



**POLITECHNIKA  
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: **Ewelina Kurzyk**  
Dyscyplina naukowa: **nauki chemiczne - biotechnologia**

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

Tytuł rozprawy w języku polskim:

**Występowanie oraz charakterystyka molekularna oporności na azole wśród klinicznych i środowiskowych izolatów *Aspergillus fumigatus***

Tytuł rozprawy w języku angielskim:

**Incidence and molecular characteristics of azole resistance within clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates**

Promotor	Promotor pomocniczy
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
<b>dr hab. inż. Anna Brillowska-Dąbrowska, prof. nadzw. PG</b>	<b>dr inż. Piotr Szweda</b>

Gdańsk, rok 2018



*Na powstanie i ostateczny kształt mojej pracy doktorskiej miało wpływ wiele osób, którym chciałabym w tym miejscu bardzo serdecznie podziękować.*

*W pierwszej kolejności dziękuję Promotor mojej pracy dr hab. inż. Annie Brillowskiej-Dąbrowskiej prof. nadzw. PG za całą przekazaną mi przez te lata wiedzę oraz wszelką pomoc. Dziękuję za niezliczone godziny rozmów, dyskusji, konsultacji oraz setki wymienionych maili. Miałam w życiu ogromne szczęście, że mogłam pracować pod okiem tak wspaniałego specjalisty, ale przede wszystkim, że mogłam współpracować z Takim Człowiekiem. Dziękuję za to, że poza merytorycznym i naukowym wsparciem mogłam liczyć na wspaniałą atmosferę pracy, wyrozumiałość w związku z różnymi napotkanymi okolicznościami i nieocenioną pomoc – zawsze wtedy, kiedy jej potrzebowałam.*

*Chciałabym również podziękować Promotorowi Pomocniczemu tej pracy dr inż. Piotrowi Szwedzie, za poświęcony czas - szczególnie w czasie stawiania przeze mnie „pierwszych kroków” w samodzielnej pracy laboratoryjnej. Dziękuję za wszystkie udzielone mi odpowiedzi na pytania związane z używanymi metodykami i obsługą kolejnych „nowych” dla mnie sprzętów i aparatur.*

*Szczególne podziękowania należą się również Pani dr n. med. Urszuli Nawrot z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Dziękuję za nieocenioną pomoc w tworzeniu kolekcji szczepów wykorzystywanych w niniejszej pracy i owocną współpracę.*

*Serdecznie dziękuję także Koleżankom z Zespołu Mykologii Molekularnej z 017ChA: mgr inż. Natalii Kobyłak i mgr inż. Martynie Mroczyńskiej. Martynie - za „pomocną dłoń” a nawet dwie, w momentach kiedy okazywało się, że moje dłonie to za mało; Natalii - za podtrzymywanie mnie na duchu, kiedy przychodziły różnego rodzaju trudności.*

*Wszystkim Pracownikom Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii oraz Katedry Technologii Leków i Biochemii za bardzo miłą atmosferę pracy, wszelkie wskazówki i sugestie oraz życzliwe udostępnianie wszelkich potrzebnych aparatur i sprzętów bez których nie byłabym w stanie ukończyć tej pracy. Panu dr hab. inż. Hubertowi Cieślińskiemu dziękuję za recenzje sprawozdań rocznych.*

*Koleżankom i Kolegom z Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii za niesamowity klimat pracy i godziny spędzone na bardziej i mniej merytorycznych dyskusjach.*

*Na koniec, pragnę także szczególnie podziękować całej mojej Rodzinie a przede wszystkim mojemu Mężowi Mateuszowi. Dziękuję za umożliwienie mi naukowego rozwoju, cierpliwość i nieocenione wsparcie oraz wiarę w moje możliwości nawet wtedy, kiedy sama w siebie wątpiłam.*

*Z całego serca dziękuję,*

*Ewelina Kurzyk*



Praca współfinansowana ze środków NCN w ramach projektu OPUS  
nr 2013/11/B/NZ7/04935: „Występowanie oraz charakterystyka molekularna oporności na azole  
wśród klinicznych i środowiskowych izolatów *Aspergillus fumigatus*.”

## Spis treści

<b>STRESZCZENIE PO POLSKU .....</b>	<b>8</b>
<b>STRESZCZENIE PO ANGIELSKU.....</b>	<b>10</b>
<b>SPIS NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI.....</b>	<b>10</b>
<b>CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....</b>	<b>13</b>
<b>1. <i>Aspergillus spp.</i>.....</b>	<b>13</b>
1.1. Charakterystyka gatunku <i>A. fumigatus</i> .....	14
1.2. Chorobotwórczość szczepów <i>A. fumigatus</i> .....	15
1.3. Choroby wywoływane przez grzyby z rodzaju <i>A. fumigatus</i> .....	16
1.3.1. Alergiczna aspergiloza oskrzelowo-płucna .....	16
1.3.2. Grzybniak kropidlakowy .....	17
1.3.3. Przewlekła martwicza postać aspergilozy .....	17
1.3.4. Inwazyjna aspergiloza.....	18
1.3.5. Choroby zwierząt wywoływane przez <i>A. fumigatus</i> .....	19
1.4. Metody diagnostyki grzybów .....	20
1.4.1. Diagnostyka klasyczna i serologiczna.....	21
1.4.2. Diagnostyka molekularna.....	23
<b>2. Terapia grzybic wywołowanych przez <i>A. fumigatus</i>.....</b>	<b>25</b>
2.1. Stosowanie azoli w leczeniu chorób wywołowanych przez <i>A. fumigatus</i> .....	25
2.2. Stosowanie azoli w rolnictwie .....	27
2.3. Mechanizm działania azoli na komórki grzybów.....	30
<b>3. Oporność <i>A. fumigatus</i> na azole.....</b>	<b>32</b>
3.1. Nabywanie oporności na azole przez <i>A. fumigatus</i> .....	32
3.2. Molekularny mechanizm oporności <i>A. fumigatus</i> na azole.....	34
3.2.1. Mutacje w genie <i>CYP51A</i> .....	34
3.2.2. Nadekspresja genu <i>CYP51A</i> i <i>CYP51B</i> .....	37
3.2.3. Nadekspresja genów kodujących pompy błonowe .....	39
3.2.4. Modyfikacje szlaku sygnałowego w odpowiedzi na stres.....	39
3.2.5. Inne mechanizmy oporności <i>A. fumigatus</i> na azole .....	40
<b>4. Strategie poszukiwania nowych leków.....</b>	<b>42</b>
<b>5. Globalny problem nabywania przez <i>A. fumigatus</i> oporności na azole.....</b>	<b>44</b>
<b>CEL I ZAKRES PRACY .....</b>	<b>46</b>



<b>CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA .....</b>	<b>47</b>
<b>6. Materiały .....</b>	<b>47</b>
6.1. Izolaty <i>A. fumigatus</i> .....	47
6.2. Odczynniki i materiały wykorzystywane w badaniach .....	50
6.2.1. Odczynniki i materiały wykorzystywane do hodowli <i>A. fumigatus</i> .....	50
6.2.2. Odczynniki wykorzystywane do izolacji DNA .....	50
6.2.3. Odczynniki, zestawy i materiały wykorzystywane do identyfikacji gatunkowej..	50
6.2.4. Odczynniki i materiały wykorzystywane do oznaczenia wrażliwości na antymikotyki .....	50
6.2.5. Odczynniki, zestawy i materiały wykorzystywane do sekwencjonowania genu <i>CYP51A</i> .....	51
6.2.6. Odczynniki i materiały wykorzystywane do analizy tandemowych powtórzeń w rejonie promotora genu <i>CYP51A</i> .....	51
6.2.7. Odczynniki, zestawy i materiały wykorzystywane do analizy ekspresji genów ...	51
<b>7. Metody .....</b>	<b>52</b>
7.1. Hodowla <i>A. fumigatus</i> .....	52
7.2. Izolacja DNA .....	52
7.3. Identyfikacja gatunkowa .....	52
7.4. Oznaczenie wrażliwości izolatów <i>A. fumigatus</i> na posakonazol, itrakonazol i worikonazol .....	54
7.5. Sekwencjonowanie genu <i>CYP51A</i> .....	54
7.6. Badanie występowania powtórzeń tandemowej sekwencji (TR <sub>34</sub> ) w rejonie promotora genu <i>CYP51A</i> .....	56
7.7. Wpływ obecności azoli na izolaty <i>A. fumigatus</i> .....	57
7.7.1. Hodowla izolatów <i>A. fumigatus</i> .....	59
7.7.2. Badanie poziomów ekspresji genów .....	59
7.7.2.1. Izolacja RNA i synteza cDNA .....	59
7.7.2.2. Real-time PCR .....	60
7.7.2.3. Analiza poziomów ekspresji genów .....	63
7.7.2.3.1. Analiza poziomów ekspresji genów metodą komparatywną .....	64
7.7.2.3.2. Analiza zmian poziomów ekspresji genów metodą Pfaffla .....	65
7.7.3. Oznaczanie wrażliwości na azole .....	65
7.8. Oznaczanie wrażliwości izolatów <i>A. fumigatus</i> na izawukonazol .....	66
<b>8. Wyniki i wnioski .....</b>	<b>67</b>



8.1. Potwierdzenie przynależności gatunkowej badanych izolatów .....	67
8.2. Wrażliwość izolatów <i>A. fumigatus</i> na posakonazol, itraconazol i vorikonazol .....	67
8.3. Analiza sekwencji genu <i>CYP51A</i> izolatów <i>A. fumigatus</i> .....	73
8.4. Występowanie tandemowych powtórzeń (TR <sub>34</sub> ) w rejonie promotora genu <i>CYP51A</i> . .....	75
8.5. Badanie wpływu azoli na izolaty <i>A. fumigatus</i> .....	76
8.5.1. Oznaczenia wrażliwości na azole izolatów <i>A. fumigatus</i> hodowanych jednokrotnie na podłożach z dodatkiem antymikotyków .....	76
8.5.2. Badanie poziomów ekspresji genów izolatów <i>A. fumigatus</i> metodą komparatywną .....	77
8.5.2.1. Analiza poziomów ekspresji genów izolatów <i>A. fumigatus</i> hodowanych na podłożu Sabouraud .....	77
8.5.2.2. Analiza zmian poziomów ekspresji genów izolatów <i>A. fumigatus</i> hodowanych na podłożu z posakonazolem .....	78
8.5.2.3. Analiza zmian poziomów ekspresji genów izolatów <i>A. fumigatus</i> hodowanych na podłożu z itraconazolem .....	82
8.5.2.4. Analiza zmian poziomów ekspresji genów izolatów <i>A. fumigatus</i> hodowanych na podłożu z vorikonazolem .....	86
8.5.3. Badanie zmian w poziomach ekspresji genów <i>A. fumigatus</i> po hodowli na podłożach z dodatkiem azoli – metoda Pfaffla .....	91
8.5.3.1. Analiza zmian poziomów ekspresji genu <i>CYP51A</i> .....	93
8.5.3.2. Analiza zmian poziomów ekspresji genu <i>CYP51B</i> .....	96
8.5.3.3. Analiza zmian poziomów ekspresji genu <i>MDR1</i> .....	99
8.5.3.4. Analiza zmian poziomów ekspresji genu <i>MDR2</i> .....	102
8.5.3.5. Analiza zmian poziomów ekspresji genu <i>MDR3</i> .....	105
8.5.3.6. Analiza zmian poziomów ekspresji genu <i>ATRF</i> .....	108
8.5.4. Wpływ długotrwałej ekspozycji izolatów <i>A. fumigatus</i> na działanie azoli oraz skutki zaprzestania ekspozycji.....	111
8.5.4.1. Zmiany w morfologii izolatów <i>A. fumigatus</i> podczas hodowli.....	111
8.5.4.2. Oznaczenia wrażliwości na azole wielokrotnie pasażowanych izolatów <i>A. fumigatus</i> .....	114
8.5.4.3. Analiza zmian poziomów ekspresji genów pasażowanych izolatów <i>A. fumigatus</i> wykonana metodą komparatywną .....	121
8.5.4.4. Analiza zmian poziomów ekspresji genów pasażowanych izolatów <i>A. fumigatus</i> wykonana metodą Pfaffla .....	124



8.5.4.4.1. Analiza zmian poziomów ekspresji genów izolatów <i>A. fumigatus</i> hodowanych na podłożu z dodatkiem posakonazolu .....	125
8.5.4.4.2. Analiza zmian poziomów ekspresji genów izolatów <i>A. fumigatus</i> hodowanych na podłożu z dodatkiem worikonazolu .....	127
8.5.4.4.3. Analiza zmian poziomów ekspresji genów izolatów <i>A. fumigatus</i> hodowanych na podłożu z dodatkiem itrakonazolu .....	129
8.6. Wrażliwość izolatów <i>A. fumigatus</i> na izawukonazol .....	131
<b>DYSKUSJA .....</b>	<b>134</b>
<b>WNIOSKI KOŃCOWE .....</b>	<b>150</b>
<b>PERSPEKTYWY .....</b>	<b>151</b>
<b>OGÓLNY SCHEMAT STOSOWANEJ METODYKI .....</b>	<b>153</b>
<b>SPIS TABEL .....</b>	<b>154</b>
<b>SPIS RYCIN .....</b>	<b>157</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>159</b>
<b>WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO .....</b>	<b>172</b>



## STRESZCZENIE PO POLSKU

*Aspergillus fumigatus* jest grzybem pleśniowym szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. U osób z obniżoną odpornością może powodować różnego rodzaju infekcje. W ostatnich latach częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych powodowanych przez *A. fumigatus* dramatycznie wzrasta. Niestety wzrasta także wskaźnik śmiertelności. Lekami tzw. pierwszego rzutu stosowanymi w leczeniu chorób wywołanych przez *A. fumigatus* są azole. Jako jedyna grupa związków, są stosowane zarówno w medycynie, jak i w rolnictwie. Problem ich nadmiernego stosowania dotyczy głównie Europy, gdzie co roku na 50% gruntów produkcyjnych stosowane są azolowe fungicydy. Tak powszechne użycie azoli prowadzi do selekcji szczepów opornych. Wzrost oporności na azole stał się problemem, który wymaga ciągłego nadzoru międzynarodowego i prowadzenia badań epidemiologicznych, a także konieczności badania mechanizmów nabywania oporności.

Celem badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej było sprawdzenie występowania oporności na azole grzybów *A. fumigatus* pochodzących z Polski oraz jej molekularna charakterystyka.

W toku badań utworzono kolekcję 200 izolatów *A. fumigatus* pochodzących z różnych miejsc Polski. W skład kolekcji wchodziły izolaty kliniczne, środowiskowe i weterynaryjne. Przynależność gatunkową badanych grzybów potwierdzono metodami diagnostyki klasycznej oraz molekularnej. Następnie oznaczono lekowrażliwość badanych izolatów na posakonazol, itraconazol i vorikonazol według wytycznych EUCAST. W toku przeprowadzonych badań wykazano obecność izolatów opornych na azole.

W ramach pracy nad niniejszą rozprawą przeanalizowano występowanie różnych mechanizmów oporności na azole u badanych izolatów: mutacje punktowe w genie *CYP51A*, występowanie tandemowych powtórzeń w rejonie promotora genu *CYP51A* (TR<sub>34</sub>), ekspresję genów *CYP51A*, *CYP51B*, *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF*. W toku przeprowadzonych badań zaobserwowano występowanie różnych mutacji w genie *CYP51A* w tym jednej, którą udało się powiązać z opornością na azole (mutacja L98H skorelowana z TR<sub>34</sub>), a także zaobserwowano różnice w poziomach ekspresji badanych genów pomiędzy izolatami opornymi i wrażliwymi na azole. W trakcie badań własnych sprawdzono także wpływ obecności azoli w medium hodowlanym na grzyby z gatunku *A. fumigatus*. Sprawdzono wpływ obecności vorikonazolu, posakonazolu i itraconazolu w medium hodowlanym na poziomy ekspresji genów i zmiany wartości MIC. W toku przeprowadzonych badań zaobserwowano nabycie oporności na azole w wyniku długotrwałej ekspozycji, zmiany poziomów ekspresji badanych genów oraz zmiany w morfologii grzybów w obecności posakonazolu i itraconazolu.

W toku przeprowadzonych badań oznaczono także wrażliwość izolatów na izawukonazol - nowy związek azolowy dopuszczony do stosowania u ludzi. Zaobserwowano występowanie oporności na izawukonazol zarówno izolatów opornych jak i wrażliwych na pozostałe azole.

## STRESZCZENIE PO ANGIELSKU

*Aspergillus fumigatus* is a mold widely distributed in nature. In people with reduced immunity, it can cause various types of infections. In recent years, the incidence of invasive fungal infections caused by *A. fumigatus* has increased dramatically. Unfortunately, mortality also increases. Azoles are the first line drugs used to treat diseases caused by *A. fumigatus*. Azoles are the only group of compounds used both in medicine and in agriculture. The problem of excessive use concerns mainly Europe, where azole fungicides are used every year for 50% of production lands. Such widespread use of azoles leads to the selection of resistant strains. The increase in azole resistance has become a problem that requires continuous international surveillance and epidemiological research, as well as the need to study mechanisms for acquiring resistance.

The aim of the research conducted as part of this doctoral thesis was to check the occurrence of resistance to azoles of *A. fumigatus* fungi from Poland and their molecular characteristics.

In the course of the research, a collection of 200 isolates of *A. fumigatus* from various places in Poland was created. The collection included clinical, environmental and veterinary isolates. The species belonging to the studied fungi was confirmed by classical and molecular diagnostics methods. Next, the susceptibility of the tested isolates to posaconazole itraconazole and voriconazole according to EUCAST guidelines was determined. In the course of the tests carried out, the presence of azole resistant isolates was demonstrated.

As part of the work of this dissertation the occurrence of various mechanisms of azole resistance in tested isolates was analyzed: point mutations in the *CYP51A* gene, occurrence of tandem repeats in the region of the *CYP51A* gene promoter (TR<sub>34</sub>), *CYP51A*, *CYP51B*, *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF* gene expression. In the course of the conducted studies, different mutations in the *CYP51A* gene were observed, including one that was successfully associated with azole resistance (L98H mutation correlated with TR<sub>34</sub>), as well as differences in expression levels of the examined genes between resistant and azole sensitive isolates. In the course of own research, the effect of azoles in culture medium on *A. fumigatus* species was also checked. The effects on gene expression levels and changes in MIC values of different concentrations of itraconazole, voriconazole and posaconazole and the different length of exposure to these compounds were tested. In the course of the conducted research, the acquisition of azole resistance was observed as a result of long-term exposure, changes in expression levels of the examined genes and changes in fungal morphology in the presence of posaconazole and itraconazole.

In the course of the conducted tests, the sensitivity of isolates to isavuconazole was also determined - a new azole compound approved for use in humans. Isavuconazole resistance was observed both in resistant and sensitive isolates of other azoles.



## SPIS NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

A.	<i>Aspergillus</i>
A	nukleotyd adeninowy (w łańcuchu nukleotydowym)
A	alanina (w łańcuchu aminokwasowym)
ABC	rodzina białek transporterów wielolekowych, ang. <i>ATP Binding Cassette</i>
ABPA	alergiczna aspergiloza oskrzelowo-płucna (ang. <i>Allergic Bronchopulmonary Aspergilosis</i> )
AIDS	zespół nabytego niedoboru odporności (ang. <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> )
ang.	z angielskiego
<i>ATRF</i>	gen kodujący transporter błonowy ABC
BAL	bronchoskopia z płukaniem oskrzelowo-pęcherzykowym
$\beta$ -tubulina	gen kodujący tu bulinę, referencyjny gen <i>A. fumigatus</i>
C	cysteina (w łańcuchu aminokwasowym)
C	nukleotyd cytozynowy (w łańcuchu nukleotydowym)
cDNA	komplementarne DNA uzyskane poprzez odwrotną transkrypcję na matrycy mRNA (ang. <i>complementary DNA</i> )
CYP51A	białko CYP51A u <i>Aspergillus spp.</i>
<i>CYP51A</i>	gen kodujący białko CYP51A
<i>CYP51B</i>	gen kodujący białko CYP51B
D	kwas asparaginowy
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>DeoxyriboNucleic Acid</i> )
E	kwas glutaminowy
ELISA	test immunoenzymatyczny lub immunoenzymosorpcyjny (ang. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
ETS	niekodujący region rybosomalnego DNA, część fragmentu IGS (ang. <i>External TranScribed region</i> )
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
F	fenyloalanina
G	glicyna
G	nukleotyd guaninowy (w łańcuchu nukleotydowym)
GMS	barwnik wykorzystywany w barwieniu histopatologicznym (ang. <i>Gomari's Methanamine Silver stain</i> )
H	histydyna
I	izoleucyna
IGS	region niekodujący rybosomalnego DNA (ang. <i>InterGenic Spacer region</i> )
ITS	wewnętrzny region niekodujący (ang. <i>Internal Transcribed Spacer</i> )
ITR	itrazonazol
IZA	izawukonazol



K	lizyna
L	leucyna
L98H	rezultat mutacji powodującej zmianę sensu: zamiana tyminy na adeninę w 293 pozycji łańcucha nukleotydowego, powodująca zamianę leucyny na histydynę w 98 pozycji łańcucha aminokwasowego
M	metionina
MDR1	gen kodujący białko MDR1
MDR2	gen kodujący białko MDR2
MDR3	gen kodujący białko MDR3
MFS	rodzina białek MFS ( <i>ang. Major Facilitator Superfamily</i> )
MIC	minimalne stężenie hamujące wzrost ( <i>ang. Minimal Inhibitory Concentration</i> )
MOPS	kwas 3-( <i>N</i> -morfolino)propanosulfonowy
N	asparagina
P	prolina
PAS	barwnik wykorzystywany w barwieniu histopatologicznym ( <i>ang. Periodic Acid-Schiff</i> )
PCR	reakcja łańcuchowej polimerazy ( <i>ang. Polymerase Chain Reaction</i> )
POS	posakonazol
Q	glutamina
R	arginina
RNA	kwas rybonukleinowy ( <i>ang. Ribonucleic Acid</i> )
RPMI	Podłoże do hodowli komórkowych, wykorzystywane do wyznaczania wartości MIC ( <i>ang. Roswell Park Memorial Institute Medium</i> )
S	seryna
SAB	podłoże agarowe Sabouraud
SRBA	białko odgrywające rolę w oporności na azole przez regulację genu <i>CYP51A</i>
SRBAP	rodzina białek mająca znaczenie podczas biosyntezy steroli ( <i>ang. Sterole Regulator Element Binding Protein</i> )
T	nukleotyd tyminowy (w łańcuchu nukleotydowym)
T	treonina
TR <sub>34</sub>	powtórzenie 34-nukleotydowej sekwencji promotora (z <i>ang. Tandem Repeats</i> ) w genie <i>CYP51A</i>
TR <sub>34</sub> L98H	powtórzenie 34-nukleotydowej sekwencji promotora w genie <i>CYP51A</i> powiązana z zamianą lizyny na histydynę w 98 pozycji aminokwasowej
V	walina
VOR	worikonazol
W	tryptofan
WOR	worikonazol
Y	tyrozyna



## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. *Aspergillus spp.*

Grzyby z rodzaju *Aspergillus* (A.) zostały po raz pierwszy zidentyfikowane i skatalogowane w 1729 roku przez włoskiego biologa - księdza Pier Antonio Micheli. Wygląd komórek grzybów oglądanych pod mikroskopem przypominał mu kropidło (*aspergillum*), służące do kropienia wodą święconą. Dlatego rodzaj ten otrzymał nazwę kropidlaki: *Aspergillus* [Micheli P, 1976]. W 1815 roku A. Mayer po raz pierwszy zaobserwował występowanie kropidlaków u ptaków. W 1842 roku, brytyjski lekarz John Hughes Bennett odkrył pierwszy przypadek aspergilozy płuc u ludzi [Wahl E, 1928]. Około sto lat później, w 1940 roku Arthur Henrici zaobserwował, że rolnicy stanowią grupę szczególnie podatną na aspergiloze [Henrici A, 1940]. Niedługo po tym, bo w 1948 roku zaobserwowano, że u pacjentów z obniżoną sprawnością układu immunologicznego infekcje mogą rozsiewać się poprzez układ krwionośny i powodować zakażenia układowe lub inwazyjne [Gerstl B, 1948]. Po upływie kolejnych pięciu lat (w 1953 roku) Rankin zaobserwował, że grzyby z rodzaju *Aspergillus* mogą wywoływać oportunistyczne zakażenia u pacjentów z obniżoną odpornością.

Obecnie, do rodzaju *Aspergillus*, niekiedy jeszcze zwanego *Neosartorya* zalicza się około 670 gatunków grzybów. Ponad 40 z nich jest uznawanych za chorobotwórcze dla człowieka i mogą powodować szereg różnego rodzaju zakażeń. Szacuje się, że nawet 500 000 pacjentów rocznie cierpi na inwazyjną postać aspergilozy, 4 mln pacjentów rocznie zapada na alergiczną aspergilozę oskrzelowo-płucną, a 3 mln osób boryka się z przewlekłą aspergilozą płuc [Stensvold C, 2012].

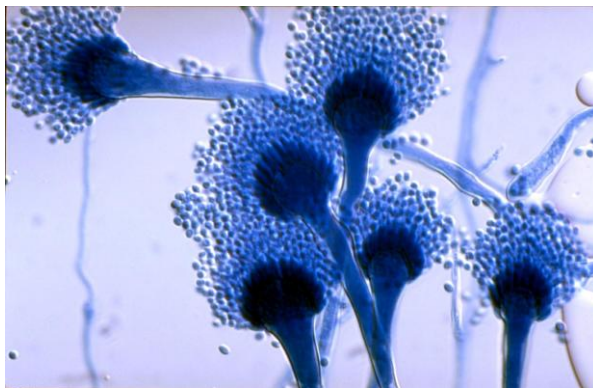
Gatunkiem, który jest najczęstszą przyczyną chorób u ludzi jest *A. fumigatus*. Do innych, mniej patogennych gatunków, niemniej jednak stanowiących istotny czynnik etiologiczny grzybic należą *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* i *A. nidulans*. Do rozwoju infekcji powodowanych przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* dochodzi w przypadku obniżenia sprawności ludzkiego układu immunologicznego. W organizmie powstają w ten sposób sprzyjające warunki środowiskowe dla rozwoju grzybów. W związku z powyższym, istotne jest, aby systemy identyfikacyjne obejmowały zarówno gatunki chorobotwórcze, jak i te, które do tej pory nie były opisywane jako czynnik zakażenia [Hope W, 2005; Soubani A, 2002; Krzyściak P, 2011].

Komórki grzybów z rodzaju *Aspergillus* charakteryzują się rozdętą szczytową częścią zwaną pęcherzykiem (*vesiculum*). Pęcherzyki charakteryzują się – w zależności od gatunku - różnorodnym kształtem: od okrągłych do maczugowatych. Pęcherzyki umieszczone są na długim trzonku - zwanym łodygą – który rozszerza się przy podstawie, przez co kształtem przypomina odwróconą literę „T”. Na pęcherzyku znajdują się struktury zarodnikotwórcze. Komórki wytwarzające zarodniki ułożone są bezpośrednio na pęcherzyku - tworząc jednorzędowy układ komórek lub pośrednio, dając układ dwurzędowy [Krzyściak P, 2011]. Budowę konidioforu grzybów z rodzaju *Aspergillus* przedstawiono na rycinie pierwszej (Ryc. 1.).

Ryc. 1. Budowa konidioforu grzybów z rodzaju *Aspergillus* na przykładzie gatunku *A. fumigatus*

[źródło:

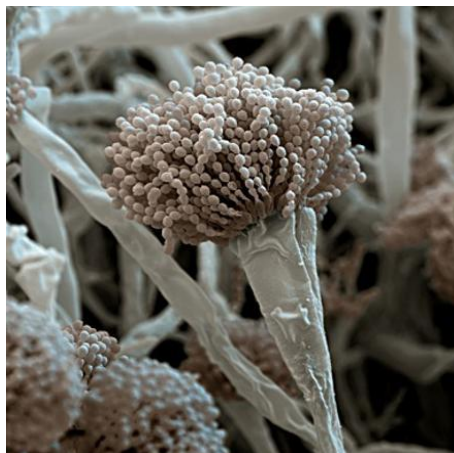
<https://alchetron.com/Aspergillus-fumigatus#->]



### 1.1. Charakterystyka gatunku *A. fumigatus*

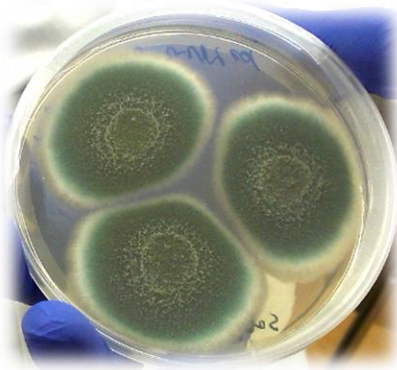
*A. fumigatus* (polska nazwa zwyczajowa: kropidlak popielaty) jest saprofitycznym grzybem pleśniowym, powszechnie występującym w przyrodzie. Jego naturalną niszą ekologiczną są: gleba, gnijące resztki roślinne, wilgotne ściany lub kurz. Występuje na całym świecie i odgrywa bardzo ważną rolę w obiegu węgla i azotu w przyrodzie. Przedstawiciele tego gatunku produkują tysiące zarodników. Zarodniki grzybów z rodzaju *Aspergillus* znajdują się na konidioforach, z których mogą zostać uwolnione. Zarodniki, dzięki swej niewielkiej średnicy i masie swobodnie unoszą się w powietrzu, co sprawia, że wraz z wdychem dostają się do płuc ludzi i zwierząt. Mała wielkość zarodników umożliwia im także przenikanie z pęcherzyków płucnych do krwioobiegu [Latgé J, 1999; Soubani A, 2002; Kayser F, 2007].

Konidiofory *A. fumigatus* zbudowane są z główek umieszczonych na krótkich, gładkościennych trzonkach. Główki konidioforów ułożone są w układzie kolumnowym, choć w przypadku młodych konidioforów mogą mieć również układ promienisty. Główki konidioforów ułożone są na trzonku, który w swej szczytowej części ma często zielone zabarwienie. Trzonek jest wysoki na około 300  $\mu\text{m}$ , a jego średnica mierzy około 5-8  $\mu\text{m}$ . Pęcherzyki przechodząc z trzonka przyjmują kształt maczugi (szerokość 20-30  $\mu\text{m}$ ). Układ strzępek końcowych jest jednorzędowy. Komórki wytwarzające zarodniki są zielone i charakteryzują się wielkością 6-8 x 2-3  $\mu\text{m}$ . Zarodniki są okrągłe, szorstkie, o zielonej barwie. Ich średnica wynosi 2,5-3  $\mu\text{m}$  [Krzyściak P, 2011; Shapiro R, 2011; Latgé J, 1999].



Ryc. 2. Budowa konidioforów *A. fumigatus*  
[źródło: <http://radiopaedia.org/articles/aspergillus-fumigatus>]

*A. fumigatus* jest gatunkiem ciepłolubnym (termofilnym), zdolnym do wzrostu w temperaturze powyżej 45°C. Cechą unikatową tego gatunku - wyróżniającą go od pozostałych grzybów z tego rodzaju - jest zdolność do wzrostu w temperaturze 70°C. Wzrost grzybni na podłożu zarodnikotwórczym (Czapek-Dox Agar) w temperaturze 25°C jest bardzo szybki, kolonie grzyba osiągają wielkość 4 cm (+/- 1 cm) po tygodniowej hodowli. Na podłożu używanym powszechnie w mikrobiologii do hodowli grzybów (Sabouard) w początkowej fazie wzrostu kolonie grzyba są koloru białego, jednak z czasem przybierają barwę od zielonej do szaro-brunatnej. Od strony podłoża grzybnia może być bezbarwna, choć zazwyczaj jest koloru białło-żółtego, sporadycznie może przechodzić w kolor ciemnobrunatny. Kolonie mogą być cienkie, filcowate, często mocno pofałdowane lub kosmate z brzegu. Na rycinie trzeciej (Ryc. 3.) przedstawiono typowy wygląd koloni *A. fumigatus* na podłożu Sabouard [Krzyściak P, 2011; Klich M, 2006; Letage J, 1990].



Ryc. 3. Siedmiodniowe kolonie *A. fumigatus* na podłożu Sabouard [zdjęcie własne]

## 1.2. Chorobotwórczość szczepów *A. fumigatus*

*Aspergillus fumigatus* może być przyczyną różnych infekcji m.in. zakażenia dróg oddechowych u chorych z astmą, po przeszczepach, przebytej gruźlicy, u osób z mukowiscydozą i sarkoidozą. Jest coraz powszechniejszą przyczyną grzybic inwazyjnych u chorych z oddziałów hematologicznych. W ostatnich latach częstość występowania inwazyjnych zakażeń grzybiczych powodowanych przez *A. fumigatus* wzrasta. Dane literaturowe podają, że obecnie inwazyjne aspergilozy dotyczą rocznie nawet do 500 000 osób, 4 mln osób rocznie choruje na alergiczną aspergilozę, a 3 mln cierpi na przewlekłe alergiczne zapalenie płuc. Szacuje się, że w Unii Europejskiej około 2 400 000 osób rocznie choruje na aspergilozę. Niestety wzrasta także wskaźnik śmiertelności powodowany chorobami wywołanymi przez *A. fumigatus* i obecnie wynosi on od 30% u pacjentów o ogólnie dobrym stanie zdrowia, do nawet 90% u pacjentów w grupie największego ryzyka (np. chorych na AIDS) [Croft C, 2016; Taccone F, 2015; Verweij P, 2016; van der Linden 2015].

Podstawowymi wrotami zakażenia *A. fumigatus* u ludzi są płuca, a dokładniej drzewo oskrzelowe. Zdarza się jednak, że drobnoustrój ten wnika do organizmu człowieka poprzez uszkodzoną skórę czy błony śluzowe. Inwazyjna aspergiloza jest chorobą, która spośród wszystkich chorób wywoływanych przez *A. fumigatus* powoduje największą liczbę zgonów, a jej śmiertelność szacuje się na 80% [Ramakrishnan J, 2016].

Istnieje również ryzyko wprowadzenia *A. fumigatus* do organizmu pacjenta poprzez zabiegi chirurgiczne. W takich przypadkach zakażenie grzybicze może obejmować takie narządy jak serce, skórę, oczy oraz szpik kostny. Grzybica może również rozwijać się w mózgu (grzybicę mózgu obserwuje się u niespełna 15% pacjentów chorujących na inwazyjną aspergilozę, a jej śmiertelność wynosi około 95%), uchu wewnętrznym i zewnętrznym, zatokach przynosowych (blisko 60% przypadków kończy się zgonem) i oczodołach, w ranach powstałych po oparzeniu skóry oraz przeszczepionych narządach, czy na wszczepionych sztucznych zastawkach serca [Shapiro R, 2011; Kousha M, 2011; Kędziora K, 2008].

### 1.3. Choroby wywoływane przez grzyby z rodzaju *A. fumigatus*

*A. fumigatus* powoduje choroby wielu ssaków – w tym człowieka, a także ptaków i owadów. Należy zaznaczyć jednak, iż *A. fumigatus* jest grzybem oportunistycznym, a grzybice które wywołuje są pochodzenia egzogenne (wywoływane przez grzyby bytujące na roślinach, w glebie i powietrzu). Choroby, które wywołuje *A. fumigatus*, dotyczą przede wszystkim osoby z obniżoną odpornością. Osoby z prawidłowo działającym układem immunologicznym - pomimo codziennego wdychania wraz z powietrzem do płuc zarodników tych grzybów - nie są narażone na zarażenie [Letage J, 1995; Lamb D, 1999; Fritz H, 2007]. *A. fumigatus* może wywoływać u ludzi ostre i przewlekłe zakażenia dróg oddechowych (tzw. „płuco farmera”, aspergiloza, *aspergilloma*). Zazwyczaj wrotami zakażenia są płuca, jednak wielkość zarodników umożliwia im przekraczanie granicy pęcherzyk płucny – krwioobieg, a tym samym może skutkować rozsianiem się infekcji w różnych narządach i tkankach, co z kolei może przyczyniać się do zakażenia układu krwionośnego, moczowego, nerwowego, płciowego, pokarmowego oraz zakażenia mięśni szkieletowych. Zdarza się, że pierwotne zakażenie nie zaczyna się w płucach, wówczas *A. fumigatus* może powodować zakażenia przewodu słuchowego, uszu, jamy sutkowej, oczu oraz zatok przynosowych. Zarodniki *A. fumigatus* mogą wywoływać reakcje alergiczne w postaci astmy, kataru siennego czy alergicznej aspergilozy oskrzelowo-płucnej. U zwierząt grzyby z gatunku *A. fumigatus* są przyczyną poronień u bydła i klaczy, ciężkich chorób u ptaków, powodujących istotne szkody w hodowli drobiu [Krzyściak P, 2011, Barrs V, 2013]. Poniżej omówiono cztery istotne choroby wywoływane u ludzi przez *A. fumigatus*.

#### 1.3.1. Alergiczna aspergiloza oskrzelowo-płucna

Alergiczna aspergiloza oskrzelowo-płucna (*allergic bronchopulmonary aspergillosis* - ABPA) to choroba powodowana przez reakcję nadwrażliwości na antygeny z rodzaju *Aspergillus* (najczęściej *A. fumigatus*). Po raz pierwszy opisano ją w 1952 roku. Występuje przeważnie u chorych na mukowiscydozę oraz osób chorych na astmę oskrzelową. Bardzo sporadycznie ABPA rozpoznaje się u pacjentów niechorujących na astmę oskrzelową. W przypadku alergicznej aspergilozy oskrzelowo-płucnej, pacjenci skarżą się na napadową duszność, kaszel (z odkasztuszaniem brunatnych





czopów) oraz na gorączkę, a także utratę masy ciała i ogólne osłabienie. Przedłużone utrzymywanie się konidiów *A. fumigatus* w oskrzelach pacjentów chorych na astmę czy mukowiscydozę spowodowane jest upośledzonym mechanizmem oczyszczania oskrzeli. Wiąże się to z ich skurczem, a także obrzękiem błony śluzowej i nagromadzeniem śluzu, który stanowi doskonałą pożywkę dla rozwoju pleśni. Zainfekowanie dróg oddechowych przez grzyby z gatunku *A. fumigatus* powoduje wytwarzanie immunoglobulin klasy E (IgE) i G (IgG). Przeciwciała IgE odpowiedzialne są za wywołanie natychmiastowej reakcji, prowadzącej do nasilenia skurczu oskrzeli, a także obrzęku błony śluzowej i naciekanie eozynofili do dróg oddechowych. Eozynofile uwalniają z ziarnistości substancje powodujące uszkodzenie tkanki płucnej [Patterson K, 2010; Nowicka U, 2011].

Alergiczną aspergilozę oskrzelowo-płucną charakteryzuje duża zmienność obrazu radiologicznego. Najczęściej obserwuje się obecność niedodmy (brak rozprężania się pęcherzyków płucnych prowadzący do częściowej lub całkowitej bezpowietrzności miąższu płucnego) i cech zaczerwienienia oskrzeli śluzem [Nowicka U, 2011].

Do innych schorzeń o podłożu alergicznym wywoływanych przez grzyby z gatunku *A. fumigatus* należą: alergiczna aspergiloza zatok przynosowych, alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych oraz ziarnikowatość okołoskrzelowa.

### 1.3.2. Grzybniak kropidlakowy

Grzybniak kropidlakowy to choroba, która zwykle rozwija się w jamach płucnych powstałych po wcześniej przebytych chorobach (w tym: gruźlica, ropień płuca, sarkoidoza, włóknienie górnych płatów w przebiegu zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa, zawał płuca). Grzybniak kropidlakowy jest ograniczonym tworem kulistym. Składa się on z poplątanych, martwych i żywych elementów grzybni, fibryny, śluzu oraz rozłożonych komórek organizmu gospodarza: krwinek i nabłonka. Grzybniak w pierwszej kolejności objawia się krwiopluciem. Zdarza się, że jest przyczyną rozległych krwotoków płuc, stanowiąc zagrożenie dla życia pacjenta. Przyczyną krwawienia może być lokalna inwazja pleśni do wyścielających jamę naczyń krwionośnych, a także wydzielanie przez grzyby endotoksyn. Leczenie opiera się na wycięciu zainfekowanej grzybem tkanki płucnej z zapasem zdrowej tkanki. W niektórych przypadkach stosuje się terapię itrakonazolem przez okres 6 - 9 miesięcy [Fritz H, 2007; Kousha M, 2011].

### 1.3.3. Przewlekła martwiczka postać aspergilozy

Przewlekła martwiczka postać aspergilozy po raz pierwszy została zidentyfikowana w 1981 roku. Określono ją wówczas jako semiinwazyjną aspergilozę płuc. Rok później postać przewlekłej grzybicy kropidlakowej nazwano przewlekłą martwiczą aspergilozą płuc. Choroba ta charakteryzuje się trwałymi uszkodzeniami tkanki płucnej. Nie powoduje jednak - co ma miejsce w przypadku inwazyjnej aspergilozy - zajęcia naczyń płucnych. Choroba dotyka przede wszystkim pacjentów



w średnim wieku oraz osoby starsze mające problemy z miejscowo upośledzonymi mechanizmami odpornościowymi, które są wynikiem przebycia uprzednio przewlekłych chorób płuc. Ponadto przewlekła martwicza postać aspergilozy może występować również u pacjentów z obniżoną odpornością z powodu alkoholizmu, cukrzycy, przewlekłej choroby wątroby czy reumatoidalnego zapalenia stawów. Choroba najczęściej przebiega wolno i łagodnie. Objawy mogą trwać od kilku miesięcy do kilku lat [Soubani A, 2002; Kousha M, 2011].

Do najczęściej występujących objawów przewlekłej martwiczej aspergilozy należą kaszel z intensywnym odksztuszaniem, nieustanny spadek masy ciała oraz stopniowo postępujące osłabienie. Często obserwuje się również krwioplucie i stan podgorączkowy. Wczesnym sygnałem przewlekłej martwiczej postaci aspergilozy może być pogrubienie opłucnej przylegającej do zajętego mięszu płucnego. Ze względu na mało specyficzne objawy choroby, ciężko jest ją odróżnić od grzybniaka kropidlakowego. W celu trafnego diagnozowania przewlekłej martwiczej aspergilozy konieczne jest uprzednie wykluczenie inne chorób tworzących nacieki w drogach oddechowych, przede wszystkim gruźlicy, nowotworów płuc czy zakażeń bakteryjnych. W leczeniu przewlekłej martwicy wywołanej *A. fumigatus* stosuje się amfoterynę B i itrakonazol. W zaawansowanym stadium choroby konieczne jest wycięcie zmian martwiczych z zapasem zdrowej tkanki płucnej. Brak odpowiedniego leczenia powoduje rozwinięcie się infekcji grzybiczej w całych płucach oraz rozsianie zakażenia po całym organizmie, co w rezultacie może doprowadzić do śmierci pacjenta [Kousha M, 2011].

#### 1.3.4. Inwazyjna aspergiloza

Inwazyjna aspergiloza została po raz pierwszy opisana w 1953 roku. Jest najcięższą postacią zakażenia układu oddechowego powodowaną przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*. Choroba ta stała się główną przyczyną zgonów pacjentów z obniżoną odpornością. Szacuje się, że inwazyjna aspergiloza dotyczy 5-25% pacjentów z ostrą białaczką, 5-10% chorych na przewlekłą białaczkę szpikową oraz 0,5-5% przypadków pacjentów po leczeniu cytotoksycznym chorób układu krwionośnego. U pacjentów po przeszczepie płuc i serca ryzyko zachorowania na inwazyjną aspergilozę wywołaną przez grzyby z gatunku *A. fumigatus* wynosi aż do 26%. Przeszczep innych narządów wiąże się z mniejszą, aczkolwiek nadal istotną podatnością na zakażenia grzybicze. Dodatkowo występowanie inwazyjnej aspergilozy obserwuje się u 25-40% pacjentów cierpiących na przewlekłą chorobę ziarniniakową, oraz od 1 do 12% chorych na AIDS. W większości przypadków inwazyjna aspergiloza rozwija się u chorych z zaawansowaną chorobą nowotworową. Objawy inwazyjnej aspergilozy są mało specyficzne - gorączka, ból w klatce piersiowej, kaszel, złe samopoczucie, utrata wagi - co utrudnia postawienie szybkiej i prawidłowej diagnozy [Kędziora K, 2008; Kousha M, 2011; Latgé J, 1999].

Zarodniki *A. fumigatus* wdychane wraz z powietrzem dostają się do płuc i u osób z obniżoną odpornością zaczynają kiełkować. Rozwijająca się w płucach grzybnia zaczyna wydzielać toksyczne metabolity, które hamują działanie układu

immunologicznego, co w konsekwencji umożliwia dalszy, sprawnym rozrost grzybni. Strzępki zaczynają wnikać do naczyń krwionośnych. Skutkuje to tworzeniem zakrzepów wewnątrz naczyń krwionośnych powodując tym samym powstawanie miejscowych zawałów płuc. Rozwijająca się w płucach grzybica, może powodować rozległe niszczenie tkanki płucnej, wywołując silne krwotoki, co może ostatecznie doprowadzić do śmierci pacjenta. Zakażenie *A. fumigatus* występujące w płucach może rozprzestrzeniać się poprzez krew do innych narządów. U blisko 50% pacjentów z inwazyjną aspergilozą stwierdza się rozprzestrzenianie się infekcji grzybiczej z płuc do innych narządów [Shapiro R, 2011; Kousha M, 2011; Kędziora K, 2008].

### 1.3.5. Choroby zwierząt wywoływane przez *A. fumigatus*

Jak już wspomniano w niniejszej pracy, *A. fumigatus* może być przyczyną różnego rodzaju infekcji u zwierząt. Najbardziej wrażliwą na infekcje grupą zwierząt są ptaki. Choroby wywoływane przez *A. fumigatus* dotyczą przede wszystkim indyków, pingwinów, ptaków drapieżnych i ptactwa wodnego. Za czynnik predysponujący uważa się warunki środowiskowe (ograniczona wymiana powietrza, narażenie na toksyny powodujące podrażnienie błon śluzowych i wilgotność). Również anatomiczne cechy ptaków predysponują do rozwijania się infekcji grzybiczych w drogach oddechowych (brak nagłośni zapobiegającej przedostawaniu się cząstek stałych do dolnych dróg oddechowych, brak przepony powodujący niezdolność do wytworzenia silnego odruchu kaszlowego). Drogi oddechowe stanowią zazwyczaj wrota zakażenia *A. fumigatus*, który odpowiedzialny jest za 95% przypadków aspergilozy u ptactwa [Tell L, 2005]. U ptaków występuje głównie aspergiloza oskrzelowo-płucna, powodująca duszności, zdyszanie, senność, anoreksję i ogólne wycieńczenie ptaków. Obserwuje się również zapalenie tchawicy, rozprzestrzenianie się infekcji do mózgu, uszkodzenia dróg oddechowych, płuc, pęcherzyków płucnych. Mogą występować także zmiany guzkowe w płucach lub ostre zapalenie płuc, któremu towarzyszy fibrynowe zapalenie opłucnej [Tell L, 2005; Klika E, 1996; Harmon B, 1998].

U przeżuwaczy aspergiloza może rozwijać się bezobjawowo w oskrzelach, a także powodować zapalenie sutków oraz zapalenie łożyska, co często kończy się poronieniem [Tell L, 2005]. Problem częstych poronień dotyczy głównie krów, u których jest to często jedyny objaw infekcji grzybiczej. Zapalenie płuc u przeżuwaczy może szybko prowadzić do śmierci zainfekowanego zwierzęcia. Najczęściej występujące objawy obejmują gorączkę, szybkie i płytkie oddychanie, wydzielina z nosa i mokry kaszel. W przewlekłym grzybiczym zapaleniu płuc objawy choroby bardzo przypominają objawy gruźlicy. Za drogi zakażenia uważa się głównie płuca i układ pokarmowy. Czynnikiem predysponującym do zakażeń *A. fumigatus* jest karmienie bydła sianem, które jest silnie zanieczyszczone zarodnikami grzybów [Tell L, 2005; Sarfati J, 1996].

U koni aspergiloza atakuje często gardło oraz błony śluzowe nosa. W przypadku infekcji płuc, choroba postępuje bardzo szybko i jest wysoce śmiertelna. W przypadkach zainfekowania płuc konia, obserwuje się również ostre zapalenie jelita, które prawdopodobnie jest czynnikiem predysponującym do rozwoju zakażeń grzybiczych.

Za inne czynniki predysponujące do zakażenia uważa się urazy tkanek miękkich i warunki środowiskowe, które sprzyjają kiełkowaniu zarodników (wysoka wilgotność). Uważa się, że zapalenie okrężnicy powoduje głęboką neutropenię, która zmniejsza immunokompetencję koni, a następnie inwazję *A. fumigatus* z rozerwanej błony śluzowej jelit na cały organizm. W przypadku rozprzestrzenienia się infekcji do mózgu i nerwu wzrokowego obserwuje się u koni zaburzenia koordynacji i problemy ze wzrokiem (w tym ślepotą) [Tell L, 2005; Lepage O, 2004].

