

Przewidywanie przynależności gatunkowej grzybów patogennych i fenotypu lekooporności oraz badanie mechanizmów jego modulacji w gatunkach *Candida albicans* i *non-albicans*

Drożdże rodzaju *Candida* są organizmami oportunistycznymi wchodzącymi w skład naturalnej mikroflory człowieka. Bytują głównie w obrębie końcowej części przewodu pokarmowego oraz błon śluzowych jamy ustnej, i przy pełnej sprawności układu odpornościowego gospodarza nie ujawniają zdolności chorobotwórczych. W warunkach znacznie osłabionej odporności, wywołanej zwykle odbywaną terapią immunosupresyjną, chemioterapią lub zakażeniem wirusem HIV, drożdże *Candida* mogą prowadzić do zagrażających życiu infekcji układowych. Najpowszechniej jednak zakażenia grzybicze dotyczą pacjentów leczonych długotrwale antybiotykami, u których w skutek wyniszczenia flory bakteryjnej zaburzona została równowaga mikrobiologiczna. Zakażenia takie obejmują najczęściej śluzówkę jamy ustnej lub dolnych dróg rodnych kobiet i stanowią przyczynę długotrwałej i trudnej do wyleczenia infekcji.

Trudności związane z leczeniem kandydoz wynikają zwykle z niewłaściwego doboru sposobu leczenia do występującego czynnika etiologicznego. Stosowane jako lek pierwszego rzutu związki azolowe wykazują dużą skuteczność w stosunku do najpopularniejszego gatunku *Candida albicans*. Natomiast izolowane co raz powszechniej drożdże gatunku *C. glabrata* charakteryzują się wysoką opornością na tą grupę leków i uporczywe, aczkolwiek nieskuteczne leczenie takich infekcji bez wcześniejszego rozpoznania gatunku drożdży *Candida* lekami azolowymi może prowadzić do wzrostu ich wirulencji i dalszej ekspansji w głąb tkanek gospodarza. W pracy przedstawiono wyniki badań dotyczących oceny przydatności analizy HRM produktów reakcji PCR, jako narzędzia do szybkiej, prostej i wiarygodnej identyfikacji gatunkowej drożdży *Candida*. Amplifikowanym w reakcji PCR fragmentem genomu była sekwencja - ITS2, która różni się między gatunkami długością oraz składem nukleotydowym, natomiast zachowuje konserwatywność w obrębie gatunku. Wykazano skuteczność techniki HRM w rozpoznawaniu gatunków dziesięciu szczepów *Candida* pochodzenia klinicznego, 38 szczepów *Candida* wyizolowanych ze śliny zdrowych osób, a także sześciu gatunków grzybów dermatofitycznych, w oparciu o porównanie kształtów krzywych dla szczepów badanych, z kształtami krzywych wzorcowych.

Innym istotnym problemem utrudniającym leczenie zakażeń drożdżami *Candida* jest zdolność tych organizmów do nabywania oporności na stosowane leki, a często również, jak w przypadku związków azolowych, na całą grupę leków. Wśród mechanizmów nabywania oporności wymienia się mutacje w genie ERG11, kodującego enzym będący jednym z kluczowych elementów w szlaku syntezy ergosterolu, niezbędnego w prawidłowej syntezie błony komórkowej drożdży. Enzym ten, 1,4- α -demetylaza lanosterolu, jest celem działania wszystkich leków azolowych, a mutacje genu ERG11 prowadzą do ograniczenia powinowactwa tego enzymu do azoli i obniżają skuteczność ich działania przeciwgrzybiczego. W pracy zawarto wyniki badań nad wykorzystaniem metody HRM do przewidywania oporności drożdży *Candida*

