

STRESZCZENIE

CECHY DETERMINUJĄCE PATOGENICZNOŚĆ MIKROGRZYBÓW ZASIEDLAJĄCYCH PRZEWÓD POKARMOWY OSÓB ZDROWYCH ORAZ PACJENTÓW Z RAKIEM JELITA GRUBEGO

Patrycja Kulas

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Dynowskiej
Katedra Mikrobiologii i Mykologii, Wydział Biologii i Biotechnologii,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Celem badań była ocena zróżnicowania ekofizjologicznego grzybów kolonizujących różne ontocenozy osób zdrowych oraz pacjentów z rakiem jelita grubego, z uwypukleniem gatunków często notowanych w mykologii medycznej oraz gatunków rzadko opisywanych, ale o wyraźnych tendencjach do ekologicznej ekspansywności w stosunku do ontosfery człowieka. Do realizacji celu przyjęto następujące zadania badawcze:

1. Ocena mykologiczna materiałów pobranych przez lekarzy onkologów (makro-, mikrohodowle, testy biochemiczne)- identyfikacja grzybów.
2. Sprawdzenie poprawności identyfikacji grzybów metodą spektrometrii masowej MALDI TOF.
3. Określenie aktywności enzymatycznej wyizolowanych grzybów z wykorzystaniem testów API ZYM firmy Biomerieux.
4. Określenie lekowrażliwości wyizolowanych grzybów metodą dyfuzyjno-krażkową w żelu agarowym.
5. Próba określenia tempa wzrostu grzybów w analizowanych odcinkach przewodu pokarmowego z wykorzystaniem szczepów *Candida albicans*, gatunku zdolnego do tworzenia „germ tubes”.

Materiał badawczy, stanowiły grzyby wyizolowane z jamy ustnej, jelita grubego i odbytu 30 osób zdrowych- grupa kontrolna (15 kobiet, 15 mężczyzn- do badań przystąpiło 55) oraz od 51 pacjentów ze zdiagnozowanym histopatologicznie rakiem jelita grubego (24 kobiet, 27 mężczyzn- do badań przystąpiło 65 osób). W badaniach wykorzystano: wymazy, wycinki śródoperacyjne, endoskopię pobierane przez lekarzy klinicystów, współpracujących od wielu lat z Katedrą Mikrobiologii i Mykologii Uniwersytetu Warmińsko- Mazurskiego.

Materiały biologiczne poddane były standardowej diagnostyce zalecanej w laboratoriach mykologicznych (makrohodowle na podłożu Sabourauda, mikrohodowle na podłożu Nickersona, testy biochemiczne, podłoże chromogenne CHROMagar Candida). W celu analizy niektórych cech fizjologicznych badanych izolatów oceniono ich lekowrażliwość na 8 antymykotyków metodą dyfuzji w żelu agarowym, przy użyciu krążków antymykotykowych firmy MastDiagnostics, a aktywność enzymatyczną oceniono przy użyciu testów API ZYM firmy BioMerieux. Wszystkie szczepy poddano identyfikacji MALDI-TOF (spektrometria mas), którą wykonano w Wojewódzkiej Stacji Epidemiologicznej w Olsztynie.

Uzyskane wyniki wskazują na obecność grzybów w przewodzie pokarmowym zarówno osób zdrowych jak i chorych. W grupie kontrolnej osoby takie stanowiły 54,5%, a u pacjentów z rakiem jelita grubego 78,5 %. W grupie kontrolnej wyodrębniono 10 gatunków przyporządkowanych do 4 rodzajów: *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* i *Trichosporon*. Łączna liczba izolatów wynosiła 61. Najliczniej, reprezentowany był rodzaj *Candida* (43

izolaty= 70,4% zbadanych) z wyraźną dominacją *C. albicans* – 22 izolaty. Do rzadko notowanych w mykologii medycznej zaliczono: *Rh. glutinis*, *Rh. minuta*, *S. cerevisiae*, *T. beigellii* i *T. inkin*. Liczba izolatów uzyskanych z poszczególnych ontocenoz była porównywalna u kobiet i u mężczyzn: największa w jamie ustnej (14 i 16), nieco mniejsza w odbycie (11 i 13), najmniejsza w jelicie grubym (3 i 4), ale zawsze większa u mężczyzn. U pacjentów z rakiem jelita grubego wyodrębniono 11 gatunków przyporządkowanych do 3 rodzajów: *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*. Rodzaj *Candida* był najliczniej reprezentowany, dominował *C. albicans*. Wyłącznie u kobiet odnotowano *C. tropicalis*, a wyłącznie u mężczyzn *Rh. glutinis* i *T. inkin* – aż 15 izolatów. Liczba gatunków notowanych w poszczególnych ontocenozach jest bardzo zbliżona i wynosi od 8 do 9 u kobiet i 10 gatunków u mężczyzn, podobnie jak liczba izolatów: od 24 (kobiety) do 26 (mężczyźni) w jamie ustnej, od 15 (kobiety) do 29 (mężczyźni) w odbycie i od 21 (kobiety) do 24 (mężczyźni) w ontocenozie jelita grubego. Liczby te są zawsze nieco wyższe u mężczyzn.

Wyniki dotyczące aktywności enzymatycznej bardzo wyraźnie wskazują, że u osób z nowotworami aktywność i spektrum produkowanych enzymów, tych samych gatunków grzybów, w tych samych ontocenozach osiągają znacznie wyższe wartości u pacjentów nowotworowych niż u osób zdrowych. U osób zdrowych aktywność enzymatyczna była na niskim i średnim poziomie (do 20 nanomoli hydrolizowanego substratu). U pacjentów nowotworowych aktywność enzymatyczna osiągnęła poziom wysoki i bardzo wysoki (20- 40 i > nanomoli hydrolizowanego substratu). Szczególnie dotyczy to grzybów zasiedlających, zmienione nowotworowo, jelito grube.

Badanie skuteczności testowanych leków nie przyniosło zbyt obiecujących wyników. Ogólnie stwierdzono bardzo wysoką i wysoką lekooporność, a u licznych izolatów wrażliwość była na niskim poziomie lub jej nie notowano. Wyjątek stanowi amfoterycyna B. Tylko w jej przypadku nie odnotowano izolatów opornych i wtórnie opornych, a u kilku gatunków, także słabo wrażliwych.

Wzrost grzybów uzyskanych od osób zdrowych był wyraźny, a poszczególne jego fazy łatwiejsze do uchwycenia niż w przypadku pacjentów nowotworowych. Wprawdzie grzyby pochodzące od tych drugich zaczęły rosnąć szybciej, ale wzrost ich był nieregularny. W przypadku niniejszych badań tempo i zakres zmian w znacznej mierze zależały od nowotworu. Najwyraźniej uwidoczniło się to w wynikach dotyczących aktywności enzymatycznej grzybów, znacznie wyższej u osób chorych. Ponadto u gatunków o wzrastającej ekspansywności w jelicie grubym, zmienionym nowotworowo aktywność niektórych enzymów była wyższa. To niepokojący fakt, gdyż właściwości enzymatyczne decydują o stopniu patogeniczności grzybów. W przeprowadzonych badaniach wysoki poziom aktywności enzymatycznej z reguły korelował ze spadkiem lekowrażliwości, a zróżnicowanie tej aktywności pociągało za sobą zróżnicowanie tempa wzrostu.

Należy podkreślić, że obecność grzybów u pacjentów nowotworowych może być następstwem rozwoju nowotworu lub też grzyby opanowując wcześniej ontosferę były biologicznym czynnikiem karcinogennym.