U psów aspergiloza jest zazwyczaj zlokalizowana w jamie nosowej lub zatokach przynosowych. Aspergiloza nosa rozpoczyna się w tylnym rejonie szczęki górnej, a jej objawami są letarg, ból nosa, owrzodzenie nosa, kichanie, jednostronna lub obustronna wydzielina z nosa, zapalenie kości i szpiku oraz krwawienie z nosa. Rozsiane choroby wywoływane przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* występują najczęściej u psów w średnim wieku (głównie u owczarka niemieckiego). Kliniczne objawy rozsianej aspergilozy mogą obejmować letarg, kulawiznę, anoreksję, utratę wagi, zanik mięśni, gorączkę, krwimocz, nietrzymanie moczu. Zmiany często występują w węzłach chłonnych brzusznych i piersiowych, nerkach, śledzionie i kręgach. Również często obserwowane jest zapalenie szpiku. Obserwuje się także grzybice powierzchniowe, głównie grzybice skóry, wpływające na zmiany wyglądu sierści, która zaczyna przypominać mysie owłosienie. Dotyczy to przede wszystkim młodych psów [Zonderland J, 2002; Tell L, 2005, Lane J, 1974].

Choroby wywoływane przez *A. fumigatus* u kotów są mniej powszechne niż u psów, jednak mogą przebiegać bardzo agresywnie. Rozwój aspergilozy u kotów często powoduje silny obrzęk głowy. W niektórych przypadkach można zaobserwować masę w jamie płucnej lub owrzodzenie podniebienia twardego. Rozprzestrzenianie się infekcji po organizmie może powodować atak na ośrodkowy układ nerwowy, co prowadzi do powstania objawów neurologicznych [Goodall S, 1984, Barrs V, 2013].

#### 1.4. Metody diagnostyki grzybów

Precyzyjna i dostatecznie szybka diagnostyka zakażeń wywołanych przez *A. fumigatus* jest trudna ze względu na stosunkowo powolny wzrost kolonii grzybów i ich dużą różnorodność morfologiczną. Istotne jest, aby metoda umożliwiająca prawidłową identyfikację grzybów była szybka, wiarygodna i tania. Krótki czas postawienia wiarygodnej diagnozy ważny jest ze względu na fakt, iż późne rozpoznanie może powodować niską skuteczność przeprowadzanej terapii, co może doprowadzić do śmierci pacjenta. Ważne jest także, by metoda była na tyle prosta, by można ją było przeprowadzać z wykorzystaniem aparatury znajdującej się już na wyposażeniu laboratoriów diagnostycznych. Nie bez znaczenia jest też koszt metody, gdyż im będzie niższy, tym bardziej prawdopodobne, że metoda będzie powszechnie wykorzystywana. Niestety diagnostyka molekularna grzybic nie jest tak dobrze rozwinięta jak diagnostyka wielu chorób powodowanych przez bakterie. W związku z tym, bardzo istotne jest poszukiwanie dobrych, szybkich i możliwie nieinwazyjnych metod diagnostycznych dla *A. fumigatus*. Problem skutecznej diagnostyki zakażeń grzybiczych potęguje

ich różnorodność i zdolność do szybkiej adaptacji w nowych warunkach [Hachem R, 2009; Kozel, 2014].

#### 1.4.1. Diagnostyka klasyczna i serologiczna

W metodach klasycznej diagnostyki zakażeń grzybiczych na szeroką skalę wykorzystywana jest bezpośrednia mikroskopia. Cechuje się dobrą czułością i krótkim czasem oczekiwania na wyniki badania. Niestety, podstawową wadą jest brak możliwości odróżnienia grzybów z rodzaju *Aspergillus* od innych grzybów nitkowatych (*Penicillium* spp i *Scedosporium* spp). W związku z tym, w celu skutecznej diagnostyki z próbek pobranych z miejsca zmienionego chorobowo wykonuje się preparaty bezpośrednie lub barwione. Następnie ocenia się obecność grzybów w badaniu mikroskopowym. Dodatek do preparatu 10% wodorotlenku potasu wspomaga wizualizację strzępków, poprzez częściowe trawienie i rozpuszczanie materiału białkowego, pozostawiając nienaruszoną ścianę komórkową grzybów. Preparaty można dodatkowo wybarwić za pomocą specyficznych barwników lub znakować fluorescencyjnie. W barwieniu histopatologicznym wykorzystuje się barwnik GMS (z ang. *gomori's methenamine silver stain*) oraz PAS (z ang. *periodic acid-Schiff*). Barwienie za pomocą barwnika PAS pozwala na uwidocznienie elementów tła, umożliwiając ocenę architektury tkanek, a także reakcji zapalnej. Barwnik GMS działa inaczej. Nie barwi elementów komórkowych, ani tkanek gospodarza, a jedynie ścianę komórkową grzybów pozwalając na bardzo czułe wykrywanie nawet małych fragmentów ścian komórkowych, które mogą być zasłonięte przez tkanki gospodarza. Zastosowanie tych barwników pozwala na określenie typu aspergilozy [Hope W, 2005].

Skuteczną identyfikację gatunku *A. fumigatus* umożliwia posiew materiału na odpowiednie podłoża i hodowla w wysokiej temperaturze. *A. fumigatus* można odróżnić od innych kropidlaków na podstawie dobrego wzrostu w temperaturze 45°C (a nawet 70°C), a także na podstawie niebieskozielonego koloru kolonii oraz kolumnowej główki z jednorzędowym układem komórek wytwarzających zarodniki. Dodatkowo, poprzez badanie wrażliwości na antybiotyki można określić odpowiednie opcje terapeutyczne [Krzyściak P, 2011; Klich M, 2006].

Diagnostyka klasyczna polega na bezpośrednim potwierdzeniu obecności komórek grzyba w badanym materiale. W przypadku zakażeń powodowanych przez *A. fumigatus* jest ona bardzo trudna, ponieważ grzyby z rodzaju *Aspergillus* w związku z powszechnym występowaniem w powietrzu często stanowią zanieczyszczenie materiału diagnostycznego. Rozpoznanie uznaje się za potwierdzone wyłącznie w przypadku wykrycia rozgałęzionych nici grzyba, ulegających barwieniu urotropiną (heksametylenotetraminą srebra) w badanym materiale.

W celu identyfikacji grzybów z rodzaju *Aspergillus* z krwi pacjenta stosuje się test polegający na wykazaniu w krwi pacjenta obecności swoistego antygeny. W tym celu, wykorzystuje się cząstki lateksu opłaszczone przeciwciałami monoklonalnymi, które wiążą specyficznie galaktomannan, który jest swoistym antygenem występującym w surowicy w trakcie zakażenia grzybami z rodzaju *Aspergillus*. W przypadku zakażenia

*Aspergillus spp.*, wytwarzany jest galaktomannan, który wiąże się z cząstkami lateksu opłaszczonymi przeciwciałami, powodując reakcję aglutynacji. Do diagnostyki wykorzystuje się także metody immunodyfuzyjne oraz ELISA, które są pomocne zwłaszcza w diagnostyce przebiegu aspergilozy układowych [Kayser F, 2007].

W diagnostyce zakażeń powodowanych przez grzyby z gatunku *A. fumigatus* duże znaczenie ma badanie histologiczne oraz wyniki bronchoskopii z płukaniem oskrzelikowo-pęcherzykowym (BAL). Obecność grzyba w bezpośredniej mikroskopii może sugerować zarówno kolonizację tkanek, jak i zanieczyszczenie materiału, co ostatecznie może prowadzić do fałszywie dodatnich wyników. Obecnie ważnym narzędziem diagnostycznym w rozpoznaniu inwazyjnej aspergilozy jest wysokiej rozdzielczości tomografia komputerowa płuc [Burgos A, 2008].

W klasycznej diagnostyce zakażeń grzybiczych wykorzystuje się również metody serologiczne, polegające na wykrywaniu antygenów grzybiczych oraz swoistych przeciwciał w surowicy gospodarza. Standardowe techniki, takie jak immunodyfuzja, test precipitacji czy odczyn wiązania dopełniacza nie są wystarczająco czułe i swoiste, by mogły być stosowane w diagnostyce inwazyjnej aspergilozy u osób z upośledzonym układem immunologicznym. Zastosowanie metod takich jak immunohistochemia (z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych), immunofluorescencja czy hybrydyzacja *in situ* mogą pomóc w określeniu gatunków i rodzajów grzybów lub pozwalają na potwierdzenie postawionej wcześniej diagnozy [Hope W, 2005].

Zastosowanie metody polegającej na wykrywaniu przeciwciał skierowanych przeciwko *Aspergillus spp.* jest wykorzystywane w diagnostyce chronicznej aspergilozy płucnej. Uzupełnieniem klasycznych technik diagnostycznych są techniki pozwalające na wykrycie wolno krążących antygenów grzybiczych, takich jak galaktomannan i 1,3- $\beta$ -glukan. Galaktomannan jest stabilnym termicznie heteropolisacharydem występującym w ścianie komórkowej większości gatunków *Aspergillus* i *Penicillium*. Stanowi on wysoce immunogeny antygen, który został uznany za dobry marker w diagnostyce aspergilozy. Test immunoenzymatyczny umożliwia wykrycie antygeny z czułością 1 ng/mL surowicy we wczesnym etapie zakażenia inwazyjnego. W teście wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne EBA-2 skierowane przeciwko galaktomannanowi *Aspergillus*. Test ten, charakteryzuje się swoistością powyżej 85%. Odnotowano jednak spadek specyficzności tego testu u noworodków i dzieci, co może być związane z przedostaniem się do krwi galaktomannanu z pokarmu poprzez uszkodzone lub niepoprawnie wykształcone jelito [Hope W, 2005]. Specyficzność tego testu spada również u dorosłych pacjentów z uszkodzonym jelitem. Otrzymanie dodatnich wyników podczas dwóch osobnych badań może świadczyć o inwazyjnym zakażeniu *A. fumigatus*. Diagnozę tę należy dodatkowo poprzeć danymi klinicznymi, badaniami radiologicznymi i innymi testami laboratoryjnymi. Test aglutynacji lateksowej stosuje się do szybkiej diagnostyki ciężkich zakażeń *A. fumigatus*. Charakteryzuje się wysoką swoistością w zakresie 90-100% i mniejszym progiem detekcji antygeny galaktomannanu, niż test immunoenzymatyczny [Hope W, 2005; Verweij P, 1995].

Grzyby z rodzaju *Aspergillus* wytwarzają różne zewnątrzkomórkowe enzymy np. metaloproteazy, fosfolipazy, jak również pierwotne (np. mannitol) i wtórne (np. gliotoksyna) metabolity. Wszystkie te substancje wykazują duży potencjał, jako

markery w diagnostyce inwazyjnej aspergilozy. Zdolność tworzenia przez *Aspergillus spp.* D-mannitolu jest znana od wielu lat. Naukowcy badają potencjał diagnostyczny tego metabolitu. Jednak zastosowanie D-mannitolu w identyfikacji grzybów jest ograniczone ze względu na potrzebę przeprowadzania złożonych pomiarów z wykorzystaniem chromatografii cieczowej i spektrometrii mas [Hope W, 2005].

#### 1.4.2. Diagnostyka molekularna

W ciągu ostatnich lat wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem biologii molekularnej opartej na analizie DNA i RNA w diagnostyce zakażeń grzybiczych. Wiele ośrodków naukowych prowadzi badania nad wykrywaniem DNA *Aspergillus spp.* w celu rozpoznania inwazyjnej aspergilozy w próbkach krwi, BAL lub zatopionych w parafinie fragmentów tkanek. Metody diagnostyki molekularnej charakteryzują się bardzo wysoką czułością, swoistością oraz bardzo krótkim czasem identyfikacji. Do najczęściej wykorzystywanych metod należy reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR, z ang. *polymerase chain reaction*) [Hope W, 2005].

Najczęściej jako target molekularny w identyfikacji *A. fumigatus* wykorzystuje się rybosomalne DNA (rDNA), kodujące podjednostki rybosomów w genomie grzybów. Rybosomalne DNA składa się z regionu niekodującego IGS (z ang. *intergenic spacer region*), w którym można wyróżnić fragmenty ETS1 i ETS2 (z ang. *external transcribed spacer*), fragmenty kodujące elementy strukturalne rybosomu, takie jak: 18S, 5,8S i 28S, a także wewnętrzne regiony niekodujące ITS1 oraz ITS2 (z ang. *internal transcribed spacer*). Fragmenty ITS charakteryzują się dużą zmiennością międzygatunkową oraz wysokim stopniem zakonserwowania genetycznego w obrębie tego samego gatunku. Z uwagi na powyższe, ITS zostały wybrane przez międzynarodowe stowarzyszenie International Society for Human and Animals Mycology jako markery molekularne w klasyfikacji rodzajowej i gatunkowej grzybów. Po przeprowadzeniu amplifikacji fragmentu ITS za pomocą starterów ITS1 i ITS4, należy przeprowadzić jego sekwencjonowanie [Kozel T, 2014; Irinyi L, 2016].

Wykorzystanie regionu ITS w celu identyfikacji *A. fumigatus* nie jest wystarczające. W celu prawidłowej identyfikacji gatunkowej konieczne jest oznaczenie pełnej sekwencji nukleotydowej fragmentów regionu ITS oraz  $\beta$ -tubuliny, gdyż w przypadku grzybów z rodzaju *Aspergillus* analiza sekwencji regionu ITS umożliwia jedynie identyfikację sekcji *fumigati*, a nie gatunków do niej należących: *A. fumigatus*, *A. lentulus*, *A. pseudofisheri*, *A. fumigatiaffinis*, *A. brevipes*, *A. duricaulis*, *A. novofumigatus*, *A. uniliteralis*, *A. viridinutans*. Dlatego w celu identyfikacji poszczególnych gatunków wykorzystuje się analizę sekwencji genu  $\beta$ -tubuliny. Poprawna identyfikacja gatunkowa jest bardzo istotna, ponieważ wszystkie gatunki z sekcji *fumigati* z wyjątkiem *A. fumigatus* mają naturalną oporność na azole. Sekwencje regionu ITS i  $\beta$ -tubuliny danego szczepu porównuje się z sekwencjami z baz danych, np. zdeponowanymi w bioinformatycznej bazie danych (GenBank) przy wykorzystaniu odpowiednich programów np. BLAST [Kozel T, 2014; Alcazar-Fuoli L, 2008; Sugui J, 2015].

Mimo licznych zalet - w tym szybkości, czułości i specyficzności - metody identyfikacji grzybów oparte na reakcji PCR nie są powszechnie wykorzystywane w laboratoriach klinicznych ze względu na brak standaryzacji reakcji PCR wykrywającej DNA *A. fumigatus*. Główną wadą metod opartych o amplifikację kwasów nukleinowych jest możliwość uzyskania fałszywie dodatniego wyniku. Przyczyną tego, może być powszechne występowanie grzybów w środowisku, a także fakt, iż kolonizują one skórę i błony śluzowe ludzi i zwierząt [Hope W, 2005; Kozel T, 2014]. Dodatkowo, metoda ta nie umożliwia stwierdzenia, czy w badanym materiale występują komórki grzybów zdolne do namnażania i zainicjowania rozwoju choroby, czy wyłącznie DNA pozostałe po śmierci komórek grzybów.



## 2. Terapia grzybic wywołanych przez *A. fumigatus*

Ogólny sukces leczenia chorób wywołanych przez grzyby z gatunku *A. fumigatus* zależy od wielu czynników. Kluczem do prawidłowej terapii jest równoczesne zwrócenie uwagi na każdy z nich. Ważne jest, aby możliwie jak najszybciej i prawidłowo przeprowadzić identyfikację patogenu oraz dobrać odpowiednie leki, na które ten patogen jest wrażliwy. Istotne jest równoczesne określenie ogólnego stanu zdrowia pacjenta, chorób towarzyszących i na stałe zażywanych leków, aby wykluczyć ich antagonistyczne działanie z antymikotykiem [Sugui J, 2015]. Poniżej omówiono leki używane w leczeniu pacjentów chorujących na grzybicę wywołaną przez *A. fumigatus*, a także trudności i wyzwania jakie stoją w walce z zakażeniami grzybiczymi.

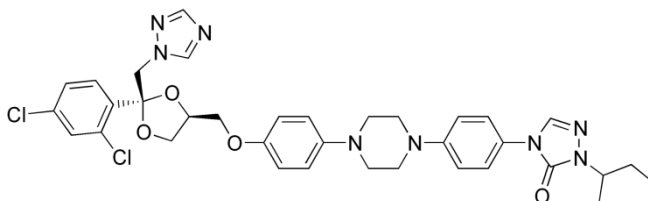
Obecnie istnieją trzy klasy środków przeciwgrzybiczych stosowanych w leczeniu aspergilozy. Są to związki azolowe, polienowe i echinokandyny. Ze względu na najmniejszą ilość skutków ubocznych oraz szerokie spektrum działania, lekami pierwszego rzutu są azole [Wei X, 2015]. Azole są syntetycznymi pochodnymi imidazolu lub triazolu. W 1980 roku zostały wprowadzone na rynek medyczny jako leki mające zapobiegać zakażeniom grzybiczym. Do najczęściej stosowanych azoli w leczeniu, czy też przeciwdziałaniu zakażeń grzybiczych należą cztery azole: flukonazol, itraconazol, posakonazol i vorikonazol. Jednak w przypadku leczenia zakażeń powodowanych przez *A. fumigatus*, nie stosuje się flukonazolu [Lamb D, 1999].

Oprócz zastosowania w medycynie, azole jako jedyna grupa związków są jednocześnie szeroko wykorzystywane w rolnictwie jako środki ochrony roślin przed pleśniami. Azolowe środki grzybobójcze są stosunkowo tanie, a jednocześnie bardzo skuteczne w zwalczaniu kłopotliwych w rolnictwie grzybów – w tym grzybów z rodzajów: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicilium*. Azole są również szeroko stosowane jako środki przeciwgrzybicze w ochronie materiałów budowlanych i jako leki przeciwgrzybicze w weterynarii [Claire L, 2015; Azevedo M, 2015].

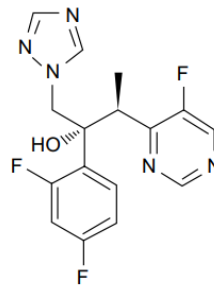
### 2.1. Stosowanie azoli w leczeniu chorób wywołanych przez *A. fumigatus*

Itrakonazol był pierwszym dostępnym środkiem stosowanym doustnie przeciwko zakażeniom wywołanym przez *A. fumigatus*. Używany był także do leczenia niezagrażającej życiu blastomikozy oraz grzybicy paznokci. Obecnie antybiotyk ten został zatwierdzony w terapii przeciw *A. fumigatus* i w leczeniu alergicznej aspergilozy oskrzelowo-płucnej [Kathiravan M, 2012]. Strukturę itraconazolu przedstawiono na rycinie czwartej (Ryc. 4.).

Ryc. 4. Struktura itraconazolu  
[źródło: www.drugbank.ca]



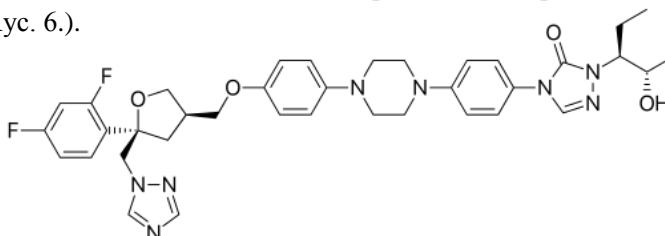
W 2002 roku do stosowania w leczeniu aspergiloz został dopuszczony worikonazol. Charakteryzuje się on szerokim spektrum działania przeciwko wielu gatunkom grzybów w tym grzybów nitkowatych. Worikonazol oddziałuje z wieloma różnymi związkami (benzodiazepyny, digoksyna, leki immunosupresyjne i niektóre leki użytku codziennego). Interakcje między nimi mogą stanowić poważny problem w leczeniu pacjentów zażywających wiele różnych leków. Powoduje również szereg skutków ubocznych, między innymi może powodować uszkodzenie wątroby, co wiąże się z koniecznością odstawienia leku. Główną zaletą worikonazolu - stanowiącą przewagę nad pozostałymi azolami - jest możliwość podania preparatu zarówno w formie doustnej, jak i dożylniej. Obecnie, to worikonazol jest lekiem pierwszego rzutu przy terapii potwierdzonej inwazyjnej aspergilozy [Jacobs S, 2017; Kauffman C, 2006; Odds F, 2003]. Strukturę worikonazolu przedstawiono na rycinie piątej (Ryc. 5.).



Ryc. 5. Struktura worikonazolu [źródło: Jakob S, 2017]

Posakonazol został wprowadzony jako lipofilowy lek drugiej generacji w profilaktyce inwazyjnych zakażeń powodowanych grzybami z rodzajów *Candida* i *Aspergillus*. Na rynku farmaceutycznym pojawił się w 2006 roku. Jednakże jego stosowanie wywołuje cały szereg uciążliwych skutków ubocznych. U 14% pacjentów pojawiają się problemy z układem pokarmowym (nudności, wymioty, bóle brzucha, biegunka), a także bóle głowy czy zwiększenie aktywności enzymów wątrobowych. Podczas zażywania antybiotyku ważne jest stosowanie wysokotłuszczowej diety. Do tej pory nie istnieją dożylne preparaty posakonazolu, które mogłyby być stosowane u ciężko chorych pacjentów [Kathiravan M, 2012; Kauffman C, 2006].

Struktura posakonazolu wykazuje bardzo duże podobieństwo do struktury itrakonazolu. Jediną różnicą jest zamiana pierścienia dioksolanowego na tetrahydrofuran. Te niewielkie różnice strukturalne pomiędzy tymi związkami skutkują istotną zmianą aktywności przeciwgrzybowej, biodostępności, interakcji z innymi lekami czy potencjalnej toksyczności [Odds F, 2003]. Struktura posakonazolu przedstawiona została na rycinie szóstej (Ryc. 6.).



Ryc. 6. Struktura posakonazolu [źródło: www.drugbank.ca]



## 2.2. Stosowanie azoli w rolnictwie

Azolowe fungicydy już od ponad 50 lat są szeroko rozpowszechnione i wykorzystywane w rolnictwie. Stosowanie środków grzybobójczych w Europie jest praktykowane szczególnie w uprawach zbożowych (pszenica) [Stensvold C, 2012]. Szacuje się, iż w Europie zachodniej zużywa się aż 37% fungicydów wykorzystywanych na całym świecie. W 2003 roku azolowe środki ochrony roślin stanowiły aż 1/3 wszystkich klas fungicydów. Związki te często stosuje się bezpośrednio na liście roślin, co potencjalnie zwiększa ryzyko długotrwałej ekspozycji występujących w środowisku grzybów *A. fumigatus* na azole [Stensvold C, 2012; Verweij P, 2009].

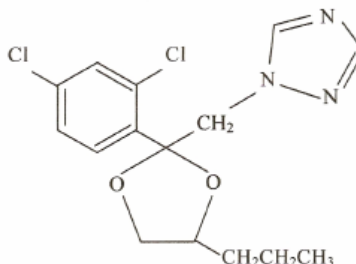
Azolowe środki ochrony roślin każdego roku używane są do oprysków plantacji nie tylko zbóż, ale również roślin ozdobnych, warzyw i owoców. Opryski stosowane są minimum dwa razy: w fazie adaptacji roślin do środowiska (na samym początku uprawy – w momencie najintensywniejszego rozwoju i wzrostu roślin) i od razu po zbiorach – w celu uniknięcia zepsucia zebranych już plonów. Należy również dodać, iż często stosowane są dodatkowe opryski w trakcie trwania uprawy - w momencie zaobserwowania infekcji hodowanych roślin. W trakcie jednego oprysku na 1 m<sup>2</sup> powierzchni rośliny zużywane jest około 10 mg związku azolowego [Azevedo M, 2015]. Warto zaznaczyć również, że normy stosowania azoli w rolnictwie są różne dla różnych upraw np. sady owocowe i pola ziemniaczane można traktować związkami azolowymi nawet 15 razy w roku, podczas gdy uprawy zbóż maksymalnie 4 razy [Stensvold C, 2012].

Problem stosowania azoli w rolnictwie dotyczy głównie Europy, gdzie co roku na 50% gruntów produkcyjnych stosowane są azolowe fungicydy. Dla porównania w Stanach Zjednoczonych azole stosuje się na nie więcej niż 5% całkowitego arealu [Azevedo M, 2015]. Różnice w ilości zużywanych azoli na obszarach rolnych pomiędzy Europą i Stanami Zjednoczonymi wynikają głównie z tego, iż w Europie obserwuje się większą gęstość zaludnienia, mniejsze rozmiary gospodarstw rolnych, inny typ gleby oraz bardziej wilgotny klimat niż w Stanach Zjednoczonych. Wszystkie te cechy sprzyjają rozwojowi infekcji grzybiczych na polach uprawach co skutkuje zwiększeniem ilości zużywanych do ochrony upraw fungicydów, w tym związków azolowych [O'Neill J, 2015].

Największe zużycie azoli w Europie przypisuje się Holandii. Jednak nie są dostępne szczegółowe dane na ten temat [Azevedo M, 2015]. W holenderskiej hodowli tulipanów powszechną praktyką jest zanurzanie w środkach grzybobójczych każdej cebulki tulipana tuż przed posadzeniem [O'Neill J, 2015]. W Polsce w 2012 roku sprzedaż grzybobójczych środków na bazie imidazoli i triazoli wyniosła 823035,4 kg substancji czynnej [Malinowska E, 2015].

Do obecnie stosowanych azolowych środków grzybobójczych należy szesnaście triazoli: bitertanol, cyprokonazol, difenokonazol, epoksykonazol, fluchinkonazol, flusilazol, flutriafol, heksakonazol, metkonazol, mychlobutanil, penkonazol, propikonazol, tebukonazol, triadimefon, triadimenol, tritikonazol oraz trzy imidazole: imazalil, prochloraz, triflumizol. Dodatkowo azole stosowane są jako herbicydy (karfentrazon), insektycydy (isazofos), regulatory wzrostu (paklobutrazol) i środki

roztoczobójcze (azocyklotyna). Przykładowa struktura związków azolowych używanych w rolnictwie przedstawiona została na przykładzie propikonazolu na rycinie siódmej (Ryc. 7.).



Ryc. 7. Struktura propikonazolu  
[źródło: Stanescu A, 2010]

Terabukonazol i propikonazol są stosowane również w celu ochrony powierzchni materiałów i przedmiotów np. w celu konserwacji murów i materiałów budowlanych oraz do produkcji farb, gum, klejów do tapet, tworzyw sztucznych, uszczelniaczy i wyrobów włókienniczych [Stensvold C, 2012].

Do najczęściej stosowanych azolowych środków ochrony roślin należą: propikonazol, bromukonazol, epoksykonazol, difenokonazol i tebukonazol. Wszystkie one posiadają bardzo podobną strukturę do triazoli używanych w medycynie.

Poza podobieństwem struktury, azole stosowane w rolnictwie przyjmują takie samo ułożenie przestrzenne podczas dokowania do enzymu jak azole stosowane w medycynie. Warto nadmienić, że te pięć związków wprowadzono na rynek krótko przed zarejestrowaniem pierwszej klinicznej oporności na azole [Snelders E, 2012]. Ponadto fungicydy te wykazują działanie przeciwko dzikim szczepom *A. fumigatus*, ale nie wykazują wpływu na szczepy zawierające mutację TR<sub>34</sub>/L98H w genie *CYP51A* [Stensvold C, 2012; Verweij P, 2009]. Wykazano, iż w warunkach laboratoryjnych tebukonazol jest w stanie indukować tworzenie powtórzeń tandemowych w sekwencji promotora genu *CYP51A* przez co może przyczyniać się do indukcji oporności na medycznie stosowane azole [Snelders E, 2012].

Szerokie stosowanie azoli w wielu bardzo zróżnicowanych dziedzinach powoduje ogromne zanieczyszczenie powietrza, gleby i wód gruntowych tymi związkami [García-Valcárcel A, 2011]. Azole ze względu na swą stabilność mogą pozostawać w środowisku naturalnym przez długi czas. Szacuje się, że okres półtrwania azoli w środowisku wynosi zwykle ponad rok [Azevedo M, 2015]. W związku z tak długim utrzymywaniem się azoli w środowisku oraz intensywnym ich zastosowaniem w rolnictwie ważne jest, by prowadzić badania nad wpływem obecności azoli na zdrowie ludzi i zwierząt. Z dotychczasowo przeprowadzonych badań wynika, że azole mogą mieć niekorzystny wpływ na ludzki układ endokrynną [Stensvold C, 2012].

Istnieje także wiele doniesień na temat występowania leków z grupy azoli, bądź azolowych fungicydów w produktach żywnościowych. W 2005 roku opublikowano wyniki badań, w których przebadano 103 próbki wina na obecność azoli w ich składzie. Wyniki wskazują, iż ponad 75% próbek wina zawierało związki azolowe. Wyniki tych badań nie są zaskakujące, jeśli uświadomimy sobie, że azolowe fungicydy są bardzo



powszechnie stosowane w winnicach w związku z nagminnymi zakażeniami winorośli przez grzyby *A. fumigatus*. Z przeprowadzonych przez Trösken i wsp. badań wynika, że ponad 53% z 103 przebadanych próbek win charakteryzowała się występowaniem w ich składzie tebukonazolu, a w przypadku ponad połowy przebadanych win w składzie znajdował się więcej niż jeden związek azolowy. Takie wyniki mogą wskazywać na stosowanie podczas uprawy winorośli naprzemiennie lub łącznie różnych fungicydów. Związków azolowych nie zaobserwowano jedynie w próbkach win, które zostały wyprodukowane z ekologicznie uprawianych winogron [Trösken E, 2005]. Udokumentowano również akumulację związków azolowych w sałacie [García-Valcárcel A, 2015].

Warto również zaznaczyć, że stosowanie azoli w rolnictwie nie tylko niesie za sobą ryzyko spożywania pokarmów z pozostałościami stosowanych - bezpośrednio na nich – azolami, ale że nie mniej istotne jest przedostawanie się azoli do wód gruntowych czy oczyszczalni ścieków. Związki te, ze względu na swoją hydrofobową naturę mogą akumulować się w osadach dennych i osadach ściekowych, które często wykorzystywane są w rolnictwie jako nawozy. To skutkować może nie tylko utrzymywaniem się azoli w środowisku, ale może przyczynić się do nieustannego, niekontrolowanego zwiększania się ilości azoli w środowisku [García-Valcárcel A, 2011; Kahle M, 2008].

Wciąż brakuje badań określających jakie ryzyko stanowi dla ludzi spożywanie żywności zawierającej w swoim składzie azolowe fungicydy. Niemniej jednak, utrzymywanie się azoli w środowisku naturalnym jest niepokojące zważywszy na udokumentowaną zależność pomiędzy występowaniem azoli w środowisku a nabywaniem oporności *A. fumigatus* na medycznie stosowane triazole [Rocchi S, 2014].

Zdaniem ekspertów z Europejskiej Agencji Ochrony Roślin co roku nawet 40% pól na świecie jest traconych z powodu szkodników i chorób. Szacuje się, że gdyby nie stosowanie pestycydów, straty byłyby ponad dwukrotnie wyższe. W związku z tym, całkowite wycofanie fungicydów z użytku jest nierealne. Warto jednak wprowadzić monitorowanie ich zużycia [Rocchi S, 2014]. Ważne jest także zwiększanie świadomości rolników i zachęcanie ich do maksymalnego zminimalizowania zużycia fungicydów. Być może pomoże to zapobiegać rozwojowi oporności i zwiększy prawdopodobieństwo, że rozwinięta oporność okaże się być odwracalna [Mani A, 2013]. Dobrą praktyką byłoby również stosowanie naprzemiennie różnych związków przeciwgrzybiczych, które charakteryzują się różnym sposobem działania na komórki grzybowe [Azevedo M, 2015].

Uważa się również, że rzadsze stosowanie fungicydów o wyższych dawkach jest mniej szkodliwe niż ciągle stosowanie tych samych środków w niższych dawkach, ponieważ długość czasu ekspozycji grzybów na antymikotyki zwiększa ryzyko rozwoju oporności [Azevedo M, 2015]. Istotne jest także - aby w przyszłości - nowe kliniczne leki przeciwgrzybicze nie były równocześnie stosowane w rolnictwie i innych gałęziach przemysłu [O'Neill J, 2015]. Warto również zaznaczyć, iż wprowadzenie nowych środków grzybobójczych do rolnictwa stanowi ogromne wyzwanie, ponieważ związki te nie mogą być toksyczne dla ludzi, zwierząt i roślin, a ich zastosowanie musi



umożliwiać wytwarzane wolnej od pozostałości antymikotyków żywności [Azevedo M, 2015].

W Polsce z roku na rok ilość stosowanych środków ochrony roślin nieustannie wzrasta. Masa sprzedanych środków grzybobójczych w 2000 r. wyniosła 4686 tony, w 2005 r. - 9915 ton a w 2012 r. – 14 474 tony. Substancje z grupy azoli (głównie imidazolach, triazolach i benzimidazolach) stanowią drugą pod względem wielkości grupę wszystkich sprzedanych środków grzybobójczych [Malinowska E, 2015]. W związku z tym istnieje realne zagrożenie wzrostu odsetka opornych na azole izolatów *A. fumigatus* w Polsce.

### 2.3. Mechanizm działania azoli na komórki grzybów

Działanie azoli na komórki grzybów opiera się głównie na zahamowaniu działania enzymu 14- $\alpha$ -demetylazy lanosterolu biorącego udział w biosyntezie ergosterolu. W przypadku niektórych gatunków grzybów może dochodzić również do blokowania kolejnego etapu, za który odpowiada  $\Delta 22$  desaturaza [Odds F, 2003] oraz inhibicji transporterów błonowych np. P-glikoproteiny (P-gp) [Bruggemann R, 2009].

Głównym celem molekularnym azoli jest cytochrom P450. Katalizuje on reakcję usunięcia grupy metylowej (32) znajdującej się w pozycji 14- $\alpha$  w cząsteczce lanosterolu lub eburikolu. Gen kodujący 14- $\alpha$ -demetylazę lanosterolu oznacza się *ERG11p* u drożdży z rodzaju *Candida* lub *CYP51* u pleśni z rodzaju *Aspergillus*. Zahamowanie aktywności demetylazy lanosterolu przez leki z grupy azoli, powoduje zahamowanie syntezy ergosterolu. Ergosterol wchodzi w skład błony komórkowej grzybów i odpowiada za jej prawidłowe funkcjonowanie, poprzez utrzymanie integralności, płynności i asymetrii membrany. W budowie enzymu demetylazy lanosterolu można wyróżnić grupę prostetyczną – hem oraz dwa kanały prowadzące do centrum aktywnego [Lamb D, 1999; Mellado E, 2001; Mellado E, 2007; Nascimento A, 2003].

W skład rodziny białek CYP51 wchodzi ponad 100 białek występujących w różnych organizmach. Niektóre gatunki - w tym *A. fumigatus* - wytworzyły dwa homologiczne geny odpowiedzialne za prawidłową syntezę tego białka (*CYP51A* i *CYP51B*). Zazwyczaj aktywny jest gen *CYP51A* [Lepesheva G, 2008]. Prawdopodobną funkcją genu *CYP51B* jest przejmowanie roli genu *CYP51A* w przypadku jego dysfunkcji. Usunięcie obu genów powoduje śmierć komórek grzyba [Wei X, 2015].

Warto nadmienić, iż gen *CYP51A* występuje także u ludzi. Jest on zaangażowany w transformację lanosterolu w szlaku metabolicznym biosyntezy cholesterolu. Jednak mniejsze powinowactwo leków azolowych do *CYP51A* ssaków niż do *CYP51A* grzybów zapewnia zarówno bezpieczeństwo, jak i skuteczność leczenia. [Ramakrishnan J, 2016].

Dokładny mechanizm blokowania aktywności demetylazy polega na wiązaniu się atomu azotu N4 pierścienia triazolowego lub N3 pierścienia imidazolowego do żelaza znajdującego się w centrum aktywnym enzymu. Wiązanie to powoduje deaktywację tlenu, który jest niezbędny do przeprowadzenia reakcji demetylacji. Pozostałe fragmenty

cząsteczek azoli wiążą się z apoproteiną enzymu w sposób zależny od indywidualnej struktury antybiotyku. Budowa centrum aktywnego enzymu demetylasy lanosterolu może różnić się u poszczególnych gatunków grzybów [Odds F, 2003].

Blokowanie cytochromu P450 prowadzi do nagromadzenia dużej ilości lanosterolu w komórce, przez co następuje zmniejszenie ilości ergosterolu. To z kolei wywołuje zakłócenia struktury membrany zewnętrznej. W wyniku tego komórki grzybów stają się podatne na uszkodzenia. Dochodzi do zmiany aktywności enzymów związanych z błoną, które odpowiadają za transport składników odżywczych oraz budowę chityny. W wyniku tych zmian dochodzi do zakłócenia wzrostu i proliferacji komórek grzybni [Georgopapadakou N, 1996].

### 3. Oporność *A. fumigatus* na azole

Lekami tzw. pierwszego rzutu w leczeniu chorób wywoływanych przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* są związki azolowe (posakonazol, vorikonazol i itraconazol). Z perspektywy czasu wiadomo, że pierwsze oporne na azole izolaty *A. fumigatus* pojawiły się na zachodnim wybrzeżu USA, w Kalifornii, pod koniec lat 80-tych. Izolaty te zidentyfikowano u dwóch pacjentów leczonych wcześniej itraconazolem [Verweij P, 2002]. Jednak pierwsze doniesienia na temat oporności *A. fumigatus* na azole odnotowano w 1997 roku w Holandii [Denning D, 1997]. Od tamtej pory obserwuje się systematyczny wzrost liczby opornych szczepów. W większości przypadków oporność szczepów *A. fumigatus* na azole wywoływana jest mutacją TR<sub>34</sub>/L98H - powtórzenie 34-nukleotydowej sekwencji promotora (z ang. *tandem repeats*) w genie *CYP51A* powiązana z zamianą lizyny na histydynę w 98 pozycji aminokwasowej. Szacuje się, że mutacja ta warunkuje oporność około 50% izolatów *A. fumigatus*.

#### 3.1. Nabywanie oporności na azole przez *A. fumigatus*

Nabywanie przez grzyby z gatunku *A. fumigatus* oporności na azole zaczyna stanowić globalny problem. W Wielkiej Brytanii zaobserwowano wzrost oporności z 5% w 2004 roku do 14% w 2008 roku i do 20% w 2009 roku. Częstość występowania oporności *A. fumigatus* na azole w europejskich szpitalach wynosi około 3,2%. Niestety przedstawiane powyżej dane prawdopodobnie są znacznie zaniżone ze względu na brak rutynowego oznaczania oporności *A. fumigatus* [Denning D, 1997; Perlin D, 2015 van der Linden, 2015].

Obecnie wiadomo, że istnieją dwie drogi nabywania oporności na azole przez izolaty *A. fumigatus*. Pierwszą możliwością, jest droga kliniczna, związana z używaniem triazoli w medycynie w celu leczenia pacjentów cierpiących na infekcje grzybicze. Drugą możliwością, jest droga środowiskowa, związana głównie z zastosowaniem azoli w rolnictwie do ochrony roślin przed grzybiczymi patogenami. Zanim jednak ustalono, że obie drogi są równie istotne w nabywaniu przez *A. fumigatus* oporności na azole powstawały różne hipotezy, które pojedynczo nie były w stanie do końca wyjaśnić przyczyn narastającej oporności.

Początkowo uważano, że problem ten wiąże się przede wszystkim z nadmiernym, często nieuzasadnionym stosowaniem azoli w terapii. Kliniczna droga nabywania oporności na azole przez grzyby z gatunku *A. fumigatus* od początku wydawała się być oczywista. Przed 2001 rokiem uważano, że *A. fumigatus* rozwija się w płucach wyłącznie poprzez sporulację i namnaża się wielopokoleniowo jako ten sam szczep. Jednak w momencie terapii związkami azolowymi, grzyby mogą nabywać oporność i rozprzestrzeniać się. Teoria ta nie była jednak doskonała, ponieważ choroby wywoływane przez grzyby *Aspergillus spp.* nie są zakaźne, a co za tym idzie przenoszenie się opornych izolatów z pacjenta na pacjenta jest bardzo mało prawdopodobne. Teoria ta nie wyjaśniała również przypadków występowania opornych





na azole szczepów u pacjentów, którzy nie stosowali wcześniej w terapii leków azolowych [Hof H, 2001, Verweij P, 2009].

W 2001 roku po raz pierwszy zasugerowano, że nabywanie oporności *A. fumigatus* na medycznie stosowane azole może wiązać się ze stosowaniem azolowych fungicydów w rolnictwie [Hof H, 2001]. Powyższe argumenty pozwoliły wysnuć wniosek, że droga klinicznego nabywania oporności na azole nie może być jedyna. Hipotezę tą potwierdzono w 2009 r. wskazując na to, że środowiskowa droga nabywania oporności może być jeszcze ważniejsza niż droga kliniczna [Verweij P, 2009].

Występowanie jednej – klinicznej - drogi nabywania oporności na azole wydaje się być mało prawdopodobne również z innego względu. Jak już wspomniano, związki z grupy azoli występują powszechnie w środowisku w skutek ich szerokiego wykorzystywania zarówno w klinicyście, rolnictwie, budownictwie i weterynarii. [Verweij P, 2009].

W związku z tak powszechnym i nieustannym występowaniem azoli w środowisku zaczęto bardziej zwracać uwagę na monitorowanie nabywania oporności na azole wśród środowiskowych izolatów *A. fumigatus*. Dzięki temu zaobserwowano, że odporne na medycznie stosowane azole izolaty *A. fumigatus* mogą być izolowane z roślin rosnących w pobliżu szpitali. Izolaty *A. fumigatus* odporne na medycznie stosowane azole zaobserwowano także w kompoście, liściach i nasionach pochodzących z centrów ogrodnich. Odnotowano również odporne na triazole stosowane w medycynie izolaty *A. fumigatus*, pochodzące z powietrza środowisk szpitalnych (korytarze oddziałów) [Snelders E, 2009]. Izolaty odporne na azole izolowano również z gleby [Mortensen K, 2010].

Kolejnym argumentem wskazującym na możliwość nabywania oporności na azole wskutek ekspozycji środowiskowej jest fakt, iż aż 64 - 71% chorych z powodu inwazyjnej aspergilozy zakażonych opornym *A. fumigatus* nigdy wcześniej nie była leczona azolami. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że źródłem ekspozycji pacjentów na azole są również śladowe ilości tych substancji obecne w żywności [Sanglard D, 2016].

Na podstawie powyższych obserwacji uważa się, że żadna z możliwych dróg nabywania oporności na azole (zarówno kliniczna, jak i środowiskowa) nie może istnieć jako jedyna. Obecnie uważa się, że powstawanie opornych szczepów jest możliwe zarówno poprzez ekspozycję pacjentów na antybiotyki z grupy azoli, oraz poprzez stosowanie azoli w rolnictwie jako środków ochrony roślin [Sanglard D, 2016].

## 3.2. Molekularny mechanizm oporności *A. fumigatus* na azole

Znane są różne molekularne mechanizmy nabywania przez *A. fumigatus* oporności na azole. Zostały one podzielone na cztery ogólne kategorie. Należą do nich: mutacje w genie *CYP51*, nadekspresja genu *CYP51*, zwiększenie transkrypcji genów kodujących transportery błonowe oraz modyfikacja odpowiedzi komórkowej na stres [Wei X, 2015].

### 3.2.1. Mutacje w genie *CYP51A*

Najczęściej występującym mechanizmem oporności na azole obserwowanym u *A. fumigatus* są mutacje w genie *CYP51A*. Gen ten koduje 14- $\alpha$ -demetylazę lanosterolu i odpowiada za syntezę ergosterolu [Chowdhary A, 2014]. Demetylaza 14- $\alpha$ - lanosterolu, jest enzymem zaliczanym do rodziny cytochromu P450, który katalizuje konwersję lanosterolu do ergosterolu poprzez usunięcie grupy metylowej przy 14 atomie węgla. Mechanizm tej reakcji jest trój etapowy. Grupa metylowa utleniana jest do alkoholu, następnie do aldehydu, a na końcu jest usuwana w postaci kwasu metanowego (mrówkowego). Funkcję grupy prostetycznej spełnia hem z atomem żelaza, który jest niezbędny do wiązania cząsteczek tlenu wykorzystywanych w kolejnych reakcjach utlenienia [Shyadehi A, 1996]. Skutecznym inhibitorem działania enzymu są związki azolowe, które łączą się z atomem żelaza poprzez wolną parę elektronową nieprotonowanego atomu azotu, co uniemożliwia dostęp do centrum aktywnego cząsteczki tlenu i demetylację lanosterolu [Podust L, 2001]. W ten sposób blokowana jest demetylaza lanosterolu i ergosterol nie jest syntezowany. Brak ergosterolu zmienia płynność błony komórkowej i prowadzi do śmierci komórki [Chowdhary A, 2014].

U grzybów *A. fumigatus* występują dwa geny kodujące 14- $\alpha$ -demetylasy lanosterolu - *CYP51A* i *CYP51B*. Nokaut każdego genu z osobna nie utrudnia grzybom funkcjonowania, jednak usunięcie obu genów nieuchronnie prowadzi do śmierci komórki. Badania wskazują, że demetylaza najczęściej ulega ekspresji z genu *CYP51A*. Aktywność genu *CYP51B* pojawia się dopiero w przypadku braku poprawnie funkcjonującego genu *CYP51A*. Gen *CYP51B* może również spełniać inne, dotąd nieznane funkcje [Mellado E, 2004; Wei X, 2015].

Opisano kilka pojedynczych nukleotydowych polimorfizmów w genie *CYP51A*, których występowanie skutkuje istotnymi zmianami w strukturze przestrzennej syntezowanego enzymu. Zmiany te powodują zmniejszenie lub nawet całkowitą utratę jego aktywności [Rivero-Menendez O, 2016].

Pierwszą zidentyfikowaną mutacją wywołującą oporność na azole *A. fumigatus* była mutacja punktowa w genie *CYP51A* skutkująca zamianą glicyny w 54 pozycji łańcucha aminokwasowego (G54) na inny aminokwas. Mutacja ta, indukowana *in vivo* spowodowała powstanie szczepów *A. fumigatus* opornych na posakonazol, a wykryta w izolatach klinicznych powodowała zmniejszoną wrażliwość na posakonazol i oporność na itraconazol. Substytucja glicyny w 54 pozycji łańcucha aminokwasowego powoduje zaburzenie wiązania długiego łańcucha bocznego posakonazolu i itraconazolu do kanału



demetylazy lanosterolu. Worikonazol nie posiada długiego łańcucha bocznego, dlatego pomimo zamiany glicyny w 54 pozycji łańcucha aminokwasowego na inny aminokwas w dalszym ciągu jest w stanie wiązać się w centrum aktywnym. Na podstawie dynamiki molekularnej ustalono, iż mutacje wpływające na zmianę wrażliwości tych grzybów na azole usytuowane są w pobliżu centrum aktywnego lub blisko kanału białka. W powstawaniu oporności ważną rolę odgrywają przede wszystkim następujące aminokwasy: walina, lizyna, izoleucyna, arginina podstawione zamiast metioniny 220 (M220). Wywołują one silną oporność na azole [Buied A, 2010; Shapiro R, 2011; Xiao L, 2004; Wei X, 2015]. Mutacja powodująca zamianę glicyny w 138 pozycji łańcucha aminokwasowego (G138) na inny aminokwas powoduje jednoczesną oporność na itraconazol i worikonazol. Natomiast zamiana glicyny w 448 pozycji łańcucha aminokwasowego na serynę (G448S) powoduje powstanie oporności na worikonazol i obniżenie podatności na itraconazol i posakonazol.

W literaturze opisano już ponad 30 mutacji punktowych występujących w genie *CYP51A* powodujących powstanie oporności na azole u *A. fumigatus*. Dotychczas odnotowane mutacje zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 1.). Mutacje powodujące zmiany aminokwasowe: P216L, F219C/I, A284T, Y431C, G432S i G434C są opisywane jako związane z opornością na azole, jednak potrzebne są dalsze badania, aby potwierdzić ich rolę w rozwoju oporności [Rivero-Menendez O, 2016]. Najczęściej występującą mutacją punktową powodującą oporność na azole jest mutacja powodująca zmianę sensu: zamiana tyminy na adeninę w 293 pozycji łańcucha nukleotydowego, powodująca zamianę leucyny na histydynę w 98 pozycji łańcucha aminokwasowego (L98H) [Verweij P, 2007; Wei X, 2015].

Tab. 1. Mutacje w genie *CYP51A* korelowane z opornością na azole

A9T	Y121F	M220K/R/V/I/T	Y431C
N22D	N125I	M236 K/T/V	G432S
F46Y	G138C/I	N248T	G434C
G54E/R/W/G/K/V	Q141H	D255E	T440A
S52T	H147Y	A284T	G448S
Q88H	M172V	S297T	F464Y
L98H	P216L	P394L	Y491H
V101F	F219C/I	E427G/K	F495I

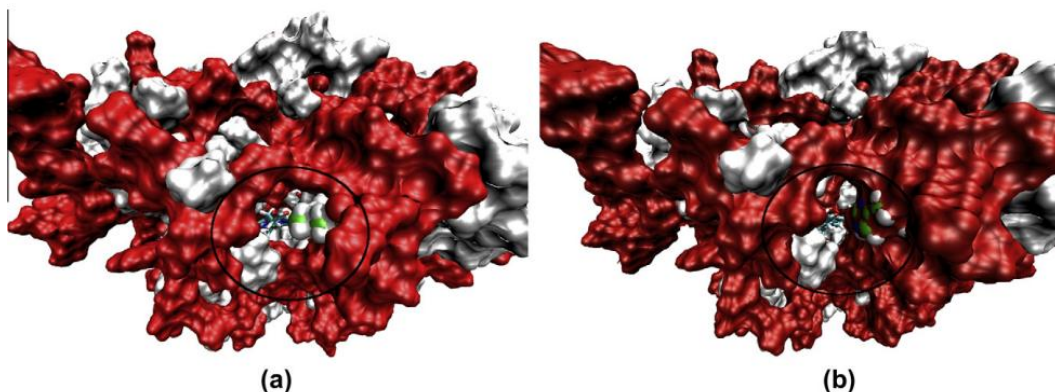
Istnieje kilka mutacji punktowych w genie *CYP51A* zlokalizowanych w tzw. kodonach hot spot, których związek z opornością na azole został potwierdzony. Wystąpienie mutacji związanych z glicyną 54 (G54), powoduje oporność krzyżową na itraconazol i posakonazol [Diaz-Guerra T, 2003; Nascimento A, 2003]. Substytucje aminokwasów przy metioninie 220 (M220), związane z zmniejszoną wrażliwością na triazole [Mellado E, 2004]. Mutacje w glicynie 138 (G138) powodujące jednoczesną oporność na itraconazol i worikonazol [Howard S, 2006] a mutacja w glicynie 448

(G448S) powodującą oporność na worikonazol oraz zmniejszoną podatność na itraconazol i posakonazol [Bellete B, 2010; Manavathu E, 2003; Pelaez T, 2012].

