato al 5% DI FBS senza antibiotici (per due ore).

3.6.3 Preparazione dei batteri

Sono stati selezionati per l'esperimento due ceppi di *S. aureus*: ATCC® 29213™ e DSMZ® 20491™ (produttore di alfa emolisina). Entrambi i ceppi sono stati coltivati in Tryptic soy broth a 37°C o/n. La concentrazione batterica di partenza è stata determinata mediante misurazione dell'OD 600nm.

Per la preparazione delle cellule batteriche attive, sia la coltura di *S. aureus* ATCC 29213 che quella di *S. aureus* 20491 sono state preparate come descritto nel paragrafo 3.3.4. Il pellet è stato lavato con PBS (2volte) e diluito fino ad ottenere una concentrazione

batterica pari a 10^8 CFU/mL [88]. La preparazione del surnatante è descritta nel paragrafo 3.2.5.

3.6.4 *Preincubazione del tessuto*

le biopsie sono state preincubate con le sospensioni test (HA, Hac40 e c40) alle concentrazioni utilizzate per gli esperimenti *in vitro* descritti nel paragrafo 3.2.2. Le piastre sono state incubate per due ore a 37°C al 10% di CO₂. Dopo due ore i tessuti sono stati infettati con le sospensioni precedentemente preparate di *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* DSM20491 inoculate sull'epidermide alle concentrazioni di 10^6 CFU/mL e con il surnatante di *S. aureus* DSM20491 addizionato al 10%.

3.6.5 *Coincubazione del tessuto*

Nel saggio di coincubazione l'infezione e il trattamento con le sospensioni test sono stati eseguiti contestualmente.

Come controlli per entrambi i saggi (preincubazione e coincubazione) sono stati utilizzati, tessuti non trattati, tessuti infettati con i due ceppi di *S. aureus*, trattati con il surnatante e tessuti trattati con le sospensioni test (HA, Hac40 e c40).

I tessuti sono stati incubati per 24h o 48h al termine delle quali sono stati lavati per tre volte con PBS e fissati in formalina tamponata al 10% fino al momento dell'inclusione.

3.6.6 *Analisi istologica*

Il tessuto è stato disidratato mediante l'uso di soluzioni a concentrazioni crescenti di etanolo (50%, 75% e 90%) e xilene, successivamente incluso in blocchi di paraffina e tagliato ad uno spessore di 5 µm. Una volta ottenuta la fettina è stata montata su un vetrino SuperFrost Plus (Thermo Scientific™) caricato positivamente e colorata con ematossilina ed eosina (H&E) e digitalizzati utilizzando un sistema di scansione leica TM 5000p.

3.6.7 *Immunofluorescenza*

I tessuti sono stati dapprima sottoposti ad un processo di sparaffinatura mediante due lavaggi da 5 minuti con xylene. Sono stati poi successivamente reidratati con concentrazioni crescenti di etanolo (prima 5 minuti con etanolo 100% e poi 5 minuti con etanolo 80%). La fase di sparaffinatura si conclude con due lavaggi da 5 minuti ognuno in acqua corrente. Lo smascheramento antigenico è stato effettuato mediante 4 lavaggi ognuno da due minuti con una soluzione di Na-citrato pH 6.0. I vetrini sono stati lavati tre volte con PBS 1X (5 minuti) e le sezioni sono state trattate con la blocking solution

costituita da NGS 10% (in PBS 1X) per 1 ora. A questo punto abbiamo applicato l'anticorpo primario su ogni sezione. Gli anticorpi sono stati diluiti in NGS 1% 1:100. Sono stati selezionati due anticorpi per tre delle proteine delle tight junction: Claudin1 Rabbit Polyclonal (13050-1-1AP PROTEINTECH™) (presente in tutti gli strati dell'epidermide) e ZO1 Monoclonal Antibody (ZO1-1A12 INVITROGEN™) (presente nello strato superficiale dell'epidermide) [182, 183]. I vetrini sono stati quindi incubati o/n a 4°C. dopo 24h i vetrini sono stati lavati tre volte in PBS (5 minuti) e incubati per 1 ora con l'anticorpo secondario diluiti in NGS 1% 1:1000. Sono stati scelti Goxms Alexa Fluor Plus™ 488 e goat anti rabbit Alexa Fluor™ 568. I vetrini sono stati lavati tre volte in PBS (5 minuti) e infine è stato aggiunto il DAPI (Nuncblue fixed cell stain R376069. I vetrini sono stati lavati tre volte in PBS (5 minuti) e incubati per 10 minuti con una soluzione di sudan black (in etanolo 70%) al fine di ridurre l'autofluorescenza. i vetrini sono stati montati mediante DAKO-Glycergel®, Aqueous Mounting Medium (COD.C056330-2) e digitalizzati utilizzando un microscopio a fluorescenza.

3.6.8 Osservazione al microscopio

Tutte le immagini sono state acquisite con la fotocamera DS-Qi2 (Nikon, Giappone) del microscopio confocale C2/C2si (Nikon, Giappone) montato su una base Ti2-U con zoom ottico 20x. Il software NIS-Elements (Nikon, Giappone) è stato utilizzato per l'analisi. Tutte le immagini delle colorazioni sono state acquisite ed elaborate con le stesse impostazioni e aree rappresentative sono state scansionate.

4. Risultati

4.1 Attività dei derivati di *Cutibacterium acnes* su patogeni cutanei

L'andamento della crescita dei germi cutanei in presenza e assenza (controllo) dei diversi surnatanti è mostrato in Figura 18. Ad una prima valutazione di tipo qualitativo misurando l'area sotto la curva" (Area Under the Curve, AUC) appare evidente che per la gran parte dei germi cutanei testati il surnatante derivato dal ceppo brevettato *C. acnes* DSM 28251 sviluppa la più elevata azione inibente sulla crescita microbica (fig. 20).

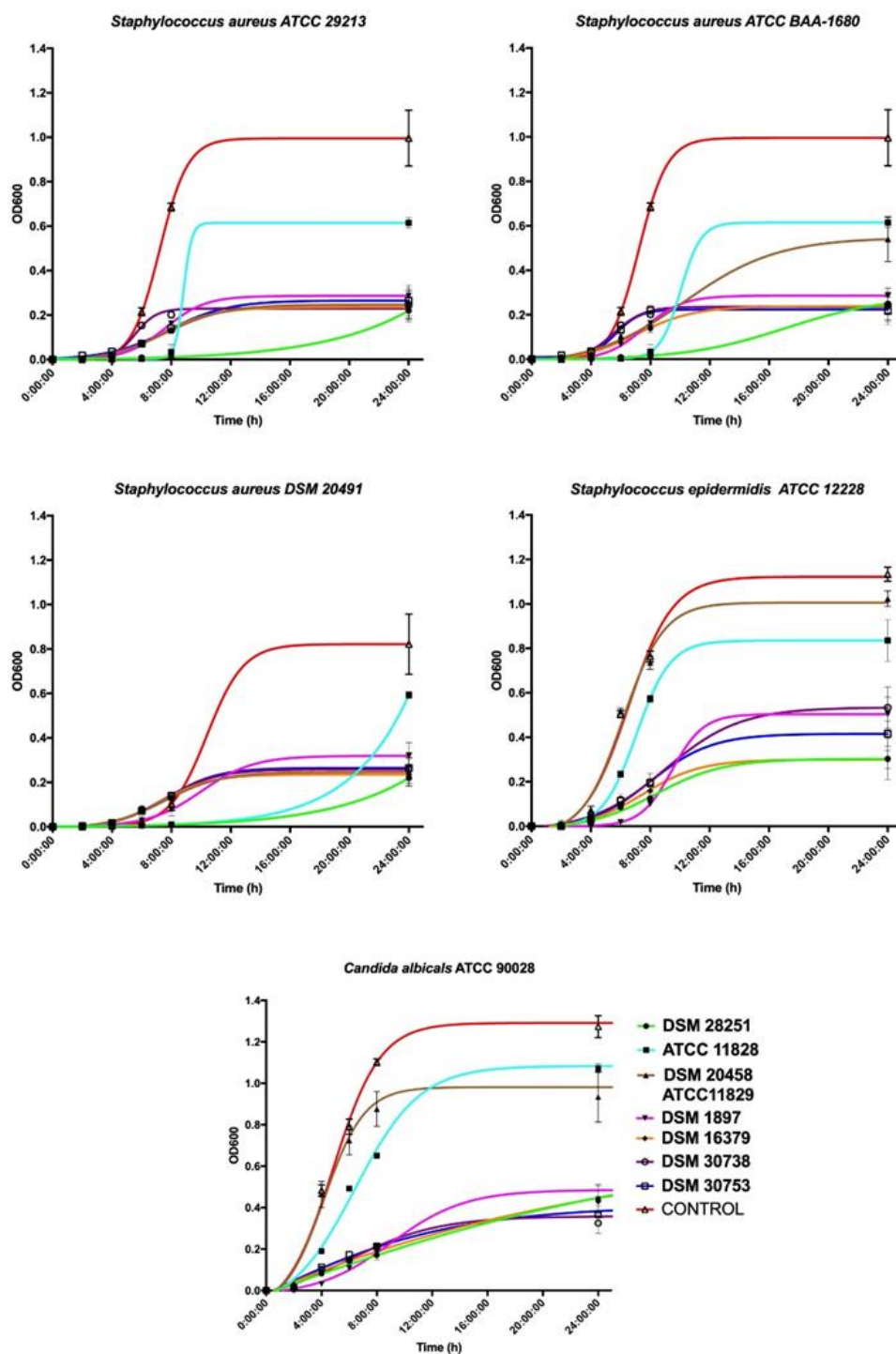


Figura 20 Curve di crescita di germi della pelle inoculati senza (controllo) e con surnatanti batterici di diversi ceppi di *Cutibacterium*.

In tabella 2a è invece riportata per tutti i germi cutanei la stima quantitativa dell'AUC in presenza di ciascun surnatante. I valori di AUC in tabella confermano quanto riportato in Figura 19. Il surnatante *C. acnes* DSM 28251 risulta inibire maggiormente la crescita di tutti i batteri cutanei testati rispetto agli altri surnatanti testati. L'unica eccezione è riscontrabile in merito al lievito *C. albicans* ATCC 90028 che risulta parimenti inibito anche dalla presenza del derivato DSM 30738.

		DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458 ATCC 11829	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753	Controllo
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Total Area	1,86	5,24	3,35	3,916	3,29	4,11	3,63	14,58
	Std. Error	0,07	0,3	0,51	0,06	0,14	0,61	0,58	1,02
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-1680	Total Area	2,16	5,23	5,96	3,89	3,36	4,16	4,09	14,61
	Std. Error	0,34	0,33	0,81	0,06	0,52	0,61	0,52	1,02
<i>S. aureus</i> DSM 20491	Total Area	1,86	4,87	3,34	3,35	3,27	3,51	3,57	7,57
	Std. Error	0,07	0,15	0,52	0,53	0,138	0,387	0,575	1,12
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	Total Area	3,74	12,39	16,00	4,97	4,07	6,36	5,38	17,09
	Std. Error	0,75	0,76	0,37	0,62	0,35	0,82	0,48	0,33
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Total Area	8,37	22,35	23,74	8,37	8,70	7,19	7,79	30,47
	Std. Error	0,67	0,21	1,22	0,56	0,15	0,44	0,35	0,46

Tabella 2a Valori dell'area sotto la curva e relativi errori standard (blu chiaro) delle curve di crescita mostrate nella figura 1 con/senza (controllo) surnatante batterico. La scala di colore per ogni ceppo indica la gamma di valori AUC: dal minore (rosso scuro) al maggiore (verde scuro) valore AUC.

Per una stima più precisa della riduzione di crescita ottenuta in presenza dei vari surnatanti in tabella 2b sono presentati i dati riguardanti la riduzione percentuale di crescita rispetto alle condizioni controllo. Anche le riduzioni percentuali di crescita confermano i risultati fin qui discussi evidenziando ulteriormente che l'attività del surnatante DSM 30738 sul ceppo *C. albicans* ATCC 90028 risulta solo di poco superiore e quindi paragonabile a quella del surnatante *C. acnes* DSM 28251.

	<i>DSM</i> 28251	<i>ATCC</i> 11828	<i>DSM</i> 20458 <i>ATCC</i> 11829	<i>DSM</i> 1897	<i>DSM</i> 16379	<i>DSM</i> 30738	<i>DSM</i> 30753
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	87,22	64,05	77,01	73,14	77,45	71,80	75,09
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-1680	85,24	64,18	59,23	73,40	76,99	71,54	72,00
<i>S. aureus</i> DSM 20491	75,44	35,70	55,92	55,79	56,82	53,63	52,88
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	78,12	27,50	6,38	70,93	76,16	62,80	68,52
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	72,52	26,65	22,09	72,54	71,46	76,40	74,43

Tabella 2b Percentuale di diminuzione della crescita rispetto alla condizione di controllo (senza inoculo di surnatante). La scala di colore per ogni ceppo indica la gamma di diminuzione: da maggiore (rosso scuro) a minore (verde scuro) diminuzione della crescita (%).

Analogamente a quanto mostrato sopra vengono mostrati in figura 20 i risultati dell'andamento della crescita dei germi cutanei questa volta in presenza e assenza (controllo) dell'intero soma batterico previamente inattivato al calore (*Heat-Killed bacteria- HKb*). Dalla comparazione della rispettiva Area sotto la curva" (*Area Under the Curve, AUC*) appare evidente che per tutti i germi cutanei testati il derivato dal ceppo brevettato *C. acnes* DSM 28251 sviluppa la più elevata azione inibente sulla crescita microbica (fig. 21).

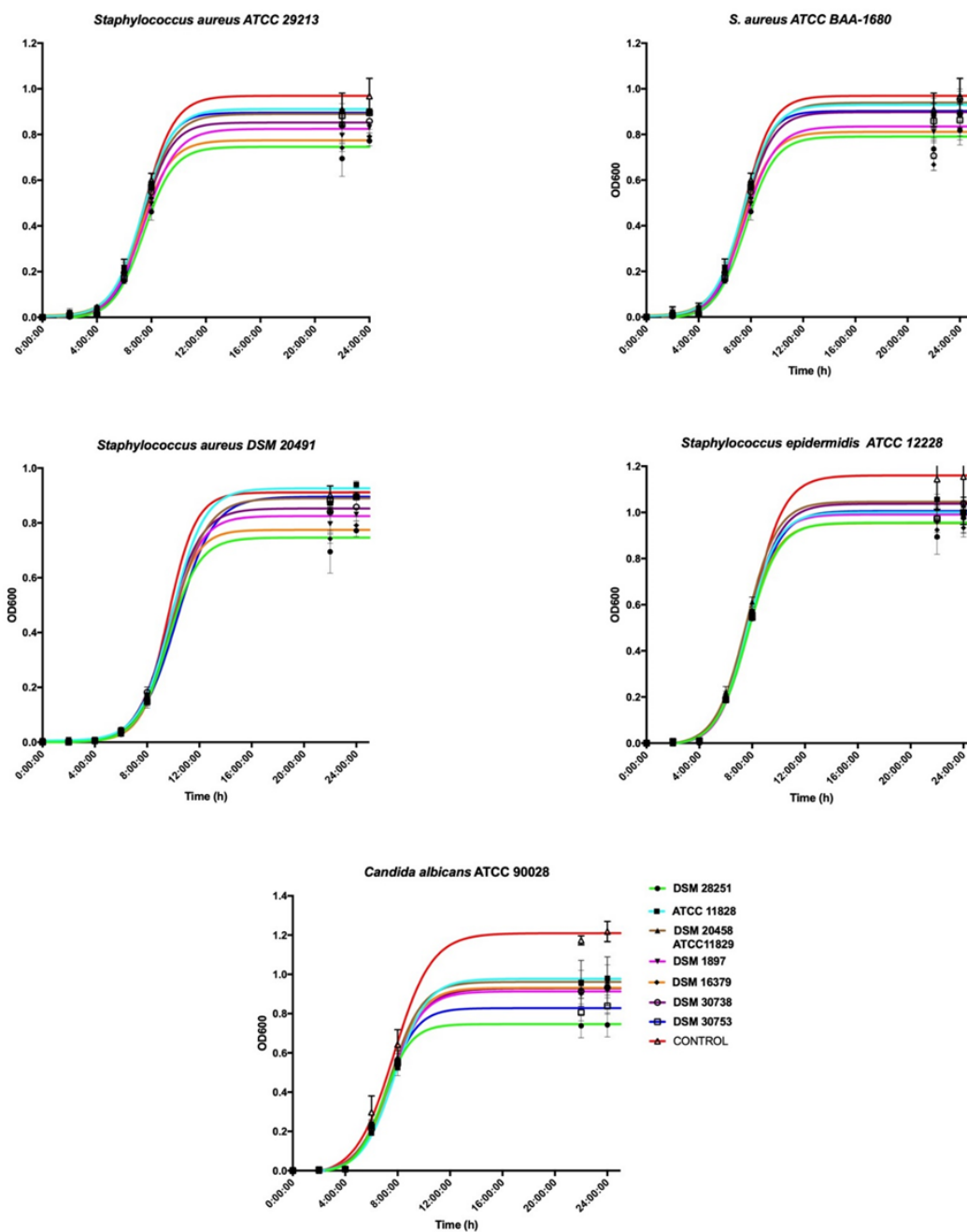


Figura 21 Curve di crescita dei germi della pelle inoculati senza (controllo) e con batteri uccisi dal calore di diversi ceppi di *Cutibacterium*

In tabella 3a è invece riportata per tutti i germi cutanei la stima quantitativa dell'AUC in presenza di ciascun derivato. I valori di AUC in tabella confermano quanto riportato in Figura 20. L' *HKb* ottenuto da *C. acnes* DSM 28251 risulta inibire maggiormente la crescita di tutti i germi cutanei testati rispetto agli altri derivati testati.