albicans na podstawie mutacji w genie ERG11 wykrywanych jako zmiany kształtu krzywej topnienia produktu PCR. Skanowanie całego genu ERG11 w postaci dziewięciu zachodzących fragmentów pozwoliło wyróżnić pięć wariantów tego genu wśród puli dziewięciu szczepów pochodzenia klinicznego i szczepów referencyjnych. Występowanie wszystkich różnic potwierdzono sekwencjonowaniem. Korelację pomiędzy opornością na leki azolowe, a występowaniem polimorfizmów w genie ERG11 wykazano przez zsekwencjonowanie genu w puli dwudziestu siedmiu szczepów pochodzących ze śliny ochotników i określenie ich oporności testami ATB FUNGUS3. Wykryto dwie mutacje korelujące z opornością na leki w sposób istotny statystycznie. Podsumowując, wyniki badań wskazują, że metoda analizy HRM może stanowić dogodne narzędzie do szybkiej, taniej i wiarygodnej preselekcji próbek DNA przeznaczonych do sekwencjonowania w predykcji lekooporności szczepów *Candida albicans* i tym samym wspomóc diagnostykę zakażeń tymi drobnoustrojami.

Drugim często obserwowanym mechanizmem nabywania oporności na leki przez drożdże *Candida* jest zwiększona aktywność transportowa białek przezbłonowych z rodziny transporterów ABC. W literaturze naukowej wykazano korelację między stopniem oporności drożdży na leki, a aktywnością pomp przezbłonowych, badaną na podstawie zdolności do akumulacji barwnika fluorescencyjnego wewnątrz komórki. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badania nad wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej jako potencjalnego prostego i szybkiego testu oporności szczepów drożdży gatunku *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* i *C. krusei* różniących się profilem oporności na leki przeciwgrzybicze. Wykazano, że zaproponowany sposób testowania oporności jest zawodny i nie może być wykorzystywany jako alternatywa dla standardowej procedury oceny lekooporności drożdży *Candida*.

Doniesienia literaturowe wskazują, że niewłaściwy dobór dawki związków azolowych podczas leczenia zakażeń drożdżowych może nie tylko prowadzić do nabywania oporności przez infekujący szczep, ale również do uruchomienia szlaków odpowiedzi na stres oksydacyjny u drożdży *Candida*. Do tej pory wykryto kilka powiązań tych szlaków z rozwojem wirulencji patogennych drożdży, a także wzrostem oporności na leki, ale wiedza na ten temat jest nadal niepełna, zwłaszcza w przypadku gatunku *C. glabrata*. W pracy przedstawiono wyniki badań nad wpływem subtoksycznych dawek związków azolowych na podstawowe elementy odpowiedzi na stres oksydacyjny dla drożdży gatunków *C. albicans* i *C. glabrata*. Wykazano, że generacja wolnych rodników w obu gatunkach kształtuje się podobnie: ketokonazol i itrakonazol zwiększają generację anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru, natomiast inkubacja z flukonazolem nie wpływa znacząco na poziom tych rodników. Spośród badanych enzymów aktywność S-transferazy glutationowej oraz reduktazy zmieniała się pod wpływem różnych leków analogicznie dla gatunków *C. albicans* i *C. glabrata*, natomiast zmiany aktywności katalazy pod wpływem leków azolowych różniły się dla tych gatunków, a także dla szczepów tego samego gatunku.

Monika Caban

Abstract

Candida yeasts are opportunistic organisms that are part of the human microflora. They are mainly located within the end of the gastrointestinal tract and mucous membranes of the oral cavity, and if the the host immune system works properly they do not reveal the pathogenic potential. Under conditions of significantly impaired immunity, usually caused by immunosuppressive therapy, chemotherapy or HIV infection, *Candida* yeast can lead to life-threatening systemic infections. However, fungal infections are most common in patients treated antibiotics for a long time, and thus having impaired microbial balance as a result of the eradication of bacterial flora. These infections usually cover the mucosa of the oral cavity or lower genital tract of women and are the cause of long-lasting and difficult to cure infections.