Drugą grupę zmian w genie *CYP51A* stanowią mutacje powodujące oporność tzw. pan-azolową. U grzybów z gatunku *A. fumigatus* ten typ oporności krzyżowej na azole zależy od swoistych mutacji (tzw. hot spot) w *CYP51A* w połączeniu ze zmianami w regionie promotora, prowadząc do powstania szczepów opornych wieloazolo-opornych (multiazole-resistant) [Rodriguez-Tudela J, 2008; Mellado E, 2007; Verwiej P, 2007]. Mechanizmy te generowane są przez kombinacje różnych modyfikacji w genie *CYP51A*. Pierwszy mechanizm – najczęściej występujący - oparty jest o korelację tandemowego powtórzenia 34 nukleotydowej sekwencji (TR<sub>34</sub>) w regionie promotora genu *CYP51A*, wraz z substytucją leucyny 98 histydyną (TR<sub>34</sub>L98H) [Mellado E, 2007]. Zmiana ta jest najczęściej identyfikowanym mechanizmem odporności występującym w środowiskowych szczepach *A. fumigatus* [Vermeulen E, 2013]. Drugą, często występującą zmianą jest występowanie tandemowego powtórzenia 46 nukleotydowej sekwencji w rejonie promotora połączona z zamianą tyrozyny 121 na fenyloalaninę oraz treoniny 289 na alaninę (TR<sub>46</sub>Y121F/T289A) co jest związane z opornością na worikonazol [van der Linden J, 2013].

W celu ustalenia wpływu najczęściej korelowanej z nabywaniem przez izolaty *A. fumigatus* oporności na azole mutacji L98H w białku CYP51A przeprowadzono modelowanie molekularne i określono zmiany w oddziaływaniu wewnątrz białka. Na podstawie dynamiki molekularnej określono, iż kodon 98 znajduje się w pętli, która łączy helisę B i B'. W szczepie dzikim hydrofobowa leucyna oddziałuje z resztą proliny 124, która znajduje się w pętli BC. Gdy wskutek mutacji nastąpi substytucja leucyny histydyną w pozycji 98 te hydrofobowe interakcje nie występują. Symulacje wykonane za pomocą dynamiki molekularnej wykazały, iż mutacja skutkująca substytucją L98H powoduje niewielkie zakłócenie stanu hydrofobowego w stosunku do powierzchni hydrofilowych. Zmiany powierzchni hydrofobowych i hydrofilowych w białku CYP51A szczepu dzikiego i zmutowanego przedstawiono na rycinie ósmej (Ryc. 8.).

Z powodu tych niewielkich zakłóceń, pętla BC jest bardziej elastyczna i ułatwia zamknięcie pierwszego kanału wejściowego dla ligandu. Inną konsekwencją mutacji jest zaburzenie oddziaływania hemu z resztą tyrozyny 121 w wyniku bliższego położenia wprowadzonej histydyny do grupy karboksylowej hemu. Z tego powodu dochodzi do przeniesienia łańcuchów bocznych tyrozyny 107 i 121, co w konsekwencji prowadzi do zamknięcia drugiego kanału ligandu [Snelders E, 2011].



Ryc. 8. Przedstawienie powierzchni hydrofobowych (kolor biały) i hydrofilowych (czerwony) w białku CYP51A szczepu dzikiego (a) i zmutowanego (b). Kodon 98 przedstawiony został kolorem zielonym. W obszarze zaznaczonym kółkiem przedstawiono hydrofobowe reszty L98 umiejscowione naprzeciwko hydrofilowej fenyloalaninie w pozycji 124 (a). W zmutowanym białku równowaga ta jest zaburzona, gdyż histydyna jest hydrofilowa (b) [źródło: Snelders E, 2011]

Ponadto z analiz struktur krystalicznych białka CYP51A szczepu dzikiego wywnioskowano, iż reszty tyrozyny w pozycjach 107 i 121 są również zaangażowane w wiązanie azoli. W związku z tym mutacja L98H ma negatywny wpływ na oddziaływanie z egzogennym ligandem. Należy jednak dodać, iż nie zaburza ona równowagi hydrofobowej w centrum aktywnym, co jest istotne dla wiązania lanosterolu i aktywności enzymu [Snelders E, 2011; Paul S, 2016].

### 3.2.2. Nadekspresja genu *CYP51A* i *CYP51B*

Poza omówionymi powyżej mutacjami w genie *CYP51A* innym ważnym mechanizmem oporności *A. fumigatus* na azole jest korelacja mutacji w tym genie z powtórzeniem tandemowej sekwencji TR<sub>34</sub> rejonu promotora tego genu (TR<sub>34</sub> - tandemowe powtórzenie sekwencji złożonej z 34 następujących po sobie nukleotydów: 5' GAATCACGCGGTCCGGATGTGTGCTGAGCCCAAT 3'). Powtórzenie to działa jako wzmacniacz transkrypcji [Verweij P, 2007; Chowdhary, 2012; Rath, 2012; Moye-Rowley, 2015; Prigitano, 2014]. Mutacja TR<sub>34</sub>/L98H została po raz pierwszy zidentyfikowana w Holandii w 1997 roku [Denning D, 1997].

Mutacja TR<sub>34</sub>/L98H powoduje wysoki poziom oporności na itrakonazol i średnią wrażliwość na worikonazol lub posakonazol. Obecnie izolaty *A. fumigatus* charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H są identyfikowane w wielu krajach [Chowdhary, 2012; Rath, 2012; Moye-Rowley, 2015; Prigitano, 2014; Kurzyk E, 2015]. Izolaty *A. fumigatus*, które posiadały 2 powtórzenia TR<sub>34</sub> w sekwencji promotora oraz mutację L98H, charakteryzują się aż 8-krotnym wzrostem poziomu ekspresji genu *CYP51A* w stosunku do szczepu dzikiego [Mellado E, 2007; Shapiro R, 2011; Wei X, 2015].

Wiele badań wskazuje na to, iż pojawienie się mechanizmu oporności opartego o mutację TR<sub>34</sub>/L98H może mieć związek ze stosowaniem azoli w rolnictwie jako środków ochrony roślin przed grzybiczymi patogenami. Hipoteza ta powstała w oparciu o doniesienia, iż ten rodzaj mutacji (TR<sub>34</sub>/L98H) nie ogranicza się tylko do izolatów klinicznych, ale jak już wspomniano, występuje również w szczepach *A. fumigatus* izolowanych z gleby i kompostu [Snelders E, 2009; Wei X, 2015].

Podobny mechanizm działania związany jest z mutacją TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A w genie *CYP51A* i jest on coraz częściej spotykany i korelowany głównie z opornością na worikonazol [Ingen, 2015; Vermeulen, 2013; Vasquez, 2016; Rivero-Menendez O, 2016]. Niedawno w Chinach udokumentowano, że mutacje TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A, A284T, G448S i P222Q w genie *CYP51A* mogą być wywoływane przez triazolowe fungicydy (tebukonazol, epoksykonazol, propikonazol, metkonazol i heksakonazol) [Jingbei R, 2017].

U grzybów z gatunku *A. fumigatus* scharakteryzowano białko SRBA odgrywające rolę w oporności na azole poprzez regulację genu *CYP51A* [Willger S, 2008]. Białko SRBA - należące do rodziny SREBP (z ang. *sterol regulator element binding protein*) - jest regulatorem transkrypcji, który ma duże znaczenie podczas biosyntezy steroli, polaryzacji komórek, niedotlenienia oraz morfogenezy strzępek. Badania Blosser S. i wsp. wykazały, że usunięcie genu kodującego białko SRBA powoduje zwiększenie podatności izolatów *A. fumigatus* na worikonazol i flukonazol co tłumaczy się zmniejszeniem ilości transkryptu *CYP51A*. Prawdopodobnie białko SRBA wiąże się z genem *CYP51A* i może w ten sposób wpływać na regulację jego aktywności [Blosser S, 2011]. Jednak należy przeprowadzić dalsze badania w celu określenia genetycznej regulacji nabywania oporności na azole przez *A. fumigatus* za pośrednictwem białka SRBA [Rivero-Menendez O, 2016; Blatzer M, 2011; Blosser S, 2012].

Istnieje także inny czynnik transkrypcyjny o udowodnionym wpływie na oporność *A. fumigatus* na azole. Badania przeprowadzone przez Wei X. i wsp. wykazują, iż mutacja w kompleksie czynnika transkrypcyjnego wiążącego podjednostkę HAPE w miejscu sekwencji CCAAT jest zdolna do indukowania u tych grzybów oporności na azole. Wystarczy zmiana jednego aminokwasu w domenie wysoko zakonserwowanej podjednostki HAPE w pozycji 88 (P88L), aby uniemożliwić wiązanie podjednostki do sekwencji CCAAT znajdującej się w obrębie promotora genu *CYP51A*. W wyniku czego dochodzi do braku regulacji ekspresji genów przez HAPE i w konsekwencji do ekspresji genu *CYP51A* [Wei X, 2015; Camps S, 2012].

Jak już wspomniano, białko CYP51 u *A. fumigatus* jest kodowane przez dwa geny *CYP51A* i *CYP51B*. Oporność na azole głównie dotyczy genu *CYP51A* i nadekspresji tego genu. Rola genu *CYP51B* jest niejasna. Zaobserwowano kilka mutacji w tym genie, jednak nie są one powiązane z opornością na azole. Odnotowano jeden kliniczny przypadek, gdzie izolat *A. fumigatus* był oporny na azole, nie posiadał mutacji w genie *CYP51A*, ale charakteryzował się nadekspresją genu *CYP51B*. Jednak w celu wykazania korelacji nadekspresji tego genu z opornością, konieczne są dalsze badania [Rivero-Menendez O, 2016; Bueid A, 2013].

### 3.2.3. Nadekspresja genów kodujących pompy błonowe

Do rozwoju oporności *A. fumigatus* na leki z grupy azoli przyczynia się nie tylko nadekspresja genu *CYP51A*, ale także nadekspresja genów kodujących transportery błonowe. Transportery błonowe zdolne są do wypompowywania leków z komórki, co prowadzi do zmniejszenia stężenia azoli w ich wnętrzu. Do głównych rodzajów pomp zalicza się superrodzinę transporterów błonowych (MFS, z ang. *major facilitator superfamily*) oraz białka transportowe zawierające kasetę wiążącą ATP (ABC, z ang. *ATP binding cassette superfamily*) [Wei X, 2015].

Nadrodzina MFS stanowi dużą rodzinę białek transportujących. Transportery należące do tej nadrodziny tworzą symporty i antyporty. Wykorzystując gradient jonów wodorowych lub sodowych są w stanie transportować antybiotyki, cukry i substraty cyklu Krebsa. Do tej pory u grzybów *A. fumigatus* opisano i zbadano cztery pompy nadrodziny MDR: MDR1, MDR2, MDR3 i MDR4 [Paulsen I, 1996; Shapiro R, 2011].

Pompy ABC zbudowane są z dwóch domen. Jedna z nich jest wysoce hydrofobowa i odpowiada za wiązanie substratu oraz za jego translokację. Druga domena jest hydrofilowa. Posiada ona zdolność do wiązania nukleotydów. Domena ta znajduje się po wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej i odpowiada za pozyskiwanie energii do aktywnego transportu poprzez hydrolizę ATP. Pompy typu ABC transportują aminokwasy, białka, cukry, peptydy, leki i jony metali. Są bardziej specyficzne niż pompy MFS. ATRF - należący do rodziny transporterów ABC - był pierwszym transporterem błonowym powiązanym z opornością *A. fumigatus* na azole. Istnieją doniesienia, że ekspresja genu kodującego pompy błonowe ATRF ulega zwiększeniu, gdy izolaty *A. fumigatus* hoduje się na podłożu z dodatkiem itraconazolu [Davidson A, 2004; Wei X, 2015]. Jednak najnowsze dane literaturowe poddają w wątpliwość stwierdzenie, że nadekspresji genu *ATRF* - jako jedynego czynnika - wpływa na oporność *A. fumigatus* na azole [Sanglard D, 2016].

Szacuje się, że genom *A. fumigatus* może zawierać około 49 genów transporterów rodziny ABC i aż 278 genów nadrodziny MFS. Zrozumienie dokładnej roli transporterów błonowych na oporność *A. fumigatus* wciąż wymaga dalszych badań. Do tej pory wykazano, że nadekspresja genów kodujących transportery błonowe często współistnieje z mutacjami punktowymi występującymi w genie kodującym 14- $\alpha$ -demetylazę lanosterolu [Wei X, 2015; Chamilos G, 2005].

### 3.2.4. Modyfikacje szlaku sygnałowego w odpowiedzi na stres

Dane literaturowe wskazują, że grzyby zdolne są do wytworzenia oporności na lek nie tylko wskutek mutacji w genach czy ich nadekspresji, ale także poprzez modyfikację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacji, które zaangażowane są w odpowiedź komórki na stres. Do wytworzenia oporności na azole u szczepów *A. fumigatus* mogą przyczynić się: odpowiedź komórki na niepoprawnie „sfałdowane” białka (UPR z ang. *unfolded protein response*), stres oksydacyjny oraz odpowiedź na stres błony lub ściany komórkowej [Wei X, 2015].



UPR ma doprowadzić do usunięcia nieprawidłowo sfałdowanych białek z komórek. Ligaza E3-ubikwityny kodowana przez gen *HRD1* poprzez znakowanie nieprawidłowo sfałdowanego białka u grzybów przyczynia się do jego degradacji. W toku przeprowadzonych przez Krishnan i wsp. badań wykazano, że delecja genu *HRDA*, który jest homologiem *HRD1* u *A. fumigatus*, uniemożliwia stymulację odpowiedzi na niesfałdowane białko i tym samym przyczynia się do wytworzenia większej oporności na worikonazol, niż u szczepów dzikich. Szczep z nokautem genu *HRDA* charakteryzował się trzykrotnym wzrostem wartości MIC worikonazolu. Analiza lekowrażliwości tego szczepu wykazała, iż utrata genu *HRDA* nie wpływa na zmiany wartości MIC dla kaspofunginy i amfoterycyny B [Krishnan K, 2013; Wei X, 2015].

Podobne badania przeprowadzone na biorących udział w reakcji na stres oksydacyjny białkach YAP1. Białko YAP1 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych AP-1 (z ang. *activating protein-1*). Białko YAP1 jest uważane za centralny regulator odpowiedzi na stres oksydacyjny u grzybów *Saccharomyces*. Badania prowadzone przez Qiao i wsp. [Qiao J, 2010] wykazały, że mutanty *A. fumigatus*, charakteryzujące się usunięciem z białka YAP1 domeny c-CRD (C-końcowa domena bogata w cysteinę), charakteryzowały się mniejszą wrażliwością na worikonazol (wartość MIC dla szczepu dzikiego - 2 mg/L a dla szczepu bez domeny c-CRD - 16 mg/L) oraz większą opornością na różne utleniacze (nadtlenuk wodoru i diamidy) w porównaniu do szczepu dzikiego *A. fumigatus*, co może wskazywać na to, że szlak odpowiedzi na stres oksydacyjny odgrywa rolę w oporności grzybów na antymikotyki. Zaobserwowano także, że delecja genu *YAP1* nie wpłynęła na wrażliwość *A. fumigatus* na worikonazol, itrakonazol i amfoterycynę B.

Także mutacje w białku MKK2, które uczestniczy w szlaku integracyjnym błony komórkowej, mogą odgrywać rolę w zmniejszeniu wrażliwości *A. fumigatus* na azole [Shapiro R, 2011; Qiao J, 2010]. W toku badań prowadzonych przez Dirr i wsp. zaobserwowano, że szczepy pozbawione genu *MKK2* charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na worikonazol i posakonazol i są mniej wirulentne w badaniach prowadzonych na modelu mysim [Dirr F, 2010].

U grzybów *Candida albicans* dobrze opisana jest rola białka szoku cieplnego HSP90 (z ang. *heat shock protein 90*) w nabywaniu oporności na azole, jednak u *A. fumigatus* mechanizm ten nie jest dobrze poznany. HSP90 jest eukariotycznym chaperonem molekularnym, który wspomaga kluczowe etapy fałdowania i transportu białek w momencie stresu środowiskowego. Badania Lamoth F. i wsp. wykazały, iż usunięcie reszty lizyny w pozycji 27 łańcucha aminokwasowego białka HSP90 (K27) lub acetylacja lizyny również może skutkować opornością *A. fumigatus* na worikonazol. Dokładne mechanizmy, dzięki którym HSP90 kontroluje i wspomaga etapy fałdowania białek w momencie stresu środowiskowego pozostają nieznane [Lamoth F, 2014; Rivero-Menendez O, 2016].



### 3.2.5. Inne mechanizmy oporności *A. fumigatus* na azole

W 2005 roku Xiong Q. i wsp. przedstawili kolejny mechanizm oporności *A. fumigatus* na azole. Zaobserwowano, iż obecność surowicy lub cholesterolu w medium badawczym może obniżyć *in vitro* wpływ itrakonazolu na *A. fumigatus*. Prawdopodobnie związane jest to ze zdolnością *A. fumigatus* do pobierania i wbudowywania cholesterolu w błonę komórkową w warunkach tlenowych. Gromadzenie cholesterolu w błonie komórkowej może rekompensować braki ergosterolu w komórce po leczeniu antybiotykami z grupy azoli [Xiong Q, 2005].

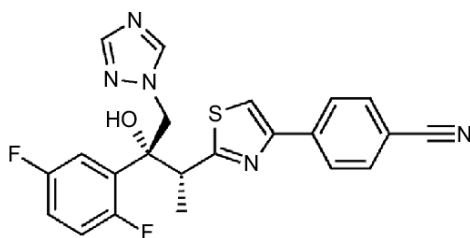
Kolejnym - choć stosunkowo rzadko spotykanym - mechanizmem oporności izolatów *A. fumigatus* na azole jest zmiana ścieżki biosyntezy ergosterolu. W wyniku tego 14 $\alpha$ -metylofekosterol zastępuje zasadniczy 14 $\alpha$ -metylobisterol i zapewnia właściwą funkcjonalność błony komórkowej [Ramakrishnan J, 2016]. Zmniejszona przepuszczalność membran oraz możliwość tworzenia biofilmu są również uważane za mechanizmy oporności na leki z grupy azoli [Stensvold C, 2012].

#### 4. Strategie poszukiwania nowych leków

Zwalczanie oporności na leki obejmuje dwie strategie. Istotną sprawą jest stosowanie antymikotyków tylko i wyłącznie wtedy, kiedy mamy do czynienia z izolatami wrażliwymi na ich działanie w celu zmniejszenia ryzyka selekcji szczepów opornych. Dodatkowo dąży się do poszukiwania nowych leków. Niestety jest to bardzo trudne zadanie. Próbuje się nie tylko modyfikować związki stosowane jako leki, ale także poszukiwać nowych celów. Niestety analizy 28 000 badań rozwoju farmaceutycznego w Europie, Japonii i Stanach Zjednoczonych wykazują, że wskaźnik skuteczności znajdowania ogólnoustrojowych środków na patogeny wynosił jedynie 3,92% [Ngo H, 2016].

Poszukuje się również leków, które działają synergistycznie na komórki grzybów. Przeprowadzono między innymi badania na myszach nad synergistyczną interakcją worikonazolu i anidulafunginy. Kombinacja tych dwóch leków skutecznie działała przeciwko izolatom wrażliwym na triazole, jednak nie przyniosła korzyści w leczeniu chorób wywoływanych przez izolaty oporne [Seyedmousavi S, 2013]. Istnieją także doniesienia o tym, że synergistyczne działanie echinokandyn z triazolami lub lipidową formą amfoterycyny B może być skuteczne w terapii grzybic [Panackal A, 2014].

Poza poszukiwaniem nowych leków w celu zwiększenia skuteczności terapii próbuje się także modyfikować leki już istniejące, w taki sposób, by zmienić mechanizm ich działania na komórki grzybów. W ten sposób stworzony został izawukonazol. Strukturę izawukonazolu przedstawiono na rycinie dziewiątej (Ryc. 9.). Lek ten, został zatwierdzony jako najnowsza alternatywa do stosowania klinicznego i leczenia chorób, w tym inwazyjnej aspergilozy [Ramakrishnan, 2016].



Ryc. 9. Struktura izawukonazolu [źródło: Jacobs S, 2017]

Mechanizm działania izawukonazolu jest taki sam jak w przypadku stosowanych już od lat w medycynie azoli. Istnieją badania wykazujące jego zwiększoną aktywność i szersze spektrum działania dzięki zmianom łańcucha bocznego [Li J, 2015]. Badania przedkliniczne wskazywały na jego porównywalną bądź większą aktywność przeciwgrzybiczną w leczeniu inwazyjnej aspergilozy, a także wskazują na to, iż jest bezpieczniejszy dla organizmu człowieka i lepiej tolerowany przez pacjentów niż worikonazol a tym samym stanowi dla niego dobrą alternatywę w leczeniu. W związku z tym, że dopuszczony do leczenia został stosunkowo niedawno, istnieje



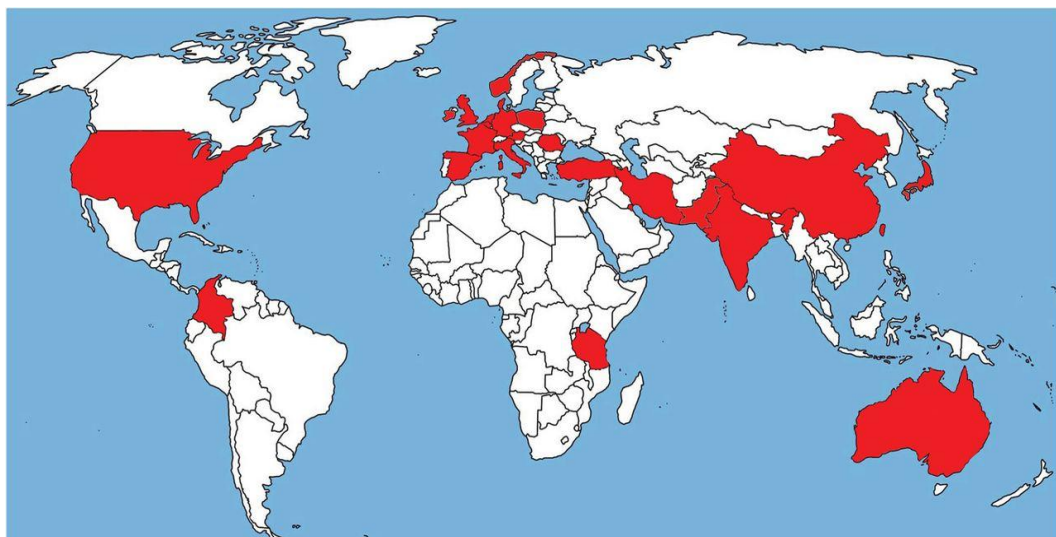
niewiele danych dotyczących skuteczności i bezpieczeństwa leczenia izawukonazolem. Lekiem pierwszego rzutu w terapii inwazyjnej aspergilozy nadal pozostaje worikonazol. W izawukonazolu upatruje się jednak dobrą alternatywę dla osób nietolerujących leczenia worikonazolem [Jaobs S, 2017]. W badaniach przeprowadzonych w Polsce zaobserwowano dużą aktywność leku nawet przy niskim stężeniu i nie zaobserwowano oporności na izawukonazol [Sulik-Tyszka, 2016]. Niestety na podstawie niewielkiej puli przebadanych szczepów nie można uznać wyników za odzwierciedlające rzeczywisty stan w Polsce.

## 5. Globalny problem nabywania przez *A. fumigatus* oporności na azole

Od 1997 roku, kiedy po raz pierwszy stwierdzono występowanie opornych na azole izolatów *A. fumigatus* odnotowuje się pojawianie się i wzrost ich ilości w wielu krajach świata, między innymi w Holandii, Niemczech, Wielkiej Brytanii, Francji, Hiszpanii, Chinach, Tajwanie, na bliskim wschodzie, w Azji, Afryce oraz Stanach Zjednoczonych [Denning D, 1997; Mayr A, 2011; Chowdhary A, 2012; Kikuchi K, 2014; Le Pape P, 2015; Wang D, 2014; Wiederhold N, 2015; Wu C, 2015; Verweij P, 2016]. W Wielkiej Brytanii procent opornych izolatów wzrósł z 6,6% w 2007 roku do 27,8% w 2009. W Holandii zaobserwowano występowanie 1,7% opornych izolatów (w latach 1945-1998), poprzez 4,6% (lata 2007-2009) do 24% (lata 2010-2013). We Francji zaobserwowano wzrost częstości występowania opornych izolatów z 0,8% (lata 2006-2009) do 8% (w latach 2010-2011), a największy wzrost zaobserwowano w Niemczech, gdzie w latach 2011-2012 odsetek wynosił 3,2% a w latach 2012-2013 wzrósł aż do 29,6% [Goncalves S, 2016].

W Polsce wciąż niewiele jest informacji w tej dziedzinie – większość z nich, stanowią dane przedstawione w niniejszej rozprawie a opublikowane już w kilku czasopismach. Z badań wynika, że odsetek klinicznych opornych na azole izolatów *A. fumigatus* wynosi około 2,25% [Kurzyk E, 2015]. Istnieją także doniesienia z Polski o występowaniu oporności na azole wśród środowiskowych izolatów *A. fumigatus*. W badaniach Ziółkowskiej i wsp. dotyczących 85 izolatów *A. fumigatus* izolowanych od stada gęsi oraz z ich środowiska hodowlanego wyizolowano izolaty *A. fumigatus* charakteryzujące się opornością na azole. Niespełna 13% izolatów charakteryzowało się opornością na itraconazol. Były wśród nich zarówno izolaty pochodzące od gęsi, jak i wyizolowane z wody [Ziółkowska G, 2014].

Rozprzestrzenianie się opornych na azole izolatów *A. fumigatus* zaczyna być globalnym problemem. Dotychczas odporne na azole izolaty zarejestrowano w Austrii, Belgii, Danii, Francji, Niemczech, Grecji, Włoszech, Holandii, Norwegii, Polsce, Portugalii, Rumunii, Hiszpanii, Szwecji, Turcji i Wielkiej Brytanii. Problem z opornością na azole poza Europą dotyczy także Stanów Zjednoczonych, Australii, Brazylii, Chin, Indii, Iranu, Japonii, Kolumbii, Kuwejtu, Pakistanu, Tajwanu, Tanzanii [Rivero – Menendez O, 2016; Verweij P, 2016; Chowdhary A, 2012; Lockhart S, 2011; Seyedmousavi S, 2013; Kurzyk E, 2015; Nawrot U, 2017]. Wzrost ilości izolatów opornych na azole prowadzi do niepowodzenia terapii i wiąże się ze wzrostem śmiertelności pacjentów z obniżoną odpornością sięgającej nawet do 88% [Howard, 2009; Denning D, 2011; van der Linden, 2011]. Na poniższej mapie (Ryc. 10.) kolorem czerwonym zaznaczono państwa, w których odnotowano występowanie opornych na azole izolatów *A. fumigatus*.



Ryc. 10. Mapa przedstawiająca stan oporności na azole izolatów *A. fumigatus* [źródło: Meis J, 2016]

Nabywanie oporności na azole jest zjawiskiem stanowiącym poważne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi [Wei X, 2015]. Wzrost oporności na azole stał się problemem zdrowia publicznego, który wymaga ciągłego nadzoru międzynarodowego i prowadzenia badań epidemiologicznych, a także konieczność badania mechanizmów nabywania oporności w środowisku [van der Linden, 2015].

## CEL I ZAKRES PRACY

Celem niniejszej rozprawy było sprawdzenie czy w Polsce występuje problem oporności na azole izolatów *A. fumigatus* oraz zbadanie molekularnego mechanizmu oporności na azole klinicznych i środowiskowych izolatów *A. fumigatus*.

Do zrealizowania celu pracy konieczne było zrealizowanie następujących zadań, stanowiących cele pośrednie niniejszej rozprawy:

1. Stworzenie zróżnicowanej (pod względem pochodzenia) kolekcji szczepów *A. fumigatus* izolowanych z różnych rejonów Polski oraz potwierdzenie ich przynależności gatunkowej.
2. Ocena wrażliwości zebranych izolatów na antymikotyki stosowane w terapii grzybic wywoływanych przez *A. fumigatus* (posakonazol, worikonazol i itraconazol).
3. Analiza sekwencji genu *CYP51A* w poszukiwaniu mutacji punktowych warunkujących powstawanie oporności *A. fumigatus* na azole.
4. Badanie poziomów ekspresji genów *CYP51A* i *CYP51B* oraz genów kodujących transportery błonowe: *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF*.
5. Badanie wpływu ekspozycji na azole (posakonazol, itraconazol i worikonazol):
  - a. na wrażliwość *A. fumigatus* na azole;
  - b. na poziomy ekspresji genów: *CYP51A*, *CYP51B*, *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF*.
6. Ocena wrażliwości izolatów *A. fumigatus* na nowy, dopuszczony do stosowania u ludzi związek przeciwgrzybowy: izawukonazol.

## CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

### 6. Materiały

#### 6.1. Izolaty *A. fumigatus*

Do badań wykorzystano kolekcję 204 izolatów *A. fumigatus* przedstawioną w tabeli drugiej (Tab. 2.). W badanej puli znalazły się izolaty kliniczne (144 izolaty – 71%), środowiskowe (46 izolatów – zaznaczono w tabeli kolorem zielonym – 22%) i weterynaryjne (14 izolatów – zaznaczone w tabeli kolorem pomarańczowym – 7%). Przynależność gatunkowa izolatów - za wyjątkiem izolatów środowiskowych pochodzących z Gdańska i Nadola, które zostały zidentyfikowane w ramach niniejszej pracy - została wstępnie określona metodami diagnostyki klasycznej przez dr n. med. Urszulę Nawrot pracującą w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Tab. 2. Izolaty *A. fumigatus* wykorzystywane do pracy

Pochodzenie	Miejscowość	Nr izolatu	Oddział / pochodzenie izolatu
Izolaty kliniczne	Wrocław	1	-
		2	Hematologia Dziecięca
		3	Pulmunologia
		4	-
		5	Hematologia
		6	Hematologia Dziecięca
		7	Intenywisywna Terapia
		8	Hematologia
		9-10	Intenywisywna Terapia
		11-12	-
		13	Pulmunologia
		14	Intenywisywna Terapia
		15	Hematologia Dziecięca
		16	Hematologia
		17	Geriatrya
		18	Hematologia
		19	Pulmunologia
		20-21	Intenywisywna Terapia
		22	Hematologia Dziecięca
		23-26	Intenywisywna Terapia
		27-29	Hematologia
		30	Dziecięca Intenywisywna Terapia
		31	Hematologia Dziecięca
		32-33	Intenywisywna Terapia
		34	Hematologia Dziecięca
		35	Pulmunologia
		36-38	Intenywisywna Terapia
		39	Hematologia Dziecięca
		40-42	Intenywisywna Terapia

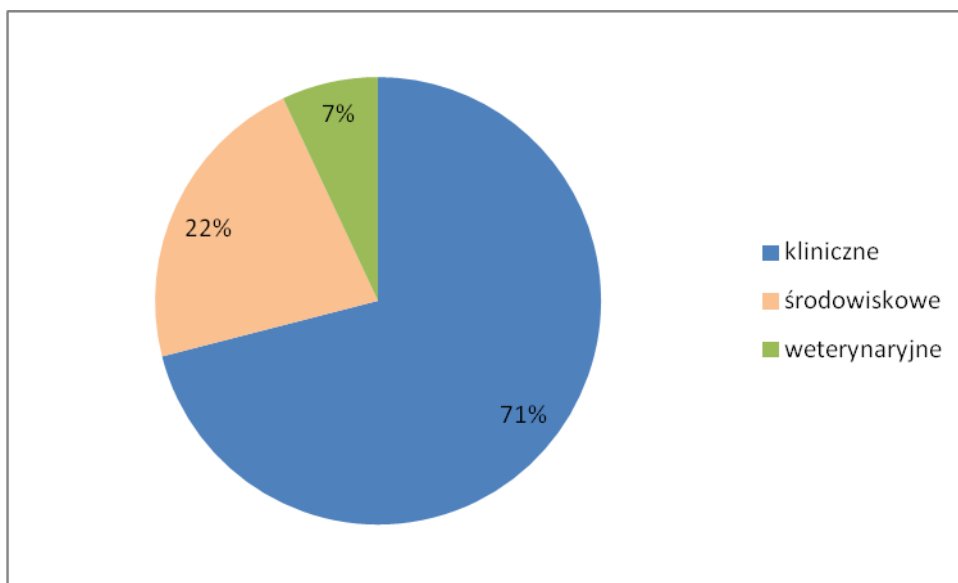


		<b>43</b>	Pulmunologia
		<b>44</b>	Alergologia
		<b>45-46</b>	Intensywna Terapia
		<b>47-49</b>	Hematologia Dziecięca
		<b>50</b>	Hematologia
		<b>51</b>	Pulmunologia
		<b>52</b>	Intensywna Terapia
		<b>53</b>	Dziecięca Intensywna Terapia
		<b>54</b>	Pulmunologia
		<b>55</b>	Dziecięca Intensywna Terapia
		<b>56-57</b>	Intensywna Terapia
		<b>58</b>	Alergologia
		<b>59</b>	Hematologia
		<b>60</b>	Intensywna Terapia
		<b>61-62</b>	Alergologia
		<b>63</b>	Intensywna Terapia
		<b>64-68</b>	-
		<b>69</b>	Hematologia Dziecięca
		<b>70</b>	-
		<b>71-73</b>	Hematologia Dziecięca
		<b>74-75</b>	Intensywna Terapia
		<b>76</b>	Hematologia
		<b>77-78</b>	Intensywna Terapia
		<b>79</b>	Hematologia Dziecięca
		<b>80</b>	Hematologia
		<b>81</b>	-
		<b>82</b>	Intensywna Terapia
		<b>83-84</b>	Hematologia
		<b>85</b>	-
		<b>86</b>	Hematologia
		<b>87</b>	Endokrynologia
		<b>88-96</b>	-
	Ślusk	<b>97-98</b>	-
	Gdańsk	<b>99-100</b>	Pneumologia
		<b>101</b>	Intensywna Terapia Medyczna
	Warszawa	<b>102</b>	Pneumologia
		<b>103</b>	Intensywna Terapia Medyczna
		<b>104</b>	Pneumologia
		<b>105</b>	Hematologia
		<b>106</b>	Neurochirurgia
		<b>107</b>	Pneumologia
		<b>108</b>	Laryngologia
		<b>109</b>	Pneumologia
		<b>110</b>	Intensywna Terapia Medyczna
		<b>111-112</b>	Hematologia
		<b>113</b>	Intensywna Terapia Medyczna
		<b>114-116</b>	Pneumologia
		<b>117</b>	Endokrynologia
		<b>118</b>	Kardiochirurgia
		<b>119</b>	Laryngologia
		<b>120</b>	Choroby Weneryczne i Nefrologia
		<b>121</b>	Chirurgia Klatki Piersiowej
		<b>122</b>	Pneumologia
		<b>123</b>	Hematologia
	<b>124</b>	Pneumologia	
	<b>125-127</b>	Hematologia	



		<b>128</b>	Intensywna Terapia Medyczna
		<b>129</b>	Hematologia
		<b>130</b>	Pneumologia
		<b>131</b>	Intensywna Terapia Medyczna
		<b>132</b>	Gastroenterologia
		<b>133</b>	Chirurgia Ogólna i Chorób Wątroby
		<b>134</b>	Hematologia
		<b>135</b>	Otolaryngologia
		<b>136-137</b>	Hematologia
		<b>138-139</b>	Intensywna Terapia Medyczna
		<b>140-141</b>	Hematologia
		<b>142-143</b>	Pneumologia
		<b>144</b>	Hematologia
Izolat środowiskowy	Nadole	<b>145</b>	Próbka powietrza
Izolat środowiskowy	Gdańsk	<b>146 - 160</b>	Próbka powietrza
Izolaty środowiskowe	Wrocław	<b>161 - 180</b>	Powietrze z korytarza Pulmonologii
Izolat środowiskowe	Wrocław	<b>181 - 190</b>	Powietrze z korytarza Hematologii Dziecięcej
Izolaty weterynaryjne	Lublin	<b>191 - 204</b>	Hodowla gęsi

Na poniższym wykresie kołowym (Ryc. 11.) przedstawiono procentowy udział izolatów klinicznych, środowiskowych i weterynaryjnych wykorzystywanych w badaniach.



Ryc. 11. Procentowy udział izolatów klinicznych, środowiskowych i weterynaryjnych



## 6.2. Odczynniki i materiały wykorzystywane w badaniach

### 6.2.1. Odczynniki i materiały wykorzystywane do hodowli *A. fumigatus*

- Podłoże Sabouraud agar (BTL)
- Antymikotyki
  - ✓ Worikonazol (Sigma)
  - ✓ Posakonazol (Sigma)
  - ✓ Itrakonazol (Sigma)
  - ✓ Izawukonazol (Liofilchem)
- Szalki Petriego (Scienceplast)

### 6.2.2. Odczynniki wykorzystywane do izolacji DNA

- Bufor A: 60 mM NaHCO<sub>3</sub>, 250 mM KCl<sub>2</sub>, 50 mM TRIS, pH 9,5
- Bufor B: 2% BSA

### 6.2.3. Odczynniki, zestawy i materiały wykorzystywane do identyfikacji gatunkowej

- 2xPCR Mix Plus High GC (A&A Biotechnology)
- Startery do reakcji PCR [White T, 1990] (Sigma)
  - ✓ ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3')
  - ✓ ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')
- Agaroza (Blirt)
- Bufor TAE (Bio-Rad)
- Bromek etydyny (Polgen)
- Clean-up Concentrator (A&A Biotechnology)

### 6.2.4. Odczynniki i materiały wykorzystywane do oznaczenia wrażliwości na antymikotyki

- RPMI 1400 (Sigma)
- MOPS (A&A Biotechnology)
- Glukoza (A&A Biotechnology)
- Antymikotyki
  - ✓ Worikonazol (Sigma)
  - ✓ Posakonazol (Sigma)
  - ✓ Itrakonazol (Sigma)
  - ✓ Izawukonazol (Liofilchem)
- 
- Płytki titracyjne 96 dołkowe (MedLab)
- Pokrywki do płytek titracyjnych (MedLab)
- Filtr strzykawkowy

- Strzykawki
- Woda destylowana

### 6.2.5. Odczynniki, zestawy i materiały wykorzystywane do sekwencjonowania genu *CYP51A*

- 2xPCR Mix Plus High GC (A&A Biotechnology)
- Startery do reakcji PCR [Diaz-Guerra T, 2003; Nawrot U, 2018] (Sigma)
  - ✓ P450-A1 (5' ATGGTGCCGATACTATGG 3')
  - ✓ P450-A2 (5' CTGTCTCACTTGGATGTG 3')
  - ✓ CYP51Afor (5' ATGGTGCCGATGCTATGGCT3')
- Agaroz (Blirt)
- Bufor TAE (Bio-Rad)
- Bromek etydyny (Polgen)
- Clean-up Concentrator (A&A Biotechnology)

### 6.2.6. Odczynniki i materiały wykorzystywane do analizy tandemowych powtórzeń w rejonie promotora genu *CYP51A*

- 2xPCR Mix Plus High GC (A&A Biotechnology)
- Startery do reakcji PCR [Bromley M, 2014] (Sigma)
  - ✓ Cyp51TR-For (5' ATAATCGCAGCACCCTCCA 3')
  - ✓ Cyp51TR-Rev (5' GGGTGTATGGTATGCTGGAA 3')
- Agaroz (Blirt)
- Bufor TAE (Bio-Rad)
- Bromek etydyny (Polgen)

### 6.2.7. Odczynniki, zestawy i materiały wykorzystywane do analizy ekspresji genów

- Kuleczki cyrkoniowe o średnicy 1 mm (A&A Biotechnology)
- Chloroform (Sigma)
- Total RNA Mini (A&A Biotechnology)
- Clean-up RNA Concentrator (A&A Biotechnology)
- TranScriba Kit (A&A Biotechnology)
- Real-Time 2xPCR Master Mix SYBR Kit A (A&A Biotechnology)

## 7. Metody

### 7.1. Hodowla *A. fumigatus*

Do hodowli grzybów *A. fumigatus* (w celu późniejszej izolacji DNA) wykorzystano podłoże Sabouraud firmy BTL. W celu przygotowywania podłoża, 46 g pożywki rozpuszczano w 1 L wody destylowanej. Po wymieszaniu, poddano sterylizacji w autoklawie. Następnie podłoże chłodzono i wylewano na płytki Petriego. Pozostawiano do zestalenia. Następnie jednorazową eżą wykonywano posiew na podłożu i inkubowano w temperaturze 30°C przez okres 6-10 dni.

W celu wyznaczenia wartości MIC izolaty hodowano w taki sam sposób. Jednak w przypadku eksperymentów polegających na sprawdzenia wpływu azoli na wartości MIC oraz na poziom ekspresji genów, do podłoża Sabouraud - po autoklawowaniu i ostudzeniu - dodawano poszczególnych antymikotyków uzyskując w podłożu następujące stężenia:

- worikonazol (0,5 oraz odpowiednio 0,25 mg/L)
- posakonazol (0,25 oraz odpowiednio 0,125 mg/L)
- itrakonazol (2,0 oraz odpowiednio 1,0 mg/L)

Następnie podłoże wylewano i pozostawiano do zestalenia. Hodowlę *A. fumigatus* na tak przygotowanych podłożach prowadzono w taki sam sposób jak przedstawiono powyżej.

### 7.2. Izolacja DNA

Do izolacji DNA zastosowano krótką metodę opracowaną przez Brillowską-Dąbrowską [Brillowska-Dąbrowska A, 2007; Brillowska-Dąbrowska A, 2010]. W tym celu w 1,5 mL próbownicy typu Eppendorf umieszczono fragment grzybni o średnicy około 3-5 mm, następnie zawieszano w 100 µL buforu A i inkubowano w temperaturze 95°C przez 10 minut. Następnie dodawano 100 µL buforu B i intensywnie wortexowano przez 10 sekund. Tak przygotowany roztwór zawierający DNA przechowywano w temperaturze 4°C. Ze względu na zastosowaną metodę izolacji DNA (która nie zakłada odseparowania DNA od innych komponentów komórkowych) nie określano jego stężenia po izolacji.

### 7.3. Identyfikacja gatunkowa

Klasyczna identyfikacja gatunkowa izolatów została przeprowadzona przez dr n. med. Urszulę Nawrot z Uniwersytetu im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (w przypadku izolatów pochodzących z Wrocławia i Warszawy) oraz przez autorkę niniejszej pracy (w przypadku izolatów środowiskowych z Gdańska i Nadola). Dodatkowo - w ramach niniejszej pracy - w celu potwierdzenia przynależności gatunkowej przeprowadzono molekularną identyfikację wszystkich badanych izolatów. W tym celu przeprowadzono sekwencjonowanie fragmentów DNA obejmujących ITS,

5,8S, IIS2 (badania prowadzone przez autorkę pracy) oraz gen kodujący  $\beta$ -tubulinę (badania zlecone zewnętrznej firmie).

Reakcję łańcuchowej polimerazy z użyciem starterów ITS1 i ITS4 przeprowadzono w celu potwierdzenia przynależności gatunkowej izolatów, do gatunku *A. fumigatus*. Matrycą użytą do reakcji było wyizolowane uprzednio DNA. W poniższych tabelach przedstawiono skład mieszaniny reakcyjnej (Tab. 3.) oraz profil temperaturowo-czasowy reakcji (Tab. 4.).

Tab. 3. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR ITS

L. p	Odczynnik	Objętość [ $\mu$ L]
1.	Woda	6,0
2.	2xPCR MixPlus High GC	10,0
3.	Starter ITS1 (10 mM)	1,0
4.	Starter ITS4 (10 mM)	1,0
5.	Matryca	2,0
<b>Objętość końcowa</b>		20,0

Tab. 4. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR ITS

Etap reakcji	Temperatura [ $^{\circ}$ C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	180	1
Denaturacja właściwa	95	30	35
Przylączenie starterów	56	30	
Wydłużanie	72	45	
Wydłużanie końcowe	72	300	1
Chłodzenie	4	300	1

Po zakończeniu reakcji PCR przeprowadzano rozdział elektroforetyczny otrzymanych produktów PCR w 2% żelu agarozowym w buforze 1xTAE przez 30 minut przy napięciu 100 V. Żel przygotowano przez rozpuszczenie 1 g agarozy LE Standard w 50 mL buforu 1xTEA. Do żelu dodawano 5  $\mu$ L bromku etydyny o stężeniu 10 mg/mL. Do studzienek nałożono 3  $\mu$ L mieszaniny po reakcji PCR. Otrzymane wyniki analizowano w świetle UV i dokumentowano za pomocą urządzenia ChemiDOC.

Produkty po reakcji PCR oczyszczano według procedury i odczynników znajdujących się w zestawie do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych „Clean Up Concentrator”. Po oczyszczeniu, zmierzono stężenie zawieszonego w buforze elucyjnym DNA i obliczono objętości roztworów wodnych zawierających 50 ng DNA. Do każdej próbki DNA dodano 5  $\mu$ L starterów ITS1 o stężeniu 5  $\mu$ M i wysłano do sekwencjonowania do firmy Macrogen.

Jako wynik sekwencjonowania genu ITS dla każdego izolatu otrzymano pliki w formacie FASTA oraz ABI. Za pomocą narzędzi bioinformatycznych, korzystając z programu BLAST przeszukano bazę sekwencji nukleotydowych. Porównywano

otrzymane sekwencje izolatów z sekwencjami zestawionymi w bazie GenBank w celu identyfikacji gatunkowej sekcji *fumigati*. Badanie sekwencji genu  $\beta$ -tubuliny zlecono zewnętrznej firmie (A&A Biotechnology).

#### **7.4. Oznaczenie wrażliwości izolatów *A. fumigatus* na posakonazol, itraconazol i worikonazol**

Do badań wrażliwości izolatów *A. fumigatus* na posakonazol, itraconazol i worikonazol zastosowano metodykę Europejskiego Komitetu do spraw Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST) opisaną w dokumencie E.Def 9.1 [Rodriguez-Tudela J, 2008]. W celu kontroli jakości wykonanych eksperymentów wykorzystano referencyjny szczep *A. fumigatus* ATCC 204305.

Inokulum do badań przygotowywane było zgodnie z procedurą opisaną w dokumencie E.Def. 9.1 EUCAST [Rodriguez-Tudela J, 2008]. Następnie 100  $\mu$ L inokulum przenoszono do każdej – za wyjątkiem kontroli ujemnej - z celek płytki titracyjnej z przygotowanymi stężeniami antymikotyków rozcieńczając ich stężenie w stosunku 1:1. Zakresy badanych stężeń poszczególnych związków w przygotowanych płytkach titracyjnych były następujące:

- Posakonazol: 0,0156 – 8 mg/L
- Worikonazol: 0,0312 – 16 mg/L
- Itraconazol: 0,0156 – 8 mg/L

Tak przygotowane płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 48 godzin, wykonując odczyt po 24 i 48 godzinach. Odczyt wyników odbywał się wizualnie zgodnie z wytycznymi EUCAST. Dla każdego izolatu oznaczenie lekowrażliwości określone było w trzech powtórzeniach.

#### **7.5. Sekwencjonowanie genu *CYP51A***

Sekwencjonowanie genu *CYP51A* przeprowadzono w celu analizy występowania mutacji punktowych w tym genie. Reakcję amplifikacji genu *CYP51A* pierwotnie prowadzono przy użyciu publikacyjnych starterów P450-A1 i P450-A2 [Diaz-Guerra T, 2003]. Wydajność reakcji – mimo optymalizacji profilu temperaturowo-czasowego oraz składu mieszaniny reakcyjnej - była niewystarczająca do sekwencjonowania. W związku z tym zaprojektowano nowy starter CYP51Afor i przeprowadzono reakcje amplifikacji razem z użyciem startera P450-A2 [Nawrot U, 2018]. W poniższych tabelach przedstawiono profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR (Tab. 6.) oraz skład mieszaniny reakcyjnej (Tab. 5.).