		<i>DSM</i> 28251	<i>ATCC</i> 11828	<i>DSM</i> 20458 <i>ATCC</i> 11829	<i>DSM</i> 1897	<i>DSM</i> 16379	<i>DSM</i> 30738	<i>DSM</i> 30753	<i>Controllo</i>
<i>S. aureus</i> <i>ATCC</i> 29213	Total Area	11,92	15,18	14,54	13,26	13,02	14,11	14,72	15,55
	Std. Error	0,61	0,25	0,18	0,28	0,27	0,33	0,13	0,57
<i>S. aureus</i> <i>ATCC</i> BAA-1680	Total Area	12,38	15,15	15,01	13,39	12,71	13,40	14,54	15,55
	Std. Error	0,40	0,52	0,42	0,39	0,31	0,48	0,54	0,58
<i>S. aureus</i> <i>DSM</i> 20491	Total Area	9,16	11,33	10,86	10,15	9,55	10,86	11,04	11,38
	Std. Error	0,56	0,23	0,14	0,25	0,16	0,32	0,19	0,25
<i>S. epidermidis</i> <i>ATCC</i> 1228	Total Area	14,83	16,37	16,67	15,58	15,20	15,88	15,60	17,62
	Std. Error	0,55	0,18	0,34	0,51	0,24	0,11	0,44	0,98
<i>C. albicans</i> <i>ATCC</i> 928	Total Area	12,94	15,24	15,66	14,87	15,12	14,98	13,81	18,81
	Std. Error	0,60	0,47	0,89	0,21	0,36	0,21	0,35	0,58

Tabella 3a I valori dell'area sotto la curva e i relativi errori standard (blu chiaro) delle curve di crescita mostrati nella figura 2 con/senza (controllo) batteri uccisi a caldo. La scala di colore per ogni ceppo indica la gamma di valori AUC: dal minore (rosso scuro) al maggiore (verde scuro) valore AUC.

Per una stima più precisa della riduzione di crescita ottenuta in presenza dei vari derivati in tabella 3b sono presentati i dati riguardanti la riduzione percentuale di crescita rispetto alle condizioni controllo. Anche le riduzioni percentuali di crescita confermano i risultati fin qui discussi evidenziando ulteriormente la maggiore attività del derivato *C. acnes* DSM 28251.

	<i>DSM</i> 28251	<i>ATCC</i> 11828	<i>DSM</i> 20458 <i>ATCC</i> 11829	<i>DSM</i> 1897	<i>DSM</i> 16379	<i>DSM</i> 30738	<i>DSM</i> 30753
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	23,344	2,379	6,495	14,727	16,270	9,260	5,338
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-1680	20,386	2,572	3,473	13,891	18,264	13,826	6,495
<i>S. aureus</i> DSM 20491	19,135	0,439	4,148	10,415	15,719	4,148	2,560
<i>S. epidermidis</i> ATCC 1228	15,834	7,094	5,392	11,578	13,734	9,875	11,464
<i>C. albicans</i> ATCC 928	31,207	18,979	16,746	20,946	19,617	20,362	26,582

Tabella 3b Percentuale di diminuzione della crescita rispetto alla condizione di controllo (senza inoculi di batteri uccisi a caldo). La scala di colore per ogni ceppo indica la gamma di diminuzione: da maggiore (rosso scuro) a minore (verde scuro) diminuzione della crescita (%).

L'andamento della crescita dei germi cutanei in presenza e assenza (controllo) dei vari frammenti è mostrato in fig. 22. Ad una prima valutazione di tipo qualitativo del parametro "Area sotto la curva" (Area Under the Curve, AUC) appare evidente che per la gran parte dei germi cutanei testati il frammento DSM 28251 sviluppa la più elevata azione inibente sulla crescita microbica

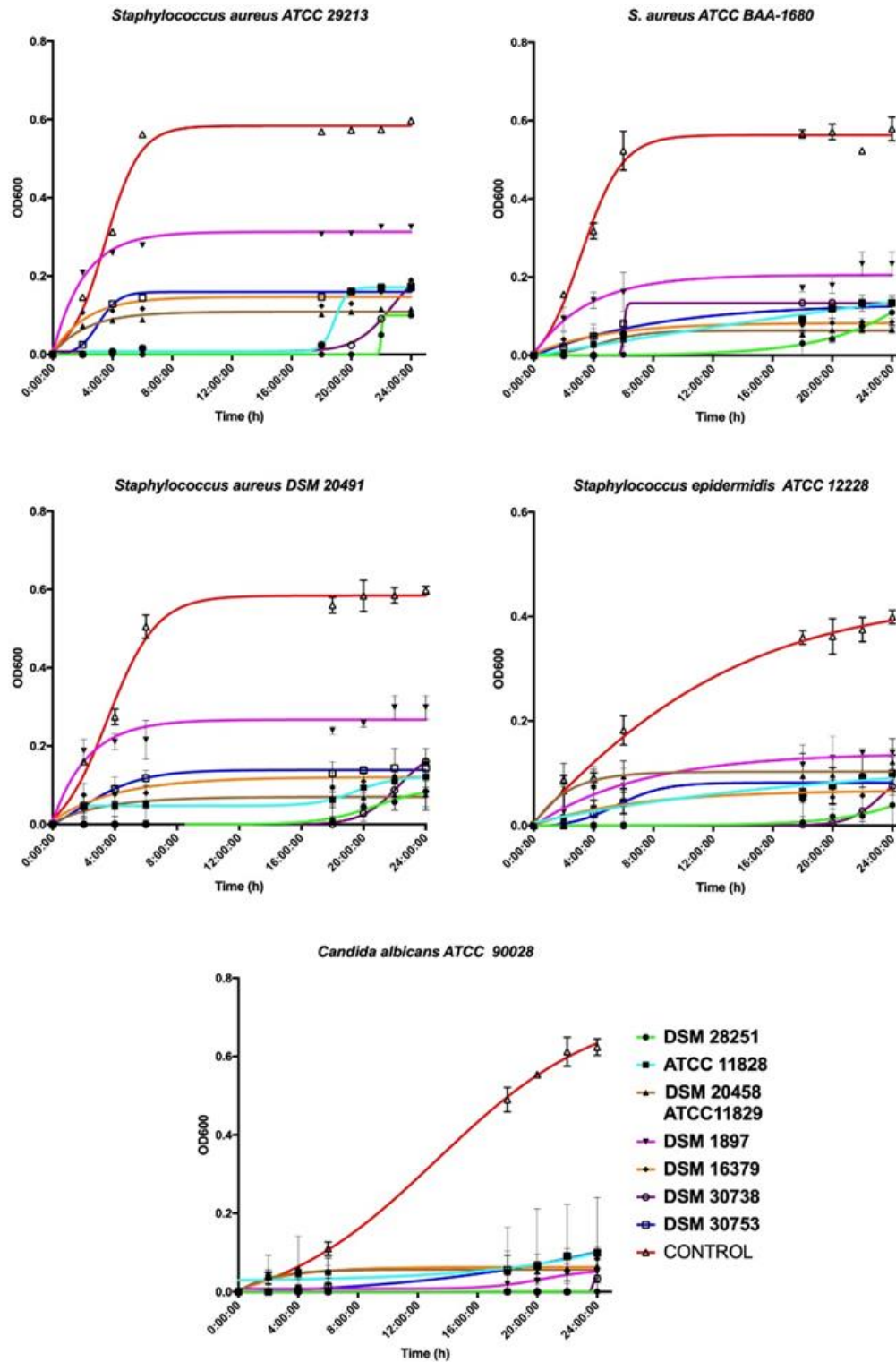


Figura 22 Curve di crescita di germi della pelle inoculati senza (controllo) e con frammenti di parete batterica di diversi ceppi di *Cutibacterium*

In tabella 4a è invece riportata la stima quantitativa dell'AUC in presenza di ciascun frammento per tutti i germi cutanei testati. I valori di AUC in tabella confermano quanto mostrato in Figura 3. Il frammento DSM 28251 risulta inibire maggiormente la crescita di tutti i germi cutanei testati rispetto ai frammenti posti a paragone.

		DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458 ATCC 11829	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753	Controllo
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Total Area	0,20	1,13	2,23	6,63	2,89	0,70	3,19	11,73
	Std. Error	0,11	0,15	0,24	0,22	0,16	0,15	0,28	0,26
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-1680	Total Area	0,57	1,66	1,09	3,87	1,53	1,99	1,99	11,34
	Std. Error	0,31	0,088	0,11	0,32	0,16	0,20	0,082	0,31
<i>S. aureus</i> DSM 20491	Total Area	0,36	1,47	1,35	5,40	2,14	0,39	2,72	11,26
	Std. Error	0,35	0,16	0,16	0,32	0,28	0,15	0,24	0,23
<i>S. epidermidis</i> ATCC 1228	Total Area	0,15	1,27	2,14	2,21	1,07	0,15	1,21	6,03
	Std. Error	0,34	0,18	0,34	0,33	0,17	0,32	0,15	0,20
<i>C. albicans</i> ATCC 928	Total Area	0,03	1,27	1,15	0,48	1,20	0,03	0,90	7,35
	Std. Error	0,10	0,35	0,35	1,20	0,12	0,28	0,33	0,22
<i>R. mucosae</i> DSM 103866	Total Area	0,02	1,498	1,992	2,218	1,384	0,06	1,442	2,267
	Std. Error	0,33	0,126	0,19	0,24	0,13	0,14	0,31	0,26
<i>R. mucosae</i> DSM 30755	Total Area	0,00	1,05	1,31	4,06	1,49	0,05	1,01	2,79
	Std. Error	0,23	0,25	0,22	0,27	0,29	0,23	0,24	0,16

Tabella 4a I valori dell'area sotto la curva [105] e i relativi errori standard (blu chiaro) delle curve di crescita mostrati in figura 3 con/senza (controllo) frammenti di parete batterica. La scala di colore per ogni ceppo indica la gamma di valori AUC: dal minore (rosso scuro) al maggiore (verde scuro) valore AUC

Per una stima più precisa della riduzione di crescita ottenuta in presenza dei vari frammenti in tabella 4b sono presentati i dati riguardanti la riduzione percentuale di crescita rispetto alle condizioni controllo ovvero in assenza di frammento di parete batterica. Anche le riduzioni percentuali di crescita confermano i risultati qui discussi.

	DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458 ATCC 11829	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	98,29	90,38	80,99	43,44	75,32	94,02	72,83
<i>S. aureus</i> BAA-1680	94,95	85,36	90,39	65,89	86,49	82,43	82,41
<i>S. aureus</i> DSM 20491	96,82	86,96	88,03	52,02	80,96	96,54	75,84
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	97,49	78,86	64,54	63,28	82,16	97,46	79,99
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	99,63	82,67	84,34	93,46	83,61	99,54	87,70
<i>R. mucosae</i> DSM 103866	99,21	33,92	12,13	2,16	38,95	97,35	36,39
<i>R. mucosae</i> DSM 30755	100,00	62,39	52,81	-45,54	46,43	98,21	63,71

Tabella 4b Crescita decrescente rispetto alla condizione di controllo (senza inoculi di frammenti). La scala di colore per ogni ceppo indica la gamma di diminuzione: da maggiore (rosso scuro) a minore (verde scuro) diminuzione della crescita (%).

Sebbene il frammento ottenuto dal ceppo *C. acnes* DSM 30738 generi valori di inibizione molto vicini a quelli di DSM 28251, la percentuale di inibizione di quest'ultimo è comunque maggiore con una performance migliore verso il ceppo *S. aureus* ATCC BAA-1680 (82,43% per DSM 30738 vs 94,95% per DSM 28251).

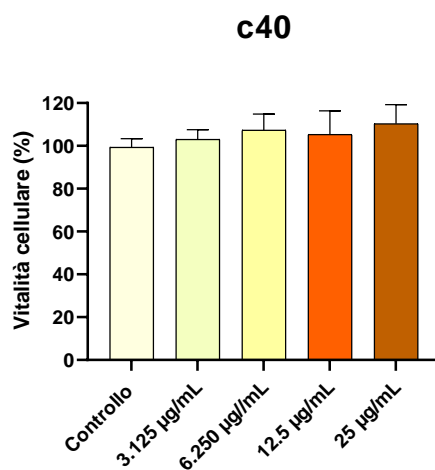
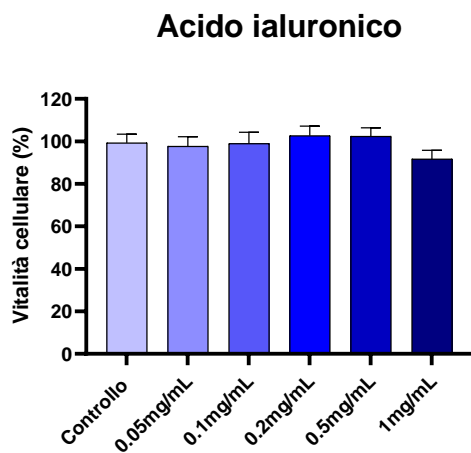
4.2 Saggio di vitalità cellulare (MTT)

Al fine di valutare gli effetti dell'HA, c40 e HAc40II sulla vitalità cellulare misurata è stato messo a punto un saggio MTT (4,5-dimetiltiazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide tetrazolium reduction test) sulla linea cellulare HaCaT. A seguito del trattamento con le sospensioni test, come mostrato in fig. 23, la vitalità cellulare è stata espressa in percentuale rispetto alle cellule di controllo non trattate.

Le cellule sono state trattate con sospensioni di acido ialuronico a concentrazione crescente (da 0,05 a 1mg/mL) sulla base di precedenti lavori [184]. Le cellule trattate con una concentrazione di acido ialuronico e acido ialuronico coniugato al frammento c40 pari a 0,2mg/mL hanno mostrato un tasso di vitalità pari al 100% per tale ragione tutti gli esperimenti sono stati condotti utilizzando tale concentrazione. Allo stesso modo sono state testate sospensioni a concentrazioni crescenti di frammento c40 (3.125µg/mL a 25µg/mL). Le cellule trattate con una concentrazione di frammento c40 pari a 25µg/mL (pari concentrazione presente nella forma coniugata all'acido ialuronico) hanno mostrato

un tasso di vitalità pari al 100% per tale ragione tutti gli esperimenti sono stati condotti utilizzando tale concentrazione (fig. 23).

