

Rozprawa doktorska

**"Odpowiedź fibroblastów na obecność biofilmów tworzonych przez patogeny izolowane z przewlekłych owrzodzeń żylnych"**

mgr inż. Joanna Czajkowska

Promotor pracy doktorskiej: dr hab. Agata Markowska-Szczupak, prof. ZUT

Promotor pomocniczy' pracy doktorskiej : dr hab. Adam Feliks Junka, prof. UMW

**Streszczenie**

Ostatnie kilkadziesiąt lat to okres bardzo intensywnych przemian cywilizacyjnych, prowadzących m.in. do licznych zmian społecznych i zmian stylu życia. Starzenie się społeczeństwa i rosnąca liczba osób cierpiących na takie choroby, jak cukrzyca i choroby układu krążenia, korelują z rosnącą liczbą przypadków ran przewlekłych, takich jak zespół stopy cukrzycowej, owrzodzenia żyłne i odleżyny. Z tego względu rany przewlekłe stanowią istotny problem dla światowych systemów opieki zdrowotnej. Rana przewlekła jest definiowana jako rana, w której występuje stan zapalny i która nie ulega prawidłowemu procesowi gojenia w określonym czasie. Kluczową przyczyną przejścia ran w stan przewlekły jest ich kontaminacja, a następnie kolonizacja przez mikroorganizmy żyjące w formie biofilmu. Ze względu na szereg swoich wyjątkowych cech, biofilm cechuje się wysoką odpornością, zarówno na odpowiedź układu immunologicznego, jak i środki przeciwdrobnoustrojowe. Ponadto rozpoznanie infekcji bakteryjnych, a w szczególności takich w których obecny jest biofilm, jest zadaniem bardzo trudnym. Wynika to między innymi z ograniczeń jakie niosą obecnie dostępne narzędzia diagnostyczne. Dało to asumpt do podjęcia badań mogących stanowić punkt wyjścia do opracowania i wdrożenia skutecznej, i nieinwazyjnej metody diagnostyki infekcji rany przewlekłej.

Głównym celem rozprawy doktorskiej była analiza metabolomiczna i genetyczna infekcji wywołanej przez biofilmy drobnoustrojów, izolowanych z przewlekłych owrzodzeń żylnych goleni oraz poszukiwanie biomarkerów infekcji w oparciu o model in vitro. Badania przeprowadzono dla trzech szczepów wzorcowych mikroorganizmów: gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus*, pałeczki okrężnicy *Escherichia coli* oraz drożdżaka *Candida albicans*. Jako model infekcji rany przewlekłej wykorzystano linię komórkową prawidłowej tkanki łącznej L929.

W pierwszym etapie badań przeanalizowano proces tworzenia biofilmu in vitro przez badane szczepy mikroorganizmów z zastosowaniem metod mikrobiologii klasycznej, mikroskopii konfokalnej i skaningowej mikroskopii elektronowej. Opracowano również autorską metodę hodowli komórek prawidłowych z biofilmami drobnoustrojowymi. Określono wpływ drobnoustrojów na żywotność fibroblastów i zidentyfikowano krytyczne punkty infekcji tzw. punkty krytycznej kolonizacji. Na podstawie uzyskanych wyników wskazano moment w którym powinno się wykonywać analizy zmian metabolicznych, indukowanych poprzez interakcję gospodarz—patogen. Dowiedziono, że proces tworzenia biofilmów w warunkach, odzwierciedlających środowisko rany przewlekłej, powoduje wysoką zmienność metaboliczną. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), pozwoliły na wyróżnienie metabolitów występujących w podwyższonym stężeniu w czasie krytycznej kolonizacji monowarstwy fibroblastów przez badane patogeny. Przeprowadzona analiza genów związanych z rozwojem biofilmu pozwoliła dowieść, że interakcja komórek drobnoustrojów z fibroblastami prowadzi do aktywacji szlaków sygnałowych, odpowiedzialnych za tworzenie biofilmów w ranach. Zaproponowany, uproszczony model rany, umożliwił identyfikację metabolitów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych charakterystycznych dla zakażenia fibroblastów różnymi rodzajami patogenów. Otrzymane rezultaty badań wnoszą wkład, nie tylko w znajomość patomechanizmu tworzenia biofilmów w ranach przewlekłych, ale mogą przyczynić się do wdrożenia nowatorskiej metody prognostyki przewlekłych owrzodzeń żylnych goleni.

Słowa kluczowe: rany przewlekłe, biofilmy bakteryjne, fibroblasty, metabolomika,

28.06.2022

*Joanna Czajkowska*