Tab. 5. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR *CYP51A* z użyciem starterów CYP51Afor i P450-A2

L. p.	Odczynnik	Objętość [μL]
1.	Woda	6,0
2.	2xPCR MixPlus High GC	10,0
3.	Starter CYP51Afor (10 mM)	1,0
4.	Starter P450-A2 (10 mM)	1,0
5.	Matryca	2,0
<b>Objętość końcowa</b>		20,0

Tab. 6. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR *CYP51A* z wykorzystaniem starterów CYP51Afor i P450-A2

Etap reakcji	Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	300	1
Denaturacja właściwa	95	45	40
Przyłączanie starterów	58	60	
Wydłużanie	72	120	
Wydłużanie końcowe	72	300	1
Chłodzenie	4	300	1

Po zakończeniu reakcji PCR przeprowadzono rozdział elektroforetyczny otrzymanych produktów PCR w 2% żelu agarozowym w buforze 1xTAE przez 50 minut przy napięciu 100 V. Do żelu dodano 5 μL bromku etydyny o stężeniu 10 mg/mL. Do studzienek nałożono 3 μL mieszaniny po reakcji PCR. Otrzymane wyniki analizowano w świetle UV i dokumentowano za pomocą urządzenia ChemiDOC.

Produkty po reakcji PCR oczyszczano według procedury i odczynników znajdujących się w zestawie do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych „Clean Up Concentrator”. Po oczyszczeniu, zmierzono stężenie zawieszonego w buforze elucyjnym DNA i obliczono objętości roztworów wodnych zawierających 50 ng DNA. Do każdej próbki DNA dodano 5 μL starterów forward o stężeniu 5 μM i wysłano do sekwencjonowania do firmy Macrogen.

Jako wynik sekwencjonowania genu *CYP51A* dla każdego izolatu otrzymano pliki w formacie FASTA oraz ABI. Za pomocą oprogramowania VectorNTI (InforMax) porównano otrzymane sekwencje z sekwencją genu *CYP51A* szczepu dzikiego.

## 7.6. Badanie występowania powtórzeń tandemowej sekwencji (TR<sub>34</sub>) w rejonie promotora genu *CYP51A*

W celu zbadania występowania powtórzeń w rejonie promotora genu *CYP51A* przeprowadzono reakcję amplifikacji tego regionu. Matrycą użytą do reakcji było wyizolowane uprzednio DNA. Poniżej przedstawiono skład mieszaniny reakcyjnej (Tab. 7.) oraz profil czasowo-temperaturowy (Tab. 8.).

Rozdział elektroforetyczny otrzymanych produktów PCR przeprowadzano w 2% żelu agarozowym w buforze 1xTAE przez 50 minut przy napięciu 100 V. W celu przygotowania żelu rozpuszczano 1 g agarozy LE Standard w 50 mL buforu 1xTEA. Do żelu dodawano 5  $\mu$ L bromku etydyny o stężeniu 10 mg/mL. Do studzienek наносzono 3  $\mu$ L mieszaniny po reakcji PCR. Otrzymane wyniki analizowano w świetle UV i dokumentowano za pomocą urządzenia ChemiDOC.

Tab. 7. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR TR<sub>34</sub>

L. p	Odczynnik	Objętość [ $\mu$ L]
1.	Woda	6,0
2.	2xPCR MixPlus High GC	10,0
3.	Starter cyp51 TR For (10 mM)	1,0
4.	Starter cyp51 TR Rev (10mM)	1,0
5.	Matryca	2,0
<b>Objętość końcowa</b>		20,0

Tab. 8. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR TR<sub>34</sub>

Etap reakcji	Temperatura [ $^{\circ}$ C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	300	1
Denaturacja właściwa	95	45	35
Przyłączanie startera	51,8	30	
Wydłużanie	72	30	
Wydłużanie końcowe	72	300	1
Chłodzenie	4	300	1



### 7.7. Wpływ obecności azoli na izolaty *A. fumigatus*

W niniejszej pracy podjęto się sprawdzenia wpływu obecności posakonazolu, itrakonazolu i vorikonazolu na wybrane izolaty *A. fumigatus*. Sprawdzano zarówno krótkotrwałą i długotrwałą ekspozycję na działanie azoli oraz reakcję na usunięcie azoli ze środowiska.

Analiza wpływu obecności azoli w medium hodowlanym dla 200 izolatów wiązała się z wyznaczeniem wartości MIC dla 1400 próbek - każdy izolat hodowany na dwóch różnych stężeniach trzech azoli oraz na podłożu bez dodatku azoli - dla każdej z nich w trzech powtórzeniach (4 200 odczytów), oraz z wyizolowaniem RNA, syntezą cDNA również z 1400 próbek i nastawieniem reakcji real-time PCR dla każdej z tych próbek dla siedmiu różnych genów (9 800 reakcji, każdą w trzech powtórzeniach, co daje razem 29 400 reakcji). W związku z tym, postanowiono zmniejszyć liczbę badanych izolatów. Do badań wybrano zróżnicowaną pulę 38 izolatów, które zostały przedstawione w tabeli dziewiątej (Tab. 9.). Izolaty wybrane zostały po uzyskaniu wyników lekowrażliwości i sekwencjonowania genu *CYP51A*.

Tab. 9. Charakterystyka izolatów wykorzystywanych w badaniu wpływu azoli na *A. fumigatus*

Nazwa izolatu	Pochodzenie izolatu	Miejsce zmiany		TR <sub>34</sub>	Oporność			
		nukleotydomowa	aminokwasowa		ITR	POS	VOR	
2	Kliniczne z Wrocławia	-	-	-	-	-	-	
13		T293A	Leu-His	+	+	+	+	
25		-	-	-	-	-	-	
29		G784T	Asp-Tyr	-	-	-	-	
55		T293A	Leu-His	+	+	+	+	
72		-	-	-	-	-	-	
73		-	-	-	-	-	-	
79		-	-	-	-	-	-	
102	Kliniczne z Warszawy	T229G G393A G433A	Leu-Val Gln-Gln Glu-Lis	-	-	-	-	
106		T229G	Leu-Val	-	-	-	-	
114		T229G G333C	Leu-Val Thr-Thr	-	-	-	-	
115		T229G G313A	Leu-Val Glu-Lys	-	-	-	-	
116		G247T	Val-Phe	-	-	-	-	
117		T293A	Leu-His	+	+	+	-	
118		A217T T229	Thr-Pro Leu-Val	-	-	-	-	
122		T441G	His-Gln	-	-	-	-	
129		T293A	Leu-His	+	+	+	+	
130		-	-	-	-	-	-	
134		T293A	Leu-His	+	+	+	-	
140		G393A G433A	Gln-Gln Glu-Lys	-	-	-	-	
144		T744A T912G	Asp-Lys Trp-Cys	-	-	-	-	
99		Kliniczny z Gdańska	A81C	Leu-Phe	-	-	-	-
191		Hodowla gęsi	G777C	Gln-His	-	+	-	-
192	-		-	-	-	-	-	
193	T667G C672T		Trp-Gly Ala-Ala	-	+	-	-	
194	G423A		Gln-Gln	-	+	-	-	
195	G885T		Gln-His	-	+	-	-	
197	C672T		Ala-Ala	-	+	-	-	
196	-		-	-	+	-	-	
198	-		-	-	-	-	-	
199	G423A G713A G905A		Gln-Gln Arg-His Ser-Asn	-	+	-	-	
200	G423A		Gln-Gln	-	+	-	-	
201	G423A G777C		Gln-Gln Gln-His	-	+	-	-	
202	G423A		Gln-Gln	-	+	-	-	
203	-		-	-	+	-	-	
145	Środowiskowe z Gdańska i okolic	T293A	Leu-His	+	+	+	+	
146		T229G	Leu-Val	-	-	-	-	
147		G393A	Gln-Gln	-	-	-	-	

### 7.7.1. Hodowla izolatów *A. fumigatus*

W celu badania zmian poziomów ekspresji genów wskutek ekspozycji na posakonazol, worikonazol i itraconazol 38 izolatów *A. fumigatus* przesiewano jednokrotnie na podłożach Sabouraud z dodatkiem azoli o stężeniach podanych w tabeli dziesiątej (Tab. 10.). Każdy z 38 izolatów hodowany był na dwóch różnych stężeniach każdego antymikotyku.

Tab. 10. Stężenia azoli używane do badań poziomów ekspresji genów

Badany antymikotyk	Stężenie badanego antymikotyku [mg/L]		
	Kontrola	Niższe stężenie	Wyższe stężenie
<b>Worikonazol</b>	0	0,25	1,0
<b>Itraconazol</b>	0	1,0	4,0
<b>Posakonazol</b>	0	0,125	0,5

Dodatkowo, w toku badań postanowiono sprawdzić wpływ długotrwałej ekspozycji izolatów *A. fumigatus* na azole. Do badań wybrano cztery izolaty (dwa odporne na azole: 13 i 145 oraz dwa wrażliwe: 2 i 192). Izolaty te pasażowano dwudziestokrotnie na podłożach z dodatkiem antymikotyków oraz bez antymikotyków w celu kontroli. Następnie - każdy z pasażowanych wcześniej izolatów – re-pasażowano: pasażowano pięciokrotnie na podłożu Sabouraud bez dodatku azoli. Każdy z czterech izolatów hodowany był na płytkach z podłożem Sabouraud z dodatkiem azoli oraz bez dodatku - jako kontrolę. Stężenia azoli stosowane do tego doświadczenia przedstawione zostały w tabeli 11 (Tab. 11.).

Tab. 11. Stężenia azoli używane do badania wpływu długotrwałej ekspozycji *A. fumigatus* na azole

Badany antymikotyk	Stężenie badanego antymikotyku [mg/L]
<b>Worikonazol</b>	0,25
<b>Itraconazol</b>	1,0
<b>Posakonazol</b>	0,125

### 7.7.2. Badanie poziomów ekspresji genów

#### 7.7.2.1. Izolacja RNA i synteza cDNA

Na przygotowane podłoże Sabouraud zawierające różne stężenia antymikotyków przesiano badane izolaty. Hodowla trwała od 7 do 10 dni temperaturze 30°C. Następnie izolaty pasażowano na kolejne podłoża z odpowiednim stężeniem danego antymikotyku. W taki sposób izolaty pasażowane były 20-krotnie. W kolejnym etapie każdy z izolatów przesiewano na podłoże Sabouraud bez dodatku antymikotyków. W ciągu trwania eksperymentu trzy razy izolowano RNA z badanych izolatów: po pierwszym pasażu na podłoże bez dodatku antymikotyków (z 38 izolatów) po dwudziestym pasażu na podłożach z dodatkiem antymikotyków (z 4 spośród tych 38 izolatów) i po kolejnych pięciu pasażach na podłożach bez antymikotyków (ponownie z tych samych 4 izolatów).



W celu izolacji RNA za pomocą jednorazowej igły preparacyjnej zbierano grzybnię do próbek z kuleczkami cyrkoniovymi. Po dodaniu 500  $\mu\text{L}$  wody z DEPC wolnej od RNAz, próbki wytrząsano przez 2 minuty przy 2500 obr/min. Otrzymaną zawiesinę pobierano do jałowych próbek typu eppendorf o poj. 1,5 mL. Kolejne etapy izolacji RNA zostały przeprowadzone zgodnie z protokołem zamieszczonym w zestawie „Total RNA Mini” z modyfikacją punktu 3 - zamiast wody dodano chloroformu oraz z modyfikacją punktu 4 - zamiast 10 minut wirowania przy 10 000 - 12 000 RPM, wirowanie trwało 20 minut. Po elucji próbki traktowano DNAzą i ponownie oczyszczono RNA zgodnie z protokołem zamieszczonym w zestawie „Clean up RNA Concentrator”. Elucję prowadzono 20  $\mu\text{L}$  wody. Otrzymany wodny roztwór RNA przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do dalszych analiz.

Następnie za pomocą urządzenia NanoDrop 1000 ustalono stężenie RNA w każdej próbce w celu obliczenia odpowiedniej objętości roztworu RNA każdej z prób zawierającej 1  $\mu\text{g}$  RNA. Reakcję przeprowadzono zgodnie z protokołem i odczynnikami zawartymi w zestawie „TranScriba”. Do syntezy cDNA wykorzystano starter oligo(dT)18, zamieszczony w zestawie „TranScriba”. Otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do dalszych analiz.

### 7.7.2.2. Real-time PCR

Początkowo przeprowadzono optymalizację warunków procesu wykorzystując przy tym cztery rozcieńczenia mieszaniny wszystkich próbek cDNA dla siedmiu par starterów użytych do amplifikacji fragmentów wybranych genów (*CYP51A*, *CYP51B*, *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF* i  $\beta$ -tubuliny). Zoptymalizowane warunki reakcji dla badania poziomu ekspresji genów zostały przedstawione w poniższych tabelach (Tab. 12. – Tab. 18.) Skład mieszaniny reakcyjnej, której końcowa objętość wynosiła 20  $\mu\text{L}$  przedstawiono w tabeli 19 (Tab. 19.).

Tab. 12. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu *CYP51A*

WARUNKI REAKCJI DLA GENU <i>CYP51A</i>				
L.p.	Etapy reakcji real-time PCR	Temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Czas [s]	Skok [ $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ ]
1.	Denaturacja wstępna	95	300	4,4
AMPLIFIKACJA – 45 cykli				
2.	Denaturacja właściwa	95	15	4,4
3.	Przylączenie starterów	60	15	2,2
4.	Wydluzanie	72	20	4,4
WYZNACZANIE KRZYWEJ TOPNIENIA				
5.	Denaturacja	95	10	4,4
6.	Topnienie produktów PCR	60	60	2,2
		97	60	0,1
7.	Wydluzanie	40	300	2,2

Tab. 13. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu *CYP51B*

<b>WARUNKI REAKCJI DLA GENU <i>CYP51B</i></b>				
<b>L.p.</b>	<b>Etapy reakcji real-time PCR</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Czas [s]</b>	<b>Skok [°C/s]</b>
1.	Denaturacja wstępna	95	300	4,4
<b>AMPLIFIKACJA – 45 cykli</b>				
2.	Denaturacja właściwa	95	15	4,4
3.	Przylączenie starterów	52	15	2,2
4.	Wydłużanie	72	20	4,4
<b>WYZNACZANIE KRZYWEJ TOPNIENIA</b>				
5.	Denaturacja	95	10	4,4
6.	Topnienie produktów PCR	60	60	2,2
		97	60	0,1
7.	Wydłużanie	40	300	2,2

Tab. 14. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu *MDR1*

<b>WARUNKI REAKCJI DLA GENU <i>MDR1</i></b>				
<b>L.p.</b>	<b>Etapy reakcji real-time PCR</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Czas [s]</b>	<b>Skok [°C/s]</b>
1.	Denaturacja wstępna	95	300	4,4
<b>AMPLIFIKACJA – 40 cykli</b>				
2.	Denaturacja właściwa	95	30	4,4
3.	Przylączenie starterów	59	60	2,2
4.	Wydłużanie	72	60	4,4
<b>WYZNACZANIE KRZYWEJ TOPNIENIA</b>				
5.	Denaturacja	95	10	4,4
6.	Topnienie produktów PCR	60	60	2,2
		95	60	0,1
7.	Wydłużanie	40	300	2,2

Tab. 15. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu *MDR2*

<b>WARUNKI REAKCJI DLA GENU <i>MDR2</i></b>				
<b>L.p.</b>	<b>Etapy reakcji real-time PCR</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Czas [s]</b>	<b>Skok [°C/s]</b>
1.	Denaturacja wstępna	95	300	4,4
<b>AMPLIFIKACJA – 40 cykli</b>				
2.	Denaturacja właściwa	95	30	4,4
3.	Przylączenie starterów	62	60	2,2
4.	Wydłużanie	72	60	4,4
<b>WYZNACZANIE KRZYWEJ TOPNIENIA</b>				
5.	Denaturacja	95	10	4,4
6.	Topnienie produktów PCR	60	60	2,2
		95	60	0,1
7.	Wydłużanie	40	300	2,2

Tab. 16. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu *MDR3*

<b>WARUNKI REAKCJI DLA GENU <i>MDR3</i></b>				
L.p.	Etapy reakcji real-time PCR	Temperatura [°C]	Czas [s]	Skok [°C/s]
1.	Denaturacja wstępna	95	300	4,4
AMPLIFIKACJA – 40 cykli				
2.	Denaturacja właściwa	95	30	4,4
3.	Przylączenie starterów	62	60	2,2
4.	Wyłużanie	72	60	4,4
WYZNACZANIE KRZYWEJ TOPNIENIA				
5.	Denaturacja	95	10	4,4
6.	Topnienie produktów PCR	60	60	2,2
		95	60	0,1
7.	Wyłużanie	40	300	2,2

Tab. 17. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu *ATRF*

<b>WARUNKI REAKCJI DLA GENU <i>ATRF</i></b>				
L.p.	Etapy reakcji real-time PCR	Temperatura [°C]	Czas [s]	Skok [°C/s]
1.	Denaturacja wstępna	95	300	4,4
AMPLIFIKACJA – 40 cykli				
2.	Denaturacja właściwa	95	30	4,4
3.	Przylączenie starterów	60	60	2,2
4.	Wyłużanie	72	60	4,4
WYZNACZANIE KRZYWEJ TOPNIENIA				
5.	Denaturacja	95	10	4,4
6.	Topnienie produktów PCR	60	60	2,2
		95	60	0,1
7.	Wyłużanie	40	300	2,2

Tab. 18. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu  $\beta$ -tubuliny

<b>WARUNKI REAKCJI DLA GENU <math>\beta</math>-tubuliny</b>				
L.p.	Etapy reakcji real-time PCR	Temperatura [°C]	Czas [s]	Skok [°C/s]
1.	Denaturacja wstępna	95	300	4,4
AMPLIFIKACJA – 40 cykli				
2.	Denaturacja właściwa	95	40	4,4
3.	Przylączenie starterów	60	60	2,2
4.	Wyłużanie	72	60	4,4
WYZNACZANIE KRZYWEJ TOPNIENIA				
5.	Denaturacja	95	10	4,4
6.	Topnienie produktów PCR	60	60	2,2
		95	60	0,1
7.	Wyłużanie	40	300	2,2

Tab. 19. Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystywany do reakcji real-time PCR

L. p	Odczynnik	Objętość [ $\mu$ L]
1.	Woda	8,8
2.	Mix A	10,0
3.	Starter przedni (100 mM)	0,1
4.	Starter wsteczny (100 mM)	0,1
5.	Matryca cDNA	1,0
<b>Objętość końcowa</b>		20,0

Reakcję real-time PCR dla każdego genu, dla każdej próbki wykonywano w trzech powtórzeniach. Następnie obliczano średnią arytmetyczną z uzyskanych wyników cyklu progowego dla każdego genu.

### 7.7.2.3. Analiza poziomów ekspresji genów

Oznaczanie poziomu ekspresji genów wiąże się z poprzedzającymi procesami, podczas których może dochodzić do utraty materiału genetycznego i prowadzić do błędnych wyników oznaczeń poziomu ekspresji. Aby zapobiec tego typu błędom zastosowano normalizację poziomu ekspresji badanego genu w stosunku do poziomu ekspresji genu referencyjnego jakim w tym przypadku jest  $\beta$ -tubulina. W przedstawionych w niniejszej pracy badaniach, do obliczeń poziomów ekspresji genów wykorzystano dwie metody: komparatywną (porównawczą) i metodę Pfaffla [Pfaffl M, 2001, Tybulski J, 2008].

Do analizy statystycznej wyników uzyskanych w trakcie eksperymentów dotyczących poziomów ekspresji genów zastosowano test U Manna Whitney'a. Jest to nieparametryczny test porównującym dwie grupy niezależne. Zmienna zależna musi być mierzona na skali co najmniej porządkowej (może być również mierzona na skali ilościowej). Jest to podstawowy warunek dla zastosowania tego testu. Zastosowanie testu U Manna Whitney'a nie wymaga równoliczności grup, rozkładu normalnego czy też homogenicznych wariancji. To sprawia, że może być on szeroko stosowany. Test U Manna Whitney'a polega na rangowaniu wyników zmiennej zależnej (od najmniejszej do największej) w badanych grupach, a następnie grupy są ze sobą porównywane.

W toku eksperymentów przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy sprawdzano różnice w poziomach ekspresji poszczególnych genów izolatów *A. fumigatus* podzielonych na grupy:

- izolaty z mutacją TR<sub>34</sub>L98H i bez tej mutacji;
- izolaty odporne wyłącznie na itraconazol i wrażliwe na wszystkie badane na azole
- izolaty odporne na itraconazol bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H i izolaty odporne na itraconazol z mutacją TR<sub>34</sub>L98H

W trakcie analizy sprawdzano poziomy ekspresji genów po hodowli na podłożu Sabouraud oraz porównywano z poziomami ekspresji genów tych samych grup izolatów hodowanych na podłożach z dodatkiem poszczególnych azoli.

W trakcie przeprowadzania analizy statystycznej wyznaczany był tzw. parametr P, którego wartość poniżej 0,05 oznacza, że obydwie populacje są znacząco różne, co potwierdza hipotezę, że w jednej z grup obserwowany jest znaczący wzrost bądź spadek poziomu ekspresji danego genu [Mazerski J, 2009].

### 7.7.2.3.1. Analiza poziomów ekspresji genów metodą komparatywną

Metoda komparatywna oparta jest na modelu matematycznym, który pozwala wyliczyć względną różnicę poziomu ekspresji badanego genu między próbkami nieznanymi a próbą referencyjną. W pierwszej kolejności wyznacza się cykle progowe ( $C_t$ ) reakcji powielania genów badanych i kontrolnych w próbach nieznanymi i w próbie referencyjnej. Następnie, dla poszczególnych prób wyliczane są różnice pomiędzy wartościami  $C_t$  PCR przebiegającej na matrycy genu badanego i genu kontrolnego ( $\Delta C_t$ ). Obliczenia przeprowadzane są zarówno dla prób nieznanymi, jak i kalibracyjnych wg następującego schematu:

$$\Delta C_t (\text{próba nieznana}) = C_t \text{ genu badanego} - C_t \text{ genu referencyjnego}$$

$$\Delta C_t (\text{kalibrator}) = C_t \text{ genu badanego} - C_t \text{ genu referencyjnego}$$

Następnie oblicza się  $\Delta \Delta C_t$  dla każdej próby:

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t (\text{próba nieznana}) - \Delta C_t (\text{kalibrator}).$$

Obliczenie znormalizowanej wartości względnego poziomu ekspresji badanego genu w próbie nieznanymi względem kalibratora przeprowadza się wg wzoru:

$$R = 2^{-\Delta \Delta C_t}.$$

Uzyskiwane w ten sposób wyniki wyrażane są jako wielokrotność próby kalibracyjnej. Wartość parametru R równa 1 oznacza, że poziom ekspresji lub liczba kopii genu w próbie kalibracyjnej i nieznanymi są jednakowe. Liczba mniejsza od jedności wskazuje na wyższy poziom ekspresji w próbie kalibracyjnej zaś większa, na wyższą ekspresję genu w próbie nieznanymi w porównaniu z próbą referencyjną.

Warunkiem stosowania metody komparatywnej są zbliżone efektywności reakcji powielania sekwencji genu badanego i genu referencyjnego. Dlatego zastosowanie tej metody poprzedza porównanie wydajności reakcji (E). W tym celu należy prześledzić zmiany  $\Delta C_t$  (różnica między wartościami  $C_t$  genu badanego i referencyjnego dla tej samej początkowej ilości matrycy) uzyskane dla serii rozcieńczeń matrycy [Tyburski J, 2008].

W pracy jako gen referencyjny wykorzystany został gen  $\beta$ -tubuliny. Jako kalibrator wykorzystano uśrednione wartości uzyskane dla izolatów wrażliwych na azole, u których nie zaobserwowano mutacji w genie *CYP51A*.



### 7.7.2.3.2. Analiza zmian poziomów ekspresji genów metodą Pfaffla

Metoda ta umożliwia korekcję danych pod względem różnic w wydajności real-time PCR. Wzór matematyczny uwzględnia normalizację oraz porównanie poziomu transkryptu w próbie nieznanej i kalibracyjnej. Metoda ta wymaga wyznaczenia efektywności (E) powielania genu badanego i referencyjnego. Wydajność real-time PCR genu badanego i referencyjnego nie musi być podobna. W kolejnym etapie wyznacza się cykle progowe ( $C_p$ ) dla genu badanego i genu referencyjnego zarówno dla prób badanych, jak i kalibratora. Autor modelu proponuje obliczanie względnego poziomu ekspresji badanego genu według wzoru:

$$R = \frac{(E_{\text{gen badany}})^{\Delta C_p \text{ gen badany (kontrola-próbka)}}}{(E_{\text{gen kontrolny}})^{\Delta C_p \text{ gen kontrolny (kontrola-próbka)}}$$

gdzie:

**R** – to poziom badanego transkryptu w próbie nieznanej wyrażony jako wielokrotność kalibratora;

**$E_{\text{gen badany}}$**  – wydajność powielania genu badanego;

**$E_{\text{gen kontrolny}}$**  – wydajność powielania genu kontrolnego;

**$C_p \text{ gen badany}$**  – różnica cykli progowych wyznaczonych dla genu badanego w próbie kalibracyjnej i nieznanej;

**$C_p \text{ gen kontrolny}$**  – różnica cykli progowych PCR genu kontrolnego między próbą kalibracyjną i nieznaną [Tyburski J, 2008].

Do obliczeń użyto arkusza kalkulacyjnego opracowanego do obliczeń metodą Pfaffla, dostępnego na stronie internetowej: <http://www.microbiologybook.org/pcr/pcr-pfaffl.htm>

$R = 1$  oznacza „wyjściowy” poziom ekspresji genu, czyli taki, który występuje u danego izolatu hodowanego na podłożu Sabouraud bez dodatku antymikotyków. Wzrost poziomu ekspresji genu uznawany jest za istotny, gdy wartość  $R$  wynosi co najmniej 2. Wartość  $R = 2$  oznacza, że poziom ekspresji badanego genu jest dwa razy większy od „wyjściowego”.



### 7.7.3. Oznaczanie wrażliwości na azole

Po 20-krotnych pasażach izolatów *A. fumigatus* na podłożach z dodatkiem antymikotyków (posakonazol: stężenie – 0,125 mg/L, worikonazol: stężenie – 0,25 mg/L i itrakonazol: stężenie – 1 mg/L) oraz po kolejnych 5 pasażach tych izolatów na podłożu Sabouraud wyznaczono wartości MIC dla posakonazolu, itrakonazolu i worikonazolu.

### 7.8. Oznaczanie wrażliwości izolatów *A. fumigatus* na izawukonazol

Do badań wrażliwości izolatów *A. fumigatus* na izawukonazol wybrano 100 izolatów *A. fumigatus* i zastosowano metodykę Europejskiego Komitetu do spraw Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST) opisaną w dokumencie E.Def 9.3. [Arendrup M, 2017] W celu kontroli jakości wykonanych eksperymentów wykorzystano referencyjny szczep *A. fumigatus* ATCC 204305. Zarówno przygotowanie inokulum, jak i odczyt wyników przeprowadzano zgodnie z wytycznymi EUCAST.

Zakres badanych stężeń izawukonazolu wynosił: 0,0312 – 16 mg/L. Dla każdego izolatu oznaczenie lekowrażliwości zostało wykonane w trzech powtórzeniach.

**Ogólny schemat metodyki wykorzystywanej w niniejszej pracy przedstawiono na stronie 145.**

## 8. Wyniki i wnioski

### 8.1. Potwierdzenie przynależności gatunkowej badanych izolatów

W celu potwierdzenia przynależności gatunkowej 204 izolatów do *A. fumigatus* wykonano reakcje PCR regionu ITS. Spodziewana wielkość amplifikowanego fragmentu ITS dla grzybów *A. fumigatus* wynosiła około 600 pz.

Otrzymane produkty reakcji PCR ITS sekwencjonowano w celu potwierdzenia ich identyfikacji. W wyniku przeprowadzonych badań, potwierdzono przynależność gatunkową 200 z 204 izolatów do gatunku *A. fumigatus*. **Cztery z 204 izolatów, które za pomocą klasycznej identyfikacji zostały przyporządkowane do gatunku *A. fumigatus* okazały się być: *A. versicolor* (izolaty kliniczne pochodzące z Warszawy o numerach: 189 i 190), *A. flavus* (izolat kliniczny pochodzący z Warszawy o numerze 139) i *Penicillium chrysogenum* (izolat kliniczny pochodzący z Wrocławia o numerze 66).** Szczepy te wykluczono z puli izolatów zakwalifikowanych do dalszych eksperymentów.

Równocześnie zewnętrznej firmie zlecono wykonanie identyfikacji molekularnej z użyciem genu  $\beta$ -tubuliny. Wyniki pokrywały się z prezentowanymi powyżej.

### 8.2. Wrażliwość izolatów *A. fumigatus* na posakonazol, itrakonazol i worikonazol

W poniższej tabeli (Tab. 20.) przedstawiono wartości MIC posakonazolu, itrakonazolu i worikonazolu dla 200 izolatów *A. fumigatus*. **Czerwonym kolorem** zaznaczono wartości MIC wskazujące na oporność izolatów na badany związek.

Tab. 20. Wyniki oznaczania lekowrażliwości izolatów *A. fumigatus* na posakonazol, worikonazol i itrakonazol

Nr izolatu	MIC ITR [mg/L]	MIC POS [mg/L]	MIC VOR [mg/L]
1	0,5	0,0312	0,25
2	0,25	0,0312	0,25
3	0,5	0,0312	0,25
4-8	0,25	0,0312	0,25
9-11	0,25	0,0312	0,125
12	0,25	0,0312	0,25
13	<b>2</b>	<b>0,5</b>	<b>2</b>
14	0,25	0,125	0,5
15-16	0,25	0,0312	0,125
17	0,125	0,0156	0,0625
18-19	0,25	0,0312	0,25
20	1	0,0625	0,5
21	0,25	0,0312	0,25
22	0,25	0,0312	0,125
23	0,25	0,0312	0,25
24	0,125	0,0156	0,0625
25	0,5	0,0312	0,25

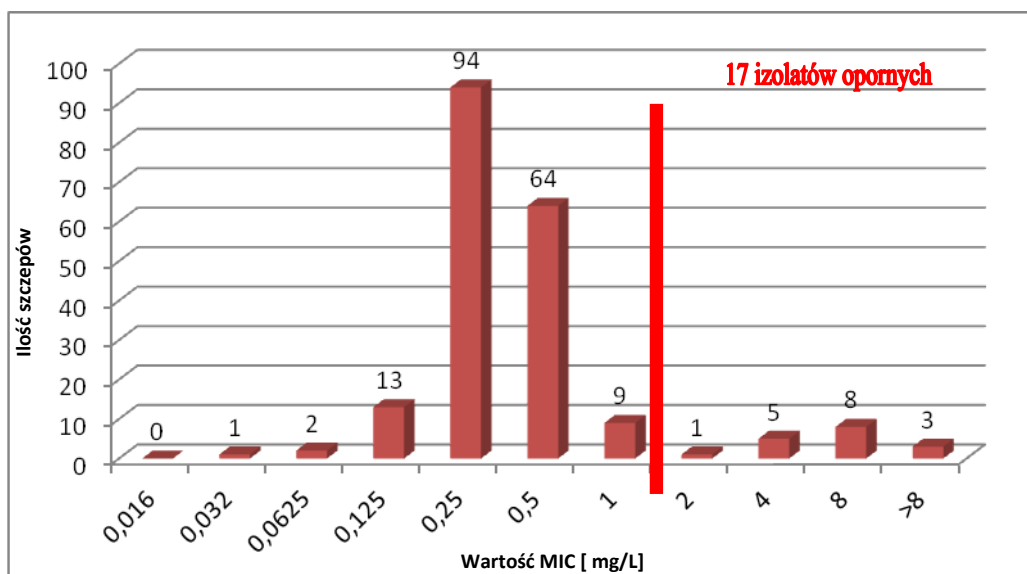
26	0,5	0,0312	0,125
27	0,25	0,0312	0,25
28	0,5	0,0312	0,125
29	0,25	0,0156	0,25
30	0,25	0,0312	0,25
31	0,125	0,0312	0,25
32	0,25	0,0312	0,125
33-34	0,25	0,0312	0,25
35	0,0625	0,0156	0,125
36	0,5	0,0312	0,5
37	0,0625	0,0256	0,0625
38	0,25	0,0312	0,25
39	0,125	0,0312	0,25
40-43	0,25	0,0312	0,25
44	0,0312	0,0156	0,125
45	0,25	0,0312	0,25
46-47	0,25	0,0156	0,25
48-50	0,25	0,0312	0,25
51	0,25	0,0312	0,5
52	0,25	0,0312	0,25
53	0,5	0,0312	0,25
54	0,25	0,0312	0,25
55	>8	0,25	2
56	0,5	0,0625	0,25
57	0,5	0,0312	0,25
58	0,25	0,0312	0,25
59	1	0,0312	0,5
60	0,25	0,0312	0,25
61-63	0,5	0,0312	0,25
64	0,5	0,0625	0,5
65	0,25	0,0312	0,25
67	0,25	0,0156	0,125
68-70	0,25	0,0312	0,25
71	0,25	0,0312	0,0625
72	0,25	0,0312	0,125
73	0,125	0,0156	0,25
74	0,5	0,0312	0,25
75-79	0,25	0,0312	0,25
80	0,25	0,0156	0,25
81-84	0,5	0,0312	0,25
85-87	0,25	0,0312	0,25
88	0,5	0,0312	0,25
89	0,25	0,0312	0,25
90-91	0,5	0,0312	0,25
92	0,5	0,0312	0,5
93	0,5	0,0312	0,25
94-95	0,25	0,0312	0,25
96	0,5	0,0312	0,25
97-98	0,25	0,0312	0,25
99-100	0,5	0,0625	0,25
101	0,25	0,0312	0,125
102	0,5	0,0625	0,5
103	0,5	0,0625	0,25
104	0,125	0,0312	0,125

105-107	0,5	0,0312	0,25
108	0,125	0,0312	0,125
109	0,25	0,0312	0,25
110	0,5	0,0312	0,25
111	0,5	0,0625	0,25
112	0,25	0,0312	0,25
113-114	0,5	0,0312	0,25
115	0,25	0,0312	0,25
116	0,5	0,0625	0,25
117	8	0,5	1
118	0,5	0,0625	0,25
119	0,125	0,0312	0,125
120-123	0,5	0,0312	0,25
124	0,5	0,0625	0,25
125-126	0,5	0,0312	0,25
127	0,25	0,0312	0,25
128	0,5	0,0625	0,5
129	>8	0,5	2
130	1	0,0625	0,5
131	0,5	0,0312	0,5
132	0,5	0,0312	0,25
133	0,0125	0,0312	0,25
134	8	0,25	1
135-136	0,5	0,0312	0,25
137	0,125	0,0312	0,125
138	0,5	0,0312	0,25
140	0,5	0,0625	0,25
141	0,5	0,0625	0,5
142	0,5	0,125	0,5
143	0,5	0,0312	0,25
144	0,5	0,0625	0,25
145	>8	0,25	2
146-147	0,25	0,0625	0,25
148	0,25	0,0312	0,25
149	0,25	0,0312	0,5
150	0,125	0,0625	0,25
151	0,125	0,0312	0,25
152	0,25	0,0625	0,5
153	0,25	0,0312	0,25
154	0,125	0,0625	0,25
155	0,5	0,0625	0,125
156	0,5	0,0312	0,125
157	0,25	0,0625	0,25
158-159	0,5	0,0312	0,25
160-161	0,5	0,0625	0,25
162	0,25	0,125	0,25
163	0,25	0,125	0,5
164-169	0,25	0,0625	0,25
170-171	1	0,0625	0,25
172	0,25	0,0625	0,25
173	1	0,0625	0,25
174-175	0,25	0,0625	0,25
176	1	0,0625	0,25



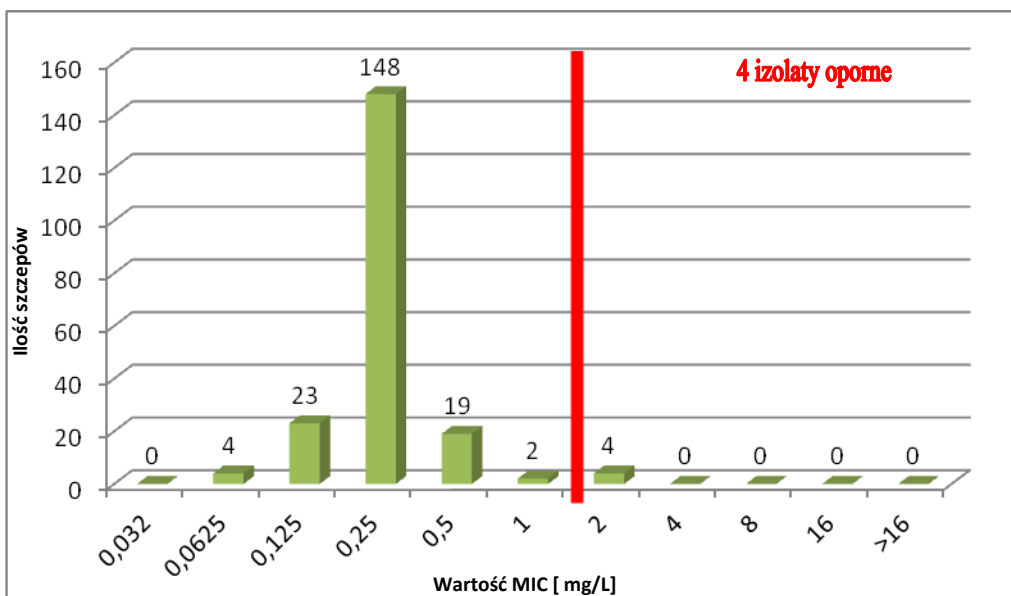
177	0,5	0,0625	0,25
178	1	0,0625	0,25
179-186	0,25	0,0625	0,25
187	1	0,0625	0,25
188	0,25	0,0625	0,25
191	4	0,0312	0,5
192	0,5	0,0625	0,25
193-194	8	0,0312	0,25
195	4	0,0625	0,25
196	8,0	0,125	0,25
197	4	0,0625	0,125
198	0,5	0,125	0,25
199	4	0,0312	0,5
200	8	0,0625	0,125
201-202	8	0,125	0,125
203	4	0,125	0,5
204	0,25	0,0312	0,0312

Na poniższych wykresach (Ryc. 12. wykres dla ITR; Ryc. 13. wykres dla VOR; Ryc. 14. wykres dla POS) przedstawiono uzyskane wyniki wartości MIC. Ilości szczepów opornych od wrażliwych oddzielono pionową, czerwoną linią.

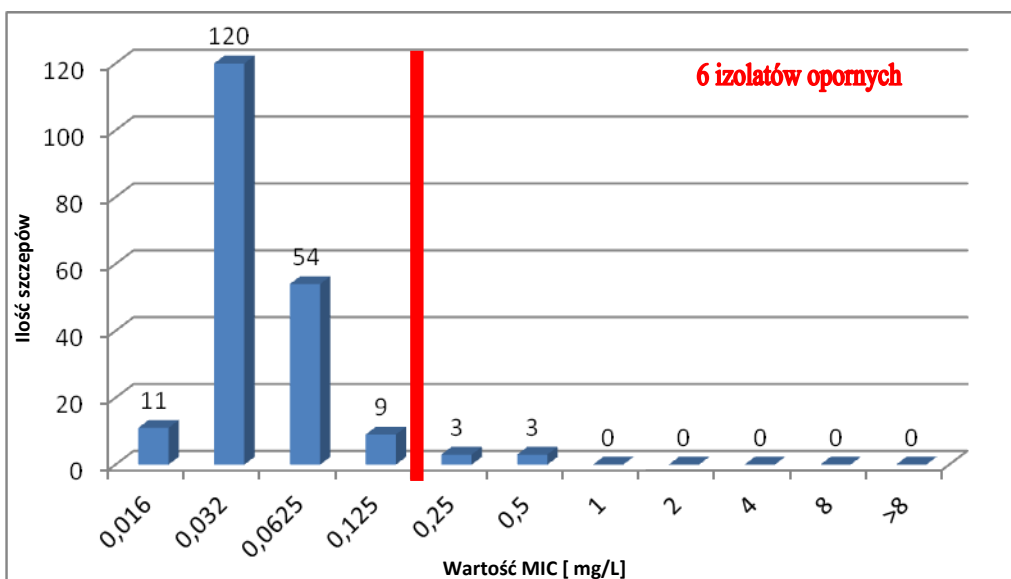


Ryc. 12. Wykres wartości MIC dla itrakonazolu





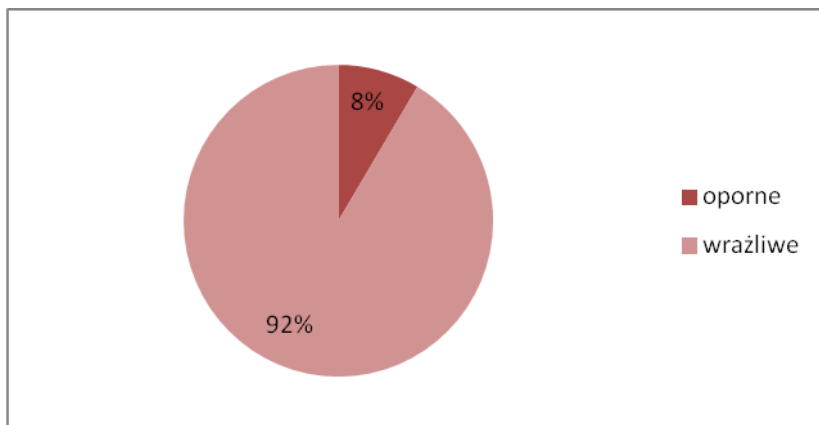
Ryc. 13. Wykres wartości MIC dla worykonazolu



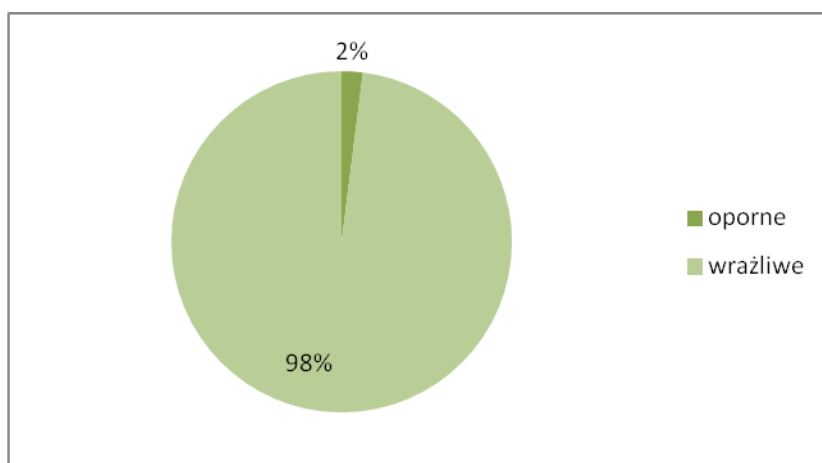
Ryc. 14. Wykres wartości MIC dla posakonazolu

Na poniższych kołowych wykresach przedstawiono procentowy udział izolatów opornych i wrażliwych na itrakonazol (Ryc. 15.), worykonazol (Ryc. 16.) i posakonazol (Ryc. 17.)

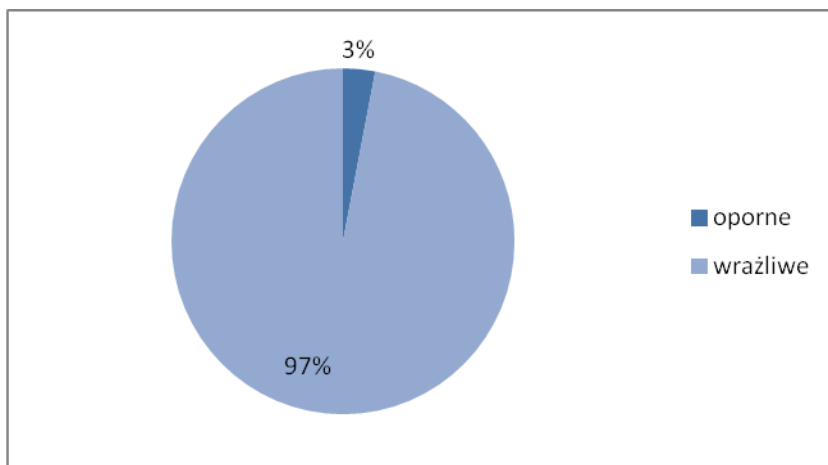




Ryc. 15. Procentowy udział izolatów opornych na itrakonazol



Ryc. 16. Procentowy udział izolatów opornych na vorikonazol



Ryc. 17. Procentowy udział izolatów opornych na posakonazol



### 8.3. Analiza sekwencji genu *CYP51A* izolatów *A. fumigatus*

W wyniku amplifikacji genu *CYP51A* uzyskano produkty PCR o długości około 1600 pz. Produkty oczyszczano za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu do oczyszczania produktów po reakcjach enzymatycznych „Clean Up Concentrator” (A&A Biotechnology). Po oczyszczeniu, mierzono stężenia próbek, rozcieńczano do 50 ng/ $\mu$ L i wysłano do sekwencjonowania. Otrzymane wyniki przeanalizowano za pomocą programu VectorNTI.

W wyniku analizy sekwencji nukleotydowych genu *CYP51A* 200 izolatów *A. fumigatus*, stwierdzono występowanie najczęściej opisywanej literaturowo mutacji odpowiadającej za oporność na leki z grupy azoli. Mutacja ta, to zamiana tyminy na adeninę w pozycji 293 łańcucha nukleotydowego powodująca zamianę w pozycji 98 łańcucha aminokwasowego leucyny na histydynę (L98H). Mutację tę zaobserwowano u sześciu z 200 przebadanych izolatów *A. fumigatus*, w tym pięciu klinicznych (izolaty z Wrocławia: 13 i 55 oraz Warszawy: 117, 129 i 134), a także w przypadku jednego środowiskowego izolatu pochodzącego z Nadola (izolat 145). Mutację tą zaznaczono w tabeli 21 (Tab. 21.) kolorem czerwonym.

Dodatkowo, zaobserwowano inne mutacje – do tej pory nieopisane w literaturze - pozostające bez wpływu na oporność izolatów na badane antymikotyki. Warto zauważyć, że w przypadku dziewięciu z 14 weterynaryjnych izolatów w genie *CYP51A* występowały mutacje punktowe, jednak ani w odniesieniu do danych literaturowych, ani w odniesieniu do wyników uzyskanych w niniejszej rozprawie nie udało się skorelować ich z tak szeroko występującą u tych szczepów opornością na itraconazol.

Wyniki analizy sekwencji w kierunku poszukiwania mutacji zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 21.). Przedstawiono w niej wyłącznie izolaty charakteryzujące się występowaniem zmiany nukleotydowej w sekwencji genu *CYP51A*. Większość z tych zmian, powodowała zmianę w sekwencji białka. Zaobserwowano także występowanie mutacji cichych, pozostających bez wpływu na sekwencję aminokwasową białka (zaznaczono w tabeli kolorem żółtym).

Tab. 21. Wyniki analizy sekwencji fragmentu genu *CYP51A*

L.p.	Nazwa izolatu	Pochodzenie izolatu	Miejsce zmiany	
			nukleotydowa	aminokwasowa
1	13	Kliniczne z Wrocławia	T293A	Leu-His
2	29		G784T	Asp-Tyr
3	55		T293A	Leu-His
4	102	Kliniczne z Warszawy	T229G	Leu-Val
			G393A	Gln-Gln
			G433A	Glu-Lis
5	106		T229G	Leu-Val
6	114		T229G	Leu-Val
			G333C	Thr-Thr
7	115		T229G	Leu-Val
			G313A	Glu-Lys
8	116		G247T	Val-Phe
9	117		T293A	Leu-His
10	118		A217T	Thr-Pro
			T229	Leu-Val
11	122		T441G	His-Gln
12	129		T293A	Leu-His
13	134		T293A	Leu-His
14	140	G393A	Gln-Gln	
		G433A	Glu-Lys	
15	144	T744A	Asp-Lys	
		T912G	Trp-Cys	
16	99	Kliniczny z Gdańska	A81C	Leu-Phe
17	191	Środowiskowy z hodowli gęsi	G777C	Gln-His
18	193		T667G	Trp-Gly
			C672T	Ala-Ala
19	194		G423A	Gln-Gln
20	195		G885T	Gln-His
21	197		C672T	Ala-Ala
22	199		G423A	Gln-Gln
			G713A	Arg-His
			G905A	Ser-Asn
23	200		G423A	Gln-Gln
24	201	G423A	Gln-Gln	
		G777C	Gln-His	
25	202	G423A	Gln-Gln	
26	145	Środowiskowe z Gdańska i okolic	T293A	Leu-His
27	146		T229G	Leu-Val
28	147		G393A	Gln-Gln

Kolorem czerwonym zaznaczono mutację L98H – najczęściej literaturowo korelowaną z opornością izolatów *A. fumigatus* na azole  
kolorem żółtym zaznaczono mutacje ciche, nie wpływające na zmianę w białku CYP51A.

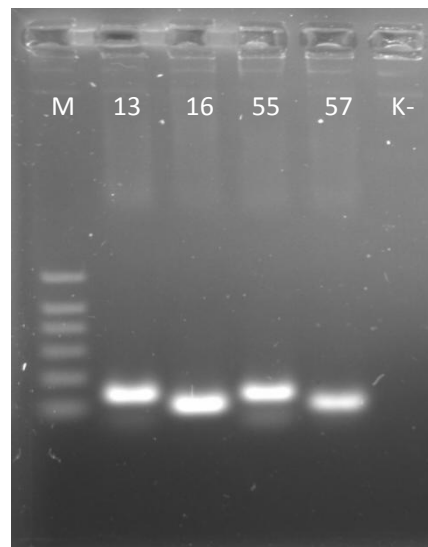
Warto zwrócić uwagę, iż mutacja T293A w genie *CYP51A* występuje u wszystkich izolatów opornych zarówno na itraconazol i posakonazol oraz tych opornych na itraconazol, posakonazol i vorikonazol. Nie zaobserwowano jej w grupie izolatów opornych wyłącznie na itraconazol oraz izolatów wrażliwych na wszystkie badane antymikotyki.