Saggio MTT sulla linea cellulare HaCaT



Acido ialuronico coniugato al c40

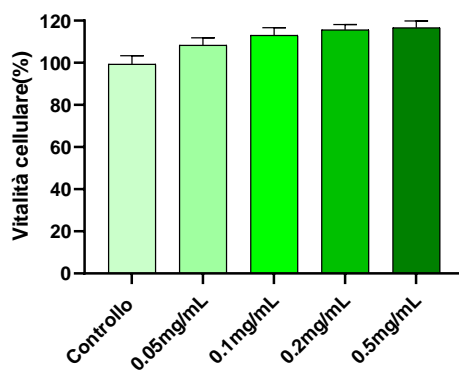


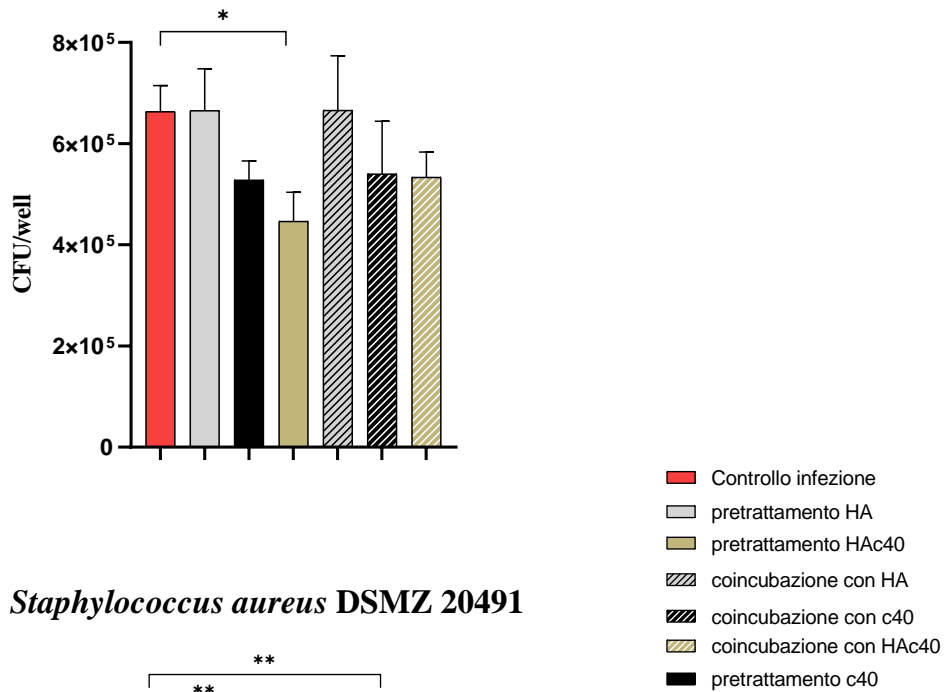
Figura 23 Saggio MTT per la valutazione della citotossicità di Acido ialuronico, frammento c40 da solo e frammento c40 coniugato all'acido ialuronico. I risultati sono espressi come media \pm DS.

4.3 Attività del frammento c40 e del coniugato HAc40 sull'adesione/invasione di *Staphylococcus aureus* alle cellule HaCaT

I due ceppi di *Staphylococcus aureus* testati hanno mostrato un buon tropismo verso la linea cellulare HaCaT. I valori medi di adesione dei ceppi non trattati con le varie sospensioni (controllo positivo) variano a seconda del ceppo: 6.6×10^5 CFU/well per *S. aureus* ATCC 29213 e 4.09×10^4 CFU/well per *S. aureus* DSM20491. Per il ceppo *S. aureus* ATCC 29213 il pre-trattamento dello *Staphylococcus aureus* con l'acido ialuronico coniugato al c40 alla concentrazione di 0,2 mg/mL ha ridotto con valori statisticamente significativi (* $p < 0.05$) rispetto al controllo/non trattato i valori di adesione del patogeno ai cheratinociti. Viceversa l'esperimento di co-incubazione non ha ridotto significativamente il grado di adesione del ceppo testato. Per quanto riguarda *S. aureus* DSM20491 sia la preincubazione del batterio che la co-incubazione con l'acido ialuronico coniugato al c40 ha ridotto con valori statisticamente significativi con valori statisticamente significativi (** $p < 0.01$) i valori di adesione del patogeno alla linea cellulare (fig. 24 e 25).

Saggio di adesione/invasione

Staphylococcus aureus ATCC 29213



Staphylococcus aureus DSMZ 20491

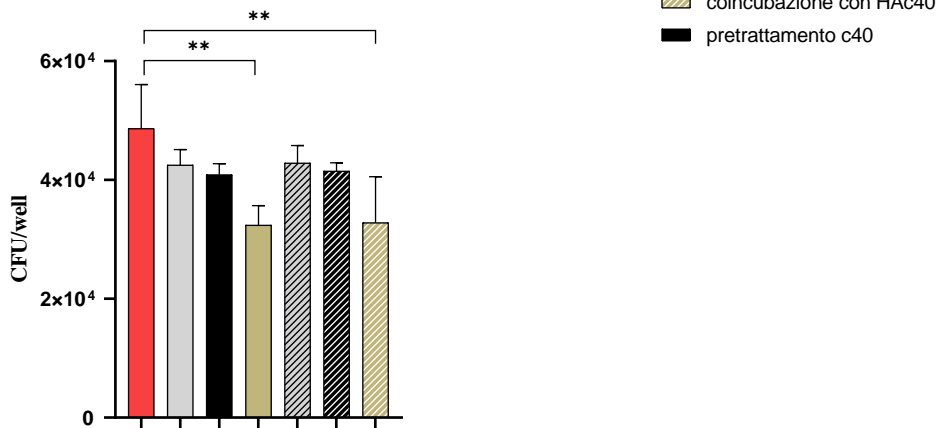


Figura 24 Effetto dell'acido ialuronico, del frammento c40 da solo e coniugato all'acido ialuronico sull'adesione di due ceppi di *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213 E DSM20491) alla linea cellulare HaCaT. I risultati sono espressi in CFU/well. Differenze statisticamente significative sono state determinate dall'analisi della varianza a una via. *indica una differenza significativa $p < 0.05$ rispetto al controllo non trattato, ** indica una differenza significativa $p < 0.01$ rispetto al controllo/non trattato.

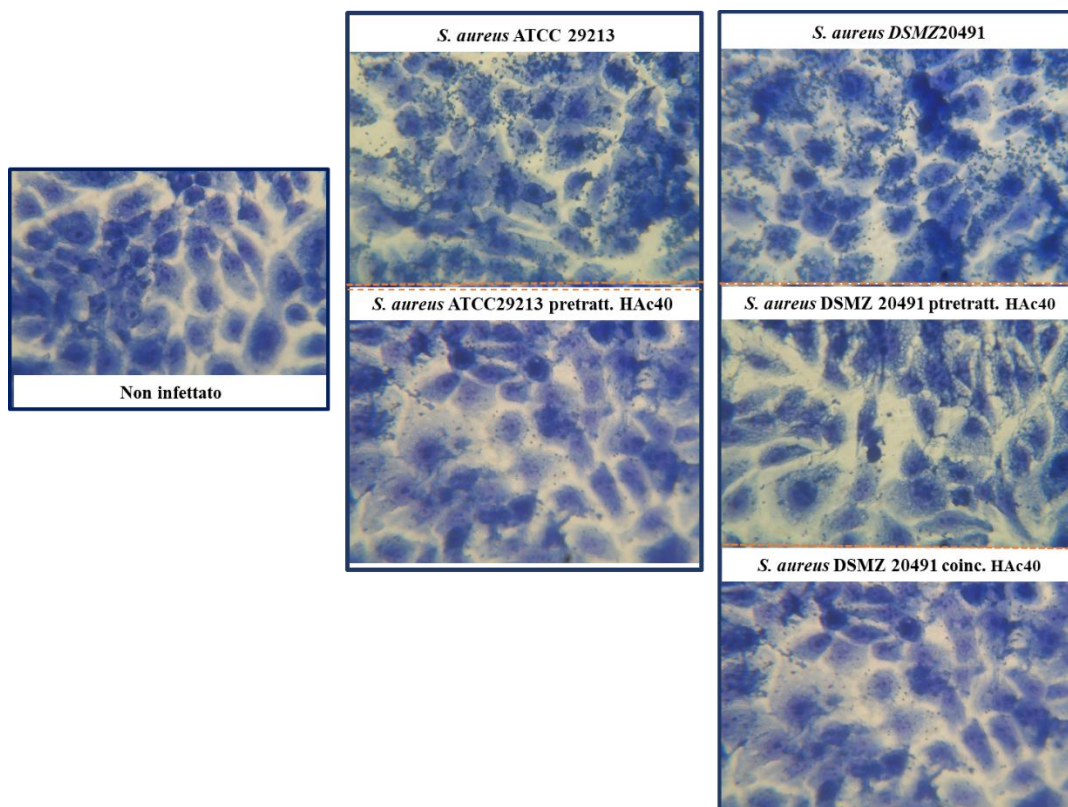


Figura 25 Colorazione Giemsa dei due ceppi di *S. aureus* aderiti alle cellule HaCaT

4.4 Attività del frammento c40 e del coniugato HAc40 sulla migrazione delle cellule HaCaT infettate con *Staphylococcus aureus*

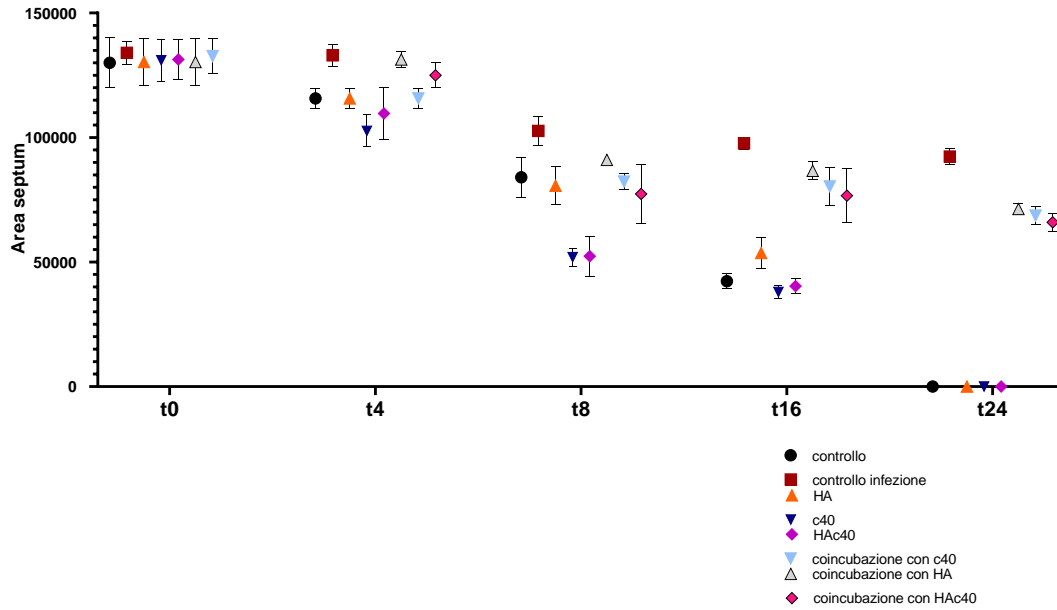
Sulla base di esperimenti preparatori è stato rilevato che si sono rilevati particolarmente attivi nell'impedire la migrazione dei cheratinociti sia il soma di *S. aureus* 29213 che il surnatante di *S. aureus* 20491. Queste condizioni sono state quindi ritenute ottimali e replicate per il saggio delle varie sostanze da testare.

Viceversa un tasso di migrazione più elevato è stato osservato per le cellule trattate con il c40 e con l'HAc40 rispetto al controllo (cellule non trattate); suggerendo che questi ultimi influenzano positivamente la proliferazione cellulare. Infatti, per i cheratinociti infettati con *S. aureus* ATCC 29213 e co-incubati contestualmente con queste due sospensioni è stato osservato un tasso di proliferazione maggiore rispetto alle cellule solamente infettate. Tuttavia nessun gruppo trattato con *S. aureus* o con il surnatante è arrivato a completa chiusura del setto al termine delle 24 ore di osservazione.

Anche nel caso dell'esperimento condotto con il surnatante del ceppo *S. aureus* DSM 20491 contenente l' α tossina, le cellule trattate con il frammento c40 e con l'HAc40 migrano più rapidamente rispetto al controllo. I cheratinociti infettati con il surnatante, ma contestualmente co-incubati con le sospensioni test, sebbene non arrivino al termine dell'esperimento a completa chiusura del setto, migrano più velocemente rispetto alle cellule solamente infettate. (fig. 26 e 27).

Saggio di migrazione

Staphylococcus aureus ATCC 29213



Surnatante di *Staphylococcus aureus* DSMZ 20491

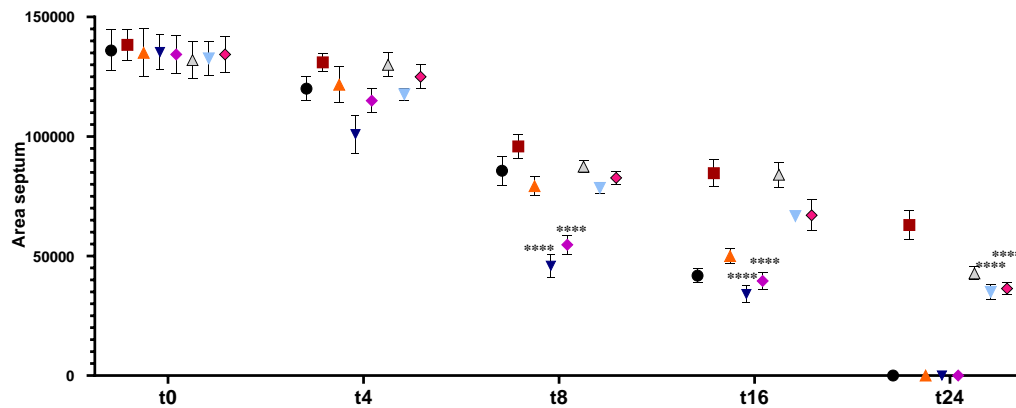


Figura 26 Effetto dell'acido ialuronico, del frammento c40 da solo e coniugato all'acido ialuronico sulla migrazione dei cheratinociti infettati con lo *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e il surnatante del ceppo DSM20491 alla linea cellulare HaCaT. I risultati sono espressi in funzione dell'area del setto. Differenze statisticamente significative sono state determinate dall'analisi della varianza a due vie. **** indica una differenza significativa $p < 0.0001$ rispetto al controllo non trattato.

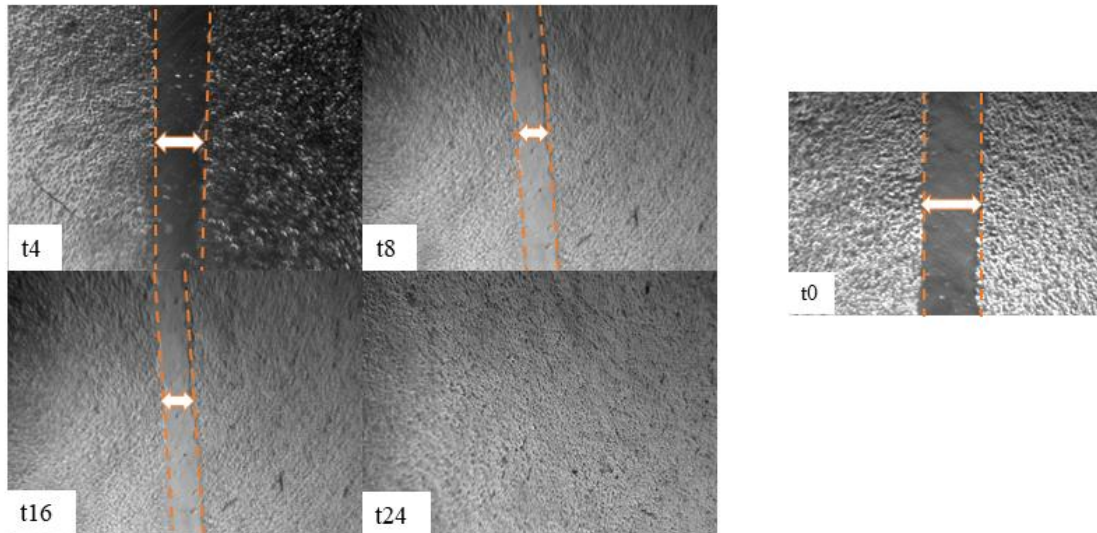


Figura 27 incremento della capacità di migrazione dei cheratinociti HaCaT esposti al frammento c40 da solo e coniugato all'acido ialuronico. Le immagini al microscopio invertito mostrate sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti. Le linee gialle tratteggiate indicano l'area del setto. T0 mean 131,987; t4 mean 41.259; t8 28.736; t16 15.937; t24 0. Ingrandimento 4x.

