

### **Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.**

„Mechanizmy adaptacji *Staphylococcus aureus* do stresu oksydacyjnego indukowanego metodą fotodynamiczną”.

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) jest Gram-dodatnim ziarniakiem, kolonizującym jamę nosowo-gardłową i skórę człowieka. Ze względu na zdolność do wytwarzania szeregu czynników wirulencji, w tym enzymów i toksyn, jest ważnym klinicznie czynnikiem etiologicznym wielu zakażeń. *S. aureus*, w szczególności szczepy metycylinyoporne (MRSA) mogą wywoływać szereg zakażeń i chorób, takich jak choroby skóry, tkanek miękkich, choroby układowe, zatrucia pokarmowe oraz zespół wstrząsu toksycznego. Szczepy MRSA charakteryzują się wysoką lekoopornością na skutek wykształcenia szeregu mechanizmów oporności, co czyni zakażenia szpitalne wywołane gronkowcem złocistym niezwykle trudnymi w leczeniu. Biorąc pod uwagę wzrastającą lekooporność oraz deficyt nowych leków, istnieje silne zapotrzebowanie na poszukiwanie nowych terapii przeciw patogenom wielolekoopornym. Jednym z alternatywnych, w stosunku do klasycznych antybiotyków, rozwiązań jest przeciwdrobnoustrojowa inaktywacja fotodynamiczna (aPDI), która jest innowacyjną metodą zwalczania drobnoustrojów, opartą na wykorzystaniu związku chemicznego, zwanego fotouczulaczem (PS), światła widzialnego o odpowiedniej długości fali oraz tlenu cząsteczkowego. Reakcja fotodynamiczna może zachodzić według dwóch mechanizmów, które zależą m.in. od stężenia tlenu w środowisku oraz struktury PS. W obu mechanizmach dochodzi do absorpcji fotonu przez cząsteczkę PS, co prowadzi do jego wzbudzenia. Wzbudzony fotouczulacz reaguje z biomolekułami takimi jak białka, kwasy nukleinowe czy lipidy błonowe, które następnie reagują z tlenem cząsteczkowym, tworząc rodniki tlenowe i inne reaktywne formy tlenu (mechanizm I) lub przekazują energię bezpośrednio na tlen cząsteczkowy, czego efektem jest powstawanie wysoce reaktywnego tlenu singletowego (mechanizm II). Reaktywne formy tlenu uszkadzają DNA, inaktywują białka oraz powodują peroksydację lipidów błon komórkowych, które mogą prowadzić do śmierci komórki bakteryjnej. Terapia światłem niebieskim (aBL) w przeciwieństwie do aPDI nie opiera się na wykorzystaniu egzogennych fotouczulaczy, lecz endogennych związków o charakterze fotouczulającym np. wewnątrzkomórkowych porfiryn. Dotychczasowe badania naszego zespołu wykazały, że odpowiedź na fotoinaktywację jest szczepowo-zależna i powoduje uszkodzenia materiału genetycznego w żywych komórkach bakterii, co może prowadzić do procesów adaptacji drobnoustrojów do indukowanego światłem stresu oksydacyjnego. Dlatego jednym z celów niniejszej pracy doktorskiej była

identyfikacja markerów genetycznych odpowiedzi *S. aureus* na fotoinaktywację. We wszystkich doświadczeniach użyto łącznie 750 szczepów, wyizolowanych w latach 2002-2012 w Szpitalu Wojewódzkim w Gdańsku oraz w Szpitalu Wojewódzkim w Koszalinie. W zależności od odpowiedzi szczepów na aPDI, izolaty *S. aureus* sklasyfikowano jako wrażliwe, średniowrażliwe lub o podwyższonej tolerancji. Porównując wartości odpowiedzi na aPDI w populacjach MRSA i MSSA, liczba szczepów charakteryzujących się większą tolerancją na aPDI była wyższa w tej pierwszej, co pozwoliło wnioskować, że szczepy MRSA są mniej wrażliwe na ten rodzaj terapii. W celu określenia, czy obserwowane różnice w odpowiedzi na aPDI między populacjami MRSA i MSSA są związane z mechanizmami lekooporności tych szczepów, przeprowadzono pomiar lekowrażliwości na rutynowo stosowane antybiotyki oraz identyfikację mechanizmów lekooporności. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy poziomem lekooporności a odpowiedzią na aPDI, jak również mechanizmem lekooporności a odpowiedzią na aPDI, co sugeruje, że elementy inne niż te związane z mechanizmami lekooporności determinują obserwowane różnice między populacjami szczepów MRSA i MSSA. W dalszej części pracy scharakteryzowano szczepy MRSA pod względem przynależności do grupy *agr*, typu kasety *SCCmec*, kompleksu klonalnego oraz typu *spa*. Przeprowadzona charakterystyka pozwoliła zaobserwować, że szczepy pozbawione funkcjonalnego operonu *agr* wykazywały zwiększoną wrażliwość na inaktywację fotodynamiczną. Także zaklasyfikowanie *S. aureus* do jednej z czterech głównych grup polimorficznych operonu *agr* ujawniło, że występują istotne różnice w odpowiedzi na aPDI między poszczególnymi grupami *agr*. Natomiast obecność różnej kasety *SCCmec* nie wpływała na odpowiedź na aPDI. Natomiast grupowanie izolatów w kompleksy klonalne oraz typy *spa* umożliwiło identyfikację linii wrażliwych na inaktywację fotodynamiczną. Badania ujawniły, że konkretne tło genetyczne może być czynnikiem predysponującym do podwyższonej tolerancji na inaktywację fotodynamiczną.

Drugim celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie prawdopodobieństwa rozwoju tolerancji *S. aureus* na inaktywację fotodynamiczną (aPDI/aBL) oraz oznaczenie mechanizmu obserwowanej adaptacji do stresu oksydacyjnego indukowanego fotoinaktywacją. Zbadano, czy wielokrotne traktowanie hodowli *S. aureus* sub-letalnymi dawkami aPDI lub aBL może prowadzić do rozwoju tolerancji na obie terapie. Uzyskane wyniki pokazują, że sub-letalne traktowanie aPDI i aBL prowadziło do rozwoju tolerancji u *S. aureus*, jednak zaobserwowane zjawisko nie przekładało się na inne typy fotouczulaczy. Obserwowaną tolerancję cechuje stabilność fenotypowa, co sugeruje, że jest ona wynikiem zmian genetycznych. Ponadto, zaobserwowano zwiększoną częstość mutacji prowadzących do oporności na rifampicynę

oraz zwiększoną ekspresję genu polimerazy V podatnej na błędy (*umuC*), co sugeruje możliwy mechanizm rozwoju tolerancji. Dodatkowo, w hodowlach wielokrotnie traktowanych sub-letalnymi dawkami aBL zaobserwowano zmiany w postaci zwiększonej lekowrażliwości na gentamycynę oraz doksycyklinę, co potwierdza założenie, że obserwowane zjawisko tolerancji wynika ze zmian genetycznych.