Część wyników z oznaczania oporności na azole oraz sekwencjonowania genu *CYP51A* wśród izolatów *A. fumigatus* została przedstawiona: na konferencji 6<sup>th</sup> International Weigl Conference on Microbiology i opublikowana w formie publikacji w materiałach pokonferencyjnych w *Acta Biochimica Polonica*, Materiały Pokonferencyjne 6<sup>th</sup> International Weigl Conference on Microbiology: „The first report of azole resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolate”; oraz przedstawiona w formie plakatów na konferencji 7th Trends in Medical Mycology „Detection of clinical *Aspergillus fumigatus* isolates resistant to triazoles” i w formie plakatu na XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Oporność izolatów *Aspergillus fumigatus* na azole”; a także opublikowana w *Medical Mycology* w publikacji: „Detection of Polish clinical *Aspergillus fumigatus* isolates resistant to triazoles” i w formie publikacji w *Acta Biochimica Polonica* „Relation of the polymorphism of *CYP51A* sequence and the susceptibility of *Aspergillus fumigatus* isolates to triazoles determined by commercial gradient test (Etest) and by reference methods”

#### 8.4. Występowanie tandemowych powtórzeń (TR<sub>34</sub>) w rejonie promotora genu *CYP51A*

Na rycinie 18 (Ryc. 18.) przedstawiono wynik rozdziału elektroforetycznego amplifikowanych fragmentów promotora genu *CYP51A* z wykorzystaniem starterów cyp51TR-For i cyp51TR-Rev dla przykładowych izolatów. Spodziewana wielkość amplifikowanego fragmentu bez powtórzeń wynosi 111 pz. zaś dla fragmentu z powtórzeniem 145 pz.



Ryc. 18. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR TR<sub>34</sub> dla przykładowych izolatów. Żel agarozowy 2%, czas rozdziału 45 minut, napięcie 90 V, M - marker o wielkości 100-700, K - kontrola negatywna; ścieżki opisane są numerami izolatów.

W wyniku reakcji PCR, której targetem był fragment regionu promotorowego genu *CYP51A* uzyskano produkty PCR widoczne na powyższym elektroforegramie (Ryc. 18). Wielkość produktów dla izolatów 13 i 55 to 145 pz. Izolaty te charakteryzują

się występowaniem powtórzenia TR<sub>34</sub> w regionie promotora genu *CYP51A*. Dla izolatów 16 i 57 uzyskano wielkość produktu 111 pz. Izolaty te nie posiadają powtórzenia TR<sub>34</sub> w rejonie promotora genu *CYP51A*.

W toku badań wykryto, iż **powtórzenie w obrębie regionu promotorowego posiada łącznie sześć z 200 izolatów *A. fumigatus***, w tym pięć klinicznych (2 izolaty z Wrocławia: 13 i 55; oraz 3 z Warszawy: 117, 129 i 134) i jeden środowiskowy pochodzący z Nadola (izolat 145). **Powtórzenia skorelowane są z występowaniem mutacji T293A w genie *CYP51A*** a co za tym idzie występuje u wszystkich izolatów opornych zarówno na itraconazol i posakonazol oraz tych opornych na itraconazol, posakonazol i worikonazol. Powtórzeń TR<sub>34</sub> nie zaobserwowano w grupie izolatów opornych wyłącznie na itraconazol oraz izolatów wrażliwych na wszystkie badane antymikotyki.

**Wyniki analizy występowania tandemowych powtórzeń w rejonie promotora zostały przedstawione w formie plakatu na II Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka – Drobnoustroje oportunistyczne”:**” Występowanie tandemowych powtórzeń (TR<sub>34</sub>) w rejonie promotora genu *CYP51A* oraz mutacji w tym genie jako czynników predysponujących do oporności na azole wśród izolatów *Aspergillus fumigatus*” Praca została wyróżniona I miejscem w sesji plakatowej.

## 8.5. Badanie wpływu azoli na izolaty *A. fumigatus*

Do badań wpływu ekspozycji *A. fumigatus* na azole wybrano 38 izolatów scharakteryzowanych w tabeli dziewiątej (Tab. 9.) w rozdziale 7.7. Poza określeniem zmian w poziomach ekspresji w poniższych podrozdziałach zaprezentowane zostaną także zmiany w morfologii grzybów, jakie zaszły wskutek ekspozycji na azole oraz wartości MIC antymikotyków dla tych izolatów.

### 8.5.1. Oznaczenia wrażliwości na azole izolatów *A. fumigatus* hodowanych jednokrotnie na podłożach z dodatkiem antymikotyków

Trzydzieści osiem izolatów *A. fumigatus* hodowano na podłożach z dwoma różnymi stężeniami posakonazolu, itraconazolu i worikonazolu. Stężenia używanych związków przedstawiono w tabeli dziesiątej (Tab. 10). Następnie wyznaczono wartości MIC dla posakonazolu, itraconazolu i worikonazolu dla 228 próbek (38 izolatów, każdy hodowany na dwóch stężeniach trzech różnych antymikotyków, co daje 228 próbek).

**Wartości MIC antymikotyków uzyskane dla wszystkich próbek bez względu na stężenie i rodzaj związku na jakim hodowane były izolaty były identyczne jak wyjściowe wartości MIC (przedstawione w tabeli 20).**

### 8.5.2. Badanie poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* metodą komparatywną

Wszystkie izolaty hodowano na podłożach o stężeniach dodatkiem: posakonazolu itrakonazolu/worikonazolu (w dwóch stężeniach – przedstawionych w Tab. 10.) i bez dodatku antymikotyku (jako kontrolę). Po pierwszym pasażu wyizolowano RNA, przeprowadzono syntezę cDNA i przeprowadzono reakcję real-time PCR w celu określenia zmian w poziomach ekspresji genów *CYP51A*, *CYP51B*, *MDR1*, *MDR2*, *MDR3* i *ATRF* badanych izolatów. W poniższych podrozdziałach przedstawiono wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów. Do obliczeń wykorzystano metodę komparatywną.

#### 8.5.2.1. Analiza poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud

Wyniki poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* hodowanych na Sabouraud bez dodatku antymikotyków zestawione zostały w poniższych tabelach (Tab. 23., Tab. 25., Tab. 27.). Wartości te służą także do porównania zmian poziomów ekspresji po pasażach na podłożach z dodatkiem określonych stężeń badanych azoli. Średni poziom ekspresji wszystkich badanych genów jest wyższy w grupie izolatów charakteryzujących się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H (zaznaczone w tabelach czerwonym kolorem czcionki) niż w grupie izolatów nie posiadających tej mutacji. Uśrednione wyniki poziomów ekspresji poszczególnych genów izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud przedstawiono w poniższej tabeli (Tab. 22.).

Tab. 22. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud. Izolaty podzielono na dwie grupy: charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H i bez tej mutacji

	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>
<b>Izolaty bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H</b>	1,840	1,057	2,538	0,982	1,671	0,911
<b>Izolaty z mutacją TR<sub>34</sub>L98H</b>	4,565	7,774	11,750	77,051	12,248	8,322

Analiza statystyczna wykonana metodą U Manna Whitney’*a* wykazała, że różnice w poziomach ekspresji genów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud pomiędzy grupą izolatów charakteryzującą się mutacją TR<sub>34</sub>L98H, a izolatami bez tej mutacji są statystycznie istotne. W związku z tym można stwierdzić, że **poziomy ekspresji badanych genów są istotnie wyższe w grupie szczepów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H niż w grupie izolatów bez tej mutacji.**

Podczas analizy statystycznej zaobserwowano także, że **poziom ekspresji genu *CYP51A* izolatów *A. fumigatus* charakteryzujących się brakiem mutacji TR<sub>34</sub>L98H, ale opornych na itrakonazol (izolaty gęsie) był wyższy niż w grupie izolatów wrażliwych na wszystkie badane azole.** Dla pozostałych genów nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami.

### 8.5.2.2. Analiza zmian poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z posakonazolem

W poniższej tabeli (Tab. 23.) przedstawiono wyniki oznaczania poziomów ekspresji genów dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud (izolaty opisane dodatkowo nr 1 po kropce np. 203.1) oraz na podłożach Sabouraud zawierających dwa różne stężenia posakonazolu (niższe oznaczone dodatkowo nr 2 po kropce np. 203.2 i wyższe oznaczone dodatkowo nr 3 po kropce np. 203.3)

Tab. 23. Poziom ekspresji genów po hodowli na podłożu Sabouraud z dodatkiem posakonazolu

nr próbki	Poziom ekspresji genów, wyznaczony względem genu $\beta$ -tubuliny					
	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>
203.1	1,017	2,797	0,452	1,932	15,609	1,731
203.2	2,220	0,126	2,979	0,286	1,647	0,490
203.3	3,258	0,522	3,542	0,285	0,209	0,319
198.1	2,785	1,281	0,555	2,193	0,774	0,702
198.2	0,091	3,162	0,037	1,913	0,210	0,370
198.3	1,191	1,884	2,037	1,347	0,788	2,509
192.1	1,582	1,470	3,965	2,161	2,325	0,112
192.2	3,439	0,553	4,499	14,730	3,149	3,996
192.3	0,986	1,595	2,496	1,959	3,439	1,659
201.1	1,773	0,022	4,678	1,033	0,182	0,139
201.2	1,577	1,603	49,683	5,852	4,042	8,236
201.3	4,927	2,197	1,763	8,704	6,667	28,090
191.1	1,356	2,216	2,988	0,991	1,048	1,928
191.2	0,684	0,260	0,280	0,602	1,189	1,138
191.3	0,517	0,751	0,253	0,948	0,938	0,677
199.1	2,439	0,134	1,508	0,162	0,099	0,015
199.2	11,212	14,764	2,053	4,225	10,411	1,534
199.3	3,607	15,915	5,520	1,476	1,354	2,615
200.1	1,788	0,666	0,078	0,618	1,152	6,307
200.2	0,302	0,541	0,039	2,110	5,657	1,935
200.3	0,232	1,222	0,060	1,371	1,513	1,358
99.1	0,292	0,017	0,650	0,136	0,181	0,072
99.2	3,036	0,123	0,569	3,640	0,434	3,451
99.3	1,190	1,143	0,081	0,320	0,117	1,107
196.1	0,858	0,905	0,121	2,869	7,346	1,770
196.2	0,085	0,139	0,015	0,154	1,602	1,528

<b>196.3</b>	0,252	1,704	0,105	0,705	0,602	0,799
<b>197.1</b>	0,697	1,804	0,341	0,189	0,397	0,334
<b>197.2</b>	10,437	12,075	0,309	1,056	0,451	0,172
<b>197.3</b>	2,853	83,132	0,286	0,777	0,151	0,064
<b>2.1</b>	0,312	0,808	2,968	1,632	3,117	0,831
<b>2.2</b>	0,256	0,388	0,556	0,435	0,190	0,175
<b>2.3</b>	0,616	3,236	0,886	0,394	0,415	0,192
<b>202.1</b>	4,055	0,291	0,091	0,798	0,228	0,245
<b>202.2</b>	0,507	0,045	0,566	1,235	0,563	0,682
<b>202.3</b>	0,135	0,407	0,088	0,474	0,443	0,145
<b>193.1</b>	2,857	0,023	7,157	1,351	1,033	0,437
<b>193.2</b>	0,332	0,155	0,353	2,230	0,529	3,176
<b>193.3</b>	1,468	8,296	0,971	14,042	16,936	20,778
<b>194.1</b>	13,023	0,305	0,987	0,613	0,541	0,663
<b>194.2</b>	0,654	0,050	0,544	0,782	3,149	0,487
<b>194.3</b>	0,207	0,311	1,058	0,740	1,073	2,017
<b>195.1</b>	3,465	1,367	1,087	0,685	1,198	0,770
<b>195.2</b>	0,229	0,246	0,212	1,595	4,287	0,954
<b>195.3</b>	1,256	4,058	2,084	6,948	3,121	6,440
<b>55.1</b>	3,181	2,257	2,180	9,331	10,254	2,562
<b>55.2</b>	3,932	0,236	7,126	4,915	6,989	1,276
<b>55.3</b>	5,524	2,977	11,337	2,168	1,862	5,231
<b>13.1</b>	1,699	3,579	34,400	0,554	0,893	0,629
<b>13.2</b>	1,782	0,200	2,448	0,413	0,618	0,076
<b>13.3</b>	4,513	1,086	1,979	2,354	0,234	0,198
<b>29.1</b>	1,189	0,853	2,696	1,031	0,464	2,609
<b>29.2</b>	0,389	0,341	0,137	0,633	3,643	2,466
<b>29.3</b>	0,069	0,806	0,069	0,234	1,678	1,344
<b>25.1</b>	0,564	0,011	1,601	1,203	0,758	0,182
<b>25.2</b>	0,405	0,427	0,714	0,503	0,841	0,863
<b>25.3</b>	2,280	0,944	2,955	0,134	0,353	0,477
<b>144.1</b>	0,345	1,046	0,497	1,217	0,524	0,157
<b>144.2</b>	5,105	0,176	4,946	23,736	0,248	0,143
<b>144.3</b>	1,487	1,017	3,174	47,946	0,155	0,080
<b>117.1</b>	3,801	14,202	7,075	0,889	6,050	5,219
<b>117.2</b>	0,471	0,687	0,026	0,449	0,056	0,024
<b>117.3</b>	0,023	0,359	0,003	0,718	0,002	0,032
<b>134.1</b>	6,006	7,368	3,013	39,680	14,524	22,685
<b>134.2</b>	0,769	0,792	0,039	0,520	0,079	0,168

<b>134.3</b>	7,230	3,956	0,113	0,662	0,231	0,100
<b>129.1</b>	9,424	7,471	18,975	405,531	3,707	1,202
<b>129.2</b>	4,791	1,478	0,181	0,681	1,306	0,331
<b>129.3</b>	1,466	1,085	0,144	1,154	2,597	1,888
<b>72.1</b>	0,852	1,053	0,406	0,274	0,542	0,515
<b>72.2</b>	3,451	1,588	1,751	3,826	12,000	6,737
<b>72.3</b>	0,436	0,325	0,074	0,844	4,665	3,548
<b>73.1</b>	1,533	5,629	4,375	1,402	4,204	1,260
<b>73.2</b>	1,948	1,522	8,612	2,788	0,276	3,110
<b>73.3</b>	1,342	3,742	0,958	3,028	10,718	3,046
<b>79.1</b>	2,975	1,010	2,533	1,334	4,378	2,803
<b>79.2</b>	4,388	5,699	10,042	0,728	13,524	0,374
<b>79.3</b>	3,330	9,236	6,146	2,389	2,373	1,811
<b>140.1</b>	1,274	1,193	4,733	0,461	1,000	0,226
<b>140.2</b>	0,056	0,033	0,009	0,378	0,003	0,003
<b>140.3</b>	5,666	1,692	0,935	0,717	0,028	0,187
<b>102.1</b>	2,738	4,952	14,281	1,765	1,451	1,843
<b>102.2</b>	0,411	0,199	2,428	0,807	0,365	0,833
<b>102.3</b>	1,525	1,489	0,070	1,602	0,504	0,213
<b>106.1</b>	0,803	0,472	2,055	0,422	0,379	0,031
<b>106.2</b>	3,053	0,182	3,832	0,428	2,158	0,201
<b>106.3</b>	1,149	0,901	0,087	0,817	0,458	0,589
<b>114.1</b>	2,345	1,672	3,079	2,220	2,658	1,667
<b>114.2</b>	1,568	0,532	1,056	3,251	0,396	0,538
<b>114.3</b>	2,169	0,886	0,464	0,972	0,076	0,461
<b>115.1</b>	0,894	0,014	0,168	0,128	0,097	0,034
<b>115.2</b>	0,098	0,086	3,156	0,127	0,551	0,298
<b>115.3</b>	0,965	0,360	4,064	0,355	0,524	0,418
<b>116.1</b>	2,239	0,417	1,852	0,421	0,274	0,124
<b>116.2</b>	1,901	0,283	1,607	3,456	34,297	0,226
<b>116.3</b>	0,443	0,346	0,114	2,615	0,195	0,201
<b>118.1</b>	0,011	0,071	0,004	0,009	0,064	0,128
<b>118.2</b>	0,073	0,059	0,034	0,461	0,122	0,009
<b>118.3</b>	0,071	0,337	3,912	0,118	0,564	0,531
<b>122.1</b>	0,129	0,157	0,001	0,034	0,015	0,033
<b>122.2</b>	0,016	0,046	0,125	6,024	0,015	0,013
<b>122.3</b>	2,309	3,338	6,034	4,988	0,557	1,476
<b>130.1</b>	0,315	0,015	4,755	0,379	0,028	0,117
<b>130.2</b>	1,453	0,997	14,618	1,299	0,413	1,492



130.3	0,450	0,009	4,107	5,611	0,122	0,279
145.1	3,278	11,764	4,860	6,322	38,063	17,635
145.2	2,066	2,784	0,426	3,195	12,817	3,475
145.3	0,577	2,369	0,801	0,709	0,876	1,461
146.1	1,545	0,673	10,541	1,240	0,491	0,252
146.2	6,760	6,501	5,144	3,187	5,749	2,708
146.3	4,389	6,200	66,934	2,263	0,925	1,276
147.1	0,831	0,494	0,028	0,515	0,899	1,120
147.2	1,410	0,147	2,617	12,301	0,482	0,277
147.3	1,722	0,795	0,793	0,678	0,346	0,075

**Czerwonym kolorem czcionki** zaznaczono w tabeli izolaty charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H w białku CYP51A.

W poniższej tabeli (Tab. 24.) przedstawiono uśrednione wyniki poziomów ekspresji poszczególnych genów, z podziałem szczepów na dwie grupy i dwa stężenia posakonazolu.

Tab. 24. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud i na podłożach z dodatkiem posakonazolu. Izolaty podzielono na dwie grupy: charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H i bez tej mutacji

	CYP51A	CYP51B	MDR1	MDR2	MDR3	ATRF
<b>Izolaty bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H, hodowane na podłożu Sabouraud</b>	1,840	1,057	2,538	0,982	1,671	0,911
<b>Izolaty bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H, hodowane na podłożu z niższym stężeniem posakonazolu</b>	2,111	1,658	3,860	3,274	3,519	1,519
<b>Izolaty bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H, hodowane na podłożu z wyższym stężeniem posakonazolu</b>	1,552	4,694	3,597	3,434	1,850	2,502
<b>Izolaty z mutacją TR<sub>34</sub>L98H, hodowane na Sabouraud</b>	4,565	7,774	11,750	77,051	12,248	8,322
<b>Izolaty z mutacją TR<sub>34</sub>L98H, hodowane na podłożu z niższym stężeniem posakonazolu</b>	2,302	1,030	1,708	1,696	3,644	0,892
<b>Izolaty z mutacją TR<sub>34</sub>L98H, hodowane na podłożu z wyższym stężeniem posakonazolu</b>	3,222	1,972	2,396	1,294	0,967	1,485

Uśredniony poziom ekspresji wszystkich badanych genów izolatów *A. fumigatus* bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H wzrasta po hodowli na podłożu z dodatkiem niskiego stężenia posakonazolu. W wyniku hodowli izolatów na podłożu z wyższym stężeniem posakonazolu, poziom ekspresji wszystkich badanych genów za wyjątkiem genu CYP51A również wzrasta.



Uśredniony poziom ekspresji wszystkich badanych genów izolatów *A. fumigatus* charakteryzujących się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H po hodowli na podłożach z dodatkiem posakonazolu (obydwa stosowane stężenia) maleje.

W przypadku genów *CYP51A* i *MDR2* (w izolatach hodowanych na podłożach z badanymi stężeniami posakonazolu) średni poziom ekspresji badanych genów izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H jest wyższy nawet po spadku poziomu ekspresji w wyniku hodowli niż tych samych izolatów bez tej mutacji hodowanych na podłożu Sabouraud. Taką samą zależność średnich poziomów ekspresji dla tej grupy izolatów zaobserwowano w przypadku genu *CYP51B* izolatów hodowanych na podłożu o wyższym stężeniu posakonazolu oraz w przypadku genu *MDR3* izolatów hodowanych na podłożu o niższym stężeniu posakonazolu.

Dla wszystkich przedstawionych powyżej wyników została przeprowadzona analiza statystyczna testem U Manna-Whitney'a i wszystkie wyniki są istotne statystycznie za wyjątkiem izolatów bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H hodowanych na wyższym stężeniu posakonazolu, gdzie zaobserwowano spadek poziomu ekspresji genu *CYP51A*.

### 8.5.2.3. Analiza zmian poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z itraconazolem

W poniższej tabeli (Tab. 25.) przedstawiono wyniki oznaczania poziomów ekspresji genów dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud (izolaty opisane dodatkowo nr 1 po kropce np. 203.1) oraz na podłożach Sabouraud o dwóch różnych stężeniach itraconazolu (niższe oznaczone dodatkowo nr 2 po kropce np. 203.2 i wyższe oznaczone dodatkowo nr 3 po kropce np. 203.3)

Tab. 25. Poziom ekspresji genów po hodowli na podłożu Sabouraud z dodatkiem itraconazolu

nr próbki	Poziom ekspresji genów, wyznaczony względem genu $\beta$ -tubuliny					
	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>
203.1	1,017	2,797	0,452	1,932	15,609	1,731
203.2	1,180	1,291	0,342	0,483	0,733	0,293
203.3	0,713	0,548	0,031	2,300	0,471	0,394
198.1	2,785	1,281	0,555	2,193	0,774	0,702
198.2	0,656	1,377	0,607	0,890	0,519	1,850
198.3	0,320	1,463	0,302	1,793	7,167	2,405
192.1	1,582	1,470	3,965	2,161	2,325	0,112
192.2	2,414	0,974	0,719	1,423	6,765	1,915
192.3	3,850	1,219	1,449	27,954	3,267	2,275
201.1	1,773	0,022	4,678	1,033	0,182	0,139
201.2	0,629	1,400	1,464	0,557	0,345	0,619



<b>201.3</b>	0,430	0,728	1,153	2,806	0,418	0,098
<b>191.1</b>	1,356	2,216	2,988	0,991	1,048	1,928
<b>191.2</b>	5,445	2,570	2,632	2,233	2,754	38,962
<b>191.3</b>	0,538	0,575	0,113	1,834	1,808	1,823
<b>199.1</b>	2,439	0,134	1,508	0,162	0,099	0,015
<b>199.2</b>	5,272	0,778	13,958	1,244	0,714	0,633
<b>199.3</b>	1,855	0,658	4,023	10,765	0,921	9,069
<b>200.1</b>	1,788	0,666	0,078	0,618	1,152	6,307
<b>200.2</b>	3,771	0,954	2,148	1,980	7,309	3,097
<b>200.3</b>	12,112	1,795	3,846	13,470	15,186	5,840
<b>99.1</b>	0,292	0,017	0,650	0,136	0,181	0,072
<b>99.2</b>	0,978	0,656	1,861	0,040	0,070	0,055
<b>99.3</b>	8,215	1,960	15,545	0,561	0,366	4,582
<b>196.1</b>	0,858	0,905	0,121	2,869	7,346	1,770
<b>196.2</b>	0,092	2,283	0,255	1,148	1,783	1,379
<b>196.3</b>	0,075	0,051	0,276	3,042	0,185	0,295
<b>197.1</b>	0,697	1,804	0,341	0,189	0,397	0,334
<b>197.2</b>	1,784	1,046	3,449	0,356	0,079	0,141
<b>197.3</b>	14,877	1,009	2,332	2,761	0,430	0,687
<b>2.1</b>	0,312	0,808	2,968	1,632	3,117	0,831
<b>2.2</b>	0,706	3,364	0,350	0,465	0,320	0,170
<b>2.3</b>	3,344	8,872	1,993	5,521	0,657	0,946
<b>202.1</b>	4,055	0,291	0,091	0,798	0,228	0,245
<b>202.2</b>	3,178	3,463	5,855	1,948	0,881	3,408
<b>202.3</b>	5,496	5,648	5,152	6,853	24,274	0,961
<b>193.1</b>	2,857	0,023	7,157	1,351	1,033	0,437
<b>193.2</b>	2,529	0,514	6,772	1,129	1,285	2,071
<b>193.3</b>	1,587	1,565	1,349	96,447	3,518	4,325
<b>194.1</b>	13,023	0,305	0,987	0,613	0,541	0,663
<b>194.2</b>	4,464	0,114	0,374	0,057	0,119	0,057
<b>194.3</b>	20,043	0,941	0,634	6,491	7,843	2,513
<b>195.1</b>	3,465	1,367	1,087	0,685	1,198	0,770
<b>195.2</b>	4,372	1,119	1,967	1,022	0,188	0,094
<b>195.3</b>	3,106	5,512	3,157	51,685	118,988	26,161
<b>55.1</b>	3,181	2,257	2,180	9,331	10,254	2,562
<b>55.2</b>	7,119	3,224	3,697	3,022	7,952	1,395
<b>55.3</b>	2,482	3,072	1,826	9,906	39,297	6,391
<b>13.1</b>	1,699	3,579	34,400	0,554	0,893	0,629
<b>13.2</b>	0,568	2,107	4,032	1,642	20,601	10,356

<b>13.3</b>	0,386	1,042	3,797	1,826	1,560	0,704
<b>29.1</b>	1,189	0,853	2,696	1,031	0,464	2,609
<b>29.2</b>	3,106	3,711	1,383	5,177	13,877	65,982
<b>29.3</b>	2,054	0,888	3,593	32,862	22,911	0,109
<b>25.1</b>	0,564	0,011	1,601	1,203	0,758	0,182
<b>25.2</b>	3,283	0,761	0,308	2,667	6,444	3,147
<b>25.3</b>	9,514	0,993	0,197	12,168	9,092	6,631
<b>144.1</b>	0,345	1,046	0,497	1,217	0,524	0,157
<b>144.2</b>	118,466	1,199	19,001	1,582	1,956	4,451
<b>144.3</b>	56,168	4,207	16,431	12,366	9,633	13,141
<b>117.1</b>	3,801	14,202	7,075	0,889	6,050	5,219
<b>117.2</b>	7,421	4,099	8,290	11,435	50,609	28,129
<b>117.3</b>	61,464	11,387	27,825	1,851	1,452	3,769
<b>134.1</b>	6,006	7,368	3,013	39,680	14,524	22,685
<b>134.2</b>	4,464	3,179	7,258	0,167	0,080	0,169
<b>134.3</b>	7,235	2,416	8,140	1,755	2,025	1,561
<b>129.1</b>	9,424	7,471	18,975	405,531	3,707	1,202
<b>129.2</b>	8,065	1,352	59,015	0,903	2,557	2,202
<b>129.3</b>	10,865	4,082	41,836	62,901	95,538	24,381
<b>72.1</b>	0,852	1,053	0,406	0,274	0,542	0,515
<b>72.2</b>	0,132	1,174	0,532	1,063	0,619	0,149
<b>72.3</b>	5,829	3,016	2,107	1,676	1,213	0,128
<b>73.1</b>	1,533	5,629	4,375	1,402	4,204	1,260
<b>73.2</b>	0,637	0,128	9,402	0,366	0,165	0,694
<b>73.3</b>	0,475	0,025	6,900	0,965	0,116	0,262
<b>79.1</b>	2,975	1,010	2,533	1,334	4,378	2,803
<b>79.2</b>	3,329	1,062	15,740	3,246	10,964	15,444
<b>79.3</b>	0,294	7,265	12,906	0,367	1,338	31,801
<b>140.1</b>	1,274	1,193	4,733	0,461	1,000	0,226
<b>140.2</b>	3,931	1,039	0,823	0,037	0,032	0,058
<b>140.3</b>	12,981	1,391	2,166	1,093	1,130	0,475
<b>102.1</b>	2,738	4,952	14,281	1,765	1,451	1,843
<b>102.2</b>	6,328	2,437	3,441	0,211	0,309	0,600
<b>102.3</b>	3,367	2,762	1,123	1,578	53,359	0,656
<b>106.1</b>	0,803	0,472	2,055	0,422	0,379	0,031
<b>106.2</b>	2,403	0,266	3,836	0,253	1,974	0,355
<b>106.3</b>	0,876	1,410	3,754	10,891	0,488	7,539
<b>114.1</b>	2,345	1,672	3,079	2,220	2,658	1,667
<b>114.2</b>	4,372	2,059	3,629	0,219	0,566	11,800

<b>114.3</b>	2,685	2,455	6,521	3,164	0,916	0,643
<b>115.1</b>	0,894	0,014	0,168	0,128	0,097	0,034
<b>115.2</b>	4,632	3,205	1,162	0,403	0,631	11,163
<b>115.3</b>	4,919	4,529	0,902	3,157	7,549	5,949
<b>116.1</b>	2,239	0,417	1,852	0,421	0,274	0,124
<b>116.2</b>	0,854	1,704	18,804	0,235	8,484	5,136
<b>116.3</b>	0,201	0,686	19,698	4,438	26,410	1,200
<b>118.1</b>	0,011	0,071	0,004	0,009	0,064	0,128
<b>118.2</b>	8,866	1,712	10,384	1,528	9,881	5,160
<b>118.3</b>	1,029	2,198	7,508	9,190	26,137	9,913
<b>122.1</b>	0,129	0,157	0,001	0,034	0,015	0,033
<b>122.2</b>	0,250	1,470	1,406	0,397	4,998	0,200
<b>122.3</b>	2,227	7,868	3,576	2,673	0,861	9,620
<b>130.1</b>	0,315	0,015	4,755	0,379	0,028	0,117
<b>130.2</b>	3,668	5,933	0,774	0,087	0,467	0,469
<b>130.3</b>	9,179	0,149	0,166	1,075	0,672	0,212
<b>145.1</b>	3,278	11,764	4,860	6,322	38,063	17,635
<b>145.2</b>	0,138	0,587	0,031	0,228	5,848	0,729
<b>145.3</b>	0,411	2,808	0,321	4,999	64,356	4,315
<b>146.1</b>	1,545	0,673	10,541	1,240	0,491	0,252
<b>146.2</b>	29,007	12,939	76,621	4,185	12,903	10,344
<b>146.3</b>	14,205	24,721	181,648	7,103	458,147	7,140
<b>147.1</b>	0,831	0,494	0,028	0,515	0,899	1,120
<b>147.2</b>	6,140	5,243	38,222	3,224	13,592	5,196
<b>147.3</b>	12,832	3,705	29,823	2,806	13,877	6,281

**Czerwonym kolorem czcionki** zaznaczono w tabeli izolaty charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H w białku CYP51A.

W poniższej tabeli (Tab. 26.) przedstawiono uśrednione wyniki poziomów ekspresji poszczególnych genów, z podziałem szczepów na dwie grupy i dwa stężenia itrakonazolu.



Tab. 26. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud i na podłożach z dodatkiem itraconazolu. Izolaty podzielono na dwie grupy: charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H i bez tej mutacji

	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>
Izolaty bez mutacji TR <sub>34</sub> L98H, hodowane na podłożu Sabouraud	1,840	1,057	2,538	0,982	1,671	0,911
Izolaty bez mutacji TR <sub>34</sub> L98H, hodowane na podłożu z niższym stężeniem itraconazolu	7,402	2,123	7,757	1,245	3,491	6,097
Izolaty bez mutacji TR <sub>34</sub> L98H, hodowane na podłożu z wyższym stężeniem itraconazolu	6,658	3,297	10,314	10,458	25,526	4,882
Izolaty z mutacją TR <sub>34</sub> L98H, hodowane na Sabouraud	4,565	7,774	11,750	77,051	12,248	8,322
Izolaty z mutacją TR <sub>34</sub> L98H, hodowane na podłożu z niższym stężeniem itraconazolu	4,629	2,425	13,720	2,899	14,608	7,163
Izolaty z mutacją TR <sub>34</sub> L98H, hodowane na podłożu z wyższym stężeniem itraconazolu	13,807	4,135	13,958	13,873	34,038	6,854

Średnie wartości poziomów ekspresji badanych genów wszystkich izolatów bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H po hodowli na podłożu z dodatkiem itraconazolu wzrosły, bez względu na zastosowane stężenie związku. Wyższe stężenie itraconazolu powodowało większy - niż stężenie niższe - wzrost ekspresji genów *CYP51B*, *MDR1*, *MDR2* i *MDR3*.

Uśredniony poziom ekspresji genów *CYP51B*, *MDR2* i *ATRF* izolatów *A. fumigatus* z mutacją TR<sub>34</sub>L98H maleje po hodowli na podłożu z dodatkiem itraconazolu, natomiast średni poziom ekspresji genów *MDR1*, *MDR3* i *CYP51A* wzrasta.

Średni poziom ekspresji wszystkich badanych genów izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H jest wyższy nawet po spadku poziomu w wyniku hodowli niż w grupie izolatów bez tej mutacji.

Dla wszystkich przedstawionych powyżej wyników została przeprowadzona analiza statystyczna testem U Manna-Whitney'a. Analiza ta wykazała, że **obecność w medium hodowlanym itraconazolu w obu badanych stężeniach powoduje istotny wzrost poziomu ekspresji genu *CYP51A* i *MDR3* u wszystkich izolatów. Istotny statystycznie był również wzrost poziomu ekspresji genu *CYP51B*, *MDR1*, *MDR2* i *ATRF* izolatów bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H a także spadek ekspresji tych genów w grupie izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H po hodowli na obu stężeniach itraconazolu.**



#### 8.5.2.4. Analiza zmian poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z worikonazolem

W poniższej tabeli (Tab. 27.) przedstawiono wyniki oznaczania poziomów ekspresji genów dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud (izolaty opisane dodatkowo nr 1 po kropce np. 203.1) oraz na podłożach Sabouraud o dwóch różnych stężeniach worikonazolu (niższe oznaczone dodatkowo nr 2 po kropce np. 203.2 i wyższe oznaczone dodatkowo nr 3 po kropce np. 203.3)

Tab. 27. Poziom ekspresji genów po hodowli na podłożu Sabouraud z dodatkiem worikonazolu

nr próbki	Poziom ekspresji genów, wyznaczony względem genu $\beta$ -tubuliny					
	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>
203.1	1,017	2,797	0,452	1,932	15,609	1,731
203.2	1,091	0,066	7,930	0,238	0,131	0,168
203.3	0,046	0,078	0,511	2,487	0,321	0,103
198.1	2,785	1,281	0,555	2,193	0,774	0,702
198.2	0,460	0,240	2,580	1,803	0,507	3,474
198.3	0,584	0,177	9,716	1,324	0,300	1,252
192.1	1,582	1,470	3,965	2,161	2,325	0,112
192.2	0,229	0,071	35,687	0,153	0,195	0,198
192.3	2,773	0,016	11,501	1,001	0,327	0,138
201.1	1,773	0,022	4,678	1,033	0,182	0,139
201.2	0,945	0,237	16,610	0,084	0,263	0,595
201.3	56,558	1,949	87,346	2,629	1,142	4,335
191.1	1,356	2,216	2,988	0,991	1,048	1,928
191.2	0,177	0,648	27,742	0,763	1,614	0,506
191.3	0,184	0,704	20,070	1,001	5,332	0,737
199.1	2,439	0,134	1,508	0,162	0,099	0,015
199.2	0,490	0,723	19,391	1,112	0,137	0,120
199.3	0,165	0,210	16,877	0,291	0,223	0,044
200.1	1,788	0,666	0,078	0,618	1,152	6,307
200.2	2,284	0,884	0,111	1,610	3,777	0,492
200.3	4,643	1,040	0,132	0,822	0,415	0,145
99.1	0,292	0,017	0,650	0,136	0,181	0,072
99.2	0,508	0,070	55,484	0,957	0,263	0,158
99.3	0,506	0,114	7,380	0,639	0,131	0,072
196.1	0,858	0,905	0,121	2,869	7,346	1,770
196.2	1,177	4,341	0,006	0,263	6,243	0,970

<b>196.3</b>	0,834	5,978	0,013	7,523	10,788	1,769
<b>197.1</b>	0,697	1,804	0,341	0,189	0,397	0,334
<b>197.2</b>	0,973	3,267	5,065	1,866	3,674	0,964
<b>197.3</b>	0,358	0,958	0,012	1,727	5,781	0,456
<b>2.1</b>	0,312	0,808	2,968	1,632	3,117	0,831
<b>2.2</b>	1,253	5,728	147,442	0,778	0,973	56,755
<b>2.3</b>	0,039	0,039	6,636	0,639	0,024	0,072
<b>202.1</b>	4,055	0,291	0,091	0,798	0,228	0,245
<b>202.2</b>	0,047	0,004	0,004	0,002	0,002	0,001
<b>202.3</b>	0,126	0,049	0,038	0,035	0,009	0,059
<b>193.1</b>	2,857	0,023	7,157	1,351	1,033	0,437
<b>193.2</b>	0,287	0,007	31,941	0,031	0,037	0,153
<b>193.3</b>	0,038	0,014	24,710	0,214	0,017	0,056
<b>194.1</b>	13,023	0,305	0,987	0,613	0,541	0,663
<b>194.2</b>	8,349	4,828	0,322	1,370	2,304	1,057
<b>194.3</b>	0,217	0,288	0,064	0,283	0,097	0,115
<b>195.1</b>	3,465	1,367	1,087	0,685	1,198	0,770
<b>195.2</b>	0,049	0,021	0,011	0,010	0,029	0,011
<b>195.3</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>55.1</b>	3,181	2,257	2,180	9,331	10,254	2,562
<b>55.2</b>	3,868	5,357	0,221	10,510	0,780	1,729
<b>55.3</b>	2,414	3,340	0,292	8,926	15,081	3,016
<b>13.1</b>	1,699	3,579	34,400	0,554	0,893	0,629
<b>13.2</b>	0,382	1,660	7,785	0,007	0,336	0,332
<b>13.3</b>	0,230	0,314	2,056	0,008	0,238	0,306
<b>29.1</b>	1,189	0,853	2,696	1,031	0,464	2,609
<b>29.2</b>	0,027	0,000	0,708	6,575	1,024	0,257
<b>29.3</b>	0,561	0,005	1,471	25,246	4,463	2,388
<b>25.1</b>	0,564	0,011	1,601	1,203	0,758	0,182
<b>25.2</b>	3,904	0,534	89,511	1,451	0,170	0,028
<b>25.3</b>	0,209	0,113	18,878	0,029	5,381	0,948
<b>144.1</b>	0,345	1,046	0,497	1,217	0,524	0,157
<b>144.2</b>	0,399	0,392	0,333	0,162	0,060	0,195
<b>144.3</b>	0,335	0,352	0,304	0,773	0,081	0,166
<b>117.1</b>	3,801	14,202	7,075	0,889	6,050	5,219
<b>117.2</b>	0,234	0,191	32,763	0,149	0,052	0,049
<b>117.3</b>	0,213	0,187	33,754	0,346	0,421	0,050
<b>134.1</b>	6,006	7,368	3,013	39,680	14,524	22,685
<b>134.2</b>	1,315	11,324	56,519	17,272	22,430	1,986



<b>134.3</b>	1,970	10,313	10,510	125,048	93,788	2,239
<b>129.1</b>	9,424	7,471	18,975	405,531	3,707	1,202
<b>129.2</b>	0,645	0,000	0,755	0,079	0,092	0,010
<b>129.3</b>	0,017	0,001	0,935	0,010	0,038	0,010
<b>72.1</b>	0,852	1,053	0,406	0,274	0,542	0,515
<b>72.2</b>	2,068	3,676	0,150	0,780	4,792	0,912
<b>72.3</b>	1,653	2,513	0,012	2,170	4,183	1,693
<b>73.1</b>	1,533	5,629	4,375	1,402	4,204	1,260
<b>73.2</b>	9,116	2,431	0,252	0,461	2,048	0,871
<b>73.3</b>	10,941	2,881	0,114	4,772	1,743	1,852
<b>79.1</b>	2,975	1,010	2,533	1,334	4,378	2,803
<b>79.2</b>	0,242	0,305	0,003	24,426	0,709	0,109
<b>79.3</b>	22,085	26,046	0,334	1,300	2,666	1,101
<b>140.1</b>	1,274	1,193	4,733	0,461	1,000	0,226
<b>140.2</b>	0,365	1,043	26,673	0,156	0,032	0,018
<b>140.3</b>	0,550	1,109	20,445	2,805	0,036	0,036
<b>102.1</b>	2,738	4,952	14,281	1,765	1,451	1,843
<b>102.2</b>	3,922	10,713	44,447	14,324	42,833	1,369
<b>102.3</b>	2,324	3,130	10,175	17,606	20,224	2,036
<b>106.1</b>	0,803	0,472	2,055	0,422	0,379	0,031
<b>106.2</b>	1,903	0,622	7,839	0,337	0,244	0,056
<b>106.3</b>	0,533	2,153	37,626	2,037	0,443	0,087
<b>114.1</b>	2,345	1,672	3,079	2,220	2,658	1,667
<b>114.2</b>	0,160	1,083	41,566	0,910	0,895	0,089
<b>114.3</b>	0,402	0,880	32,305	2,136	0,360	0,220
<b>115.1</b>	0,894	0,014	0,168	0,128	0,097	0,034
<b>115.2</b>	0,011	0,017	1,603	0,001	0,001	0,003
<b>115.3</b>	5,756	13,861	861,277	0,670	0,175	0,180
<b>116.1</b>	2,239	0,417	1,852	0,421	0,274	0,124
<b>116.2</b>	2,704	0,518	20,308	0,456	0,416	0,184
<b>116.3</b>	0,208	0,988	5,076	0,144	0,061	0,042
<b>118.1</b>	0,011	0,071	0,004	0,009	0,064	0,128
<b>118.2</b>	2,253	2,825	0,259	0,249	0,098	0,853
<b>118.3</b>	0,163	0,260	0,196	1,366	0,152	0,306
<b>122.1</b>	0,129	0,157	0,001	0,034	0,015	0,033
<b>122.2</b>	0,257	0,096	0,018	0,028	0,019	0,018
<b>122.3</b>	0,346	0,418	0,053	0,549	0,092	0,239
<b>130.1</b>	0,315	0,015	4,755	0,379	0,028	0,117
<b>130.2</b>	0,083	0,115	49,545	0,212	0,274	2,149

<b>130.3</b>	0,637	1,154	143,974	0,410	0,122	1,900
<b>145.1</b>	3,278	11,764	4,860	6,322	38,063	17,635
<b>145.2</b>	0,238	1,031	0,277	0,314	0,607	0,278
<b>145.3</b>	0,403	0,469	0,075	6,282	0,980	0,362
<b>146.1</b>	1,545	0,673	10,541	1,240	0,491	0,252
<b>146.2</b>	1,150	3,222	677,464	1,468	0,436	4,287
<b>146.3</b>	1,006	1,009	12,939	15,541	5,246	63,236
<b>147.1</b>	0,831	0,494	0,028	0,515	0,899	1,120
<b>147.2</b>	0,262	0,058	0,102	1,017	0,220	12,070
<b>147.3</b>	0,158	0,032	0,048	0,084	0,013	2,244

**Czerwonym kolorem czcionki** zaznaczono w tabeli izolaty charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H w białku CYP51A.

W poniższej tabeli (Tab. 28.) przedstawiono uśrednione wyniki poziomów ekspresji poszczególnych genów, z podziałem szczepów na dwie grupy i dwa stężenia worikonazolu w podłożach, na których były hodowane.

Tab. 28. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud i na podłożach z dodatkiem worikonazolu. Izolaty podzielono na dwie grupy: charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H i bez tej mutacji

	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>
<b>Izolaty bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H, hodowane na podłożu Sabouraud</b>	1,840	1,057	2,538	0,982	1,671	0,911
<b>Izolaty bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H, hodowane na podłożu z niższym stężeniem worikonazolu</b>	1,473	1,524	40,972	2,002	2,326	2,784
<b>Izolaty bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H, hodowane na podłożu z wyższym stężeniem worikonazolu</b>	3,388	2,018	39,127	2,892	2,070	2,592
<b>Izolaty z mutacją TR<sub>34</sub>L98H, hodowane na Sabouraud</b>	4,565	7,774	11,750	77,051	12,248	8,322
<b>Izolaty z mutacją TR<sub>34</sub>L98H, hodowane na podłożu z niższym stężeniem worikonazolu</b>	1,114	3,261	16,387	4,722	4,049	0,731
<b>Izolaty z mutacją TR<sub>34</sub>L98H, hodowane na podłożu z wyższym stężeniem worikonazolu</b>	0,875	2,437	7,937	23,437	18,424	0,997

Uśredniony poziom ekspresji badanych genów izolatów bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H po hodowli na podłożu z dodatkiem worikonazolu wzrasta dla wszystkich badanych genów za wyjątkiem *CYP51A* po hodowli na podłożu z niższym stężeniem worikonazolu. Poziom ekspresji genu *MDR1* izolatów hodowanych na podłożach o obu wartościach



stężenie wzrasta około 40-krotnie. Tak dużego wzrostu poziomu ekspresji genu nie obserwuje się u żadnego z badanych genów po pasażach na posakonazolu i itrakonazolu.

Średnie wartości poziomu ekspresji wszystkich badanych genów dla izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H maleją za wyjątkiem ekspresji genu *MDR3* po hodowli na podłożu z niższym stężeniem worikonazolu i za wyjątkiem *MDR1* po hodowli izolatów na podłożu z wyższym stężeniem worikonazolu.

Średni poziom ekspresji genów *CYP51B*, *MDR1*, *MDR2* i *MDR3* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H jest wyższy nawet po spadku poziomu ekspresji w wyniku hodowli, niż izolatów bez tej mutacji hodowanych na podłożu Sabouraud.

Dla wszystkich przedstawionych powyżej wyników została przeprowadzona analiza statystyczna testem U Manna-Whitney'a. Analiza ta wykazała, że **obecność w medium hodowlanym worikonazolu powoduje istotne zmiany ekspresji we wszystkich badanych genach za wyjątkiem genu *MDR3*. Worikonazol bez względu na zastosowane stężenie wpływa na wzrost poziomu ekspresji genów *MDR1*, *MDR2*, *ATRF* izolatów charakteryzujących się brakiem występowania mutacji TR<sub>34</sub>L98H a także istotnym obniżeniem poziomu ekspresji genów *CYP51A*, *CYP51B*, *MDR2*, *ATRF* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H.**



### 8.5.3. Badanie zmian w poziomach ekspresji genów *A. fumigatus* po hodowli na podłożach z dodatkiem azoli – metoda Pfaffla

Wszystkie izolaty hodowano na podłożach o stężeniach dodatkiem: posakonazolu /itakonazolu/worikonazolu (w dwóch stężeniach – jakich) i bez dodatku antymikotyku (jako kontrolę). Po pierwszym pasażu wyizolowano RNA, przeprowadzono syntezę cDNA i przeprowadzono reakcję real-time PCR w celu określenia zmian w poziomach ekspresji genów *CYP51A*, *CYP51B*, *MDR1*, *MDR2*, *MDR3* i *ATRF* badanych izolatów. W poniższych podrozdziałach przedstawiono wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów. Do obliczeń wykorzystano metodę Pfaffla. Jako gen referencyjny użyto gen  $\beta$ -tubuliny. Wzrost ekspresji większy bądź równy dwukrotnemu uznano za istotny. Wynik poniżej wartości = 1 wskazuje na spadek poziomu ekspresji badanego genu.

W poniższej tabeli (Tab. 29.) przedstawiono wydajności reakcji real-time PCR dla poszczególnych genów, które uzyskano przeprowadzając najpierw optymalizację profilu temperaturowo-czasowego i w wyniku wyznaczeniu krzywych standardowych dla każdego genu.

Tab. 29. Wartości wydajności reakcji amplifikacji genów *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF*, *CYP51A*, *CYP51B* i  $\beta$ -tubuliny

Nazwa genu	Wydajność amplifikacji (wartość E)
<i>MDR1</i>	2,395
<i>MDR2</i>	1,994
<i>MDR3</i>	2,217
<i>ATRF</i>	1,993
<i>CYP51A</i>	1,950
<i>CYP51B</i>	2,040
<i><math>\beta</math>-tubulina</i>	2,016

### 8.5.3.1. Analiza zmian poziomów ekspresji genu *CYP51A*

W kolejnych podrozdziałach (od 8.5.3.1. do 8.5.3.6.) przedstawione zostały uzyskane wyniki badania poziomów ekspresji poszczególnych genów po hodowli izolatów *A. fumigatus* na różnych podłożach. Ciemniejszymi kolorami w tabelach zaznaczono znaczący wzrost poziomu ekspresji. Numerem (1) zostały oznaczone niższe stężenia badanych azoli zaś numerem (2) – wyższe stężenia. **Czerwonym kolorem czcionki** wyróżniono izolaty charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H.