4.5 Valutazione istologica dei tessuti infettati con *Staphylococcus aureus* e trattati con il frammento c40 e il coniugato HAc40

Osservazioni al microscopio dei tessuti sottoposti a colorazione eosina ematossilina (E&E) evidenziano per i tessuti controllo (non trattati, trattati con il frammento c40, con l'acido ialuronico dal solo e coniugato al frammento c40) una cute normo-conformata priva di alterazione morfologiche e con epidermide sormontata da citocheratina. Viceversa, dopo 24 (fig. 28) e 48 (fig. 29) ore dall'inizio dell'infezione il quadro morfologico della cute infettata con i due ceppi di *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213 e DSM20491) e con il surnatante del ceppo DSM20491 contenente l' α -tossina, mostra una degenerazione dei cheratinociti nonché un evidente distacco dello strato corneo (freccia piena).

Analogamente i tessuti pretrattati con solo acido ialuronico (HA) e poi infettati con i due ceppi di *S. aureus* e con il surnatante evidenziano segni di un evidente distacco anche continuo dello strato corneo suggerendo che l'acido ialuronico da solo non è in grado di proteggere dal danno esercitato dai patogeni e dalla tossina. Risultati pressoché analoghi sono stati ottenuti sia dopo 24 che dopo 48 ore di incubazione.

Al contrario, il quadro morfologico dei tessuti pretrattati con il frammento di parete batterica (c40) e successivamente infettati con i due ceppi e con il surnatante evidenziano, rispetto ai tessuti solamente infettati, una cute normo conformata priva di significativi

segni di degenerazione. Allo stesso modo, i tessuti pretrattati con il frammento di parete batterica coniugato all'acido ialuronico (HAc40) e successivamente infettati con i due ceppi e con il surnatante evidenziano, rispetto ai tessuti solamente infettati, una cute normale priva di alterazioni significative sia dopo 24 che dopo 48 ore di incubazione.

Il quadro morfologico dei tessuti infettati con i due ceppi di *S. aureus* e con il surnatante e co-incubati con il solo acido ialuronico (HA), come per il preincubazione, evidenzia per tutta la lunghezza della sezione evidenti segni di degenerazione dello strato corneo paragonabili a quelli osservati per i tessuti solo infettati sia dopo 24 che dopo 48 ore di incubazione.

Viceversa il quadro morfologico dei tessuti infettati con i due ceppi di *S. aureus* e con il surnatante e co-incubati con il frammento di parete batterica evidenzia, rispetto ai tessuti solamente infettati, una cute normo-conformata priva di significativi segni di degenerazione sia dopo 24 che dopo 48 ore di incubazione.

Infine, anche il quadro morfologico dei tessuti infettati con i due ceppi di *S. aureus* e con il surnatante e co-incubati con il frammento di parete batterica coniugato all'acido ialuronico evidenzia, rispetto ai tessuti solamente infettati, un'epidermide normale priva di segni di degenerazione sia dopo 24 che dopo 48 ore di incubazione.

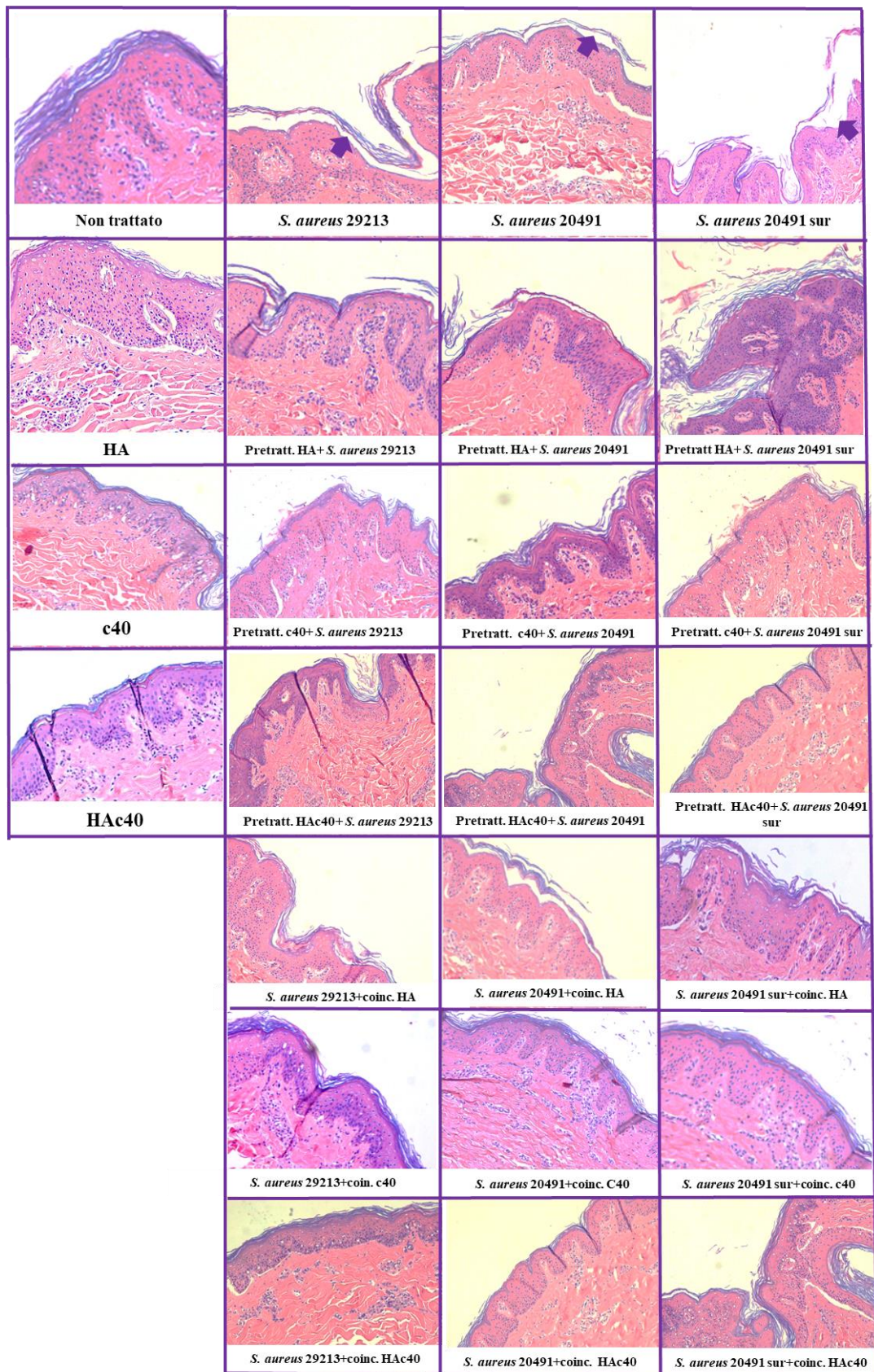


Figura 28 Colorazione Eosina Ematossilina su tessuti a 24 ore dall'infezione con i due ceppi di *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e DSM20491 e con il surnatante del ceppo DSM20491 e sui tessuti trattati (pretrattati e coincubati) con l'acido ialuronico (HA) con il frammento di parete batterica (c40) e con il c40 coniugato all'acido ialuronico (HAc40) ingrandimento 10x.

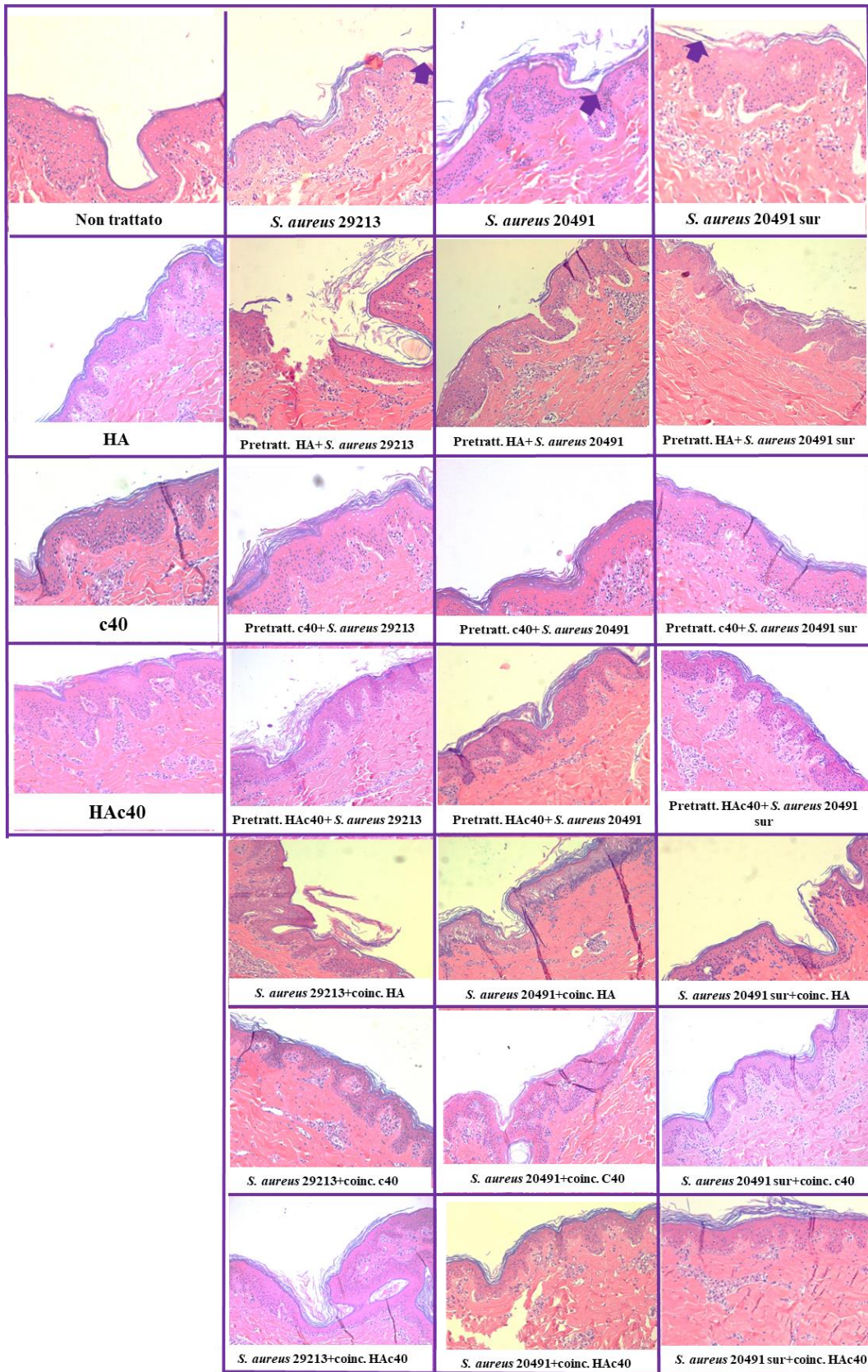


Figura 29 Colorazione Eosina Ematossilina su tessuti a 48 ore dall'infezione con i due ceppi di *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e DSM20491 e con il surnatante del ceppo DSM20491 e sui tessuti trattati (pretrattati e coincubati) con l'acido ialuronico (HA) con il frammento di parete batterica (c40) e con il c40 coniugato all'acido ialuronico (HAc40) ingrandimento 10x.

4.6 Valutazione dell'espressione delle proteine Claudina 1 e ZO1 dei tessuti infettati con *Staphylococcus aureus* e trattati con il frammento c40 e il coniugato HAc40

Dopo 48h la Claudina 1, nei tessuti infettati con *S. aureus* ATCC 29213, risulta essere down-regolata rispetto al tessuto controllo, suggerendo che il patogeno attacca questa proteina. Viceversa, i trattamenti con c40 e HAc40 fanno registrare un'up-regolazione, rendendo il livello di espressione comparabile all'espressione osservata nel tessuto controllo, suggerendo che sia il c40 che HAc40, utilizzati come preincubazione o come trattamento contestuale, sono in grado di interferire con i meccanismi patogenetici di *S. aureus*, proteggendo il tessuto dal danno (fig. 30).

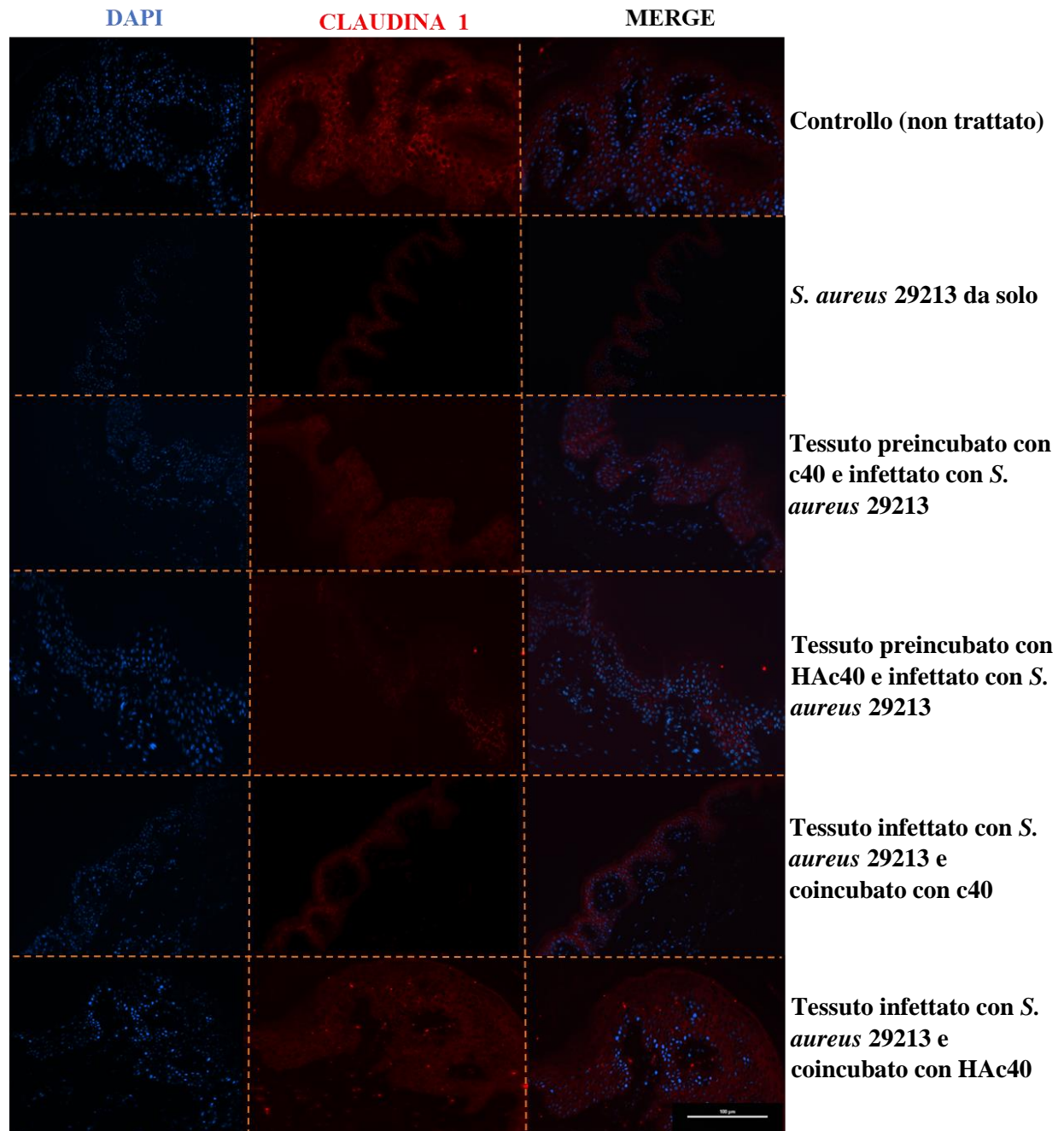


Figura 30 A sinistra è mostrato il canale del DAPI (461 nm), al centro quello del tritc (568nm), a destra è riportato il merge. I tessuti infettati con *S. aureus* 29213 ma pretrattati o coincubati con Hac40 e c40 mostrano un'up-regolazione della Claudina 1 (tritc) rispetto al tessuto infettato con il batterio.