Difficulties associated with the treatment of candidiasis are usually the result of an inappropriate choice of treatment for the underlying etiologic agent. As a first-line drug, azole compounds are highly effective against the most popular *Candida albicans* species. In contrast, isolates of *C. glabrata* are more resistant to this group of drugs and persistent, although ineffective treatment of such infections without prior recognition of the *Candida* yeast species with azole drugs may lead to increased virulence and further expansion into the host tissues. The paper presents the results of a study to assess the suitability of HRM analysis of PCR products as a tool for the rapid, simple and reliable identification of *Candida* yeast species. The amplified PCR fragment was the ITS2 sequence, which differs between species in length and nucleotide composition but is conserved within the species. The effectiveness of HRM in the identification of ten *Candida* species of clinical origin, 38 *Candida* isolates from saliva of healthy individuals, and six dermatophytic fungi, based on comparison of curve shapes for the test strains with standard curve shapes were demonstrated.

Another important problem hindering the treatment of *Candida* yeast infection is the ability of these organisms to acquire resistance to the drugs used, and often for the whole group of drugs, as it is in case of azole compounds. Resistance acquisition mechanisms include mutations in the ERG11 gene, which encodes an enzyme that is one of the key components of the ergosterol synthesis pathway required for proper synthesis of yeast cell membranes. This enzyme, 14- α -lanosterol demethylase, is the target of all azole drugs, and mutations in the ERG11 gene lead to reduction in the affinity of this enzyme to azoles and decrease the effectiveness of their antifungal action. The results of studies on the use of the HRM method to predict yeast resistance of *Candida albicans* based on ERG11 gene mutation detected as a differences in shape of melting curve of a PCR product were reported. Scanning of the entire ERG11 gene divided into nine overlapping fragments allowed to distinguish five variants of this gene among the pool of nine clinical and reference strains. The occurrence of all differences was confirmed by sequencing. Correlation between resistance to azole drugs and the occurrence of polymorphisms in the ERG11 gene was demonstrated by sequencing ERG11 gene of twenty-seven strains derived from saliva of volunteers and determining their resistance to

ATB FUNGUS3. Two mutations correlated with drug resistance were statistically significant. In conclusion, the results of the study indicate that the HRM analysis method can be a convenient tool for fast, cheap and reliable pre-selection of DNA samples to be sequenced in the drug resistance prediction of *Candida albicans* and thus help to diagnose infections with these microorganisms.

The other frequently observed mechanism of drug resistance in *Candida* yeast is the increased transport activity of transmembrane proteins of the ABC transporter family. Scientific literature has shown a correlation between the degree of yeast resistance to drugs and the activity of transmembrane pumps tested on the ability to accumulate fluorescent dye inside the cell. This paper presents the results of a study on the use of flow cytometry analysis as a potential simple and rapid resistance test for *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei* yeast strains differing in resistance profile to antifungal agents. It has been shown that the proposed method of resistance testing is unreliable and can not be used as an alternative to the standard procedure for assessing *Candida* yeast resistance.

Literature reports indicate that inappropriate dosing of azole compounds during treatment of yeast infections may not only lead to acquired resistance by the infectious strain, but also to triggering oxidative stress response pathways in *Candida* yeast. So far, several pathways have been identified to be involved with the development of virulence of pathogenic yeasts, as well as the increase in drug resistance, but the knowledge on this topic is still incomplete, especially in the case of *C. glabrata*. The dissertation presents the results of studies on the effect of suboxic doses of azole compounds on the basic elements of oxidative stress response for *C. albicans* and *C. glabrata* species. It has been shown that the generation of free radicals in both species is similar: ketoconazole and itraconazole increase the generation of superoxide anion and hydrogen peroxide, whereas incubation with fluconazole does not significantly affect the level of these radicals. Among the enzymes tested, glutathione S-transferase and reductase activity varied by different drugs analogously to *C. albicans* and *C. glabrata*, whereas changes in the activity of catalase by azole drugs differed for these species as well as for strains of the same species.

Monika Carbon