Tab. 30. Wyniki zmian względnych poziomów ekspresji genu *CYP51A*

Względny poziom ekspresji genu <i>CYP51A</i> po hodowli izolatu na podłożu z dodatkiem antymikotyku						
Nr izolatu	ITR (1)	ITR (2)	POS (1)	POS (2)	WOR (1)	WOR (2)
2	3,578	17,134	0,814	1,977	3,022	0,122
13	2,044	1,407	0,767	1,834	2,476	1,747
25	0,262	0,704	0,548	2,869	1,215	0,081
29	0,077	0,046	0,231	0,041	1,839	47,911
55	4,091	1,421	0,827	1,121	3,154	2,706
72	0,137	5,55	5,821	0,681	6,598	5,843
73	1,422	1,054	0,281	0,181	15,697	22,363
79	19,9	1,9	1,162	0,846	0,166	19,882
102	3,729	1,964	2,105	7,502	0,897	0,73
106	1,316	0,485	2,269	0,809	6,345	2,386
114	3,167	2,015	0,088	0,144	0,073	0,224
115	6,695	7,096	0,081	0,782	0,445	313,233
116	2,724	0,664	0,62	0,141	2,894	0,29
117	3,519	29,03	0,448	0,021	0,896	0,978
118	0,929	0,114	4,595	4,88	3,722	0,268
122	0,102	0,882	0,442	63,508	5,833	10,158
129	1,558	2,065	0,425	0,125	3,367	0,123
130	0,558	1,252	9,197	2,739	0,746	6,866
134	1,336	2,095	0,264	2,377	0,862	1,611
140	0,51	1,718	0,809	77,167	0,779	1,504
144	656,688	312,898	2,057	0,595	0,646	0,671
99	0,106	0,902	1474,814	546,608	4,829	6,014
191	0,202	0,018	0,511	0,386	0,373	0,477
192	4,49	7,4	1,334	0,386	0,328	4,418
193	1,556	0,955	0,075	0,321	0,106	0,019
194	0,2	0,873	5,175	1,593	1,725	0,06
195	0,892	0,665	1,35	7,655	0,032	0
197	0,895	6,919	32,415	9,247	3,978	1,834
196	0,188	0,158	6,558	20,092	1,169	1,068
198	0,833	0,408	0,192	2,567	1,183	1,882
199	2,592	0,902	3,48	1,09	2,161	0,937
200	0,3	0,974	0,12	0,091	0,385	0,946
201	0,295	0,195	1,635	4,512	1,417	97,815
202	1,556	0,955	0,642	0,146	0,002	0,007
203	1,377	0,806	2,618	3,785	3,049	0,156
145	0,073	0,225	0,776	0,235	2,378	4,464
146	1,141	0,574	0,788	0,567	2,174	2,285
147	0,957	1,961	1,233	1,448	0,353	0,263



Wtoku przeprowadzonych badań zaobserwowano, iż itrakonazol wpłynął na wzrost ekspresji genu *CYP51A* u 12 izolatów (w przypadku niższego stężenia) i 10 izolatów (przy zastosowaniu wyższego stężenia) co sumarycznie daje niespełna 29% izolatów. Sześć spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u dziewięciu izolatów (w przypadku stężenia niższego) i ośmiu (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje ponad 22%. Tylko trzy izolaty charakteryzowały się spadkiem poziomu ekspresji w obu stężeniach.

Obecność w podłożu posakonazolu w niższym stężeniu indukowała wzrost poziomu ekspresji *CYP51A* u 12 izolatów, a w stężeniu wyższym u 14 izolatów – co sumarycznie daje nieco ponad 34%. Siedem spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 11 izolatów (w przypadku stężenia niższego) i 12 (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje ponad 30%. Siedem spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń.

Worikonazol w niższym stężeniu powoduje wzrost poziomu ekspresji w przypadku 16 izolatów (przy stężeniu niższym) i 14 izolatów (przy stężeniu wyższym) co sumarycznie daje niespełna 40%. Osiem spośród tych izolatów charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u dziewięciu izolatów (w przypadku stężenia niższego) i 13 (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje niespełna 29%. Tylko cztery izolaty charakteryzowały się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.

W przypadku pięciu izolatów (13,16%) nie zaobserwowano wzrostu ekspresji genu *CYP51A* po ekspozycji na żaden z badanych związków.

W poniższej tabeli (Tab. 31.) przedstawiono uśrednione zmiany w poziomach ekspresji genu *CYP51A* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożach z dodatkiem różnych azoli. Izolaty zostały podzielone na trzy grupy: charakteryzujące się mutacją TR<sub>34</sub>L98H, charakteryzujące się innymi mutacjami w genie *CYP51A*, izolaty bez mutacji w genie *CYP51A*. Poziom ekspresji dla poszczególnych izolatów hodowanych na podłożu Sabouraud bez dodatku antymikotyku wynosi 1, wartość wyższa wskazuje na wzrost poziomu ekspresji genu w skutek hodowli na podłożu z antymikotykiem, wartość niższa wskazuje na spadek poziomu ekspresji. W tabeli cyfrą **(1)** zaznaczono niższe stężenie badanego związku, zaś cyfrą **(2)** wyższe stężenie badanego związku.

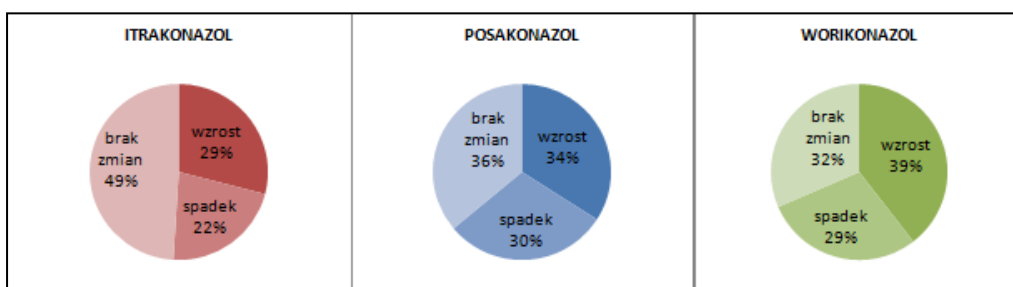
Uśredniony poziom ekspresji genu *CYP51A* izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z itrakonazolem wzrósł w każdej z badanych grup. Obecność posakonazolu w podłożu spowodowała spadek poziomu ekspresji genu *CYP51A* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H, u pozostałych grup izolatów zaobserwowano znaczący wzrost poziomu ekspresji. Obecność w podłożu worikonazolu spowodowała znaczący wzrost ekspresji genu *CYP51A* izolatów bez mutacji w genie *CYP51A*. Worikonazol spowodował także wzrost poziomu ekspresji tego genu w grupie izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H oraz wzrost ekspresji w grupie izolatów z różnymi mutacjami w przypadku zastosowania wyższego stężenia worikonazolu.

Tab. 31. Uśrednione wyniki względnych różnic w poziomach ekspresji genu *CYP51A* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych podłożach z dodatkiem różnych stężeń azoli. Izolaty podzielono na trzy grupy: charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H, charakteryzujące się innymi mutacjami i bez mutacji

	ITR (1)	ITR (2)	POS (1)	POS (2)	WOR (1)	WOR (2)
Izolaty bez mutacji w genie <i>CYP51A</i>	3,275	3,637	2,853	3,612	3,317	6,268
Izolaty z mutacją TR <sub>34</sub> L98H	2,104	6,041	0,585	0,952	2,789	1,938
Izolaty z innymi mutacjami w genie <i>CYP51A</i>	32,654	16,041	71,577	34,285	1,763	23,153

Analiza statystyczna uzyskanych wyników, przeprowadzona z wykorzystaniem testu U Manna-Whitney'a potwierdziła, że obserwowane różnice w poziomach genów są istotne statystycznie za wyjątkiem spadku poziomu ekspresji genu izolatów z innymi mutacjami w genie *CYP51A* hodowanych na niższym stężeniu worikonazolu. Oznacza to, że **obecność w medium hodowlanym itrakonazolu lub worikonazolu wpływa na wzrost poziomu ekspresji genu *CYP51A* izolatów *A. fumigatus* bez względu na mutacje w genie *CYP51A*. Posakonazol również wpływa na wzrost poziomu ekspresji genu *CYP51A* izolatów bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H i z innymi mutacja ale w przypadku izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H nie powoduje istotnych zmian poziomu ekspresji genu *CYP51A*. Dodatkowo analiza statystyczna wykazała, że poziomy ekspresji genu *CYP51A* zarówno izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H i bez tej mutacji zmieniają się bez względu na stosowane stężenie badanych azoli.**

Na poniższych wykresach (Ryc. 19.) przedstawiono procent izolatów charakteryzujących się wzrostem, spadkiem i brakiem istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *CYP51A*. Wzrost poziomu ekspresji genu uznawany jest za istotny, gdy wartość R wynosi co najmniej 2 [Tybulski J, 2008].



Ryc. 19. Wpływ itrakonazolu, worikonazolu i posakonazolu na zmiany poziomów ekspresji genu *CYP51A*

### 8.5.3.2. Analiza zmian poziomów ekspresji genu *CYP51B*

Tab. 32. Wyniki zmian względnych poziomów ekspresji genu *CYP51B*

Względny poziom ekspresji genu <i>CYP51B</i> po hodowli izolatu na podłożu z dodatkiem antymikotyku						
Nr izoaltu	ITR (1)	ITR (2)	POS (1)	POS (2)	WOR (1)	WOR (2)
2	0,585	1,202	1,197	2,891	0,865	0,006
13	10,665	4,015	0,131	0,208	21,736	5,003
25	0,263	0,272	0,354	0,222	51,309	13,354
29	1,061	0,196	1,02	0,669	0,115	1,888
55	0,811	0,609	0,488	1,844	5,524	4,094
72	2,213	4,444	13,295	0,759	1,816	1,593
73	0,336	0,049	0,667	0,479	0,374	0,56
79	16	90,8	3,104	1,436	0,295	32,768
102	0,976	0,872	0,666	1,455	0,936	0,319
106	0,499	2,172	0,939	1,389	2,351	10,353
114	0,578	0,535	0,02	0,009	0,618	0,616
115	4,368	4,843	0,343	0,406	1,168	1313,667
116	3,354	1,03	1,718	0,598	1,729	4,243
117	8,898	19,265	0,116	0,017	1,063	1,308
118	0,573	0,581	2,101	3,357	10,395	1,108
122	0,302	1,295	0,729	15,576	1,715	9,468
129	3,82	9,265	0,492	0,102	6,494	9,072
130	4,74	0,086	3,615	0,008	7,675	100,81
134	1,889	1,113	0,55	0,784	1,511	1,692
140	0,234	0,24	0,51	7,869	0,851	1,117
144	2,864	8,155	0,119	0,204	0,359	0,4
99	0,327	1,092	4,062	11,483	4,129	8,45
191	3,271	0,581	0,283	0,243	0,166	0,226
192	1,821	1,751	0,426	0,355	0,331	0,091
193	0,607	1,504	0,038	0,622	0,304	0,745
194	0,734	4,972	0,567	1,056	1,167	0,081
195	1,646	6,51	0,924	4,412	0,007	0
197	1,142	0,854	4,407	8,873	3,988	1,417
196	0,218	0,026	0,377	1,34	0,702	1,2
198	0,961	0,801	3,836	0,596	3,889	3,508
199	2,532	1,684	308,545	94,359	13,752	4,801
200	2,949	4,31	0,475	0,306	0,068	0,1
201	1,063	0,429	2,776	1,093	11,258	118,74
202	0,607	1,504	0,379	1,049	0,112	1,951
203	0,62	0,203	0,07	0,084	0,25	0,387
145	0,276	1,045	0,576	0,133	3,449	1,965
146	2,439	3,687	0,916	0,234	4,747	1,81
147	1,331	0,722	0,729	1,156	0,328	0,225

W toku przeprowadzonych badań zaobserwowano, iż itraconazol wpłynął na wzrost poziomu ekspresji genu *CYP51B* u 13 izolatów (w przypadku niższego stężenia) i 12 izolatów (przy zastosowaniu wyższego stężenia) co sumarycznie daje niespełna 33%. Dziewięć spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo itraconazol spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u ośmiu izolatów (w przypadku obydwu stężeń) co daje ponad 21%. Tylko cztery izolaty charakteryzowały się spadkiem ekspresji w obu stężeniach.



Obecność w podłożu posakonazolu w niższym stężeniu indukowała wzrost poziomu ekspresji *CYP51B* u 9 izolatów, a w stężeniu wyższym u 8 izolatów – co sumarycznie daje nieco ponad 22%. Tylko cztery spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 15 izolatów (w przypadku obu stężeń) co daje niespełna 40%. Jednocześnie spośród nich charakteryzowało się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.

Worikonazol w niższym stężeniu powoduje wzrost poziomu ekspresji w przypadku 14 izolatów (w obu badanych stężeniach) co sumarycznie daje niespełna 37%. 10 spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 12 izolatów (w przypadku stężenia niższego) i 10 (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje niespełna 29%. Sześć spośród nich charakteryzowało się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.

U 11 izolatów (28,95%) nie zaobserwowano wzrostu ekspresji genu *CYP51B* po ekspozycji na żaden z badanych związków.

W poniższej tabeli (Tab. 33.) przedstawiono uśrednione zmiany w poziomach ekspresji genu *CYP51B* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożach z dodatkiem różnych azoli. Izolaty zostały podzielone na trzy grupy: charakteryzujące się mutacją TR<sub>34</sub>L98H, charakteryzujące się innymi mutacjami w genie *CYP51A*, izolaty bez mutacji w genie *CYP51A*. Poziom ekspresji dla poszczególnych izolatów hodowanych na podłożu Sabouraud bez dodatku antymikotyku wynosi 1, wartość wyższa wskazuje na wzrost poziomu ekspresji genu w skutek hodowli na podłożu z antymikotykiem, wartość niższa wskazuje na spadek poziomu ekspresji. W tabeli cyfrą (1) zaznaczono niższe stężenie badanego związku, zaś cyfrą (2) wyższe stężenie badanego związku.

Tab. 33. Uśrednione wyniki względnych różnic w poziomach ekspresji genu *CYP51B* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych podłożach z dodatkiem różnych stężeń azoli. Izolaty podzielono na trzy grupy: charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H, charakteryzujące się innymi mutacjami i bez mutacji

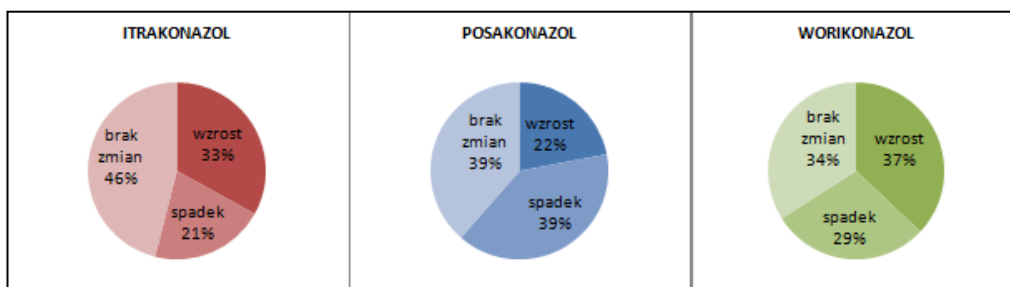
	ITR (1)	ITR (2)	POS (1)	POS (2)	WOR (1)	WOR (2)
<b>Izolaty bez mutacji w genie <i>CYP51A</i></b>	2,776	9,963	2,694	0,817	6,751	15,428
<b>Izolaty z mutacją TR<sub>34</sub>L98H</b>	4,393	5,885	0,392	0,515	6,629	3,856
<b>Izolaty z innymi mutacjami w genie <i>CYP51A</i></b>	1,538	2,234	15,612	7,026	2,680	70,491

Uśredniony poziom ekspresji genu *CYP51B* izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z itrakonazolem wzrósł w każdej z badanych grup za wyjątkiem izolatów z różnymi mutacjami w genie *CYP51A* przy hodowli w niższym stężeniu itrakonazolu. Obecność posakonazolu w podłożu spowodowała spadek poziomu ekspresji genu *CYP51B* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H, u pozostałych grup izolatów zaobserwowano znaczący wzrost poziomu ekspresji, za wyjątkiem izolatów hodowanych na wyższym

stężeniu posakonazolu. Obecność w podłożu worikonazolu spowodowała znaczący wzrost ekspresji genu *CYP51B* u wszystkich izolatów.

Przedstawione wyniki zostały poddane analizie testem U Manna-Whitney'a i wykazano, że obserwowane różnice są istotne statystycznie za wyjątkiem izolatów z różnymi mutacjami hodowanymi na podłożach z niższym stężeniem itrakonazolu oraz izolatów bez mutacji hodowanych na podłożu z wyższym stężeniem posakonazolu gdzie zaobserwowano brak istotnych zmian w poziomach ekspresji. Oznacza to, że **obecność w medium hodowlanym itrakonazolu lub worikonazolu wpływa na wzrost poziomu ekspresji genu *CYP51B* izolatów *A. fumigatus* bez względu na mutacje w genie *CYP51A*. Posakonazol również wpływa na wzrost poziomu ekspresji genu *CYP51B* izolatów bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H i z innymi mutacja ale w przypadku izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H powoduje spadek poziomu ekspresji genu *CYP51B*.** Dodatkowo analiza statystyczna wykazała, że poziomy ekspresji genu *CYP51B* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H i bez tej mutacji zmieniają się bez względu na stosowane stężenie badanych azoli.

Na poniższych wykresach (Ryc. 20.) przedstawiono procent izolatów charakteryzujących się wzrostem, spadkiem i brakiem istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *CYP51B*. Wzrost poziomu ekspresji genu uznawany jest za istotny, gdy wartość R wynosi co najmniej 2 [Tybulski J, 2008].



Ryc. 20. Wpływ itrakonazolu, worikonazolu i posakonazolu na zmiany poziomów ekspresji genu *CYP51B*

8.5.3.3. Analiza zmian poziomów ekspresji genu *MDR1*Tab. 34. Wyniki zmian względnych poziomów ekspresji genu *MDR1*

Względny poziom ekspresji genu <i>MDR1</i> po hodowli izolatu na podłożu z dodatkiem antymikotyku						
Nr izoaltu	ITR (1)	ITR (2)	POS (1)	POS (2)	WOR (1)	WOR (2)
2	0,112	1,209	1,374	2,999	11,19	0,461
13	9,256	14,701	0,742	0,964	12,551	4,83
25	0,211	0,248	0,065	0,61	4,961	1,636
29	0,659	6,386	0,223	0,199	0,324	0,652
55	1,443	1,266	0,796	2,421	1,045	1,341
72	1,435	10,375	9,614	0,59	9,259	0,972
73	2,805	3,555	0,768	0,111	6,757	4,221
79	7,7	12,3	8,493	8,949	0,064	12,049
102	0,235	0,117	6,115	0,101	0,214	0,03
106	2,286	4,342	12,154	0,246	1,895	16,162
114	1,943	6,374	0,254	0,178	1,828	1,671
115	9,056	11,279	0,157	0,235	5,809	4635,202
116	14,375	29,029	1,086	0,085	10,642	3,256
117	5,218	28,184	0,206	0,041	0,523	0,923
118	1,234	1,599	1,318	486,643	10,057	9,833
122	0,269	1,146	0,416	33,076	3,004	12,491
129	4,93	5,64	0,082	0,144	0,002	0,005
130	3,257	4,8	33,487	15,482	1,425	6,202
134	10,527	22,612	0,115	0,541	3,405	0,516
140	0,066	0,273	0,584	177,916	0,705	0,63
144	22,836	36,613	0,12	0,134	0,896	1,168
99	0,052	0,828	651,74	133,901	15,634	1,671
191	0,908	0,075	0,602	0,847	1,338	1,323
192	2,069	6,62	0,245	0,212	0,606	0,225
193	1,011	0,278	0,069	0,328	0,066	0,065
194	0,192	0,562	5,88	29,624	1,757	0,418
195	0,171	0,44	2,394	38,692	0,324	0
197	0,165	0,171	12,06	16,783	26,314	0,022
196	0,515	0,844	0,118	1,424	0,098	0,33
198	0,06	0,049	0,461	58,154	1,612	11,006
199	12,263	5,692	6,399	47,386	2,21	2,64
200	0,502	1,367	0,016	0,045	0,158	0,278
201	0,688	1,106	28,952	0,991	0,447	3,417
202	1,011	0,278	0,46	0,104	0,005	0,077
203	1,605	0,174	0,434	0,814	1,588	0,142
145	0,082	1,856	0,911	2,526	2,656	1,146
146	8,954	45,424	1,129	27,506	1,619	0,019
147	1,329	1,613	0,031	0,012	0,53	0,322

W toku przeprowadzonych badań zaobserwowano, iż itrakonazol wpłynął na wzrost ekspresji genu *MDR1* u 14 izolatów (w przypadku niższego stężenia) i 17 izolatów (przy zastosowaniu wyższego stężenia) co sumarycznie daje niespełna 41%. U wszystkich 14 izolatów u których zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji na stężeniu niższym, ekspresja wzrosła także na stężeniu wyższym. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 10 izolatów (w przypadku obu stężeń)

co daje ponad 26%. Sześć spośród nich charakteryzowało się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.

Obecność w podłożu posakonazolu w niższym stężeniu indukowała wzrost poziomu ekspresji *MDR1* u 11 izolatów, a w stężeniu wyższym u 14 izolatów – co sumarycznie daje niespełna 33%. Siedem spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 17 izolatów (w przypadku stężenia niższego) i 15 (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje ponad 42%. U 11 izolatów zaobserwowano spadek ekspresji w przypadku obu stężeń.

Worikonazol w niższym stężeniu powoduje wzrost poziomu ekspresji w przypadku 14 izolatów (przy stężeniu niższym) i 11 izolatów (przy stężeniu wyższym) co sumarycznie daje niespełna 33%. Siedem spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 10 izolatów (w przypadku stężenia niższego) i 14 (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje niespełna 32%. Siedem spośród nich charakteryzowało się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.

U siedmiu izolatów (18,42%) nie zaobserwowano wzrostu ekspresji genu *MDR1* po ekspozycji na żaden z badanych związków.

W poniższej tabeli (Tab. 35.) przedstawiono uśrednione zmiany w poziomach ekspresji genu *MDR1* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożach z dodatkiem różnych azoli. Izolaty zostały podzielone na trzy grupy: charakteryzujące się mutacją TR<sub>34</sub>L98H, charakteryzujące się innymi mutacjami w genie *CYP51A*, izolaty bez mutacji w genie *CYP51A*. Poziom ekspresji dla poszczególnych izolatów hodowanych na podłożu Sabouraud bez dodatku antymikotyku wynosi 1, wartość wyższa wskazuje na wzrost poziomu ekspresji genu w skutek hodowli na podłożu z antymikotykiem, wartość niższa wskazuje na spadek poziomu ekspresji. W tabeli cyfrą **(1)** zaznaczono niższe stężenie badanego związku, zaś cyfrą **(2)** wyższe stężenie badanego związku.

Tab. 35. Uśrednione wyniki względnych różnic w poziomach ekspresji genu *MDR1* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych podłożach z dodatkiem różnych stężeń azoli. Izolaty podzielono na trzy grupy: charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H, charakteryzujące się innymi mutacjami i bez mutacji

	ITR (1)	ITR (2)	POS (1)	POS (2)	WOR (1)	WOR (2)
<b>Izolaty bez mutacji w genie <i>CYP51A</i></b>	1,977	4,017	5,506	8,935	3,756	3,724
<b>Izolaty z mutacją TR<sub>34</sub>L98H</b>	5,243	12,377	0,475	1,106	3,364	1,460
<b>Izolaty z innymi mutacjami w genie <i>CYP51A</i></b>	3,811	7,372	34,290	46,583	2,832	223,3964

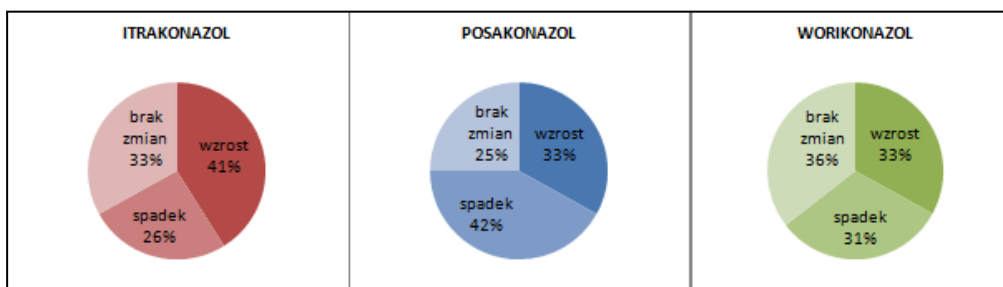
Uśredniony poziom ekspresji genu *MDR1* izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z itrakonazolem wzrósł w każdej z badanych grup. Obecność posakonazolu w podłożu spowodowała spadek poziomu ekspresji genu *MDR1* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H w przypadku hodowli na podłożu o niższym stężeniu posakonazolu, oraz brak zmian w poziomach ekspresji genu w przypadku hodowli na wyższym stężeniu posakonazolu. u pozostałych grup izolatów zaobserwowano znaczący wzrost poziomu

ekspresji. Obecność w podłożu worikonazolu spowodowała znaczący wzrost ekspresji genu *MDR1* we wszystkich grupach izolatów za wyjątkiem izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H hodowanych na wyższym stężeniu worikonazolu.

Przedstawione wyniki zostały opracowane testem U Manna-Whitney'a i są istotne statystycznie za wyjątkiem izolatów bez mutacji w genie *CYP51A* hodowanych na podłożu z niższym stężeniem itrakonazolu oraz izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H hodowanych na podłożu z wyższym stężeniem worikonazolu gdzie nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *MDR1*. Oznacza to, że **obecność w medium hodowlanym itrakonazolu lub worikonazolu wpływa na wzrost poziomu ekspresji genu *MDR1* izolatów *A. fumigatus* bez względu na mutacje w genie *CYP51A*. Posakonazol również wpływa na wzrost poziomu ekspresji genu *MDR1* izolatów bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H i z innymi mutacja ale w przypadku izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H powoduje brak istotnych zmian poziomu ekspresji genu *MDR1*.**

Dodatkowo analiza statystyczna wykazała, że poziomy ekspresji genu *MDR1* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H i bez tej mutacji zmieniają się bez względu na stosowane stężenie badanych azoli.

Na poniższych wykresach (Ryc. 21.) przedstawiono procent izolatów charakteryzujących się wzrostem, spadkiem i brakiem istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *MDR1*. Wzrost poziomu ekspresji genu uznawany jest za istotny, gdy wartość R wynosi co najmniej 2 [Tybulski J, 2008].



Ryc.21. Wpływ itrakonazolu, worikonazolu i posakonazolu na zmiany poziomów ekspresji genu *MDR1*

### 8.5.3.4. Analiza zmian poziomów ekspresji genu *MDR2*

Tab. 36. Wyniki zmian względnych poziomów ekspresji genu *MDR2*

Względny poziom ekspresji genu <i>MDR2</i> po hodowli izolatu na podłożu z dodatkiem antymikotyku						
Nr izoaltu	ITR (1)	ITR (2)	POS (1)	POS (2)	WOR (1)	WOR (2)
2	0,573	1,173	1,597	2,114	0,848	0,242
13	16,768	3,178	0,2	1,616	0,097	0,041
25	0,988	0,755	0,083	0,032	3,246	0,023
29	9,99	10,373	0,689	0,361	1,009	1,418
55	0,571	0,313	0,65	0,412	14,017	4,351
72	7,94	2,17	27,378	8,345	2,098	1,983
73	0,538	0,24	2,887	4,407	0,3	1,079
79	34,9	0,7	0,148	0,685	3,622	0,075
102	1,046	1,305	0,201	0,576	0,485	0,217
106	0,764	5,468	0,412	1,099	2,142	4,614
114	0,037	0,092	3,293	1,404	1,102	0,921
115	10,806	14,308	0,337	1,385	0,017	5,348
116	1,173	3,701	2,26	2,414	2,348	0,26
117	26,512	0,756	0,173	0,376	3,311	2,691
118	2,742	2,767	12,9	4,931	0,21	0,405
122	1,216	1,407	1,593	2,021	2,234	15,74
129	9,614	111,98	0,667	1,587	0,001	0
130	0,253	0,515	0,928	5,602	0,521	0,361
134	0,264	0,464	0,369	0,686	1,165	2,99
140	0,161	0,828	0,173	0,489	0,902	5,724
144	5,946	3,868	8,68	24,812	0,086	0,144
99	0,588	1,422	3348,118	417,641	1,475	0,351
191	1,034	0,137	0,158	0,358	0,198	0,092
192	0,594	1,997	1,867	0,357	0,188	0,433
193	0,071	1	0,211	1,918	0,06	0,147
194	0,189	3,619	1,201	1,602	18,028	1,308
195	2,999	25,729	1,178	7,601	0,01	0
197	3,825	5,02	1,554	1,651	2,518	0,82
196	0,223	0,101	0,329	2,2	0,243	2,455
198	4,328	2,91	0,156	0,166	11,553	3,033
199	0,623	0,896	6,932	3,436	8,284	0,774
200	27,85	32,604	0,865	0,807	0,258	0,047
201	1,574	1,323	2,074	4,329	0,136	1,533
202	0,071	1	0,397	0,215	0,002	0,014
203	0,416	0,33	0,034	0,049	0,537	1,885
145	0,107	0,404	0,358	0,117	0,138	0,937
146	6,91	1,995	5,724	6,048	0,865	3,182
147	20,89	3,109	0,358	0,029	5,136	0,151

W toku przeprowadzonych badań iz itrakonazol wpłynął na wzrost ekspresji genu *MDR2* u 15 izolatów (w przypadku obu stężeń) co daje niespełna 40% badanych izolatów. 12 spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u dziewięciu izolatów (w przypadku stężenia niższego) i ośmiu (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje ponad 22%. Tylko pięć spośród nich charakteryzowało się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.



Obecność w podłożu posakonazolu w niższym stężeniu indukowała wzrost poziomu ekspresji *MDR2* 10 izolatów, a w stężeniu wyższym 13 izolatów – co sumarycznie daje nieco ponad 30%. Dziewięć spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 17 izolatów (w przypadku stężenia niższego) i 12 (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje niespełna 37%. Dziewięć spośród nich charakteryzowało się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.

Worikonazol w niższym stężeniu powoduje wzrost poziomu ekspresji w przypadku 13 izolatów (przy stężeniu niższym) i 10 izolatów (przy stężeniu wyższym) co sumarycznie daje nieco ponad 30%. Tylko pięć spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 16 izolatów (w przypadku stężenia niższego) i 18 (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje niespełna 45%. Jedenaście spośród nich charakteryzowało się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.

U siedmiu izolatów (18,42%) nie zaobserwowano wzrostu ekspresji genu *MDR2* po ekspozycji na żaden z badanych związków.

W poniższej tabeli (Tab.37.) przedstawiono uśrednione zmiany w poziomach ekspresji genu *MDR2* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożach z dodatkiem różnych azoli. Izolaty zostały podzielone na trzy grupy: charakteryzujące się mutacją TR<sub>34</sub>L98H, charakteryzujące się innymi mutacjami w genie *CYP51A*, izolaty bez mutacji w genie *CYP51A*. Poziom ekspresji dla poszczególnych izolatów hodowanych na podłożu Sabouraud bez dodatku antymikotyku wynosi 1, wartość wyższa wskazuje na wzrost poziomu ekspresji genu w skutek hodowli na podłożu z antymikotykiem, wartość niższa wskazuje na spadek poziomu ekspresji. W tabeli cyfrą (1) zaznaczono niższe stężenie badanego związku, zaś cyfrą (2) wyższe stężenie badanego związku.

Tab. 37. Uśrednione wyniki względnych różnic w poziomach ekspresji genu *MDR2* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych podłożach z dodatkiem różnych stężeń azoli. Izolaty podzielono na trzy grupy: charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H, charakteryzujące się innymi mutacjami i bez mutacji

	ITR (1)	ITR (2)	POS (1)	POS (2)	WOR (1)	WOR (2)
<b>Izolaty bez mutacji w genie <i>CYP51A</i></b>	5,075	1,089	3,541	2,396	2,316	1,157
<b>Izolaty z mutacją TR<sub>34</sub>L98H</b>	8,973	19,516	0,403	0,799	3,122	1,835
<b>Izolaty z innymi mutacjami w genie <i>CYP51A</i></b>	4,604	5,569	161,798	23,023	2,142	2,019

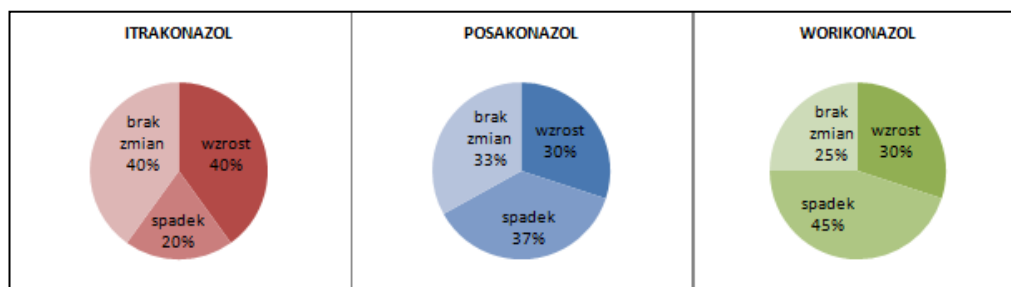
Uśredniony poziom ekspresji genu *MDR2* izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z itrakonazolem wzrósł w każdej z badanych grup za wyjątkiem izolatów bez mutacji w genie *CYP51A* hodowanych na wyższym stężeniu itrakonazolu, gdzie poziom ekspresji genu *MDR2* nie uległ zmianie. Obecność posakonazolu w podłożu spowodowała spadek poziomu ekspresji genu *MDR2* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H, u pozostałych grup izolatów zaobserwowano znaczący wzrost poziomu ekspresji tego genu. Obecność w podłożu worikonazolu spowodowała znaczący wzrost ekspresji



genu *MDR2* izolatów bez mutacji w genie *CYP51A* i z mutacją TR<sub>34</sub>L98H hodowanych na niższym stężeniu worikonazolu, oraz izolatów z różnymi mutacjami w genie *CYP51A* w przypadku obu stosowanych stężeń.

Przedstawione wyniki zostały opracowane testem U Manna-Whitney'a i są istotne statystycznie za wyjątkiem izolatów bez mutacji hodowanych na podłożu z wyższym stężeniem itrakonazolu oraz izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H hodowanych na podłożu z wyższym stężeniem worikonazolu gdzie nie zaobserwowano istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *MDR2*. Oznacza to, że **obecność w medium hodowlanym itrakonazolu lub worikonazolu wpływa na wzrost poziomu ekspresji genu *MDR2* izolatów *A. fumigatus* bez względu na mutacje w genie *CYP51A*. Posakonazol również wpływa na wzrost poziomu ekspresji genu *MDR2* izolatów bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H i z innymi mutacja ale w przypadku izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H powoduje spadek poziomu ekspresji genu *MDR2***. Dodatkowo analiza statystyczna wykazała, że poziomy ekspresji genu *MDR2* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H i bez tej mutacji zmieniają się bez względu na stosowane stężenie badanych azoli.

Na poniższych wykresach (Ryc. 22.) przedstawiono procent izolatów charakteryzujących się wzrostem, spadkiem i brakiem istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *MDR2*. Wzrost poziomu ekspresji genu uznawany jest za istotny, gdy wartość R wynosi co najmniej 2 [Tybulski J, 2008].



Ryc. 22. Wpływ itrakonazolu, worikonazolu i posakonazolu na zmiany poziomów ekspresji genu *MDR2*



8.5.3.5. Analiza zmian poziomów ekspresji genu *MDR3*Tab. 38. Wyniki zmian względnych poziomów ekspresji genu *MDR3*

Względny poziom ekspresji genu <i>MDR3</i> po hodowli izolatu na podłożu z dodatkiem antymikotyku						
Nr izoaltu	ITR (1)	ITR (2)	POS (1)	POS (2)	WOR (1)	WOR (2)
2	0,113	0,075	3,797	10,187	0,676	0,007
13	38,838	0,711	0,487	0,21	3,722	1,893
25	3,507	2,048	0,027	0,013	0,454	19,433
29	10,813	9,144	7,29	4,449	0,114	0,277
55	0,37	0,93	0,419	0,12	1,534	22,037
72	15,155	9,902	154,841	100,987	4,407	3,252
73	0,426	0,106	0,278	28,796	0,333	0,188
79	15,2	9,9	0,563	0,108	0,467	0,688
102	0,245	35,61	0,079	0,138	1,269	0,258
106	19,215	1,474	1,975	0,528	1,575	1,731
114	0,008	0,004	0,631	0,135	0,764	0,154
115	14,723	90,35	0,445	0,432	0,011	1,582
116	13,741	19,06	8,7	0,035	4,385	0,335
117	12,323	0,06	0,704	0,023	2,826	21,079
118	16,25	18,93	1,442	7,948	3,644	3,659
122	32,41	1,32	0,605	28,819	1,026	3,262
129	6,433	148,5	0,552	1,909	0,034	0,008
130	0,119	0,08	6,764	2,576	37,47	8,002
134	0,01	0,151	0,28	1,065	4,538	13,524
140	0,018	0,323	0,002	0,019	0,056	0,036
144	0,379	0,444	1,099	0,913	0,254	0,227
99	0,173	0,32	2041,554	718,57	3,716	1
191	2,791	1,72	0,418	0,404	0,299	0,745
192	1,03	0,137	0,828	1,251	0,576	0,67
193	0,795	1,005	0,385	23,686	0,363	0,088
194	0,26	10,59	1,156	0,507	130,9	2,43
195	0,174	91,71	2,541	1,644	0,011	0
197	0,455	1,127	0,505	0,18	1,615	1,798
196	0,052	0,001	23,235	7,689	2,629	2,791
198	0,131	1,018	0,089	0,354	3,486	1,108
199	9,905	5,421	9,699	1,389	1,088	1,173
200	13	9,208	11,403	3,291	0,263	0,013
201	1,808	0,911	2,101	5,806	4,718	12,522
202	0,795	1,005	1,845	2,214	0,002	0,006
203	0,329	0,81	0,048	0,006	0,238	0,598
145	0,208	0,943	0,195	0,01	7,683	10,539
146	0,168	3,585	10,359	1,221	0,181	2,131
147	24,9	8,891	0,26	0,239	2,203	0,057

W toku przeprowadzonych badań zaobserwowano, iż itrakonazol wpłynął na wzrost ekspresji genu *MDR3* u 16 izolatów (w przypadku niższego stężenia) i 15 izolatów (przy zastosowaniu wyższego stężenia) co sumarycznie daje niespełna 41%. 11 spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 18 izolatów (w przypadku stężenia niższego) i 11 (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie

daje niespełna 37%. Dziewięć spośród nich charakteryzowało się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.

Obecność w podłożu posakonazolu w niższym stężeniu indukowała wzrost poziomu ekspresji *MDR3* u 12 izolatów, a w stężeniu wyższym u 13 izolatów – co sumarycznie daje niespełna 33%. Osiem spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 14 izolatów (w przypadku stężenia niższego) i 16 (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje ponad 39%. 11 spośród nich charakteryzowało się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.

Worikonazol w niższym stężeniu powoduje wzrost poziomu ekspresji w przypadku 14 izolatów (przy stężeniu niższym) i 13 izolatów (przy stężeniu wyższym) co sumarycznie daje nieco ponad 34%. Dziewięć spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 15 izolatów (w przypadku stężenia niższego) i 14 (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje niespełna 37%. Dziewięć spośród nich charakteryzowało się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.

U sześciu izolatów (15,79%) nie zaobserwowano wzrostu ekspresji genu *MDR3* po ekspozycji na żaden z badanych związków.

W poniższej tabeli (Tab. 39.) przedstawiono uśrednione zmiany w poziomach ekspresji genu *MDR3* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożach z dodatkiem różnych azoli. Izolaty zostały podzielone na trzy grupy: charakteryzujące się mutacją TR<sub>34</sub>L98H, charakteryzujące się innymi mutacjami w genie *CYP51A*, izolaty bez mutacji w genie *CYP51A*. Poziom ekspresji dla poszczególnych izolatów hodowanych na podłożu Sabouraud bez dodatku antymikotyku wynosi 1, wartość wyższa wskazuje na wzrost poziomu ekspresji genu w skutek hodowli na podłożu z antymikotykiem, wartość niższa wskazuje na spadek poziomu ekspresji. W tabeli cyfrą (1) zaznaczono niższe stężenie badanego związku, zaś cyfrą (2) wyższe stężenie badanego związku.

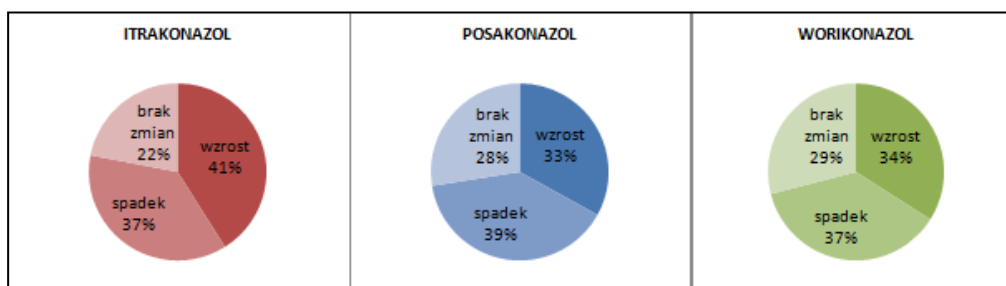
Tab. 39. Uśrednione wyniki względnych różnic w poziomach ekspresji genu *MDR3* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych podłożach z dodatkiem różnych stężeń azoli. Izolaty podzielono na trzy grupy: charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H, charakteryzujące się innymi mutacjami i bez mutacji

	ITR (1)	ITR (2)	POS (1)	POS (2)	WOR (1)	WOR (2)
<b>Izolaty bez mutacji w genie <i>CYP51A</i></b>	3,606	2,408	19,047	15,197	5,074	3,674
<b>Izolaty z mutacją TR<sub>34</sub>L98H</b>	9,697	25,216	0,440	0,556	3,390	11,513
<b>Izolaty z innymi mutacjami w genie <i>CYP51A</i></b>	7,741	14,811	100,190	38,209	7,469	1,509

Uśredniony poziom ekspresji genu *MDR3* izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z itrakonazolem wzrósł znacząco w każdej z badanych grup. Obecność posakonazolu w podłożu spowodowała spadek poziomu ekspresji genu *MDR3* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H, u pozostałych grup izolatów zaobserwowano znaczący wzrost poziomu ekspresji. Obecność w podłożu worikonazolu spowodowała znaczący wzrost ekspresji genu *MDR3* u wszystkich izolatów za wyjątkiem grupy izolatów z różnymi

mutacjami w genie *CYP51A* gdzie nie zaobserwowano zmian w poziomach ekspresji genu *MDR3*. Przedstawione wyniki zostały opracowane testem U Manna-Whitney'a i są istotne statystycznie. Oznacza to, że **obecność w medium hodowlanym itrakonazolu lub worikonazolu wpływa na wzrost poziomu ekspresji genu *MDR3* izolatów *A. fumigatus* bez względu na mutacje w genie *CYP51A*. Posakonazol również wpływa na wzrost poziomu ekspresji genu *MDR3* izolatów bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H i z innymi mutacja ale w przypadku izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H powoduje spadek poziomu ekspresji genu *MDR3***. Dodatkowo analiza statystyczna wykazała, że poziomy ekspresji genu *MDR3* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H i bez tej mutacji zmieniają się i nie ma statystycznie istotnych różnic pomiędzy wyższym i niższym stężeniem badanych azoli za wyjątkiem wyższego stężenia worikonazolu, gdzie poziom ekspresji genu *MDR3* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H jest znacząco wyższy.

Na poniższych wykresach (Ryc. 23.) przedstawiono procent izolatów charakteryzujących się wzrostem, spadkiem i brakiem istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *MDR3*. Wzrost poziomu ekspresji genu uznawany jest za istotny, gdy wartość R wynosi co najmniej 2 [Tybulski J, 2008].



Ryc. 23. Wpływ itrakonazolu, worikonazolu i posakonazolu na zmiany poziomów ekspresji genu *MDR3*

### 8.5.3.6. Analiza zmian poziomów ekspresji genu *ATRF*

Tab. 40. Wyniki zmian względnych poziomów ekspresji genu *ATRF*

Względny poziom ekspresji genu <i>ATRF</i> po hodowli izolatu na podłożu z dodatkiem antymikotyku						
Nr izoaltu	ITR (1)	ITR (2)	POS (1)	POS (2)	WOR (1)	WOR (2)
2	0,758	1,991	2,094	2,071	2,242	0,002
13	62,531	2,003	0,099	0,227	9,415	5,313
25	2,861	2,756	0,186	0,092	0,211	4,245
29	1,435	0,001	1,653	0,788	0,128	0,767
55	0,086	0,178	0,422	1,517	4,922	5,536
72	15,552	6,295	11,055	4,94	1,544	1,72
73	2,089	0,365	3,172	2,694	0,697	0,851
79	3,6	3,4	0,118	0,496	0,206	1,398
102	0,402	0,202	0,392	0,09	0,593	0,569
106	0,136	1,305	0,226	0,57	2,436	2,376
114	1,752	0,045	0,269	0,202	1,595	2,477
115	264,28	65,631	0,245	0,313	0,112	4,781
116	8,916	0,968	0,474	0,368	1,994	0,285
117	20,558	1,326	0,139	0,153	4,585	2,899
118	7,867	6,937	0,098	5,125	9,104	3,062
122	0,225	5,013	0,305	31,786	0,779	6,38
129	6,977	35,376	0,366	1,788	0,059	0,035
130	0,116	0,024	3,151	0,515	24,36	13,723
134	0,029	0,122	2,093	1,127	1,466	1,044
140	0,201	0,777	0,015	0,764	0,109	0,134
144	3,761	2,525	0,786	0,387	0,574	0,307
99	0,044	1,72	31,575	8,809	2,989	0,86
191	17,631	0,366	0,388	0,205	0,353	0,321
192	1,839	1,031	2,645	0,971	2,329	1,017
193	1,081	1,031	0,728	4,245	0,458	0,107
194	0,324	6,525	0,095	0,339	15,189	1,03
195	0,316	40,18	1,059	6,526	0,053	0
197	0,982	2,207	0,579	0,192	3,944	1,164
196	0,132	0,013	14,725	7,048	0,727	0,836
198	6,301	3,767	7,849	48,949	4,725	1,081
199	13,744	88,696	1,27	1,882	10,384	2,417
200	2,501	2,223	0,947	0,59	0,104	0,019
201	0,3	0,752	2,513	7,383	5,623	26,158
202	1,081	1,031	1,929	0,359	0,003	0,192
203	0,906	0,555	0,111	0,065	1,78	0,656
145	0,152	0,425	0,194	0,074	2,52	1,996
146	8,726	2,804	8,892	3,865	0,363	3,27
147	16,911	9,508	0,461	0,111	13,995	1,635

W toku przeprowadzonych badań zaobserwowano, iż itraconazol wpłynął na wzrost ekspresji genu *ATRF* u 17 izolatów (zarówno w przypadku niższego jak i wyższego stężenia) co daje niespełna 45% izolatów. 13 spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 13 izolatów (w przypadku stężenia niższego) i 10 (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje ponad 30%. Sześć spośród nich charakteryzowało się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.

Obecność w podłożu posakonazolu w indukowała wzrost ekspresji genu *ATRF* u 11 izolatów (przy stężeniu niższym) i 12 izolatów (przy stężeniu wyższym) co sumarycznie daje ponad 30%. Osiem spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 18 izolatów (w przypadku stężenia niższego) i 16 (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje niespełna 45%. 12 spośród nich charakteryzowało się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.

Worikonazol w niższym stężeniu powoduje wzrost poziomu ekspresji w przypadku 16 izolatów (przy stężeniu niższym) i 13 izolatów (przy stężeniu wyższym) co sumarycznie daje niespełna 37%. Osiem spośród nich charakteryzowało się wzrostem ekspresji w przypadku obu stężeń. Dodatkowo spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 12 izolatów (w przypadku stężenia niższego) i 10 (w przypadku stężenia wyższego) co sumarycznie daje niespełna 29%. Siedem spośród nich charakteryzowało się spadkiem ekspresji w przypadku obu stężeń.

U pięciu izolatów (13,16%) nie zaobserwowano wzrostu ekspresji genu *ATRF* po ekspozycji na żaden z badanych związków.

W poniższej tabeli (Tab. 41.) przedstawiono uśrednione zmiany w poziomach ekspresji genu *ATRF* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożach z dodatkiem różnych azoli. Izolaty zostały podzielone na trzy grupy: charakteryzujące się mutacją TR<sub>34</sub>L98H, charakteryzujące się innymi mutacjami w genie *CYP51A*, izolaty bez mutacji w genie *CYP51A*. Poziom ekspresji dla poszczególnych izolatów hodowanych na podłożu Sabouraud bez dodatku antymikotyku wynosi 1, wartość wyższa wskazuje na wzrost poziomu ekspresji genu w skutek hodowli na podłożu z antymikotykiem, wartość niższa wskazuje na spadek poziomu ekspresji. W tabeli cyfrą (1) zaznaczono niższe stężenie badanego związku, zaś cyfrą (2) wyższe stężenie badanego związku.