ZO1, nei tessuti trattati con *S. aureus* ATCC 29213, è quasi completamente assente confrontandolo al tessuto controllo non trattato. Viceversa, tutti i tessuti infettati con il patogeno e pretrattati o coincubati con c40 e HAc40 mostrano un'up-regolazione, in alcuni casi, quasi comparabile al tessuto controllo (fig. 31).

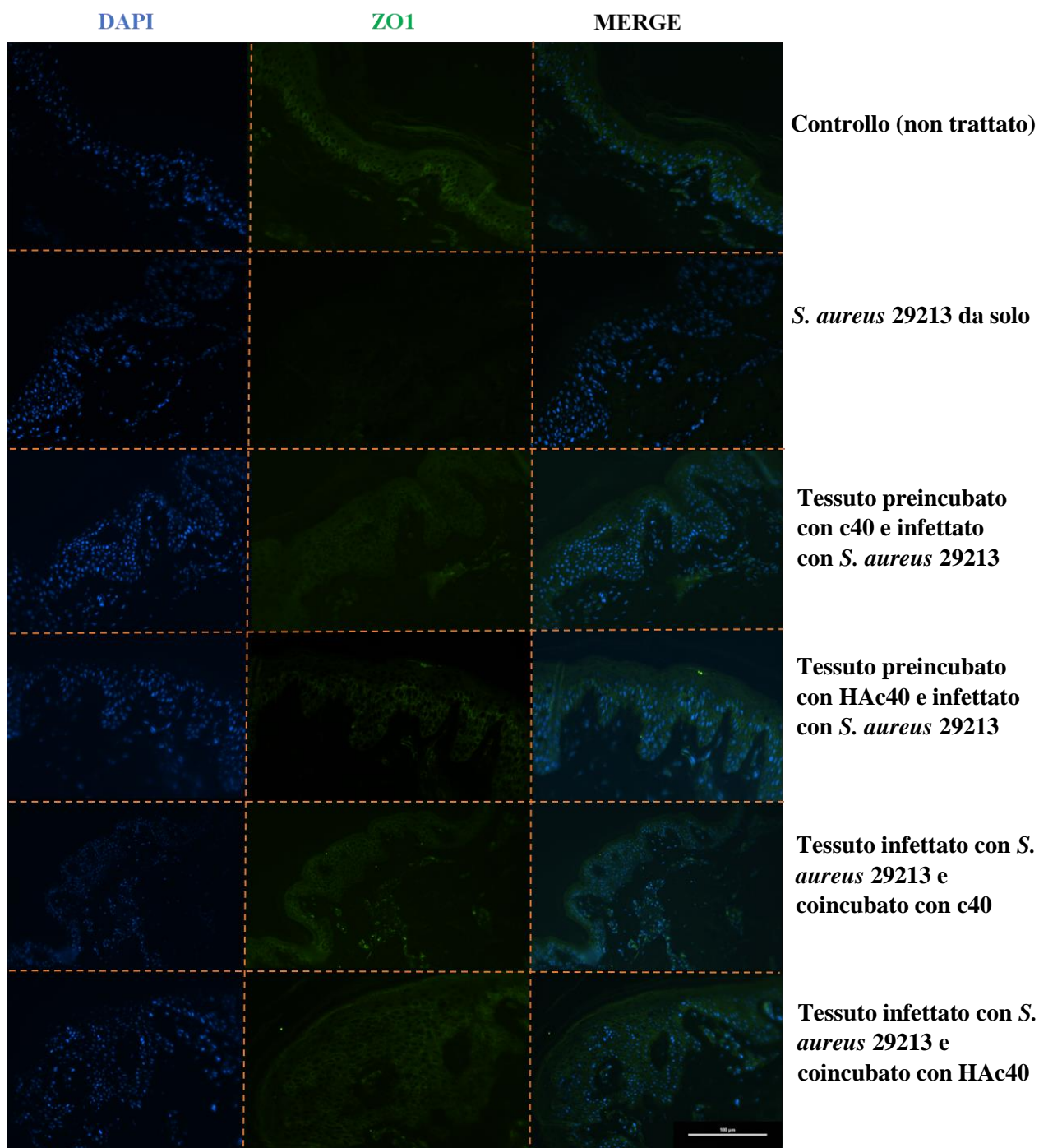


Figura 31 A sinistra è mostrato il canale del DAPI (461 nm), al centro quello del Fitc (488 nm), a destra è riportato il merge. I tessuti infettati con il patogeno, ma pretrattati o coincubati con HAc40, mostrano un livello di espressione di ZO1 (Fitc) quasi comparabile a quello del tessuto controllo non trattato.

Lo studio dell'espressione della Claudina 1 in tessuti infettati con *S. aureus* DSM20491 evidenzia una down-regolazione rispetto al tessuto controllo, suggerendo che il patogeno ha un'azione sulla proteina. Viceversa, tutti i trattamenti con c40 e HAc40 fanno registrare un'up-regolazione del livello di espressione, in particolare i tessuti pretrattati con c40 e HAc40 e quelli coincubati con HAc40 mostrano un segnale comparabile al

tessuto controllo suggerendo la presenza di un meccanismo in grado di interferire con i meccanismi patogenetici di *S. aureus* (fig. 32).

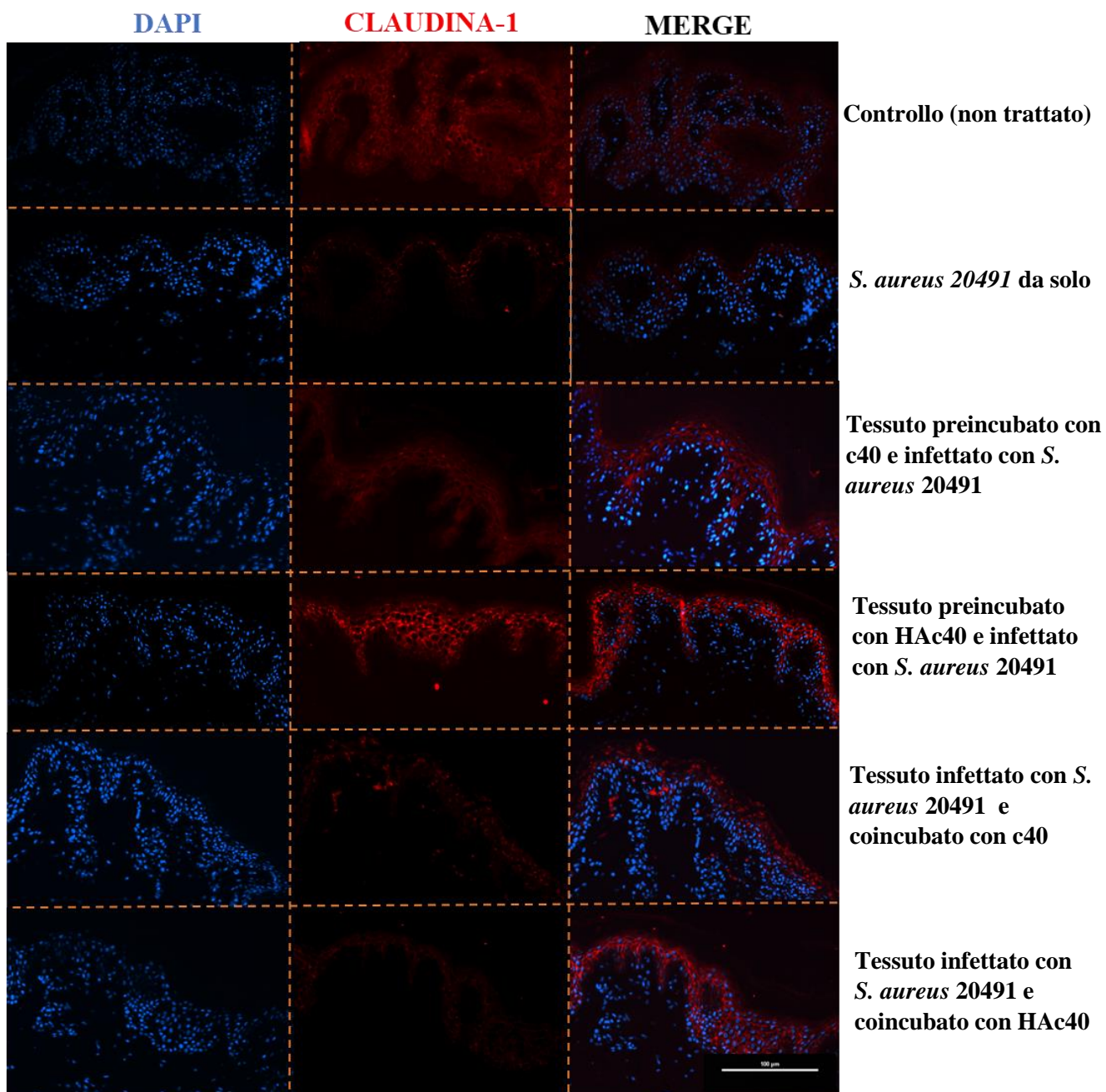


Figura 32 A sinistra è mostrato il canale del DAPI (461 nm), al centro quello del tritc (568nm), a destra è riportato il merge. I tessuti infettati con *S. aureus* 20491 ma pretrattati con c40 e HAc40 o coinubati con HAc40, mostrano un'up-regolazione della Claudina 1 (tritc) rispetto al tessuto infettato con il batterio.

ZO1 nei tessuti trattati con *S. aureus* DSM 20491 è quasi completamente assente confrontato con il tessuto controllo non trattato. Viceversa, i tessuti infettati con il patogeno ma pretrattati con c40 e HAc40, mostrano un'up-regolazione, con un livello di

espressione comparabile al tessuto controllo. Analogamente i tessuti infettati e coincubati con HAc40 (fig. 33).

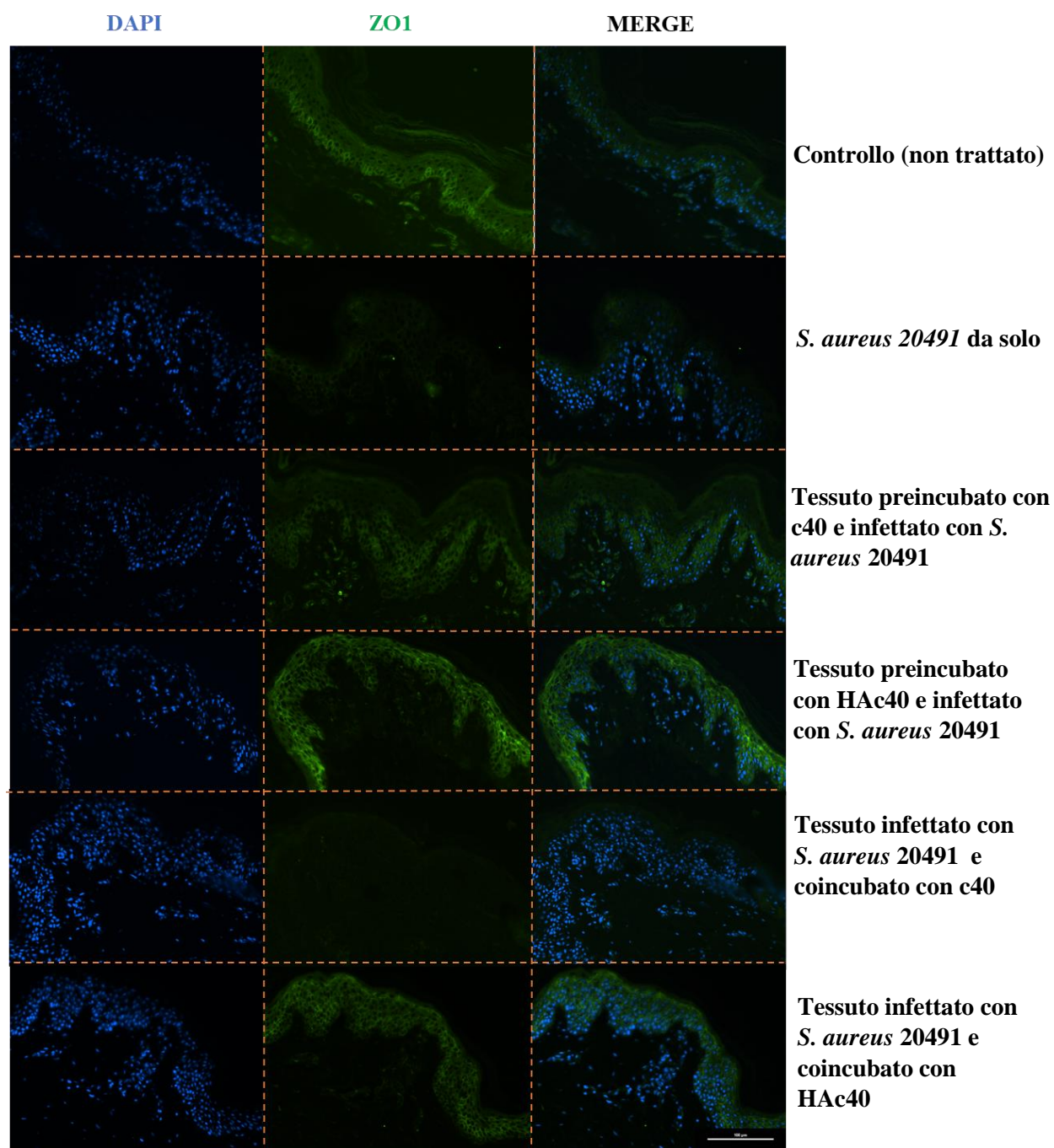


Figura 33 A sinistra è mostrato il canale del DAPI (461 nm), al centro quello del fitc (488 nm), a destra è riportato il merge. I tessuti infettati con il patogeno ma pretrattati con c40 e HAc40 o coincubati HAc40 mostrano un segnale di ZO1 (Fitc) comparabile a quello del tessuto controllo non trattato.