Tab. 41. Uśrednione wyniki względnych różnic w poziomach ekspresji genu *ATRF* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożach z dodatkiem różnych stężeń azoli. Izolaty podzielono na trzy grupy: charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H, charakteryzujące się innymi mutacjami i bez mutacji

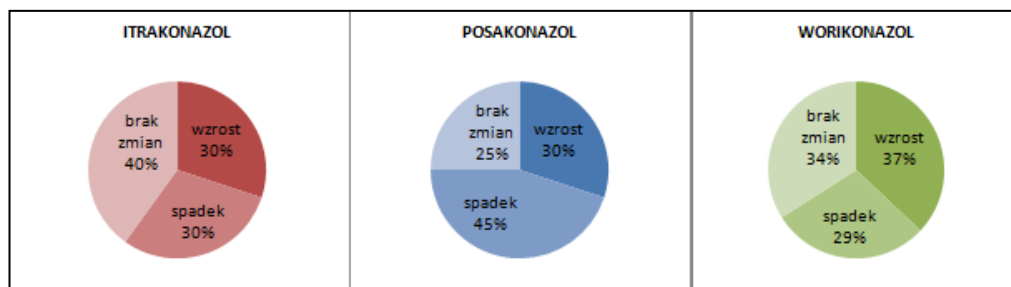
	ITR (1)	ITR (2)	POS (1)	POS (2)	WOR (1)	WOR (2)
<b>Izolaty bez mutacji w genie <i>CYP51A</i></b>	3,415	2,020	4,511	6,784	3,882	2,553
<b>Izolaty z mutacją TR<sub>34</sub>L98H</b>	15,056	6,572	0,552	0,814	3,828	2,804
<b>Izolaty z innymi mutacjami w genie <i>CYP51A</i></b>	16,744	11,345	2,587	3,557	3,188	2,721

Uśredniony poziom ekspresji genu *ATRF* izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z itrakonazolem wzrósł w każdej z badanych grup. Obecność posakonazolu w podłożu spowodowała spadek poziomu ekspresji genu *ATRF* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H, u pozostałych grup izolatów zaobserwowano znaczący wzrost poziomu ekspresji. Obecność w podłożu worikonazolu spowodowała znaczący wzrost ekspresji genu *ATRF* we wszystkich badanych grupach.



Przedstawione wyniki poddano analizie statystycznej testem U Manna-Whitney'a. Stwierdzono, że obserwowane różnice w poziomach ekspresji są istotne statystycznie. Oznacza to, że **obecność w medium hodowlanym itrakonazolu lub worikonazolu wpływa na wzrost poziomu ekspresji genu *ATRF* izolatów *A. fumigatus* bez względu na mutacje w genie *CYP51A*. Posakonazol również wpływa na wzrost poziomu ekspresji genu *ATRF* izolatów bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H i z innymi mutacja ale w przypadku izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H powoduje spadek poziomu ekspresji genu *ATFR***. Dodatkowo analiza statystyczna wykazała, że poziomy ekspresji genu *ATRF* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H i bez tej mutacji zmieniają się bez względu na stosowane stężenie badanych azoli.

Na poniższych wykresach (Ryc. 24.) przedstawiono procent izolatów charakteryzujących się wzrostem, spadkiem i brakiem istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *ATRF*. Wzrost poziomu ekspresji genu uznawany jest za istotny, gdy wartość R wynosi co najmniej 2 [Tybulski J, 2008].



Ryc. 24. Wpływ itrakonazolu, worikonazolu i posakonazolu na zmiany poziomów ekspresji genu *ATRF*

Część wyników z wpływu obecności azoli na poziomy ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* została opublikowana w Acta Biochemica Polonica: „Examination of *CYP51A* and *CYP51B* expression level of the first Polish azole resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolate”

#### 8.5.4. Wpływ długotrwałej ekspozycji izolatów *A. fumigatus* na działanie azoli oraz skutki zaprzestania ekspozycji

Do badań wpływu długotrwałej ekspozycji *A. fumigatus* na azole wybrano 38 izolatów scharakteryzowanych w tabeli dziewiątej (Tab. 9.) w rozdziale 7.7. Wszystkie izolaty pasażowano na podłożach z dodatkiem posakonazolu/itakonazolu/worikonazolu / i bez dodatku antymikotyku (jako kontrolę). Izolaty pasażowano 20-krotnie na poszczególnych podłożach i wyznaczano wartości MIC dla posakonazolu, itakonazolu i worikonazolu. Zaobserwowano wzrost wartości MIC a wyniki zostały omówione w jednym z poniższych podrozdziałów. W trakcie pasażowania izolatów *A. fumigatus* na podłożach z antymikotykami zaobserwowano zmiany w morfologii grzybów, które omówione zostały w podrozdziale 8.5.4.1. Po 20-krotnych pasażach wybrano cztery izolaty w celu określenia zmian poziomów ekspresji genów.

Następnie każdy z 38 izolatów hodowanych na podłożach z antymikotykami pasażowano pięciokrotnie na podłożu Sabouraud bez antymikotyków w celu sprawdzenia, czy usunięcie azoli z podłoża wpłynie na zmiany wartości MIC antymikotyków badanych grzybów. Wyniki tego eksperymentu zostały przedstawione w podrozdziale 8.5.4.2. Na tym etapie również sprawdzono poziomy ekspresji genów czterech izolatów *A. fumigatus*.

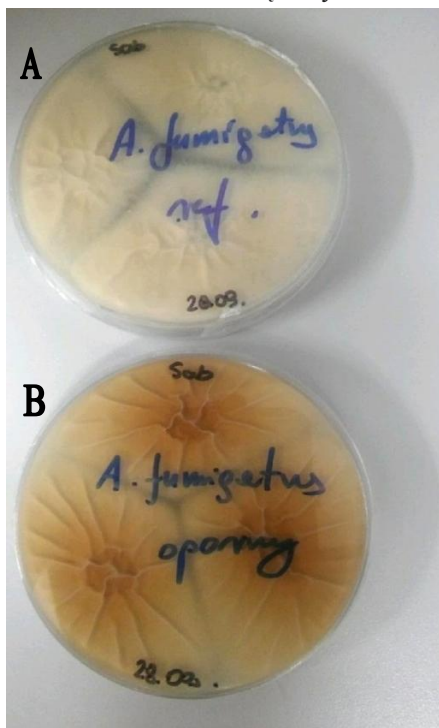
##### 8.5.4.1. Zmiany w morfologii izolatów *A. fumigatus* podczas hodowli

Klasycznie grzyby z gatunku *A. fumigatus* rosną w postaci zielonkawych lub ciemnozielono-brązowych kolonii. W toku badań nad niniejszą rozprawą zaobserwowano liczne odstępstwa od opisywanego w literaturze charakterystycznego wzrostu.

Pierwszą zaobserwowaną różnicą, było **mocniejsze wrastanie w agar grzybów charakteryzujących się mutacją TR<sub>34</sub>/L98H** a hodowanych na podłożu Sabouraud. Poza mocniejszym wrastaniem w podłoże, grzyby te charakteryzowały się ciemniejszym kolorem kolonii od dołu płytki. Takiego wzrostu nie obserwowano u pozostałych izolatów. Na rycinie 25 (Ryc. 25.) przedstawiono wyżej opisane różnice między przykładowym szczepem opornym i referencyjnym – bez mutacji w genie *CYP51A*.

Ryc. 25. Różnice we wzroście grzybów charakteryzujących się mutacją TR<sub>34</sub>/L98H od pozostałych *A. fumigatus*

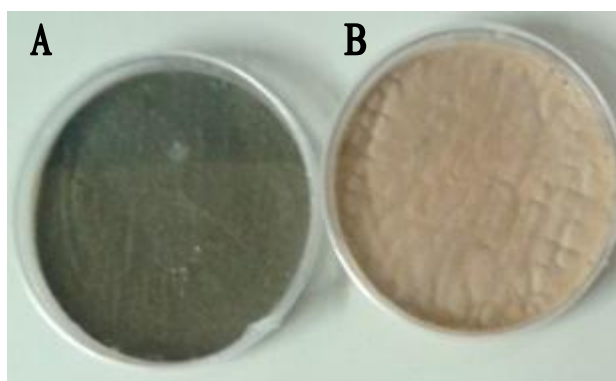
(A) – szczep referencyjny, bez mutacji



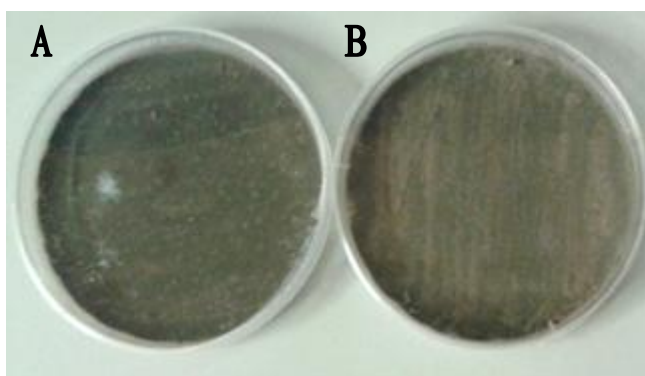
(B) – szczep z mutacją TR<sub>34</sub>L98H

Dodatkowo zaobserwowano, iż w przypadku hodowli *A. fumigatus* na agarze Sabouraud z dodatkiem itraconazolu lub posakonazolu wzrost grzybni różni się od powyższego opisu i jest zależny od ilości pasażu izolatów na podłożach z antymikotykami.

**Podczas pierwszego pasażu na podłoża z dodatkiem posakonazolu i itraconazolu kolonie *A. fumigatus* są białe i z czasem delikatnie ciemnieją do jasnego kremowego koloru.** Ponadto w przypadku hodowli *A. fumigatus* z powyższymi azolami zaobserwowano zmiany w strukturze grzybni. **Itraconazol i posakonazol indukują silne wrastanie grzybni w podłoże.** Co ciekawe, zmian w zabarwieniu i strukturze grzybni nie zaobserwowano w przypadku hodowli *A. fumigatus* na podłożu z dodatkiem worikonazolu. Izolaty hodowane na podłożu z worikonazolem oraz na podłożu bez dodatku antymikotyków rosły klasycznie. Na poniższych rycinach (Ryc. 26-28.) przedstawiono przykładowy wzrost grzybów z gatunku *A. fumigatus* na podłożach z poszczególnymi antymikotykami.

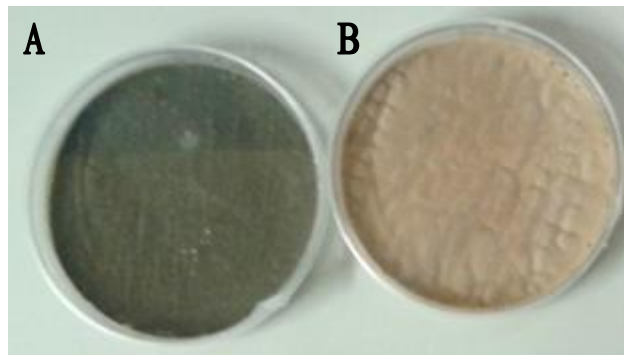


Ryc. 26. Wzrost grzybów *A. fumigatus* na podłożu Sabouraud (A) i Sabouraud z dodatkiem itraconazolu (B)



Ryc. 27. Wzrost grzybów *A. fumigatus* na podłożu Sabouraud (A) i Sabouraud z dodatkiem worikonazolu (B)

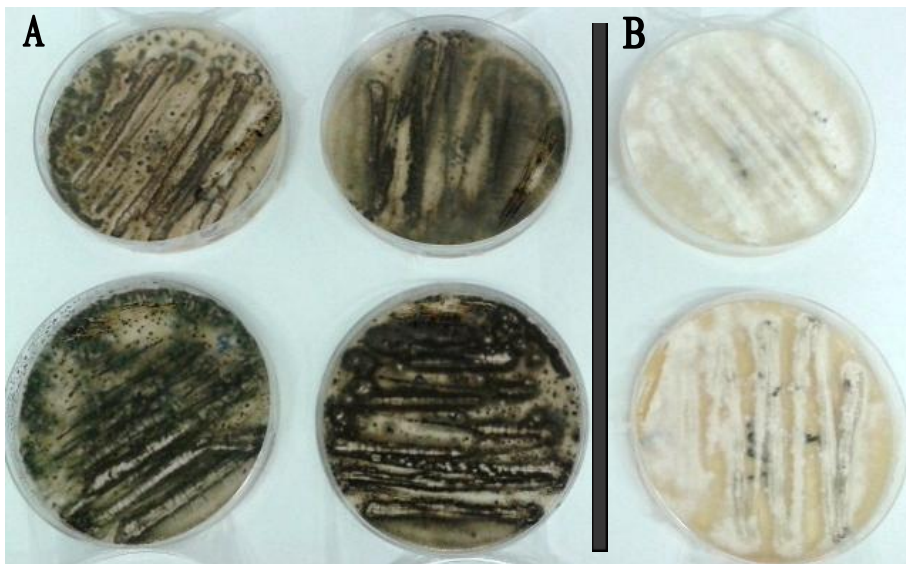




Ryc. 28. Wzrost grzybów *A. fumigatus* na podłożu Sabouraud (A) i Sabouraud z dodatkiem posakonazolu (B)

Podczas drugiego pasaży wszystkie izolaty hodowane na podłożach z dodatkiem posakonazolu, itraconazolu, worikonazolu i na podłożu bez antymikotyków rosły w sposób klasyczny.

Podczas trzeciego, czwartego i piątego pasaży izolaty hodowane na podłożach z dodatkiem worikonazolu i itraconazolu oraz bez dodatku antymikotyków rosły w sposób klasyczny, a izolaty hodowane na podłożu z dodatkiem posakonazolu rosły w bardzo zróżnicowany sposób: 21 izolatów rosło jako zielono-biało-brązowe kolonie, 2 izolaty rosły w postaci białych kolonii, a 15 izolatów rosło w klasyczny sposób jako zielonkawe kolonie. Różnorodność izolatów hodowanych na podłożu z posakonazolem przedstawiono na poniższej rycinie (Ryc. 29.).



Ryc. 29. Wzrost grzybów *A. fumigatus* na podłożu Sabouraud z dodatkiem posakonazolu; (A) – izolaty rosnące w postaci zielono-biało-brązowej grzybni, (B) – izolaty rosnące w postaci białej grzybni

Podczas szóstego pasażu wszystkie izolaty rosły w sposób klasyczny i w takiej formie rosły aż do pasażu dwudziestego. Tak samo rosły wszystkie izolaty podczas wszystkich re-pasaży na podłożu Sabouraud.

#### 8.5.4.2. Oznaczenia wrażliwości na azole wielokrotnie pasażowanych izolatów *A. fumigatus*

Wartości MIC posakonazolu, itraconazolu i vorikonazolu dla 38 izolatów *A. fumigatus* pasażowanych 20-krotnie na podłożach z dodatkiem poszczególnych antymikotyków i na podłożu Sabouraud przedstawiono w poniższych tabelach (Tab. 42-45.). W tabeli 42 (Tab. 42.) przedstawiono wyniki MIC antymikotyków uzyskane dla izolatów hodowanych na podłożu Sabouraud zarówno przed pasażami jak i po 20 i 25 pasażach. **Kolorem żółtym** zaznaczono wartości MIC różniące się od wartości uzyskanych przed pasażami.

Wyniki wartości MIC badanych związków dla izolatów hodowanych z dodatkiem azoli (pasaż) a następnie pasażowanych na podłoża bez antymikotyków (re-pasaż) przedstawiono w tabelach: Tab. 43. dla izolatów hodowanych z posakonazolem; Tab. 44. z itraconazolem i Tab. 45. z vorikonazolem.

Tab. 42. Wartości MIC badanych związków dla izolatów pasażowanych na podłożu Sabouraud

Badany związek	Wartość MIC [mg/L] po 24 i 48h					
	Itraconazol		Posakonazol		Vorikonazol	
	Przed pasażami	Po 20 i 25 pasażach	Przed pasażami	Po 20 i 25 pasażach	Przed pasażami	Po 20 i 25 pasażach
2	0,25	0,25	0,0312	0,0312	0,25	0,25
13	2	2	0,5	0,5	2	2
25	0,5	0,5	0,0312	0,0312	0,25	0,25
29	0,25	0,25	0,0156	0,0156	0,25	0,25
55	>8	8	0,25	0,25	2	2
72	0,25	0,25	0,0312	0,0312	0,125	0,125
73	0,125	0,125	0,0156	0,0156	0,25	0,25
79	0,25	0,125	0,0312	0,0312	0,25	0,25
102	0,5	0,25	0,06	0,06	0,5	0,5
106	0,5	0,25	0,03	0,03	0,25	0,25
114	0,5	0,5	0,03	0,03	0,25	0,25
115	0,25	0,25	0,03	0,03	0,25	0,25
116	0,5	0,5	0,06	0,06	0,25	0,25
117	8	8	0,5	0,5	1	1
118	0,5	0,5	0,06	0,06	0,25	0,25
122	0,5	0,5	0,03	0,03	0,25	0,25

129	>8	8	0,5	0,5	2	2
130	1	1	0,06	0,06	0,5	0,5
143	8	8	0,25	0,25	1	1
140	0,5	0,5	0,06	0,06	0,25	0,25
144	0,5	0,5	0,06	0,06	0,25	0,25
99	0,5	0,5	0,06	0,06	0,25	0,25
145	>8	>8	0,25	0,25	2	2
146	0,25	0,25	0,06	0,06	0,25	0,25
147	0,25	0,125	0,06	0,06	0,25	0,25
191	4	0,25	0,03	0,03	0,5	0,5
192	0,5	0,5	0,06	0,06	0,25	0,25
193	8	0,5	0,03	0,03	0,25	0,25
194	8	0,5	0,03	0,03	0,25	0,25
195	4	0,25	0,06	0,06	0,25	0,25
197	4	0,25	0,06	0,06	0,125	0,125
196	8	0,5	0,125	0,125	0,25	0,25
198	0,5	0,5	0,125	0,125	0,25	0,25
199	4	0,25	0,03	0,03	0,5	0,5
200	8	0,5	0,06	0,06	0,125	0,125
201	8	0,5	0,125	0,125	0,125	0,125
202	8	0,5	0,125	0,125	0,125	0,125
203	4	0,25	0,125	0,125	0,5	0,5

W wyniku pasażowania izolatów na podłożu Sabouraud zaobserwowano zmiany wartości MIC wyłącznie dla itrakonazolu. Zmiany te zaobserwowano u 17 izolatów. U 11 weterynaryjnych (Lublin) izolatów zaobserwowano utratę oporności na itrakonazol. Są to izolaty weterynaryjne, które charakteryzowały się opornością wyłącznie na itrakonazol, a u których nie wykazano mutacji w genie *CYP51A* skorelowanych z opornością. Dodatkowo u czterech pierwotnie wrażliwych na itrakonazol izolatów zaobserwowano spadek wartości MIC.

Tab. 43. Wartości MIC badanych związków dla izolatów pasażowanych na podłożu Sabouraud z dodatkiem posakonazolu, a następnie hodowanych na podłożach bez dodatku leku

Badany związek	Wartość MIC [mg/L] po 24 i 48h								
	Itrakonazol			Posakonazol			Worikonazol		
	izolat	start	pasaż	re-pasaż	start	pasaż	re-pasaż	start	pasaż
2	0,25	>8	0,25	0,0312	>8	0,0312	0,25	>16	0,25
13	2	>8	2	0,5	>8	0,5	2	>16	2
25	0,5	>8	0,5	0,0312	>8	0,0312	0,25	>16	0,25
29	0,25	>8	0,25	0,0156	>8	0,0156	0,25	>16	0,25
55	>8	>8	>8	0,25	>8	0,25	2	>16	2
72	0,25	>8	0,25	0,0312	>8	0,0312	0,125	>16	0,125
73	0,125	>8	0,125	0,0156	>8	0,0156	0,25	>16	0,25
79	0,25	>8	0,25	0,0312	>8	0,0312	0,25	>16	0,25
102	0,5	>8	0,5	0,06	>8	0,06	0,5	>16	0,5
106	0,5	>8	0,5	0,03	>8	0,03	0,25	>16	0,25
114	0,5	>8	0,5	0,03	>8	0,03	0,25	>16	0,25
115	0,25	>8	0,25	0,03	>8	0,03	0,25	>16	0,25
116	0,5	>8	0,5	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
117	8	>8	8	0,5	>8	0,5	1	>16	1
118	0,5	>8	0,5	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
122	0,5	>8	0,5	0,03	>8	0,03	0,25	>16	0,25
129	>8	>8	>8	0,5	>8	0,5	2	>16	2
130	1	>8	1	0,06	>8	0,06	0,5	>16	0,5
143	8	>8	8	0,25	>8	0,25	1	>16	1
140	0,5	>8	0,5	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
144	0,5	>8	0,5	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
99	0,5	>8	0,5	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
145	>8	>8	>8	0,25	>8	0,25	2	>16	2
146	0,25	>8	0,25	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
147	0,25	>8	0,25	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
191	4	>8	2	0,03	>8	0,125	0,5	>16	0,5
192	0,5	>8	0,25	0,06	>8	0,125	0,25	>16	0,25
193	8	>8	2	0,03	>8	0,06	0,25	>16	0,5
194	8	>8	1	0,03	>8	0,125	0,25	>16	0,5
195	4	>8	1	0,06	>8	0,5	0,25	>16	0,25
197	4	>8	2	0,06	>8	0,125	0,125	>16	0,25
196	8	>8	0,25	0,125	>8	0,5	0,25	>16	0,5
198	0,5	>8	0,5	0,125	>8	0,5	0,25	>16	0,5



199	4	>8	1	0,03	>8	0,06	0,5	>16	1
200	8	>8	2	0,06	>8	0,125	0,125	>16	0,5
201	8	>8	1	0,125	>8	0,5	0,125	>16	0,25
202	8	>8	1	0,125	>8	0,5	0,125	>16	0,5
203	4	>8	0,5	0,125	>8	0,25	0,5	>16	1

Wszystkie badane izolaty po 20-krotnym pasażu na podłożu z dodatkiem posakonazolu nabywały oporność na itrakonazol, posakonazol i worikonazol. Po re-pasażach na podłożu Sabouraud bez dodatku posakonazolu obserwowano obniżenie wartości MIC. W większości przypadków wartości MIC wróciły do poziomu sprzed pasażu.

Wyjątek stanowi grupa izolatów weterynaryjnych. Wyniki MIC dla itrakonazolu spadły w porównaniu do wyjściowych (za wyjątkiem jednego izolatu - 198 – gdzie wartość MIC wróciła do wyjściowej). W związku ze spadkiem wartości MIC, siedem izolatów utraciło oporność na itrakonazol (zaznaczono w tabeli kolorem szarym). Wyniki wartości MIC dla posakonazolu po re-pasażach wszystkich weterynaryjnych izolatów były wyższe od wyjściowych. Sześć izolatów nadal charakteryzowało się opornością na posakonazol. Wyniki wartości MIC dla worikonazolu po re-pasażach dla izolatów weterynaryjnych w większości również były wyższe od wyjściowych. Wartości MIC itrakonazolu, posakonazolu i worikonazolu uzyskane dla izolatów weterynaryjnych, które przed pasażami były wrażliwe na dany lek, następnie nabyły oporność poprzez pasaż na podłożach z antymikotykami i nie utraciły tej oporności w skutek re-pasaży na podłożu Sabouraud zostały w powyższej tabeli wyróżnione poprzez **pogrubienie czcionki**. **Żółtym wyróżnieniem** wskazane zostały wartości MIC badanych związków dla izolatów weterynaryjnych, które pomimo re-pasaży charakteryzowały się wyższą wartością MIC niż przed pasażami.

Tab. 44. Wartości MIC badanych związków dla izolatów pasażowanych na podłożu Sabouraud z dodatkiem itrakonazolu, a następnie hodowanych na podłożach bez dodatku leku

Badany związek	Wartość MIC [mg/L] po 24 i 48h								
	Itrakonazol			Posakonazol			Worikonazol		
izolat	start	pasaż	re-pasaż	start	pasaż	re-pasaż	start	pasaż	re-pasaż
2	0,25	>8	0,25	0,0312	>8	0,0312	0,25	>16	0,25
13	2	>8	2	0,5	>8	0,5	2	>16	2
25	0,5	>8	0,5	0,0312	>8	0,0312	0,25	>16	0,25
29	0,25	>8	0,25	0,0156	>8	0,0156	0,25	>16	0,25
55	>8	>8	>8	0,25	>8	0,25	2	>16	2
72	0,25	>8	0,25	0,0312	>8	0,0312	0,125	>16	0,125
73	0,125	>8	0,125	0,0156	>8	0,0156	0,25	>16	0,25

79	0,25	>8	0,25	0,0312	>8	0,0312	0,25	>16	0,25
102	0,5	>8	0,5	0,06	>8	0,06	0,5	>16	0,5
106	0,5	>8	0,5	0,03	>8	0,03	0,25	>16	0,25
114	0,5	>8	0,5	0,03	>8	0,03	0,25	>16	0,25
115	0,25	>8	0,25	0,03	>8	0,03	0,25	>16	0,25
116	0,5	>8	0,5	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
117	8	>8	8	0,5	>8	0,5	1	>16	1
118	0,5	>8	0,5	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
122	0,5	>8	0,5	0,03	>8	0,03	0,25	>16	0,25
129	>8	>8	>8	0,5	>8	0,5	2	>16	2
130	1	>8	1	0,06	>8	0,06	0,5	>16	0,5
143	8	>8	8	0,25	>8	0,25	1	>16	1
140	0,5	>8	0,5	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
144	0,5	>8	0,5	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
99	0,5	>8	0,5	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
145	>8	>8	>8	0,25	>8	0,25	2	>16	2
146	0,25	>8	0,25	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
147	0,25	>8	0,25	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
191	4	>8	1	0,03	>8	0,125	0,5	>16	2
192	0,5	>8	2	0,06	>8	0,25	0,25	>16	1
193	8	>8	2	0,03	>8	0,125	0,25	>16	1
194	8	>8	2	0,03	>8	0,5	0,25	>16	0,5
195	4	>8	1	0,06	>8	0,125	0,25	>16	0,5
197	4	>8	1	0,06	>8	0,125	0,125	>16	0,25
196	8	>8	0,25	0,125	>8	0,5	0,25	>16	1
198	0,5	>8	0,25	0,125	>8	0,5	0,25	>16	0,5
199	4	>8	1	0,03	>8	0,125	0,5	>16	1
200	8	>8	2	0,06	>8	0,125	0,125	>16	0,25
201	8	>8	1	0,125	>8	0,25	0,125	>16	0,5
202	8	>8	2	0,125	>8	0,5	0,125	>16	0,25
203	4	>8	0,5	0,125	>8	0,5	0,5	>16	1

Wszystkie badane izolaty po 20-krotnym pasażu na podłożu z dodatkiem itrakonazolu nabywały oporność na itrakonazol, posakonazol i worikonazol. Po re-pasażach na podłożu Sabouraud bez dodatku itrakonazolu obserwowano obniżenie wartości MIC. W większości przypadków wartości MIC wróciły do poziomu sprzed pasażu.

Wyjątek stanowi grupa izolatów weterynaryjnych. Wyniki MIC dla itrakonazolu spadły w porównaniu do wyjściowych. Po hodowli bez dodatku antymikotyków, sześć



izolatów utraciło oporność na itrakonazol (zaznaczono w tabeli kolorem szarym). Wyniki wartości MIC dla posakonazolu i worikonazolu po re-pasażach wszystkich weterynaryjnych izolatów były wyższe od wyjściowych. Siedem izolatów mimo re-pasaży charakteryzowało się opornością na posakonazol (której nie obserwowano przed pasażami). Jeden izolat charakteryzował się opornością na worikonazol (której również nie obserwowano przed pasażami). Wartości MIC itrakonazolu, posakonazolu i worikonazolu uzyskane dla izolatów weterynaryjnych, które przed pasażami były wrażliwe na dany lek, następnie nabyły oporność poprzez pasaż na podłożach z antymikotykami i nie utraciły tej oporności w skutek re-pasaży na podłożu Sabouraud zostały w powyższej tabeli wyróżnione poprzez **pogrubienie czcionki**. **Żółtym wyróżnieniem** wskazane zostały wartości MIC badanych związków dla izolatów weterynaryjnych, które pomimo re-pasaży charakteryzowały się wyższą wartością MIC niż przed pasażami.

Tab. 45. Wartości MIC badanych związków dla izolatów pasażowanych na podłożu Sabouraud z dodatkiem worikonazolu, a następnie hodowanych na podłożach bez dodatku leku

Badany związek	Wartość MIC [mg/L] po 24 i 48h								
	Itrakonazol			Posakonazol			Worikonazol		
izolat	start	pasaż	re-pasaż	start	pasaż	re-pasaż	start	pasaż	re-pasaż
2	0,25	>8	0,25	0,0312	>8	0,0312	0,25	>16	0,25
13	2	>8	2	0,5	>8	0,5	2	16	2
25	0,5	>8	0,5	0,0312	>8	0,0312	0,25	16	0,25
29	0,25	8	0,25	0,0156	8	0,0156	0,25	>16	0,25
55	>8	>8	>8	0,25	>8	0,25	2	>16	2
72	0,25	8	0,25	0,0312	>8	0,0312	0,125	>16	0,125
73	0,125	4	0,125	0,0156	8	0,0156	0,25	>16	0,25
79	0,25	8	0,25	0,0312	4	0,0312	0,25	>16	0,25
102	0,5	8	0,5	0,06	>8	0,06	0,5	>16	0,5
106	0,5	8	0,5	0,03	>8	0,03	0,25	>16	0,25
114	0,5	>8	0,5	0,03	>8	0,03	0,25	>16	0,25
115	0,25	>8	0,25	0,03	>8	0,03	0,25	>16	0,25
116	0,5	>8	0,5	0,06	8	0,06	0,25	>16	0,25
117	8	>8	8	0,5	>8	0,5	1	>16	1
118	0,5	8	0,5	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
122	0,5	>8	0,5	0,03	>8	0,03	0,25	>16	0,25
129	>8	>8	>8	0,5	>8	0,5	2	>16	2
130	1	>8	1	0,06	>8	0,06	0,5	>16	0,5
143	8	>8	8	0,25	>8	0,25	1	>16	1
140	0,5	>8	0,5	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25



144	0,5	8	0,5	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
99	0,5	8	0,5	0,06	8	0,06	0,25	16	0,5
145	>8	>8	>8	0,25	>8	0,25	2	>16	2
146	0,25	4	0,25	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
147	0,25	4	0,25	0,06	>8	0,06	0,25	>16	0,25
191	4	>8	2	0,03	>8	0,5	0,5	>16	1
192	0,5	>8	4	0,06	>8	0,5	0,25	>16	0,5
193	8	>8	4	0,03	>8	0,5	0,25	>16	1
194	8	>8	4	0,03	>8	0,25	0,25	>16	1
195	4	>8	2	0,06	>8	0,25	0,25	>16	0,5
197	4	>8	4	0,06	>8	0,125	0,125	>16	0,25
196	8	>8	0,5	0,125	>8	2	0,25	>16	1
198	0,5	>8	0,5	0,125	>8	2	0,25	>16	1
199	4	>8	2	0,03	>8	0,125	0,5	>16	1
200	8	>8	4	0,06	>8	0,5	0,125	>16	0,25
201	8	>8	8	0,125	>8	1	0,125	>16	0,125
202	8	>8	4	0,125	>8	1	0,125	>16	0,125
203	4	>8	4	0,125	>8	1	0,5	>16	1

Wszystkie badane izolaty po 20-krotnym pasażu na podłożu z dodatkiem worikonazolu nabywały oporność na itrakonazol, posakonazol i worikonazol. Po re-pasażach na podłożu Sabouraud bez dodatku itrakonazolu obserwowano obniżenie wartości MIC. W większości przypadków wartości MIC wróciły do poziomu sprzed pasażu.

Wyjątek stanowi grupa izolatów weterynaryjnych. Wyniki MIC dla itrakonazolu spadły w porównaniu do wyjściowych w przypadku ośmiu izolatów. Mimo to, izolaty te (za wyjątkiem izolatu nr 196, zaznaczonego w tabeli **kolorem szarym**) nadal pozostały odporne na itrakonazol. Wyniki wartości MIC dla posakonazolu i worikonazolu po re-pasażach wszystkich weterynaryjnych izolatów były wyższe od wyjściowych (za wyjątkiem wartości MIC worikonazolu dla dwóch izolatów weterynaryjnych, które wróciły do wyjściowego poziomu). Aż 11 weterynaryjnych izolatów, mimo re-pasaży, charakteryzowało się nieobserwowaną przed pasażami opornością na posakonazol.

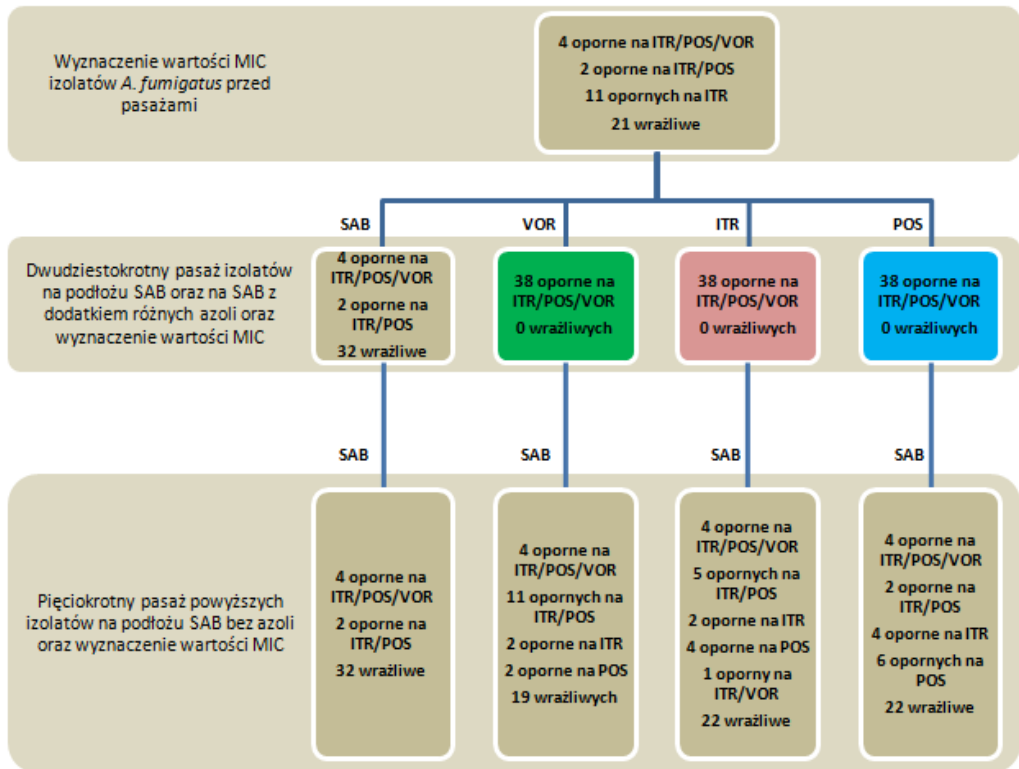
Wartości MIC itrakonazolu, posakonazolu i worikonazolu uzyskane dla izolatów weterynaryjnych, które przed pasażami były wrażliwe na dany lek, następnie nabyły oporność poprzez pasaż na podłożach z antymikotykami i nie utraciły tej oporności w skutek re-pasaży na podłożu Sabouraud zostały w powyższej tabeli wyróżnione poprzez **pogrubienie czcionki**. **Żółtym wyróżnieniem** wskazane zostały wartości MIC badanych związków dla izolatów weterynaryjnych, które pomimo re-pasaży charakteryzowały się wyższą wartością MIC niż przed pasażami. Na podstawie uzyskanych wyników, można wysnuć hipotezę, że izolaty te były już wcześniej





w środowisku wystawione na działanie azoli i stąd wyniki tej grupy izolatów są inne niż dla izolatów klinicznych.

Na poniższym schemacie (Ryc. 30.) przedstawiono zbiorcze podsumowanie wyników dotyczących wpływu występowania – bądź braku - azoli w medium hodowlanym na wrażliwość izolatów *A. fumigatus* na azole.



Ryc. 30. Podsumowanie wpływu azoli – bądź ich braku - w medium hodowlanym na grupę 38 izolatów *A. fumigatus*

#### 8.5.4.3. Analiza zmian poziomów ekspresji genów pasażowanych izolatów *A. fumigatus* wykonana metodą komparatywną

Do badań wybrano cztery izolaty (dwa wrażliwe na azole: 2 i 192 oraz dwa odporne: 13 i 145). W toku badań sprawdzano poziom ekspresji genów kodujących transportery błonowe (*MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF*) oraz odpowiedzialnych za prawidłową syntezę ściany i błony komórkowej (*CYP51A* i *CYP51B*) przed pasażami, po długotrwałej hodowli *A. fumigatus* na podłożach z dodatkiem antymikotyków oraz po re-pasażach na podłożu Sabouraud. Wyniki zostały przedstawione w poniższej tabeli (Tab. 46.).

Tab. 46. Zmiany poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* 20-krotnie pasażowanych na podłożach z dodatkiem azoli (zaznaczone niebieskim tłem): worikonazol, posakonazol i itraconazol a następnie 5-krotnie re-pasażowanych na podłożu Sabouraud (zaznaczone pomarańczowym tłem)

<b>WORIKONAZOL</b>						
	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>
<b>2</b>	1,094	6,459	2,968	2,440	3,483	33,676
<b>2 pasaż</b>	62,164	0,070	59,466	1,0845	1,968	18,290
<b>2 re-pasaż</b>	174,974	0,083	98,907	0,809	2,253	16,737
<b>13</b>	0,465	0,078	0,087	0,193	0,202	0,049
<b>13 pasaż</b>	17,208	0,158	307,406	0,061	6,038	1,301
<b>13 re-pasaż</b>	20,294	0,088	72,304	0,292	2,184	0,929
<b>192</b>	1,981	0,203	7,583	2,162	0,825	0,112
<b>192 pasaż</b>	6,431	0,192	298,999	3,724	0,380	3,418
<b>192 re-pasaż</b>	70,361	0,069	68,261	2,010	2,175	1,944
<b>145</b>	0,296	0,293	0,0116	6,322	0,205	0,152
<b>145 pasaż</b>	269,660	0,060	53,817	3,981	5,606	40,786
<b>145 re-pasaż</b>	14,084	0,140	47,275	1,191	3,236	2,373
<b>POSAKONAZOL</b>						
	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>
<b>2</b>	0,229	0,808	4,850	0,777	0,036	0,071
<b>2 pasaż</b>	1166,824	0,053	3,940	18,456	22,085	72,427
<b>2 re-pasaż</b>	294,679	0,014	55,677	1,843	2,989	21,660
<b>13</b>	1,699	3,579	34,500	0,544	0,686	0,661
<b>13 pasaż</b>	205,643	0,049	0,001	15,552	5,363	7,449
<b>13 re-pasaż</b>	18,752	0,084	17,539	0,553	1,313	2,751
<b>192</b>	1,806	3,170	166,495	2,038	2,325	1,266
<b>192 pasaż</b>	32,424	0,165	9,849	15,824	50,738	1,768
<b>192 re-pasaż</b>	30,675	0,801	168,780	2,457	5,004	3,618
<b>145</b>	1,970	11,764	4,860	2,344	30,667	15,369
<b>145 pasaż</b>	222,398	0,029	3,000	34,107	13,737	18,214
<b>145 re-pasaż</b>	176,926	0,076	109,900	4,938	3,468	11,802
<b>ITRAKONAZOL</b>						
	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>
<b>2</b>	0,312	11,324	2,840	1,632	3,117	0,832
<b>2 pasaż</b>	45,665	0,103	22,690	0,993	3,057	1,289
<b>2 re-pasaż</b>	1028,267	0,055	104,619	6,169	22,943	153,277
<b>13</b>	0,515	0,403	0,574	0,203	0,893	0,629
<b>13 pasaż</b>	299,622	0,114	23,556	7,749	12,519	404,221
<b>13 re-pasaż</b>	1126,007	0,039	26,046	12,694	38,881	0,695
<b>192</b>	0,959	1,041	0,347	2,957	7,047	4,020
<b>192 pasaż</b>	30,316	0,094	18,039	0,509	2,986	0,695
<b>192 re-pasaż</b>	205,501	0,153	105,493	5,752	27,039	10,689
<b>145</b>	3,278	4,174	0,397	4,249	38,063	17,634
<b>145 pasaż</b>	334,996	0,026	13,576	4,170	21,676	12,969
<b>145 re-pasaż</b>	48,706	0,070	65,754	1,618	1,580	4,757

Po pasażowaniu izolatów na podłożach z dodatkiem worikonazolu poziom ekspresji genu *CYP51A* rośnie, a po re-pasażach dalej wzrasta u wszystkich badanych izolatów za wyjątkiem izolatu środowiskowego nr 145. Poziom ekspresji genu *CYP51B* przy pasażach maleje u wszystkich izolatów za wyjątkiem izolatu nr 13, a przy re-pasażach, poziom ekspresji genu jest także niższy niż izolatów hodowanych na Sabouraud bez dodatku worikonazolu. **Poziom ekspresji genu *MDR1* wskutek pasaży na podłożu z worikonazolem wzrasta**, a przy re-pasażach maleje (za wyjątkiem izolatu nr 2). Poziom ekspresji genu *MDR2* przy pasażach spada u wszystkich izolatów za wyjątkiem izolatu nr 192. Przy re-pasażach trudno zaobserwować jakieś zależności. **Poziom ekspresji genu *MDR3* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H przy pasażach z worikonazolem wzrasta** a przy re-pasażach maleje. W przypadku izolatów bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H zależność jest odwrotna: przy pasażach ekspresja *MDR3* maleje, zaś przy re-pasażach wzrasta. Poziom ekspresji genu *ATRF* przy pasażach na podłożu z dodatkiem worikonazolu rośnie (za wyjątkiem izolatu nr 2) a przy re-pasażach maleje.

Po pasażowaniu izolatów na podłożach z dodatkiem itrakonazolu poziom ekspresji genu *CYP51A* rośnie. Po re-pasażach poziom ekspresji genu *CYP51A* dalej wzrasta u wszystkich badanych izolatów za wyjątkiem izolatu nr 145. **Poziom ekspresji genu *CYP51B* przy pasażach na podłożu z itrakonazolem spada**, a przy re-pasażach jest również niższy niż izolatów hodowanych na podłożu Sabouraud bez dodatku antymikotyków. **Przy pasażach izolatów na podłożu z dodatkiem itrakonazolu, poziom ekspresji genu *MDR1* wzrasta**, a w skutek re-pasaży obserwuje się dalszy wzrost poziomów ekspresji. Poziom ekspresji genu *MDR2* przy pasażach na podłożu z dodatkiem itrakonazolu spada u wszystkich izolatów za wyjątkiem izolatu nr 13, a w skutek re-pasaży rośnie. W przypadku genów *MDR3* i *ATRF* nie zaobserwowano zależności w skutek pasaży i re-pasaży.

**Wskutek pasaży izolatów na podłożu z dodatkiem posakonazolu zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji genu *CYP51A***. Przy re-pasażach poziom ekspresji genu *CYP51A* spada, ale dalej pozostaje wyższy w stosunku do poziomu ekspresji izolatów hodowanych na podłożu Sabouraud bez dodatku antymikotyków. **Poziom ekspresja genu *CYP51B* przy pasażach na podłożu z posakonazolem spada**, a przy re-pasażach jest również niższy niż w grupie izolatów hodowanych na podłożu Sabouraud bez dodatku antymikotyków. **Poziom ekspresji genu *MDR1* w skutek pasaży na podłożu z posakonazolem spada**, a po re-pasażach wzrasta. **Poziom ekspresji genu *MDR2* przy pasażach na podłożu z dodatkiem posakonazolu rośnie**, a po re-pasażach spada. Poziom ekspresji genu *MDR3* przy pasażach rośnie (za wyjątkiem izolatu nr 145) a przy re-pasażach spada, ale i tak jest wyższy (poza izolatem nr 145) od wyjściowych – po hodowli bez antymikotyku. **Poziom ekspresji genu *ATRF* przy pasażach na podłożu z posakonazolem rośnie**, a przy re-pasażach maleje (za wyjątkiem izolatu nr 192).



#### 8.5.4.4. Analiza zmian poziomów ekspresji genów pasażowanych izolatów *A. fumigatus* wykonana metodą Pfaffla

Do badań wybrano cztery izolaty (dwa wrażliwe na azole: 2 i 192 oraz dwa odporne: 13 i 145). W toku badań badano poziom ekspresji genów kodujących transportery błonowe (*MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF*) oraz odpowiedzialnych za prawidłową syntezę ściany i błony komórkowej (*CYP51A* i *CYP51B*) po długotrwałej hodowli *A. fumigatus* na podłożach z dodatkiem antymikotyków. Wyniki zostały przedstawione i omówione w kolejnych podrozdziałach.

**Wszystkie podane poziomy ekspresji odnoszą się do poziomu ekspresji danego izolatu, hodowanego na podłożu Sabouraud bez dodatku antymikotyków (kontrola).** Wartość = 1 oznacza, że poziom ekspresji badanego genu (po hodowli na podłożu z antymikotykiem) jest taki sam jak u tego szczepu hodowanego na podłożu Sabouraud bez azoli. Wynik wyższy oznacza wzrost ekspresji np. wartość = 2 oznacza dwukrotny wzrost poziomu ekspresji w odniesieniu do kontroli. Wynik niższy niż 1 oznacza spadek poziomu ekspresji w odniesieniu do kontroli.

#### 8.5.4.4.1. Analiza zmian poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z dodatkiem posakonazolu

Wyniki badania zmian poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z dodatkiem posakonazolu przedstawiono w poniższej tabeli (Tab. 47.) i na poniższym wykresie (Ryc. 31.).

Tab. 47. Zmiany w poziomach ekspresji poszczególnych genów izolatów *A. fumigatus* pasażowanych na podłożu z dodatkiem posakonazolu i re-pasażowanych na podłożu Sabouraud

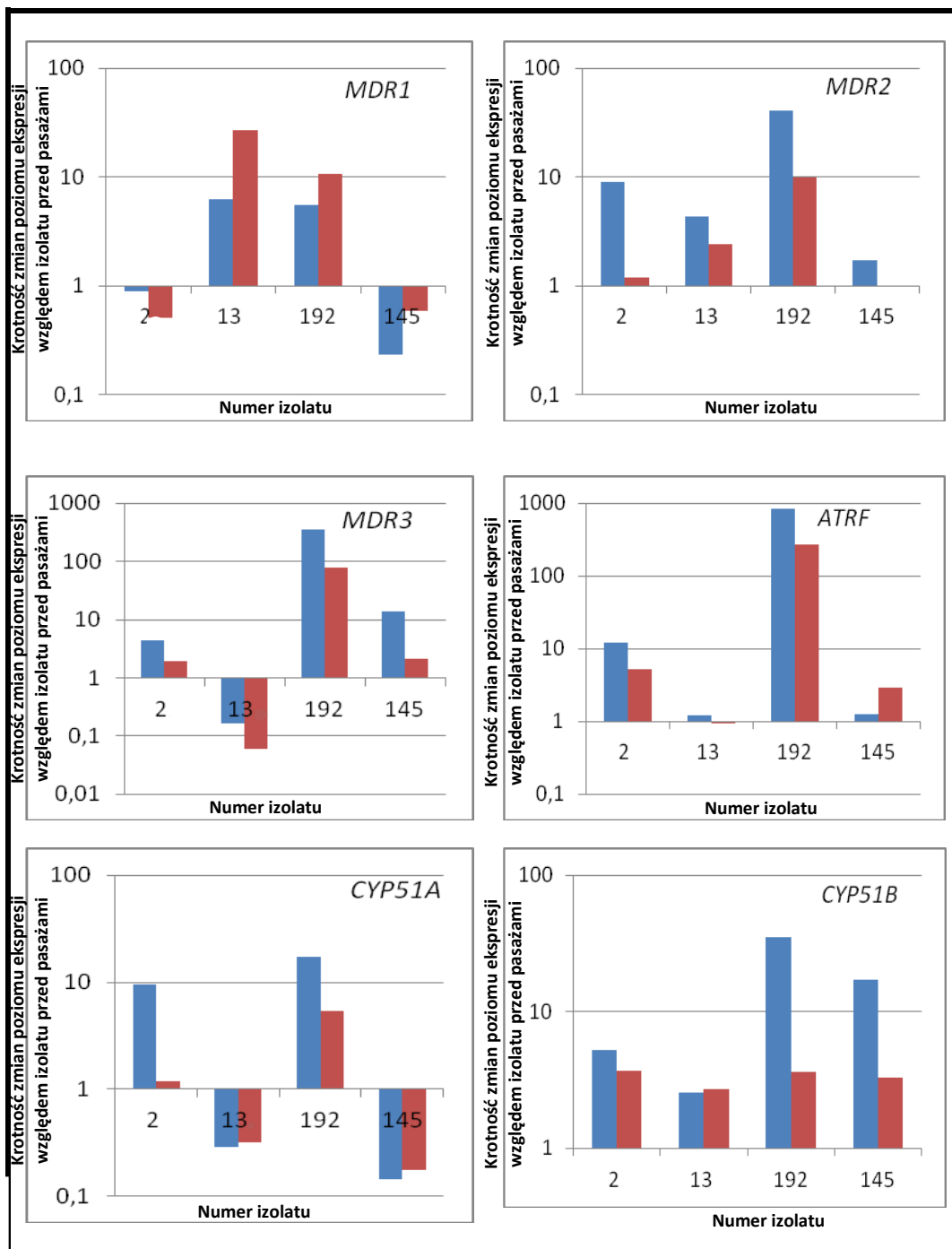
POSAKONAZOL												
ekspresja po pasażach							ekspresja po re-pasażach					
Izolat	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>
2 – W	0,896	8,937	4,385	12,202	9,514	5,264	0,504	1,198	1,976	5,195	1,197	3,706
13 – O	6,294	4,337	0,164	1,215	0,290	2,572	27,137	2,419	0,060	0,931	0,320	2,701
192 - W	5,569	40,692	349,136	825,060	17,152	35,229	10,693	9,851	77,420	274,369	5,381	3,640
145 - O	0,234	1,708	13,724	1,263	0,146	17,098	0,592	0,995	2,157	2,956	0,176	3,281

W – izolat wrażliwy na azole, bez mutacji w genie *CYP51A*

O – izolat oporny na azole, z mutacją TR<sub>34</sub>/L98H w genie *CYP51A*

We wszystkich badanych izolatach hodowanych na podłożu z dodatkiem posakonazolu zaobserwowano znaczący wzrost poziomu ekspresji genów *MDR2* i *CYP51B*. Wśród izolatów wrażliwych na azole zaobserwowano znaczący wzrost poziomu ekspresji genu *ATRF*. Ekspresja tego genu izolatów opornych wzrosła nieznacznie. W skutek hodowli grzybów na podłożu z dodatkiem posakonazolu poziom ekspresji genu *CYP51A* wzrósł znacząco w przypadku izolatów wrażliwych a w przypadku opornych poziom ekspresji tego genu spadł. Wzrost poziomu ekspresji genu *MDR3* zaobserwowano w przypadku dwóch izolatów wrażliwych i jednego opornego.