La Claudina 1 nei tessuti trattati con il surnatante di *S. aureus* DSM20491 risulta essere quasi assente, confrontandola con il tessuto controllo, suggerendo che l'atossina contenuta nel surnatante danneggia questa proteina. La preincubazione con c40 e la coincubazione con c40 e HAc40 mostrano invece un'up-regolazione, comparabile al

tessuto controllo suggerendo l'attivazione di un meccanismo in grado di interferire con i meccanismi patogenetici di *S. aureus* (fig. 34)

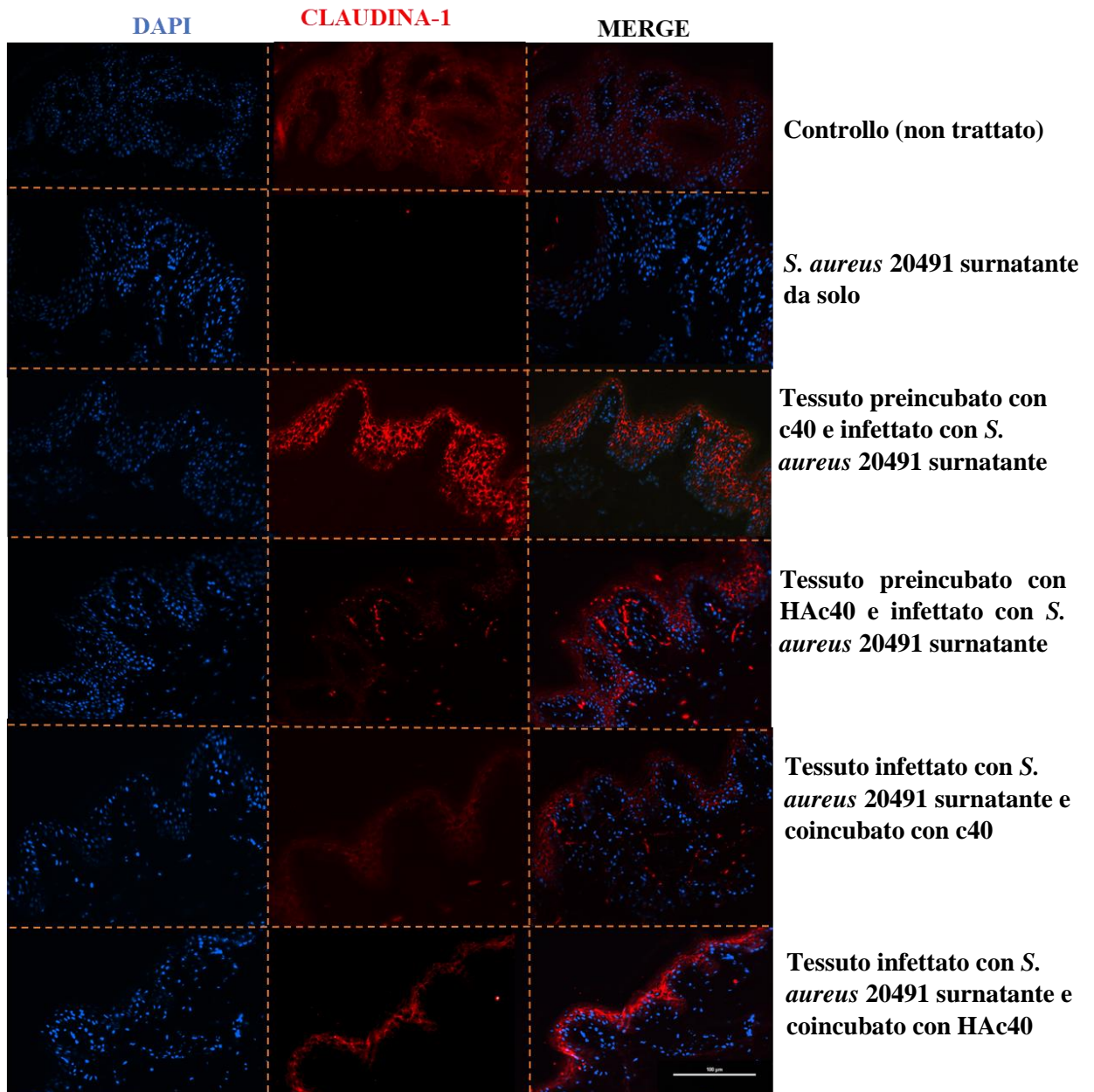


Figura 34 A sinistra è mostrato il canale del DAPI (461 nm), al centro quello del trite (568nm), a destra è riportato il merge. I tessuti trattati il surnatante di *S. aureus* 20491 ma pretrattati con c40 e coincubati con c40 e HAc40 mostrano un'up-regolazione dell'espressione della Claudina 1 (trite) confrontandola al tessuto trattato solo con il surnatante..

ZO1 nei tessuti trattati con il surnatante di *S. aureus* DSM 20491 è quasi completamente assente rispetto al tessuto controllo non trattato. Viceversa, tutti i tessuti infettati con il patogeno ma pretrattati o coincubati con c40 e HAc40 mostrano una marcata up-regolazione. In particolare i tessuti coincubati con HAc40 mostrano un livello di espressione quasi comparabile al controllo (fig. 35).

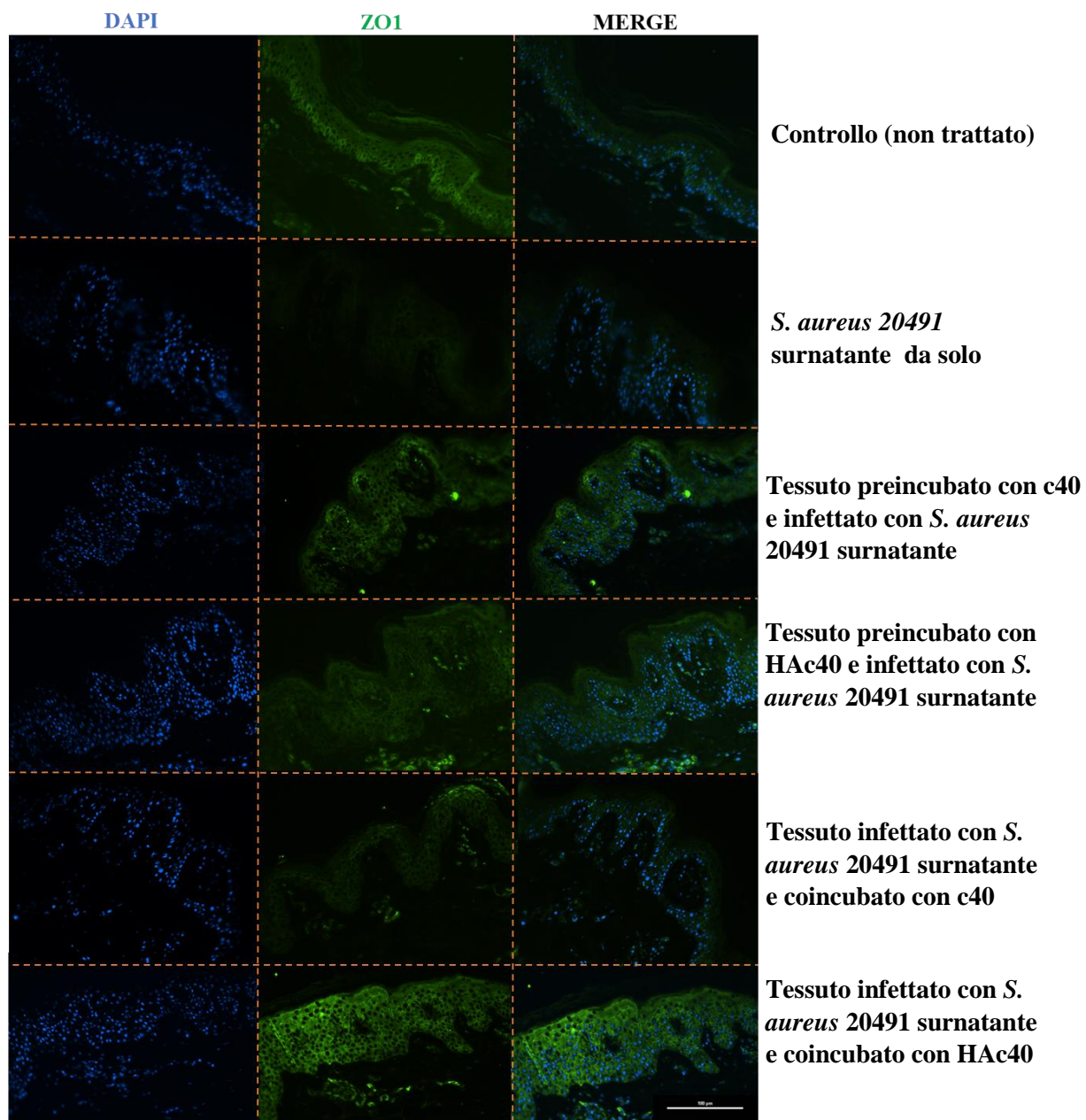


Figura 35 A sinistra è mostrato il canale del DAPI (461 nm), al centro quello del fitc (488 nm), a destra è riportato il merge. Nei tessuti trattati con il surnatante ma pretrattati con c40 e per quelli i tessuti coincubati con c40 e HA40 si osserva un segnale mostrano un livello di espressione della proteina di zoZO1 (Fite) comparabile a quello dell tessuto controllo non trattato.

5. Discussione

Diversi componenti del microbiota cutaneo sono noti per influenzare l'omeostasi della barriera cutanea. Dati recentissimi hanno confermato una ipotesi formulata da tempo la quale supportava l'esistenza una relazione mutualistica tra le cellule della pelle ad alcuni sottotipi di *Cutibacterium acnes*. La pelle costituisce un habitat permissivo per la sua colonizzazione fornendo nutrienti, umidità, siti di adesione e temperatura ottimale per la crescita. In cambio di queste risorse *C. acnes* produce un ambiente ostile per altri microbi potenzialmente patogeni, tra cui *Staphylococcus aureus*. Di conseguenza, questi ceppi di *C. acnes* sono considerati dei fattori importanti nell'istituzione e nel mantenimento dell'omeostasi epidermica [185].

Nel presente studio è stato valutato il potenziale terapeutico del *Cutibacterium acnes* nel trattamento delle patologie cutanee associate a disbiosi.

I risultati ottenuti dagli esperimenti *in vitro* condotti su tre derivati del ceppo brevettato *C. acnes* DSM 28251 (*heat killed bacteria*, surnatante e frammento c40), hanno dimostrato che ogni derivato è in grado di influenzare, se pur in maniera diversa, la crescita dei patogeni cutanei testati. Comparando i risultati ottenuti con gli stessi derivati ottenuti da ceppi filogeneticamente simili l'attività del *C. acnes* DSM 28251 risulta essere sempre più elevata. Allo stesso modo anche ceppi vicini dal punto di vista della composizione del peptidoglicano risultano avere un'attività minore. Questi risultati suggeriscono che *C. acnes* DSM28251 possiede una più ampia attività pleiotropica. Dopo aver dimostrato l'unicità del frammento c40 rispetto ad altri frammenti simili, gli esperimenti *in vitro* sulla linea cellulare HaCaT (cheratinociti umani immortalizzati) ed *ex vivo* su biopsie di cute suina hanno dimostrato l'effetto protettivo del c40 e dell'HAc40 (il frammento coniugato all'acido ialuronico) sull'azione patogenetica svolta da *S. aureus*.

Infatti dal saggio di adesione/invasione è emerso che l'adesione del ceppo *S. aureus* ATCC 29213 si riduce con valore statisticamente significativi quando la sospensione batterica è pretrattata (per due ore) con l'HAc40, viceversa l'adesione/invasione del ceppo *S. aureus* DSM20491 è statisticamente ridotta sia quando la coltura batterica è pretrattata con HAc40 che quando il saggio viene condotto co-incubando il patogeno con HAc40. Questi risultati suggeriscono che il componente HAc40 è in grado di interferire con il meccanismo di adesione e invasione dei cheratinociti utilizzato da *S. aureus* per promuovere la distruzione della barriera cutanea. Viceversa l'acido ialuronico da solo non è in grado di interagire con l'adesione di *S. aureus*.

Inoltre, il dato ottenuto dal saggio di migrazione indica che il c40, sia da solo che coniugato all'acido ialuronico, promuove la proliferazione dei cheratinociti. Infatti, le cellule infettate con *S. aureus* ATCC 29213 o trattate con il surnatante del ceppo DSM20491 (contenente l' α tossina) ma coincubate con le sospensioni test, sebbene presentino una capacità proliferativa inferiore rispetto al controllo non trattato, migrano molto più rapidamente rispetto a quelle solamente infettate. Viceversa l'acido ialuronico non modifica la capacità proliferativa delle cellule in presenza dell'infezione da *S. aureus* o del suo surnatante di coltura.

La colorazione eosina-ematossilina delle sezioni di cute suina infettata con i due ceppi di *S. aureus* e con il surnatante (precedentemente utilizzati per gli esperimenti *in vitro*) ha evidenziato sia a 24 che 48 ore di trattamento, un danno ai cheratinociti con distacco, in diversi punti della sezione, dello strato corneo. Questo dato è in linea con quanto riportato in letteratura, ossia che *S. aureus* è in grado di indurre un danno alla cute sia nella forma vitale che servendosi delle tossine. Viceversa tutti i tessuti pretrattati o co-incubati con le sospensioni c40 e HAc40 mostrano una cute normoconformata con tratti morfologici simili a quelli del controllo. Al contrario i trattamenti con il solo acido ialuronico non hanno protetto il tessuto dal danno.

Le stesse sezioni sottoposte ad un saggio di immunofluorescenza, hanno evidenziato che, dopo 48 ore di infezione il segnale di entrambe le proteine delle giunzioni tigt (Claudina1 e ZO1) si perde per i tessuti infettati con *S. aureus* ATCC 29213 e il surnatante del ceppo DSM20491 suggerendo che le interazioni ospite-patogeno nell'infezione cutanea da *S. aureus* sono principalmente dirette alle TJ. Viceversa, complessivamente tutti i trattamenti con c40 e HAc40 hanno protetto i tessuti dal danno. Tutti i tessuti infettati con *S. aureus* 29213 ma trattati con c40 e HAc40 sembrano essere protetti dal danno facendo registrare un segnale comparabile al controllo sia per Claudina che per zo1. Al contrario la pre-incubazione dei tessuti con c40 e HAc40 e la co-incubazione con HAc40 ha protetto maggiormente dal danno da *S. aureus* 20491. Infine anche nel caso del surnatante la pre-incubazione con 40 e la co-incubazione con c40 e HAc40 si sono rivelati i trattamenti migliori.

6. Conclusioni e prospettive future

La disbiosi del microbiota cutaneo gioca un ruolo importante nella patogenesi delle malattie infiammatorie della pelle. Tuttavia, il meccanismo specifico nella comparsa e nella progressione di queste patologie rimane ancora sconosciuto [44].

Le principali terapie per il trattamento delle patologie cutanee legate a disbiosi agiscono in maniera indiscriminata sul tutto microbiota cutaneo provocando una riduzione nel numero e nella composizione di specie commensali che svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento di una condizione di omeostasi [186]. Questi microrganismi in condizioni normali instaurano una relazione simbiotica con l'ospite, ma quando la stabilità della comunità microbica viene disturbata viene alterata anche la funzione immunitaria e quella di barriera fisica.

Recenti ricerche hanno dimostrato che l'applicazione di batteri commensali sulla superficie della pelle di pazienti affetti da disbiosi, modula la composizione del microbiota mirando in maniera specifica ai patogeni e preservando i commensali [187]. Chiarire la relazione tra il microbiota e la salute della pelle e indurre il microbiota a mantenere l'omeostasi per trattare le malattie rappresenta una missione importante per il futuro [67, 188]. Nel presente lavoro è stato proposto un possibile trattamento completamente naturale per contrastare i meccanismi patogenetici di *S. aureus*, il principale patogeno associato alle patologie della pelle.

In conclusione i risultati ottenuti dal nostro studio hanno dimostrato che c40 e HAc40 *in vitro* sono risultati attivi sul meccanismo di adesione/invasione e sulla migrazione mentre *ex vivo* hanno protetto i tessuti dal danno allo strato corneo e alle proteine delle tight junction preservandoli dal danneggiamento della barriera cutanea. Questi dati offrono numerosi spunti di ricerca. Saranno analizzati altri fattori di virulenza prodotti da *S. aureus* che sembrano giocare un ruolo cruciale nel processo infiammatorio guidato dal batterio (lipoproteine che attivano i TLR-2 sui cheratinociti o la δ tossina che attiva la degranolazione dei mastociti). Infine saranno studiate nel dettaglio le interazioni tra *S. aureus* e la superficie delle cellule ospiti, in particolare la proteina A, il *clumping factor* B e le proteine responsabili del legame alla fibronectina.

Ringraziamenti

Ringrazio la mia famiglia, che mi è stata sempre accanto, soprattutto chi non c'è più ma che continua a vivere nel mio cuore e in tutto ciò che faccio. Il mio tutor, il Prof. Roberto Di Marco che è stato, per me, una guida fondamentale nel mio percorso di crescita sia sperimentale che umano. Aileens Pharma S.r.l. che ha interamente finanziato questo progetto di dottorato, compreso il costo dei materiali e la borsa di dottorato di ricerca. Tutto il mio gruppo di ricerca: Daniele, Marco, Noemi, Giulio, Laura, Franca e Antonio che mi ha accompagnata in questi anni supportandomi sempre anche nelle mie scelte più folli; voi più che colleghi siete diventati amici. Angelica, che ha saputo starmi accanto nel momento più difficile della mia vita con la delicatezza e la dolcezza che la contraddistinguono, assecondando le mie decisioni senza mai giudicarmi.

Bibliografia

1. Kanitakis, J., *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*. European journal of dermatology, 2002. **12**(4): p. 390-401.
2. Goodwin, C., *Anatomy and Physiology of the Skin*. Journal of the Dermatology Nurses' Association, 2011. **3**(4): p. 203-213.
3. Mann, E., et al., *Review: skin and the immune system*. J. Clin. Exp. Dermatol. Res, , 2012. **2**(2).
4. McGrath, J., R. Eady, and F.J.R.s.t.o.d. Pope, *Anatomy and organization of human skin*. Rook's textbook of dermatology, 2004. **1**: p. 3.2-3.80.
5. Khatun, M., *A survey on skin disease and its impact on Quality of life*. 2018, East West University.
6. Wickett, R.R. and M.O.J.A.j.o.i.c. Visscher, *Structure and function of the epidermal barrier*. American journal of infection control,, 2006. **34**(10): p. S98-S110.
7. Amirlak, B., et al., *Skin anatomy*. Medscape. 2017.
8. Xu, F. and T. Lu, *Introduction to skin biothermomechanics and thermal pain*. 2011: Springer.
9. Goldsmith, L.A., et al., *Section 3. Overview of Biology, Development, and Structure of Skin*, in *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 8e*. 2012, The McGraw-Hill Companies: New York, NY.
10. James, W.D., T.G. Berger, and D.J.C.d. Elston, *Andrew's Disease of the Skin*. 2006. **9**: p. 231-245.
11. De Marchi, F., et al., *La funzione di barriera della cute e i suoi difetti nella dermatite atopica*. 2015.
12. Deo, P.N. and R. Deshmukh, *Pathophysiology of keratinization*. Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP, 2018. **22**(1): p. 86-91.
13. Gutowska-Owsiak, D., et al., *Addressing differentiation in live human keratinocytes by assessment of membrane packing order*. Frontiers in Cell and Developmental Biology,, 2020. **8**: p. 1078.
14. Vietri Rudan, M. and F.M. Watt, *Mammalian Epidermis: A Compendium of Lipid Functionality*. Frontiers in Physiology, 2022. **12**.
15. Kezic, S. and I. Jakasa, *Filaggrin and Skin Barrier Function*. Curr Probl Dermatol, 2016. **49**: p. 1-7.
16. Kim, B.E., D.Y.J.A. Leung, asthma, and i. research, *Significance of skin barrier dysfunction in atopic dermatitis*. Allergy, asthma immunology research 2018. **10**(3): p. 207-215.
17. Cichorek, M., et al., *Skin melanocytes: biology and development*. Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii I Alergologii, , 2013. **30**(1): p. 30-41.
18. Lawton, S.J.N.T., *Skin 1: the structure and functions of the skin*. Nurs. Times,, 2019. **115**: p. 30-33.
19. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M.J.E.d. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. Experimental dermatology, 2008. **17**(12): p. 1063-1072.
20. Abdallah, F., L. Mijouin, and C. Pichon, *Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism*. Mediators of inflammation, 2017. **2017**: p. 5095293-5095293.
21. Brandner, J.M., et al., *Epidermal tight junctions in health and disease*. Tissue barriers, 2015. **3**(1-2): p. e974451-e974451.
22. Elias, P.M.J.J.o.I.D., *Epidermal lipids, barrier function, and desquamation*. Journal of Investigative Dermatology,, 1983. **80**.
23. Drislane, C., A.D.J.A.o.A. Irvine, Asthma, and Immunology, *The role of filaggrin in atopic dermatitis and allergic disease*. Annals of Allergy, Asthma Immunology, 2020. **124**(1): p. 36-43.

24. Hamid, Q., M. Boguniewicz, and D.J.T.J.o.c.i. Leung, *Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis*. The Journal of clinical investigation, 1994. **94**(2): p. 870-876.
25. Oranje, A., et al., *Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: The SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score*. The British journal of dermatology, 2007. **157**: p. 645-8.
26. De Benedetto, A., A. Kubo, and L.A.J.J.o.I.D. Beck, *Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization?* Journal of Investigative Dermatology,, 2012. **132**(3): p. 949-963.
27. Yokouchi, M. and A.J.E.d. Kubo, *Maintenance of tight junction barrier integrity in cell turnover and skin diseases*. Experimental Dermatology,, 2018. **27**(8): p. 876-883.
28. Guttman, J.A., et al., *Gap junction hemichannels contribute to the generation of diarrhoea during infectious enteric disease*. Gut, 2010. **59**(2): p. 218-226.
29. Parlet, C.P., M.M. Brown, and A.R.J.T.i.m. Horswill, *Commensal staphylococci influence Staphylococcus aureus skin colonization and disease*. Trends in microbiology, , 2019. **27**(6): p. 497-507.
30. Zasloff, M.J.n., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. nature,, 2002. **415**(6870): p. 389-395.
31. Liu, L., A.A. Roberts, and T. Ganz, *By IL-1 Signaling, Monocyte-Derived Cells Dramatically Enhance the Epidermal Antimicrobial Response to Lipopolysaccharide*. The Journal of Immunology,, 2003. **170**(1): p. 575-580.
32. Jouault, T., et al., *Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by Candida albicans*. Cellular microbiology, 2009. **11**(7): p. 1007-1015.
33. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. Clinical microbiology reviews, 2009. **22**(2): p. 240-273.
34. Takeda, K. and S.J.I.i. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. International immunology,, 2005. **17**(1): p. 1-14.
35. Abdayem, R. and M.J.E.-C.M.e.M.d.I.C. Haftek, *Barriera epidermica*. Cosmetologia Medica e Medicina degli Inestetismi Cutanei,, 2016. **13**(1): p. 1-7.
36. Sanford, J.A. and R.L. Gallo. *Functions of the skin microbiota in health and disease*. in *Seminars in immunology*. 2013. Elsevier.
37. Egert, M., et al., *The association of the skin microbiota with health, immunity, and disease*. Clinical Pharmacology & Therapeutics,, 2017. **102**(1): p. 62-69.
38. Schommer, N.N. and R.L.J.T.i.m. Gallo, *Structure and function of the human skin microbiome*. Trends in microbiology,, 2013. **21**(12): p. 660-668.
39. Kong, H.H.J.T.i.m.m., *Skin microbiome: genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes*. Trends in molecular medicine, , 2011. **17**(6): p. 320-328.
40. Rosenthal, M., et al., *Skin microbiota: microbial community structure and its potential association with health and disease*. Infection, Genetics and Evolution, , 2011. **11**(5): p. 839-848.
41. Chen, Y.E. and H.J.J.o.t.A.A.o.D. Tsao, *The skin microbiome: current perspectives and future challenges*. Journal of the American Academy of Dermatology,, 2013. **69**(1): p. 143-155. e3.
42. Grice, E.A., et al., *A diversity profile of the human skin microbiota*. Genome research,, 2008. **18**(7): p. 1043-1050.
43. Zhou, H., et al., *Applications of Human Skin Microbiota in the Cutaneous Disorders for Ecology-Based Therapy*. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2020. **10**.
44. Costello, E.K., et al., *Bacterial community variation in human body habitats across space and time*. science translational medicine, 2009. **326**(5960): p. 1694-1697.
45. Paulino, L.C., et al., *Molecular analysis of fungal microbiota in samples from healthy human skin and psoriatic lesions*. Journal of clinical microbiology,, 2006. **44**(8): p. 2933-2941.

46. Paulino, L.C., C.-H. Tseng, and M.J.J.F.y.r. Blaser, *Analysis of Malassezia microbiota in healthy superficial human skin and in psoriatic lesions by multiplex real-time PCR*. FEMS yeast research,, 2008. **8**(3): p. 460-471.
47. Coelho, M.A., J.P. Sampaio, and P.J.M. Gonçalves, *Living and thriving on the skin: Malassezia genomes tell the story*. MBio,, 2013. **4**(2): p. e00117-13.
48. Schowalter, R.M., et al., *Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin*. Cell host & microbe,, 2010. **7**(6): p. 509-515.
49. Foulongne, V., et al., *Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing*. PloS one, 2012. **7**(6): p. e38499.
50. Huttenhower C, G.D., Knight R, Abubucker S, Badger JH, and e.a. Chinwalla AT, *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. nature,, 2012. **486**(7402): p. 207.
51. Grice, E.A. and J.A.J.N.r.m. Segre, *The skin microbiome*. 2011. **9**(4): p. 244-253.
52. Grice, E.A.J.G.r., *The intersection of microbiome and host at the skin interface: genomic- and metagenomic-based insights*. Genome research, 2015. **25**(10): p. 1514-1520.
53. Grogan, M.D., et al., *Research techniques made simple: profiling the skin microbiota*. Journal of Investigative Dermatology, 2019. **139**(4): p. 747-752. e1.
54. Pistone, D., et al., *A Journey on the Skin Microbiome: Pitfalls and Opportunities*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(18): p. 9846.
55. Chen, Y.E., M.A. Fischbach, and Y.J.N. Belkaid, *Skin microbiota–host interactions*. 2018. **553**(7689): p. 427-436.
56. Flowers, L., E.A.J.C.H. Grice, and Microbe, *The skin microbiota: Balancing risk and reward*. Cell host & microbe, 2020. **28**(2): p. 190-200.
57. Nakatsuji, T., et al., *Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against Staphylococcus aureus and are deficient in atopic dermatitis*. Science translational medicine, 2017. **9**(378): p. eaah4680.
58. Zipperer, A., et al., *Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization*. Nature, 2016. **535**(7613): p. 511-516.
59. Cogen, A.L., et al., *Selective Antimicrobial Action Is Provided by Phenol-Soluble Modulins Derived from Staphylococcus epidermidis, a Normal Resident of the Skin*. Journal of Investigative Dermatology, 2010. **130**(1): p. 192-200.
60. O'Neill, A.M. and R.L.J.M. Gallo, *Host-microbiome interactions and recent progress into understanding the biology of acne vulgaris*. 2018. **6**(1): p. 1-16.
61. Nakatsuji, T., et al., *The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin*. Nature communications, 2013. **4**(1): p. 1-8.
62. Belkaid, Y. and J.A.J.S. Segre, *Dialogue between skin microbiota and immunity*. Science 2014. **346**(6212): p. 954-959.
63. Nakamizo, S., et al. *Commensal bacteria and cutaneous immunity*. in *In Seminars in immunopathology* 2015. Springer.
64. Chau, T.A., et al., *Toll-like receptor 2 ligands on the staphylococcal cell wall downregulate superantigen-induced T cell activation and prevent toxic shock syndrome*. Nature medicine, 2009. **15**(6): p. 641.
65. Lai, Y., et al., *Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3–dependent inflammation after skin injury*. Nature medicine, 2009. **15**(12): p. 1377.
66. Gallo, R.L. and T.J.J.o.I.D. Nakatsuji, *Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin*. Journal of Investigative Dermatology, 2011. **131**(10): p. 1974-1980.
67. Chen, P., et al., *Potential role of the skin microbiota in Inflammatory skin diseases*. Journal of Cosmetic Dermatology, 2021. **20**(2): p. 400-409.
68. Srinivas, G., *Genome-wide mapping of gene-microbiota interactions in susceptibility to epidermolysis bullosa acquisita*. Nature communications, 2013(4(1)): p. 1-7.

69. Kong, H.H., et al., *Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis*. Genome research, 2012. **22**(5): p. 850-859.
70. Fry, L., et al., *Is chronic plaque psoriasis triggered by microbiota in the skin?* British Journal of Dermatology, , 2013. **169**(1): p. 47-52.
71. Chng, K.R., et al., *Whole metagenome profiling reveals skin microbiome-dependent susceptibility to atopic dermatitis flare*. Nature microbiology, 2016. **1**(9): p. 16106.
72. Quan, C., et al., *Psoriatic lesions are characterized by higher bacterial load and imbalance between Cutibacterium and Corynebacterium*. American Academy of Dermatology,, 2020. **82**(4): p. 955-961.
73. Szegedi, A., et al., *Acne: Transient Arrest in the Homeostatic Host–Microbiota Dialog?* Trends in Immunology, 2019. **40**(10): p. 873-876.
74. Dréno, B., et al., *Microbiome in healthy skin, update for dermatologists*. Academy of Dermatology and Venereology, 2016. **30**(12): p. 2038-2047.
75. Totté, J., et al., *Prevalence and odds of Staphylococcus aureus carriage in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis*. British Journal of Dermatology, 2016. **175**(4): p. 687-695.
76. Kobayashi, T., et al., *Kong 487 HH, Amagai M, Nagao K. 2015. Dysbiosis and Staphylococcus aureus Colonization 488 Drives Inflammation in Atopic Dermatitis*. Immunity. **42**: p. 756-766.
77. Sohn, E.J.N., *Skin microbiota's community effort*. Nature, 2018. **563**(7732): p. S91-S91.
78. Byrd, A.L., et al., *Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis*. Science translational medicine, 2017. **9**(397): p. eaal4651.
79. Meisel, J.S., et al., *Skin microbiome surveys are strongly influenced by experimental design*. Journal of Investigative Dermatology, 2016. **136**(5): p. 947-956.
80. Darabi, K., et al., *The role of Malassezia in atopic dermatitis affecting the head and neck of adults*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2009. **60**(1): p. 125-136.
81. Mempel, M., et al., *Role of Staphylococcus aureus surface-associated proteins in the attachment to cultured HaCaT keratinocytes in a new adhesion assay*. Journal of investigative dermatology, 1998. **111**(3): p. 452-456.
82. Kim, J., et al., *Interactions Between Atopic Dermatitis and Staphylococcus aureus Infection: Clinical Implications*. Allergy, asthma & immunology research, 2019. **11**(5): p. 593-603.
83. Geoghegan, J.A., A.D. Irvine, and T.J.J.T.i.m. Foster, *Staphylococcus aureus and atopic dermatitis: a complex and evolving relationship*. Trends in microbiology, 2018. **26**(6): p. 484-497.
84. Ryu, S., et al., *Colonization and infection of the skin by S. aureus: immune system evasion and the response to cationic antimicrobial peptides*. International journal of molecular sciences, 2014. **15**(5): p. 8753-8772.
85. Skov, L. and O.J.A.o.d. Baadsgaard, *Superantigens: Do they have a role in skin diseases?* Archives of dermatology, 1995. **131**(7): p. 829-832.
86. Cheung, G.Y., J.S. Bae, and M.J.V. Otto, *Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus*. Virulence, 2021. **12**(1): p. 547-569.
87. Becker, K.A., et al., *Staphylococcus aureus Alpha-Toxin Disrupts Endothelial-Cell Tight Junctions via Acid Sphingomyelinase and Ceramide*. Infection and immunity, 2017. **86**(1): p. e00606-17.
88. Ohnemus, U., et al., *Regulation of epidermal tight-junctions (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative Staphylococcus strains*. Journal of Investigative Dermatology, 2008. **128**(4): p. 906-916.
89. Iwamoto, K., et al., *Staphylococcus aureus in atopic dermatitis: Strain-specific cell wall proteins and skin immunity*. Allergy International, 2019. **68**(3): p. 309-315.

90. Becker, K.A., et al., *Staphylococcus aureus alpha-toxin disrupts endothelial-cell tight junctions via acid sphingomyelinase and ceramide*. Infection and immunity, 2018. **86**(1): p. e00606-17.
91. Nataraj, B.H. and R.H.J.C.m. Mallappa, *Antibiotic Resistance Crisis: An Update on Antagonistic Interactions between Probiotics and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Current microbiology, 2021. **78**(6): p. 2194-2211.
92. Basra, M.K., M.J.E.R.o.P. Shahrukh, and O. Research, *Burden of skin diseases*. Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research, 2009. **9**(3): p. 271-283.
93. Dekio, I., et al., *Characterization of skin microbiota in patients with atopic dermatitis and in normal subjects using 16S rRNA gene-based comprehensive analysis*. Journal of Medical Microbiology, 2007. **56**(12): p. 1675-1683.
94. Ramamuthie, G., et al., *Awareness of risk factors for skin infections and its impact on quality of life among adults in a Malaysian city: a cross-sectional study*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2015. **14**(10): p. 1913-1917.
95. Hay, R.J., et al., *The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions*. Journal of Investigative Dermatology, 2014. **134**(6): p. 1527-1534.
96. Weidinger, S., et al., *Atopic dermatitis*. Nature Reviews Disease Primers, 2018. **4**: p. 1.
97. Patel, N. and S.R. Feldman, *Adherence in atopic dermatitis*, in *Management of Atopic Dermatitis*. 2017, Springer. p. 139-159.
98. Wollenberg, A., C.J.I. Schnopp, and A. Clinics, *Evolution of conventional therapy in atopic dermatitis*. Immunology Allergy Clinics, 2010. **30**(3): p. 351-368.
99. Guttman-Yassky, E., et al., *Atopic dermatitis: pathogenesis*. Semin Cutan Med Surg, 2017. **36**(3): p. 100-103.
100. Spergel, J.M.J.A.o.a., *asthma and immunology, From atopic dermatitis to asthma: the atopic march*. Annals of allergy, asthma immunology, 2010. **105**(2): p. 99-106.
101. Gelmetti, C. and C. Colonna, *The value of SCORAD and beyond. Towards a standardized evaluation of severity?* Allergy, 2004. **59 Suppl 78**: p. 61-5.
102. Magnifico, I., et al., *Atopic dermatitis as a multifactorial skin disorder. Can the analysis of pathophysiological targets represent the winning therapeutic strategy?* Pharmaceuticals, 2020. **13**(11): p. 411.
103. Seite, S., T.J.C. Bieber, *cosmetic, and i. dermatology, Barrier function and microbiotic dysbiosis in atopic dermatitis*. Clinical, cosmetic investigational dermatology, 2015. **8**: p. 479.
104. Patrick, G.J., N.K. Archer, and L.S.J.J.o.I.D. Miller, *Which Way Do We Go? Complex Interactions in Atopic Dermatitis Pathogenesis*. Journal of Investigative Dermatology, 2020.
105. Langan, S., A. Irvine, and S.J.L. Weidinger, *Atopic dermatitis (vol 396, pg 345, 2020)*. LANCET, 2020. **396**(10253): p. 758-758.
106. Nakahara, T., et al., *Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis*. The Journal of dermatology, 2020.
107. Williams, H., C.J.J.o.a. Flohr, and c. immunology, *How epidemiology has challenged 3 prevailing concepts about atopic dermatitis*. Journal of allergy clinical immunology, 2006. **118**(1): p. 209-213.
108. Tham, E.H., et al., *Biotherapeutic Approaches in Atopic Dermatitis*. Biotechnology Journal, 2020.
109. Oh, J., et al., *The altered landscape of the human skin microbiome in patients with primary immunodeficiencies*. Genome research, 2013. **23**(12): p. 2103-2114.
110. Bjerre, R., et al., *The role of the skin microbiome in atopic dermatitis: a systematic review*. British Journal of Dermatology, 2017. **177**(5): p. 1272-1278.
111. Wollina, U.J.C., *cosmetic and i. dermatology, Microbiome in atopic dermatitis*. Clinical, cosmetic investigational dermatology, 2017. **10**: p. 51.

112. Shi, Z.F., et al., *The traditional Chinese medicine and relevant treatment for the efficacy and safety of atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Evid Based Complementary Altern Med., 2017. **2017**.
113. Rendon, A. and K.J.I.j.o.m.s. Schäkel, *Psoriasis pathogenesis and treatment*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(6): p. 1475.
114. Omland, S.H. and R.J.C.i.d. Gniadecki, *Psoriasis inversa: a separate identity or a variant of psoriasis vulgaris?* Clinics in dermatology, 2015. **33**(4): p. 456-461.
115. Syed, Z.U. and A.J.A.j.o.c.d. Khachemoune, *Inverse psoriasis*. American journal of clinical dermatology, 2011. **12**(2): p. 143-146.
116. Oji, V. and T.A. Luger, *The skin in psoriasis: assessment and challenges*. Clin Exp Rheumatol, 2015. **33**(5 Suppl 93): p. S14-9.
117. Meeuwis, K.A., et al., *Genital psoriasis: a systematic literature review on this hidden skin disease*. 2011. **91**(1): p. 5-11.
118. Göblös, A., et al., *Genetic Investigation of Inverse Psoriasis*. Life, 2021. **11**(7): p. 654.
119. Zákostelská, Z., et al., *Intestinal microbiota promotes psoriasis-like skin inflammation by enhancing Th17 response*. PloS one, 2016. **11**(7): p. e0159539.
120. Gupta, M., et al., *Psoriasis: Embarking a Dynamic Shift in the Skin Microbiota*. Journal of cosmetic dermatology, 2021.
121. Narang, T., et al., *Malassezia and psoriasis: Koebner's phenomenon or direct causation?* Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2007. **21**(8): p. 1111-1112.
122. Alekseyenko, A.V., et al., *Community differentiation of the cutaneous microbiota in psoriasis*. Microbiome, 2013. **1**(1): p. 1-17.
123. Fahlén, A., et al., *Comparison of bacterial microbiota in skin biopsies from normal and psoriatic skin*. Archives of dermatological research, 2012. **304**(1): p. 15-22.
124. Wilmer, E.N. and R.L.J.T.J.o.t.A.B.o.F.M. Hatch, *Resistant "candidal intertrigo": could inverse psoriasis be the true culprit?* Journal of the American Board of Family Medicine, 2013. **26**(2): p. 211-214.
125. Liang, X., et al., *Interplay between skin microbiota dysbiosis and the host immune system in psoriasis: Potential pathogenesis*. Frontiers in immunology, 2021. **12**.
126. Elsner, K., et al., *Prevalence of Candida species in Psoriasis*. Mycoses, 2021.
127. Leung, A.K., et al., *Dermatology: how to manage acne vulgaris*. Drugs in context, 2021. **10**.
128. Vos, T., et al., *Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. The lancet, 2012. **380**(9859): p. 2163-2196.
129. Tan, J.K.J.E.R.o.D., *Current measures for the evaluation of acne severity*. Expert Review of Dermatology, 2008. **3**(5): p. 595-603.
130. Basak, S.A. and A.L.J.P.i.r. Zaenglein, *Acne and its management*. Pediatrics in review, 2013. **34**(11): p. 479-497.
131. Dréno, B., et al., *The skin microbiome: a new actor in inflammatory acne*. American Journal of Clinical Dermatology, 2020. **21**(1): p. 18-24.
132. Wang, Y., et al., *Staphylococcus epidermidis in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of Propionibacterium acnes: implications of probiotics in acne vulgaris*. Applied microbiology and biotechnology, 2014. **98**(1): p. 411-424.
133. Lee, Y.B., E.J. Byun, and H.S.J.J.o.c.m. Kim, *Potential role of the microbiome in acne: a comprehensive review*. Journal of clinical medicine, 2019. **8**(7): p. 987.
134. Leyden, J.J., K.J. McGinley, and A.N.J.J.o.i.d. Foglia, *Qualitative and quantitative changes in cutaneous bacteria associated with systemic isotretinoin therapy for acne conglobata*. Journal of investigative dermatology, 1986. **86**(4): p. 390-393.
135. Dréno, B.J.E.J.o.D., *Bacteriological resistance in acne: a call to action*. European Journal of Dermatology, 2016. **26**(2): p. 127-132.

136. Sardana, K., et al., *Cross-sectional pilot study of antibiotic resistance in Propionibacterium acnes strains in Indian acne patients using 16S-RNA polymerase chain reaction: a comparison among treatment modalities including antibiotics, benzoyl peroxide, and isotretinoin*. Indian journal of dermatology, 2016. **61**(1): p. 45.
137. Edsberg, L.E., et al., *Revised national pressure ulcer advisory panel pressure injury staging system: revised pressure injury staging system*. Journal of Wound, Ostomy, and Continence Nursing, 2016. **43**(6): p. 585.
138. Morton, L.M. and T.J.J.J.o.t.A.A.o.D. Phillips, *Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2016. **74**(4): p. 589-605.
139. Mervis, J.S. and T.J.J.J.o.t.A.A.o.D. Phillips, *Pressure ulcers: Pathophysiology, epidemiology, risk factors, and presentation*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2019. **81**(4): p. 881-890.
140. Nagase, S., et al., *Distinct skin microbiome and skin physiological functions between bedridden older patients and healthy people: a single-center study in Japan*. Frontiers in medicine, 2020. **7**: p. 101.
141. Gomes, F., et al., *The skin microbiome of infected pressure ulcers: a review and implications for health professionals*. European Journal of Clinical Investigation, 2022. **52**(1): p. e13688.
142. Percival, S.L., S.M. McCarty, and B.J.A.i.w.c. Lipsky, *Biofilms and wounds: an overview of the evidence*. Advances in wound care,, 2015. **4**(7): p. 373-381.
143. Donelli, G.J.B.-B.H.-A.I., VOL I, *Biofilm-based Healthcare-associated Infections Volume I Preface*. Biofilm-based healthcare-associated infections, 2015. **830**: p. V-VI.
144. Espinosa, A., et al., *Polymicrobial Biofilms: Fundamentals, diseases, and treatments*—A. J. Sci. with Technol. Appl.: p. 39.
145. Wolcott, R.D., et al., *Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing*. Wound repair and regeneration, 2016. **24**(1): p. 163-174.
146. Espejo, E., et al., *Bacteremia associated with pressure ulcers: a prospective cohort study*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2018. **37**(5): p. 969-975.
147. de Wert, L.A., et al., *The cutaneous microbiome in hospitalized patients with pressure ulcers*. Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 1-11.
148. Cornish, L.J.B.J.o.C.N., *The use of prophylactic dressings in the prevention of pressure ulcers: a literature review*. 2017. **22**(Sup6): p. S26-S32.
149. van Zuuren, E.J., et al., *Emollients and moisturisers for eczema*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2017(2).
150. Khosravi, H., et al., *Treatment of Inverse/Intertriginous Psoriasis: Updated Guidelines from the Medical Board of the National Psoriasis Foundation*. Journal of Drugs in Dermatology, 2017. **16**(8): p. 760-766.
151. Wollenberg, A., et al., *Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part II*. Journal of the European Academy of Dermatology Venereology, 2018. **32**(6): p. 850-878.
152. Haider, A. and J.C.J.J. Shaw, *Treatment of acne vulgaris*. Jama, 2004. **292**(6): p. 726-735.
153. Chun, P.I.F., H.J.C.R.i.A. Lehman, and Immunology, *Current and Future Monoclonal Antibodies in the Treatment of Atopic Dermatitis*. Clinical Reviews in Allergy Immunology, 2020. **59**(2): p. 208-219.
154. Boguniewicz, M., D.Y.J.J.o.A. Leung, and C. Immunology, *Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010. **125**(1): p. 4-13.
155. Katoh, N., et al., *Clinical practice guidelines for the management of atopic dermatitis 2018*. The Journal of dermatology, 2019. **46**(12): p. 1053-1101.
156. Eichenfield, L.F., et al., *Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 2. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2014. **71**(1): p. 116-132.

157. Snetkov, P., et al., *Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer*. *Polymers*, 2020. **12**(8): p. 1800.
158. How, K.N., et al., *Hyaluronic acid-mediated drug delivery system targeting for inflammatory skin diseases: A mini review*. *Pharmacology*, 2020. **11**: p. 1105.
159. Stern, R., A.A. Asari, and K.N. Sugahara, *Hyaluronan fragments: an information-rich system*. *Eur J Cell Biol*, 2006. **85**(8): p. 699-715.
160. Bayer, I.S.J.M., *Hyaluronic acid and controlled release: A review*. 2020. **25**(11): p. 2649.
161. Cinque, B., et al., *Use of probiotics for dermal applications*, in *Probiotics*. 2011, Springer. p. 221-241.
162. Lew, L.C. and M.T.J.J.o.a.m. Liang, *Bioactives from probiotics for dermal health: functions and benefits*. *Journal of applied microbiology*, 2013. **114**(5): p. 1241-1253.
163. Hendricks, A.J., B.W. Mills, and V.Y.J.J.o.d.s. Shi, *Skin bacterial transplant in atopic dermatitis: Knowns, unknowns and emerging trends*. *Journal of dermatological science*, 2019.
164. Richert, S., A. Schrader, and K.J.I.j.o.c.s. Schrader, *Transdermal delivery of two antioxidants from different cosmetic formulations*. *International journal of cosmetic science*, 2003. **25**(1-2): p. 5-13.
165. Boukamp, P., et al., *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. *The Journal of cell biology*, 1988. **106**(3): p. 761-771.
166. Boukamp, P., et al., *Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1997. **19**(4): p. 201-214.
167. Mempel, M., et al., *Invasion of human keratinocytes by Staphylococcus aureus and intracellular bacterial persistence represent haemolysin-independent virulence mechanisms that are followed by features of necrotic and apoptotic keratinocyte cell death*. *British Journal of Dermatology*, 2002. **146**(6): p. 943-951.
168. Massey, R.C., et al., *Fibronectin-binding protein A of Staphylococcus aureus has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells*. *Cellular microbiology*, 2001. **3**(12): p. 839-851.
169. Lind, I., et al., *Purification of alpha-toxin from Staphylococcus aureus and application to cell permeabilization*. *Analytical biochemistry*, 1987. **164**(1): p. 84-9.
170. Novick, R.P., et al., *Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule*. *The EMBO journal*, 1993. **12**(10): p. 3967-3975.
171. Ngo, Q.V., et al., *Inflammatory Response Against Staphylococcus aureus via Intracellular Sensing of Nucleic Acids in Keratinocytes*. *Frontiers in immunology*, 2022. **13**: p. 828626-828626.
172. López-García, J., et al., *HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation*. *Journal of functional biomaterials*, 2014. **5**(2): p. 43-57.
173. Mohanty, S., et al., *Extract of Clinopodium bolivianum protects against E. coli invasion of uroepithelial cells*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017. **198**: p. 214-220.
174. Letourneau, J., et al., *In vitro assay of bacterial adhesion onto mammalian epithelial cells*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2011(51): p. e2783.
175. Triantaphillidou, S., R.E.J.J.o.I.S. Jacobson, and Technology, *Measurements of the modulation transfer function of image displays*. *Journal of Imaging Science and Technology*, 2004. **48**(1): p. 58-65.
176. Boreman, G.D., *Modulation transfer function in optical and electro-optical systems*. Vol. 4. 2001: SPIE press Bellingham, Washington.
177. Choi, J.H., et al., *Orostachys japonicus ethanol extract inhibits 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice and TNF- α /IFN- γ -induced TARC expression in HaCaT cells*. *Toxicological research*, 2020. **36**(2): p. 99-108.

178. Reduan, F.H., et al., *Acute and subacute dermal toxicity of ethanolic extract of Melastoma malabathricum leaves in Sprague-Dawley rats*. Toxicological Research, 2020. **36**(3): p. 203-210.
179. Duracher, L., et al., *Novel Explant Model for Skin Delivery Assessment*. Cosm. Toil, 2015. **130**(2): p. 30-40.
180. Yu, R.J. and E.J. Van Scott, *Hydroxycarboxylic acids, N-acetylamino sugars, and N-acetylamino acids*. Skinmed, 2002. **1**(2): p. 117-22; quiz 125-6.
181. Hwang, J.H., et al., *Ex Vivo Live Full-Thickness Porcine Skin Model as a Versatile In Vitro Testing Method for Skin Barrier Research*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(2).
182. Brandner, J.M., et al., *Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes*. Eur J Cell Biol, 2002. **81**(5): p. 253-63.
183. Brandner, J.M., et al., *Tight junction proteins in the skin*. Skin Pharmacol Physiol, 2006. **19**(2): p. 71-7.
184. Choi, J.-H., et al., *Synergistic effect of interleukin-6 and hyaluronic acid on cell migration and ERK activation in human keratinocytes*. Journal of Korean Medical Science, 2014. **29**(Suppl 3): p. S210-S216.
185. Bolla, B.S., et al., *Cutibacterium acnes regulates the epidermal barrier properties of HPV-KER human immortalized keratinocyte cultures*. Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 1-13.
186. Górska, S., et al., *Chemical characterization and immunomodulatory properties of polysaccharides isolated from probiotic Lactobacillus casei LOCK 0919*. Glycobiology, 2016. **26**(9): p. 1014-1024.
187. O'Neill, A.M., et al., *Identification of a human skin commensal bacterium that selectively kills Cutibacterium acnes*. Journal of Investigative Dermatology, 2020. **140**(8): p. 1619-1628. e2.
188. Stacy, A. and Y.J.S. Belkaid, *Microbial guardians of skin health*. Science, 2019. **363**(6424): p. 227-228.