Wskutek re-pasaży na podłożu bez posakonazolu poziomy ekspresji genów *MDR2*, *MDR3* (za wyjątkiem jednego opornego izolatu), *ATRF*, *CYP51A* i *CYP51B* zaczęły powracać do poziomu wyjściowego.



Ryc. 31. Poziom ekspresji poszczególnych genów *A. fumigatus* pasażowanych na podłożu z dodatkiem posakonazolu i re-pasażowanych na podłożu Sabouraud

Kolorem niebieskim zaznaczono wyniki badania poziomu ekspresji poszczególnych genów po pasażach na podłożach z antymikotykami, kolorem czerwonym zaznaczono wyniki badania poziomów ekspresji po re-pasażach. W prawym górnym rogu każdego wykresu zaznaczono jakiego genu tyczą się przedstawione na nim wyniki. Izolaty odporne na działanie azoli: 13 i 145, izolaty wrażliwe na azole: 2 i 192

#### 8.5.4.4.2. Analiza zmian poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z dodatkiem worikonazolu

Wyniki zmian poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z dodatkiem worikonazolu przedstawiono w poniższej tabeli (Tab. 48.) i na poniższym wykresie (Ryc. 32.).

Tab. 48. Zmiany poziomów ekspresji poszczególnych genów izolatów *A. fumigatus* pasażowanych na podłożu z dodatkiem worikonazolu i re-pasażowanych na podłożu Sabouraud

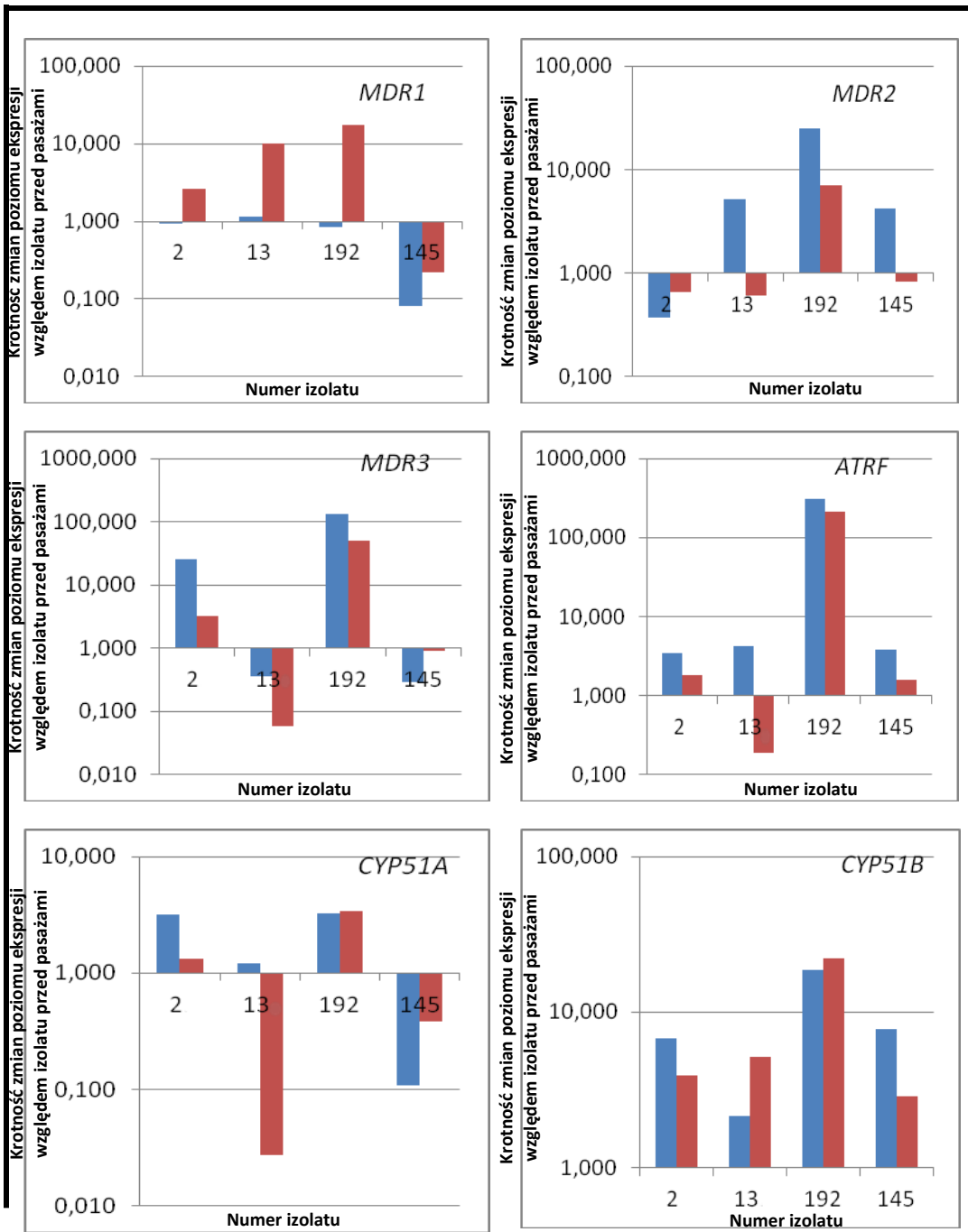
WORIKONAZOL												
ekspresja po pasażach							ekspresja po re-pasażach					
Izolat	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>
2 – W	0,932	0,375	25,452	3,399	3,211	6,772	2,584	0,658	3,259	1,781	1,329	3,883
13 – O	1,158	5,233	0,350	4,197	1,213	2,130	9,920	0,601	0,057	0,188	0,028	5,114
192 - W	0,857	24,732	132,659	311,455	3,249	18,535	17,365	7,043	49,034	215,735	3,411	22,297
145 - O	0,081	4,151	0,291	3,778	0,108	7,789	0,218	0,830	0,894	1,578	0,380	2,853

W – izolat wrażliwy na azole, bez mutacji w genie *CYP51A*

O – izolat oporny na azole, z mutacją TR<sub>34</sub>/L98H w genie *CYP51A*

Wszystkie badane izolaty *A. fumigatus* pasażowane na podłożu z dodatkiem worikonazolu charakteryzowały się znacznym wzrostem poziomu ekspresji genów *CYP51A* i *ATRF*. Poziom ekspresji genu *MDR2* wzrósł znacznie w przypadku dwóch izolatów opornych i jednego wrażliwego. Poziom ekspresji genu *MDR3* wzrósł znacząco w przypadku izolatów wrażliwych na azole a w przypadku izolatów opornych poziom ekspresji tego genu obniżył się. Poziom ekspresji genu *MDR1* w przypadku izolatów hodowanych na podłożu z dodatkiem worikonazolu znacząco obniżył się w przypadku jednego opornego izolatu a dla pozostałych nie uległ znaczącej zmianie.

W wyniku re-pasaży na podłożu bez dodatku worikonazolu poziom ekspresji genu *MDR2* i *MDR3* powraca do stanu wyjściowego (za wyjątkiem jednego opornego izolatu). Poziom ekspresji genu *MDR1* przy re-pasażach wzrósł za wyjątkiem jednego opornego izolatu.



Ryc. 32. Poziom ekspresji poszczególnych genów *A. fumigatus* pasażowanych na podłożu z dodatkiem posakonazolu i re-pasażowanych na podłożu Sabouraud

Kolorem niebieskim zaznaczono wyniki badania poziomu ekspresji poszczególnych genów po pasażach na podłożach z antymikotykami, kolorem czerwonym zaznaczono wyniki badania poziomów ekspresji po re-pasażach. W prawym górnym rogu każdego wykresu zaznaczono jakiego genu tyczą się przedstawione na nim wyniki. Izolaty odporne na działanie azoli: 13 i 145, izolaty wrażliwe na azole: 2 i 192



#### 8.5.4.4.3. Analiza zmian poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z dodatkiem itraconazolu

Wyniki zmian poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z dodatkiem wroikonazolu przedstawiono w poniższej tabeli (Tab. 49.) i na poniższym wykresie (Ryc. 33.).

Tab. 49. Zmiany poziomów ekspresji poszczególnych genów izolatów *A. fumigatus* pasażowanych na podłożu z dodatkiem itraconazolu i re-pasażowanych na podłożu Sabouraud

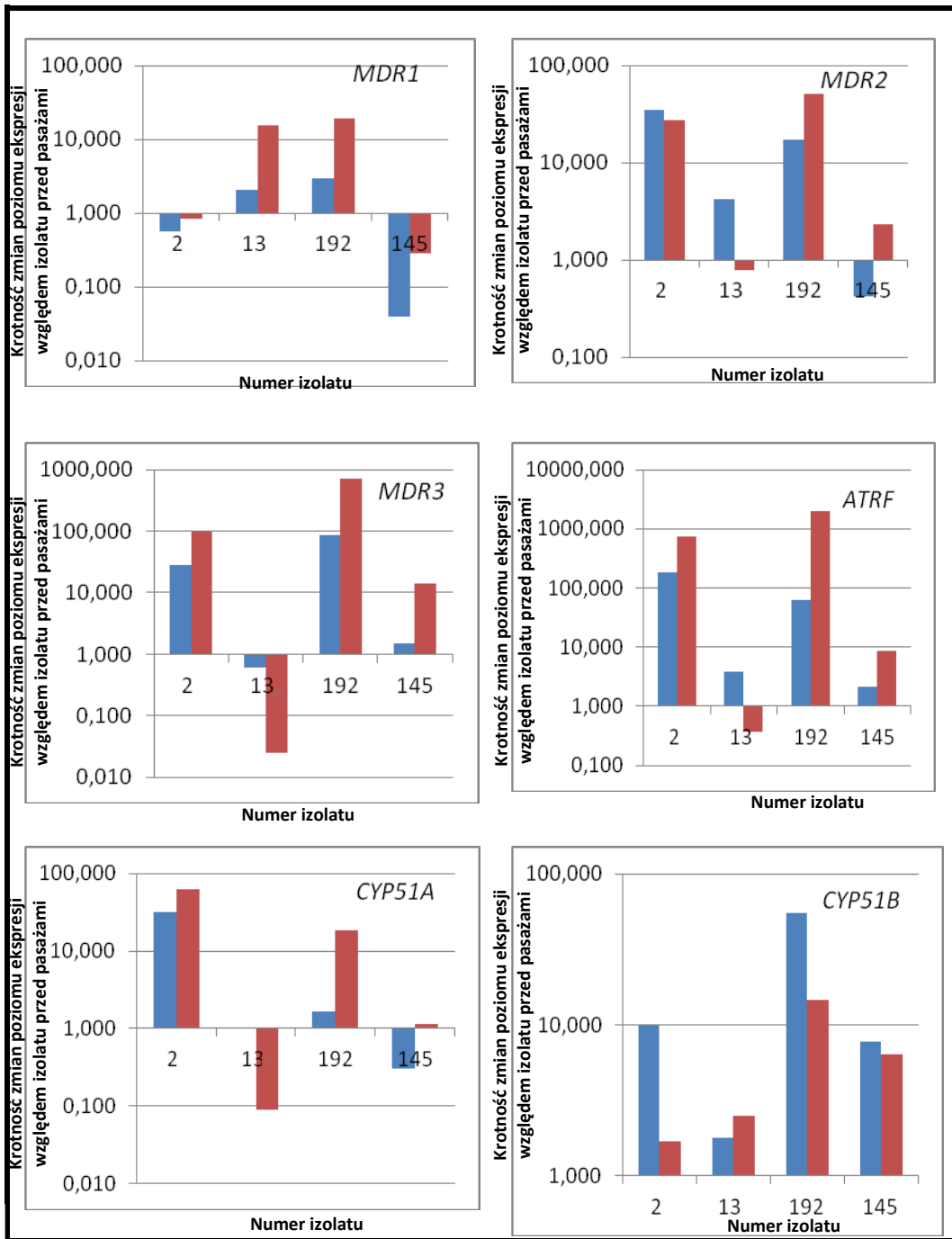
ITRAKONAZOL												
ekspresja po pasażach							ekspresja po re-pasażach					
Izolat	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>	<i>MDR1</i>	<i>MDR2</i>	<i>MDR3</i>	<i>ATRF</i>	<i>CYP51A</i>	<i>CYP51B</i>
2 - W	0,572	34,686	27,571	184,523	32,204	9,938	0,837	27,009	97,109	743,586	61,740	1,677
13 - O	2,096	4,189	0,615	3,866	1,037	1,796	15,463	0,792	0,025	0,375	0,091	2,500
192 - W	2,925	17,189	86,964	63,492	1,637	55,006	19,308	51,638	718,725	1949,132	18,663	14,554
145 - O	0,039	0,424	1,510	2,160	0,303	7,712	0,288	2,338	13,941	8,733	1,126	6,335

W – izolat wrażliwy na azole, bez mutacji w genie *CYP51A*

O – izolat oporny na azole, z mutacją TR<sub>34</sub>/L98H w genie *CYP51A*

Wszystkie badane izolaty po pasażach na podłożu z dodatkiem itraconazolu charakteryzowały się wzrostem poziomu ekspresji genu *CYP51B* i *ATRF*. Poziom ekspresji genu *MDR1* wzrasta w przypadku jednego izolatu opornego i jednego izolatu wrażliwego podczas gdy u pozostałych dwóch izolatów poziom ekspresji maleje. Poziomy ekspresji genów *MDR2* i *MDR3* znacznie wzrastają w przypadku trzech izolatów (dwóch wrażliwych i jednego opornego). Poziom ekspresji genu *CYP51A* wzrasta znacząco dla izolatów wrażliwych, a w przypadku izolatów opornych w jednym szczepie zmalał, a w drugim pozostał praktycznie niezmienny.

W wyniku re-pasaży na podłożach bez itraconazolu, poziomy ekspresji genów w większości przypadków wzrastały.



Ryc. 33. Poziom ekspresji poszczególnych genów *A. fumigatus* pasażowanych na podłożu z dodatkiem itraconazolu i re-pasażowanych na podłożu Sabouraud

Kolorem niebieskim zaznaczono wyniki badania poziomu ekspresji poszczególnych genów po pasażach na podłożach z antymikotykami, kolorem czerwonym zaznaczono wyniki badania poziomów ekspresji po re-pasażach. W prawym górnym rogu każdego wykresu zaznaczono jakiego genu tyczą się przedstawione na nim wyniki. Izolaty odporne na działanie azoli: 13 i 145, izolaty wrażliwe na azole: 2 i 192

### 8.6. Wrażliwość izolatów *A. fumigatus* na izawukonazol

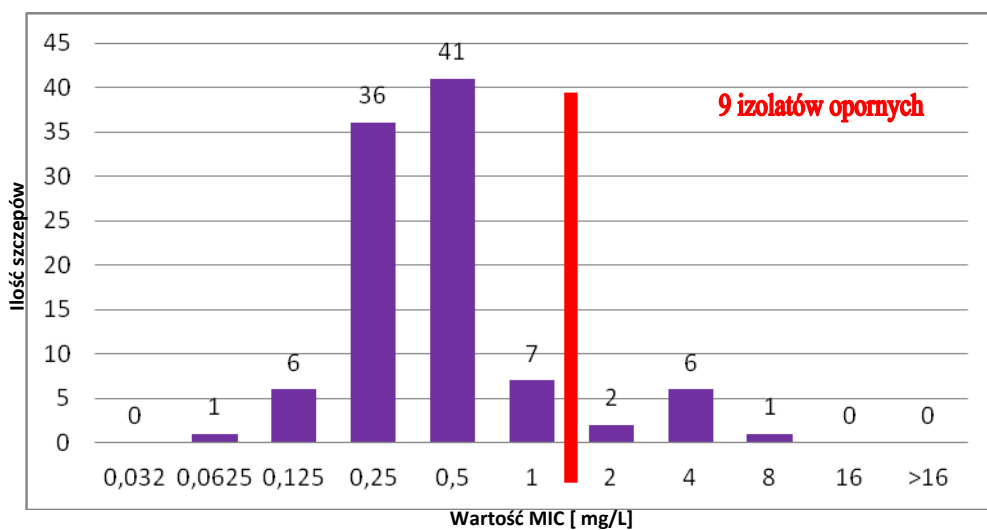
W związku z narastającą opornością izolatów *A. fumigatus* na medycznie stosowane azole (itraconazol, posakonazol i vorikonazol) poszukuje się alternatywnych związków terapeutycznych. Jednym z takich związków jest izawukonazol. Ponieważ został on dopuszczony do użycia stosunkowo niedawno, nie ma zbyt wielu danych na temat jego skuteczności. W poniższej tabeli (Tab. 50.) przedstawiono wyniki MIC dla izawukonazolu 100 izolatów *A. fumigatus*. **Czerwonym kolorem** zaznaczono wartości MIC wykazujące na oporność izolatów na izawukonazol.

Tab. 50. Wyniki oznaczania lekowrażliwości izolatów *A. fumigatus* na izawukonazol

Nr izolatu	MIC IZA [mg/L]	Uwagi
2	0,25	
3	0,5	
4-6	0,25	
12	0,25	
13	<b>4</b>	<b>Oporny na ITR, POS, WOR; TR<sub>34</sub>/L98H</b>
16	0,5	
17-19	0,25	
20	1	
21	0,25	
25-26	0,5	
27	0,25	
28-29	0,5	
31	0,125	
32	0,25	
38	0,25	
39	0,125	
40-41	0,25	
51	0,5	
52	0,25	
53	0,5	
54	0,25	
55	<b>8</b>	<b>Oporny na ITR, POS, WOR; TR<sub>34</sub>/L98H</b>
59	1	
60	0,25	
61-63	0,5	
97-99	0,25	
102	0,5	
106-107	0,5	
114-115	0,5	
116	1	
117	<b>4</b>	<b>Oporny na ITR, POS, WOR; TR<sub>34</sub>/L98H</b>
118-121	0,5	
122	0,0625	
129	<b>4</b>	<b>Oporny na ITR, POS, WOR; TR<sub>34</sub>/L98H</b>
130-132	0,5	
133	0,0125	
134	<b>4</b>	<b>Oporny na ITR i POS; TR<sub>34</sub>/L98H</b>
135	0,5	

136	0,25	
137	0,125	
138	0,25	
140	4	Wrażliwy na ITR, POS, WOR; mutacje: G393A (Gln-Gln) i G433A (Glu-Lys)
141-142	1	
143-144	0,5	
145	4	Oporny na ITR, POS, WOR; TR <sub>34</sub> /L98H
146-148	0,25	
162	0,25	
163	0,5	
164	0,25	
165-169	0,5	
170-171	1	
172-173	0,5	
174	0,25	
176	0,5	
185	0,25	
186	0,5	
187-188	2	Wrażliwy na ITR, POS, WOR; brak mutacji w CYP51A
191	0,25	
192	0,125	
193	0,25	
194	0,5	
195-196	0,25	
197	0,125	
198-199	0,5	
200-202	0,25	
203-204	0,5	

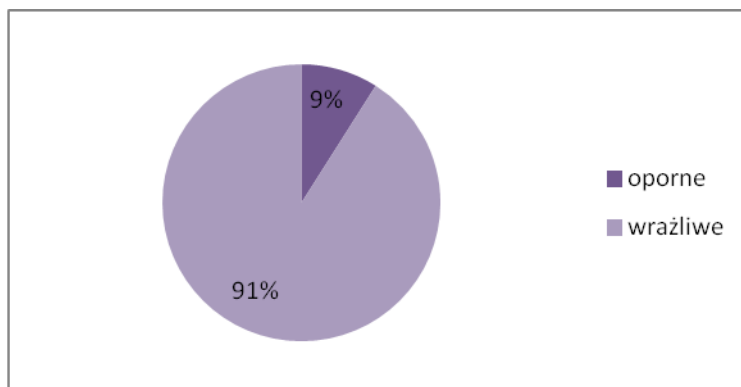
Na poniższym wykresie przedstawiono wyniki wartości MIC dla izawukonazolu (Ryc. 34.). Ilości szczepów opornych od wrażliwych oddzielono pionową, czerwoną linią.



Ryc. 34. Wykres wartości MIC dla izawukonazolu



Na poniższym wykresie kołowym przedstawiono procentowy udział izolatów opornych i wrażliwych na izawukonazol (Ryc. 35.).



Ryc. 35. Procentowy udział izolatów opornych na izawukonazol

**Część wyników z oznaczania oporności na izawukonazol izolatów *A. fumigatus* została przedstawiona w formie prezentacji na Ogólnopolska Konferencja Biotechnologów i Mikrobiologów BioMillennium: „Oporność izolatów *Aspergillus fumigatus* na izawukonazol”**

## DYSKUSJA

W ostatnich latach obserwuje się ciągły wzrost zachorowań na infekcje grzybicze powodowane przez *A. fumigatus*. Niestety, wzrasta również poziom śmiertelności w przypadku wystąpienia tego typu infekcji. Problem ten dotyczy przede wszystkim pacjentów z obniżoną odpornością, hematologicznych, po przebytych przeszczepach i leczonych kortykosteroidami [Hagiwara D, 2016; Verweij P, 2009]. Grzyby z gatunku *A. fumigatus* powodują choroby u ludzi i zwierząt, a także stanowią problemy środowiskowe: są patogenami wielu roślin uprawnych. Od wielu lat azole są lekami pierwszego rzutu w terapii grzybic powodowanych przez *A. fumigatus*. Niestety, poza stosowaniem w klinicyście są szeroko wykorzystywane w rolnictwie jako środki ochrony roślin przed grzybiczymi patogenami. Ze względu na szerokie spektrum działania wykorzystywane są także w branży budowlanej do konserwacji różnego rodzaju materiałów. Tak szerokie wykorzystywanie azoli w różnych dziedzinach prowadzi do ciągłej ekspozycji grzybów na ich działanie, co prowadzi do problemu związanych z nabywaniem przez grzyby opornością na azole [Snelder E, 2009; Berger S, 2017]. Pojawienie się oporności *A. fumigatus* na azole po raz pierwszy odnotowano w lat 70 ubiegłego stulecia. Od tego czasu przypadki oporności na azole w próbkach klinicznych odnotowano prawie w każdym europejskim kraju, w tym w Austrii [Mortensen K, 2010], Belgii [Jeurissen A, 2012; Vermeulen E, 2015; Montesinons I, 2014; Vermeulen E, 2012], Danii [Mortensen K, 2011; Zhao Y, 2013; Astvad K, 2014; Mortensen K, 2010], Francji [Dannaoui E, 2001; Bellete B, 2010; Alanio A, 2011; Burgel P, 2012; Morio F, 2012; Rocchi S, 2014; Lavargne R, 2015; Lescar J, 2014] Niemczech [Bader O, 2010; Bader O, 2015; Steinmann J, 2012; Fischer J, 2014; Rath P, 2012], Grecji [Arabatiz M, 2011] Włoszech [Prigitano A, 2014], Holandii [Camps S, 2012; Snelders E, 2008; Mellado E, 2007; Verweij P, 2007; van der Linden J, 2013; van der Linden J, 2011; Fuhren J, 2015; Snelders E, 2009; Vermeulen E, 2015; van Ingen J, 2015] Polsce [Kurzyk E, 2015; Ziółkowska G, 2014] Portugalii [Araujo R, 2007], Rumunii [Sharma C, 2015], Hiszpanii [Rodriguez-Tudela J, 2008; Diaz-Guerra T, 2003; Mellado E, 2004; Pelaez T, 2012; Mellado E, 2007; Escribano P, 2012; Escribano P, 2013; Mortensen K, 2010; Pelaez T, 2015], Szwecji [Chryssanthou E, 1997], Turcji [Ozmerdiven G, 2015] i Wielkiej Brytanii [Howard S, 2009; Howard S, 2006; Albarrag A, 2011; Bueid A, 2010].

Początkowo podejrzewano wyłącznie kliniczną drogę nabywania przez *A. fumigatus* oporności na azole. Niedawno zebrane dowody sugerują, że droga środowiskowa może być równie ważna, a nawet ważniejsza. Problem oporności *A. fumigatus* na azole stał się problemem globalnym. Mimo to, główne doniesienia na temat stanu oporności izolatów *A. fumigatus* na azole w Polsce stanowią dane uzyskane w trakcie prac nad niniejszą rozprawą [Brillowska-Dąbrowska A, 2015; Kurzyk E, 2015, Nawrot U, 2018].

W niniejszej pracy doktorskiej podjęto się sprawdzenia, czy w Polsce występuje problem rosnącej na świecie oporności izolatów *A. fumigatus* na azole oraz w przypadku



jego istnienia, określenia głównego mechanizmu molekularnego indukującego tę oporność.

W pierwszej kolejności stworzono zróżnicowaną kolekcję izolatów *A. fumigatus* pochodzących z różnych miejsc Polski (Gdańsk i okolice, Wrocław, Warszawa, Lublin, Słupsk) oraz izolowanych z różnych nisz ekologicznych (próbki od pacjentów, powietrze oddziałów szpitalnych, powietrze rejonów agroturystycznych, hodowla gęsi). W toku przeprowadzonych badań, na etapie tworzenia kolekcji natknięto się na problem z poprawną diagnostyką izolatów. W pierwszym etapie tworzenia kolekcji izolaty klasyfikowano metodami diagnostyki klasycznej, następnie potwierdzano ich przynależność za pomocą metod molekularnych. Dzięki temu, okazało się, że z **204 izolatów zaklasyfikowanych za pomocą metod klasycznych do gatunku *A. fumigatus* cztery należały do innych gatunków (w tym jeden do zupełnie innego rodzaju)**. Dwa z izolatów należały do gatunku *A. versicolor*, jeden do *A. flavus* i jeden okazał się być *Penicillium chrysogenum*. Błędna klasyfikacja tych grzybów nie wynikała z braku umiejętności i braku doświadczenia, gdyż prowadzona była przez doświadczonego w klasyfikacji grzybów diagnostę dr n. med. Urszulę Nawrot z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Błędna klasyfikacja wyniknęła z bardzo dużego podobieństwa przedstawicieli tych gatunków do siebie. To potwierdza jedynie konieczność określania przynależności gatunkowej grzybów metodami diagnostyki molekularnej, gdyż klasyfikacja klasyczna wymaga ogromnego doświadczenia, przez co obarczona jest niestety dużym błędem, co czyni ją mniej wiarygodną od metod molekularnych. Prawidłowa diagnostyka jest ważna z punktu widzenia klinicystów. *Aspergillus flavus* jest drugim najczęstszym gatunkiem z rodzaju *Aspergillus* powodującym inwazyjną aspergilozę, i jest zgłaszany jako najbardziej rozpowszechniony w krajach o suchym klimacie (np. Bliski Wschód, Afryka, Azja Południowo-Wschodnia) ponieważ jest zdolny do przetrwania w ekstremalnych warunkach [Krishnan S, 2009]. Wartości MIC amfoterycyny B i echinokandyn uzyskane dla tego gatunku są naturalnie podwyższone, ale są różne w odniesieniu do azoli. Balajee i wsp. na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* stwierdzili, że itrakonazol jest najaktywniejszym lekiem przeciw *A. flavus* [Balajee S, 2007], ale pierwsze badania opisujące inwazyjną aspergilozę spowodowaną przez *A. flavus* wykazały, iż izolat był oporny na itrakonazol i posakonazol, i że worikonazol jest najlepszą opcją terapeutyczną [Ozhak-Baysan B, 2010]. Oporność izolatów *A. flavus* na worikonazol została jednak odnotowana w innych klinicznych szczepach w badaniach prowadzonych przez Liu i wsp. oraz Paul i wsp. [Liu W, 2012; Paul R, 2015].

W pracy podjęto się także oznaczenia oporności 200 izolatów *A. fumigatus* na klinicznie stosowane azole: worikonazol, posakonazol i itrakonazol. W toku przeprowadzonych badań mających na celu oznaczenie lekowrażliwości izolatów *A. fumigatus* zaobserwowano, iż w Polsce istnieje problem oporności na azole. **Z 200 przebadanych izolatów *A. fumigatus* na worikonazol opornych było 2% (4 izolaty), na posakonazol 3% (6 izolatów) a na itrakonazol 8% (17 izolatów)**

**izolatów zebranych w kolekcję.** Problem oporności dotyczy zarówno szczepów klinicznych (5 ze 140 klinicznych izolatów – 3,6%), weterynaryjnych (11 z 14 weterynaryjnych izolatów – 78,6%) jak i środowiskowych (jeden z 46 izolatów środowiskowych – 2,17%). **Wśród badanych izolatów zaobserwowano cztery (2%) odporne na wszystkie trzy badane azole** (dwa kliniczne z Wrocławia: 13 i 55, jeden kliniczny z Warszawy: 129 oraz jeden środowiskowy z Nadola: 145). **Dwa izolaty (1%) charakteryzowały się opornością na itraconazol i posakonazol** (oba kliniczne z Warszawy). **Jedenaście izolatów charakteryzowało się opornością wyłącznie na itraconazol** (5%) i były to izolaty weterynaryjne wyizolowane z hodowli gęsi. W toku badań własnych nie zaobserwowano izolatów opornych na posakonazol i/lub worikonazol, niebędących opornymi na itraconazol.

Jedno z pierwszych badań dotyczących oporności krzyżowej na azole izolatów *A. fumigatus* przeprowadzono na 17 klinicznych izolatach, które były odporne na itraconazol. Szczepy te wykazywały oporność krzyżową między itraconazolem i posakonazolem, ale nie worikonazolem. Wynika to zapewne z podobieństwa struktury posakonazolu i itraconazolu [Mosquera J, 2002; Xiao L, 2004]. Oporność krzyżową między azolami *A. fumigatus* badali także Howard i wsp. wykazując, że 74% badanych izolatów opornych na itraconazol było również opornych na posakonazol i 65% oporna na worikonazol [Howard S, 2009]. W niniejszej rozprawie doktorskiej z 17 opornych izolatów *A. fumigatus* wszystkie charakteryzowały się opornością na itraconazol, sześć opornością na posakonazol (35,3% wszystkich opornych izolatów) i cztery opornością na worikonazol (23,5% wszystkich opornych). Warto zaznaczyć, że w niniejszej pracy badawczej **64,7% opornych na azole izolatów *A. fumigatus* charakteryzowało się opornością wyłącznie na itraconazol, czyli zaledwie 35,3% badanych izolatów charakteryzowało się opornością krzyżową.** Warto jednak zaznaczyć, że izolaty odporne wyłącznie na itraconazol to izolaty weterynaryjne a nie kliniczne, których oporność nie wynikała z mutacji w genie *CYP51A*, a prawdopodobnie z ekspozycji na azole stosowane w rolnictwie. **Wśród opornych na azole izolatów klinicznych - badanych w niniejszej rozprawie (5 izolatów) - wszystkie charakteryzują się opornością krzyżową** (trzy izolaty odporne na itraconazol, posakonazol i worikonazol oraz dwa izolaty odporne na itraconazol i posakonazol). Prigitano i wsp. wykazali, że we Włoszech istnieje problem oporności na azole środowiskowych izolatów *A. fumigatus*. Przeprowadzone przez nich badania wykazały, że odsetek środowiskowych izolatów *A. fumigatus* opornych na azole jest zdecydowanie wyższy niż przedstawiony w niniejszej pracy (2,17%) i wynosi 16%. Izolaty te charakteryzowały się opornością na itraconazol i posakonazol i wrażliwością na worikonazol [Prigitano A, 2014].

Odnosząc dane uzyskane w wyniku prac własnych nad niniejszą rozprawą do danych literaturowych, można zaobserwować, że w Polsce problem oporności na azole zarówno wśród środowiskowych i klinicznych izolatów *A. fumigatus* nie jest tak dramatyczny jak w niektórych krajach Europy, aczkolwiek należy wziąć pod uwagę ilość przebadanych izolatów środowiskowych. W Wielkiej Brytanii procent opornych izolatów wynosi ponad 27%, w Holandii ponad 24%, w Niemczech ponad 29%. We Francji podobnie jak w Polsce częstość występowania opornych izolatów *A. fumigatus* wynosi 8% [Goncalves S, 2016]. Warto jednak zaznaczyć, że wyniki uzyskane w niniejszej





rozprawie przedstawiają dane uzyskane w wyniku badania przede wszystkim próbek pochodzących z dwóch szpitali (Wrocław i Warszawa) i nie odzwierciedlają rzeczywistej sytuacji środowiskowej w Polsce.

Raporty badań dotyczące oporności izolatów *A. fumigatus* na azole w krajach azjatyckich sugerują, że wskaźnik oporności w Azji jest niższy niż w Europie [Rivro-Menendez O, 2016]. Pierwsze informacje na temat oporności na azole z krajów azjatyckich dotyczą klinicznych izolatów z Tajwanu, gdzie stwierdzono, że oporność na azole wynosi 5% (dwa izolaty z 40 badanych) [Hsueh P, 2005]. Od tego czasu zgłoszono kilka innych przypadków. Również w Tajwanie zaobserwowano oporność na triazole wśród klinicznych izolatów *A. fumigatus* warunkowaną mutacją TR<sub>34</sub>L98H. Odsetek szczepów opornych, wyizolowanych od pacjentów nie leczonych wcześniej azolami wynosi 7,9% [Wu C, 2015]. Badania prowadzone w Chinach przez Zhang i wsp. również wykazały obecność klinicznych izolatów *A. fumigatus* opornych na azole. W toku badań przeanalizowano 126 izolatów, pochodzących od 126 pacjentów i zaobserwowano, że 3,17% było opornych na itraconazol (4 izolaty) a jeden z nich był dodatkowo oporny na posakonazol i vorikonazol. Dodatkowo wykazano, że dwa z czterech opornych izolatów charakteryzowały się mutacją TR<sub>34</sub>L98H w genie *CYP51A*; jeden charakteryzował się mutacją M220I, a u czwartego izolatu nie zaobserwowano mutacji w genie *CYP51A* [Zhang M, 2017].

W związku z tym, że oporność izolatów *A. fumigatus* na azole bardzo często powodowana jest mutacjami w genie *CYP51A*, kolejnym etapem pracy nad niniejszą rozprawą doktorską była analiza sekwencji genu *CYP51A* izolatów *A. fumigatus*. Według doniesień literaturowych, mutacje w genie *CYP51A* są najczęstszym obserwowanym mechanizmem oporności na azole izolatów *A. fumigatus* [Chowdhary A, 2014]. **Badaniach własnych przeprowadzono analizę sekwencji genu *CYP51A* 200 izolatów i zaobserwowano, iż u 6 z nich występuje mutacja zamiany tyminy na adeninę T293A skutkująca zamianą leucyny na histydynę L98H. Izolaty charakteryzujące się tą mutacją były odporne na wszystkie badane azole lub odporne krzyżowo na itraconazol i posakonazol.** Mutacja ta występowała u pięciu izolatów klinicznych (izolaty o numerach: 13, 55, 117, 129 i 134) oraz u jednego izolatu środowiskowego (izolat nr 145). Co ciekawe, nie zaobserwowano jej w przypadku izolatów wyizolowanych od gęsi - opornych wyłącznie na itraconazol. **Dodatkowo, zaobserwowano również występowanie innych mutacje w genie *CYP51A*, pozostających jednak bez wpływu na oporność izolatów na badane antymikotyki: A81C, A217T, T229G, G247T, G313A, G333C, G393A, G423A, G433A, T441G, T667G, C672T, G713A, T744A, G777C, G784T, G885T, G905A, T912G.** Warto zauważyć, że w przypadku dziewięciu z 14 weterynaryjnych izolatów występowały różne mutacje punktowe w genie *CYP51A*, jednak nie udało się skorelować ich z tak szeroko występującą u tych szczepów opornością na itraconazol. Wyniki te wskazują na to, że izolaty te charakteryzują się prawdopodobnie innym mechanizmem oporności niż mutacja w genie *CYP51A*.

W toku badań nad niniejszą rozprawą doktorską sprawdzono także występowanie tandemowych powtórzeń w rejonie promotora genu *CYP51A* (TR<sub>34</sub>). Powtórzenia te działają jako wzmacniacze transkrypcji i według literatury często korelowane są z występowaniem mutacji L98H. **Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy wskazują, że wszystkie sześć izolatów *A. fumigatus* charakteryzujących się występowaniem mutacji L98H posiadają również powtórzenia tandemowe w rejonie promotora genu *CYP51A*.** Związek między występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H a opornością na azole jest dobrze udokumentowany [Diaz-Guerra T, 2003; Howard S, 2011; Mellado E, 2007; Snelders E, 2011]. Częstość występowania oporności na azole w Europejskich ośrodkach zdrowia wynosi 3,2% [van der Linden J, 2015]. Warto pamiętać o tym, że wartość ta może być znacznie zaniżona w skutek braku rutynowego oznaczania oporności izolatów *A. fumigatus*. **W badaniach własnych wykazano, że odsetek klinicznych izolatów, charakteryzujących się mutacją TR<sub>34</sub>L98H jest minimalnie wyższy niż w europejskich ośrodkach zdrowia i wynosi niespełna 3,6% (5 ze 140 izolatów).** Badania prowadzone w 18 ośrodkach w Europie Zachodniej wykazały iż 48,9% opornych izolatów charakteryzuje się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H [van der Linden J, 2015]. Odnosząc te dane do wyników badań własnych uzyskanych w niniejszej pracy zaobserwowano, iż w Polsce wśród badanych izolatów ten odsetek jest niższy i wynosi 35,3% (17 izolatów opornych na azole w tym 6 charakteryzujących się mutacją TR<sub>34</sub>L98H). W literaturze opisywany jest również inny - podobny do TR<sub>34</sub>L98H - mechanizm oporności na azole. Jest on związany z mutacją TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A [van der Linden J, 2013] w genie *CYP51A* i jest on coraz częściej spotykany [Ingen J, 2015; Vermeulen E, 2013; Steinmann J, 2012; Fischer J, 2014; Astvad K, 2014; Fuhren J, 2015; Vermeulen E, 2015; Vasquez J, 2016; Lavergne R, 2015; Montesions I, 2014]. W toku badań nad przedstawioną rozprawą nie zaobserwowano jego występowania wśród polskich izolatów. W Niemczech analiza 455 środowiskowych izolatów *A. fumigatus* wykazała 45 charakteryzujących się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H (10%) i sześć charakteryzujących się występowaniem mutacji TR<sub>46</sub>Y121F/T289A (1,32%) [Bader O, 2015]. W Holandii od 82% do 89% przypadków opornych na azole izolatów *A. fumigatus* wynikało z obecności jednej z dwóch mutacji w genie *CYP51A*: TR<sub>34</sub>L98H i TR<sub>46</sub>Y121F/T289A podczas gdy w przypadku Belgii było to 64% a w Turcji 87% przypadków [Verweij P, 2015; Vermeulen E, 2015; Ozmerdiven G, 2015].

W Pakistanie w przypadku trzech na 14 opornych na azole klinicznych izolatów *A. fumigatus* stwierdzono mechanizm oparty o mutację TR<sub>34</sub>L98H [Perveen I, 2016]. Co ciekawe, oporność na azole wywołana mutacją TR<sub>34</sub>L98H nie została opisana w Japonii, choć odnotowano tam występowanie oporności. Kikuchi i wsp. zaobserwowali trzy odporne na azole izolaty ze 171 (1,75%) klinicznych szczepów *A. fumigatus* wyizolowanych w latach 1987-2008 [Kikuchi K, 2014]. W Japonii odnotowano mechanizmy oporności oparte o mutacje w genie *CYP51A*: G448S i TR<sub>46</sub>Y121FT289A [Toyotome T, 2016; Hagiwara D, 2016]. Częstość występowania opornych na azole izolatów *A. fumigatus* jest niewielka także w Indiach. Dane literaturowe podają, że oporność oznaczana była w trzech szpitalach i oparta była o mechanizm TR<sub>34</sub>L98H.

Mutacja ta obserwowana była w 44 izolatach z 630 (6,9%); wśród dwóch na 103 (1,9%) oraz wśród 10 na 685 (1,5%) [Chowdhary A, 2012; Chowdhary A, 2015; Chowdhary A, 2012]. Podobne wyniki zaobserwowano w krajach Bliskiego Wschodu, takich jak Iran, gdzie odsetek opornych, klinicznych izolatów wynosi 3,5% [Mohammadi F, 2015]. W Kuwejcie zaobserwowano dwa izolaty odporne z 16 izolatów klinicznych (12,5%) i jeden z 50 izolatów środowiskowych (2%) [Ahmad S, 2015].

Oporność na azole wśród środowiskowych izolatów *A. fumigatus* występujących w Azji jest również niższa niż w Europie. Niedawne doniesienie na temat stosowania azolowych fungicydów na farmie dyni nie wykazało oporności na azole (przebadano 50 izolatów *A. fumigatus*) [Kano R, 2015]. W Indiach odnotowano występowanie mechanizmu oporności na azole związanego z występowaniem mutacji TR<sub>46</sub>Y121F/T289A wśród kilku środowiskowych izolatów wyizolowanych z pól uprawnych [Chowdhary A, 2014]. Zaobserwowano także mechanizm związany z mutacją TR<sub>34</sub>L98H występujący u 44 z 630 izolatów (6,98%) *A. fumigatus* pobranych z gleby pól ryżowych, upraw herbaty, ogrodów, plantacji drzew bawełny i powietrza oddziałów szpitalnych [Chowdhary A, 2012]. Oporność środowiskowych izolatów *A. fumigatus* na azole, spowodowana mutacją TR<sub>34</sub>L98H zaobserwowano także w Iranie i Kuwejcie. Odsetek środowiskowych izolatów *A. fumigatus* w Iranie wynosi 12,2% [Badali H, 2012], a w Kuwejcie 7% [Ahmad S, 2014].

Badania na temat oporności izolatów *A. fumigatus* na azole prowadzone są również w USA. Ostatnie kompleksowe badanie w USA obejmowało 220 klinicznych izolatów *A. fumigatus* izolowanych w latach 2001-2014. Zaobserwowano 26 izolatów opornych na azole (11,82%): dwa charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L89H; dwa charakteryzujące się mutacją TR<sub>46</sub>Y121F/T289A; zaobserwowano także inne mutacje punktowe w genie *CYP51A* u opornych izolatów: G54R/W/E M220I/K/V, G138S/C, G448S i F219S [Wiederhold N, 2016]. Zgodnie z wiedzą autorki niniejszej pracy, do tej pory nie zaobserwowano oporności na azole wśród środowiskowych izolatów *A. fumigatus* w USA.

Badania dotyczące oporności na azole izolatów *A. fumigatus* w krajach Ameryki Południowej wskazują na sporadyczne występowanie oporności. W Brazylii odnotowano sześć izolatów opornych z 170 klinicznych (3,53%) zebranych w latach 2000-2012 ale nie zaobserwowano mechanizmu oporności spowodowanego mutacją TR<sub>34</sub>L98H ani TR<sub>46</sub>Y121F/T289A w genie *CYP51A* [Lockhart S, 2015].

Oporność na azole wśród środowiskowych izolatów *A. fumigatus* odnotowano także w Afryce. W trakcie badań, w Tanzanii wyizolowano 15 opornych na azole ze 108 (10,19%) środowiskowych izolatów *A. fumigatus*. 11 z nich charakteryzowało się mutacją TR<sub>34</sub>L98H, a cztery charakteryzowało się mutacją TR<sub>46</sub>Y121F/T289A [Chowdhary A, 2014]. Inne badania, również dotyczące Tanzanii wykazały, że mutacja G54E w genie *CYP51A* była odpowiedzialna za oporność na azole aż 46,4% środowiskowych izolatów *A. fumigatus* z tego kraju [Sharma C, 2015]. Według wiedzy autorki niniejszej pracy do tej pory w Afryce nie opublikowano jeszcze żadnych raportów dotyczących oporności na azole izolatów klinicznych.

W Australii w latach 2000-2013 zebrano kolekcję 418 szczepów *A. fumigatus*. Dziewięć spośród nich charakteryzowało się obniżoną podatnością na itraconazol, posakonazol i vorikonazol, wszystkie zawierały od dwóch do pięciu substytucji aminokwasowych, w tym: G54R, F46Y, Y431S, G448S, M172V, N248T, D255E, E427K; mutację TR<sub>34</sub>L98H zidentyfikowano jedynie u dwóch izolatów. Pierwszy z nich został wyizolowany w 2004 roku od pacjenta długotrwale leczonego itraconazolem. Drugi izolat pochodzi od pacjenta, który w 2012 roku podróżował do Europy i prawdopodobnie właśnie tam zainfekował się izolatem z mutacją TR<sub>34</sub>L98H [Kidd S, 2015].

W niniejszej pracy podjęto się także ustalenia, czy obecność posakonazolu, itraconazolu i vorikonazolu w medium hodowlanym grzybów może wpłynąć na indukcję oporności na azole u grzyby z gatunku *A. fumigatus*. Eksperyment ten składał się z dwóch głównych etapów. Pierwszy etap zakładał jednorazową hodowlę 38 izolatów na dwóch różnych stężeniach posakonazolu / itraconazolu bądź vorikonazolu oraz na podłożu bez dodatku azoli w celu kontroli. Drugi etap zakładał długotrwałe pasażowanie izolatów na podłożach z niskim stężeniem posakonazolu / vorikonazolu bądź itraconazolu (20 pasaży na podłożach Sabouraud + posakonazol / vorikonazol / itraconazol, oraz 20 pasaży na podłożu Sabouraud bez antymikotyków jako kontrolę), następnie re-pasażowanie tych izolatów na podłożach bez dodatku azoli (pięć pasaży na podłożu Sabouraud). **Podejście to jest podejściem innowacyjnym a wiąże się z ideą, że w środowisku naturalnym grzyby z gatunku *A. fumigatus* są narażone na długotrwałą ekspozycję na związki azolowe.**

W części teoretycznej niniejszej pracy przedstawiono informację, że rozprzestrzenianie się oporności na azole jedynie drogą kliniczną jest wysoce nieprawdopodobne. **Opierając się na wynikach uzyskanych w badaniach własnych, trzeba przyznać, że presja środowiskowa związana z obecnością medycznie stosowanych azoli w medium hodowlanym wymusza na *A. fumigatus* nabywanie oporności.** Można również zasugerować, iż ciągła i silna presja azoli stosowanych w rolnictwie może być przyczyną nabywania oporności na azole drogą środowiskową. W trakcie badań własnych, podczas etapu pozyskiwania próbek do kolekcji, zaobserwowano **występowanie opornych na azole izolatów typowo środowiskowych** (izolat nr 145 pochodzi z próbki powietrza pobranej z agroturystycznych obszarów okolic Gdańska – ze wsi Nadole charakteryzujący się mutacją TR<sub>34</sub>L98H). W tym miejscu należy ponownie podkreślić, że azole są jedną grupą związków chemicznych, stosowanych zarówno w medycynie jak i ochronie środowiska przed patogenami. Niestety w związku z powyższym ryzyko nabywania przez *A. fumigatus* oporności na azole w środowisku naturalnym jest ogromne.

W toku prowadzonych badań zaobserwowano, że podczas pasaży izolatów na podłożach z dodatkiem antymikotyków badane izolaty nie miały problemów ze wzrostem i wytwarzały dużo więcej zarodników niż te same izolaty pasażowane na podłożu bez antymikotyków. Ta obserwacja może potwierdzać stwierdzenie, że przeżycie opornych grzybów nie byłoby możliwe, gdyby nabyte mutacje odbywały

się kosztem innych procesów życiowych [Valsecchi I, 2015]. Dlatego uzasadnione byłoby zaprzestanie stosowania azoli do celów innych niż medyczne. Trudno jednak wyobrazić sobie, że możliwe jest całkowite zaprzestanie używania azoli w rolnictwie. **W trakcie pasażu izolatów na podłożach z dodatkiem azoli zaobserwowano także zmiany w morfologii kolonii grzybów. Co ciekawe, obserwacja ta nie została do tej pory odnotowana w literaturze.** Izolaty *A. fumigatus* hodowane na podłożach z dodatkiem itrakonazolu i posakonazolu charakteryzowały się kremowym kolorem grzybni, zaś izolaty hodowane na podłożu z worikonazolem rosły w sposób klasyczny. Obecność w podłożu posakonazolu w kolejnych pasażach powodowała kolejne zmiany zabarwienia grzybni. Warty uwagi jest również fakt, że w skutek długotrwałej ekspozycji na azole, kolor kolonii grzybów po kilku pasażach ostatecznie powraca do klasycznego. Wskazuje to na jakiś rodzaj adaptacji do warunków otaczającego grzyby środowiska.

W toku badań 38 izolatów *A. fumigatus* hodowano na podłożach o wyższym i niższym stężeniu posakonazolu, itrakonazolu i worikonazolu oraz na podłożu Sabouraud jako kontroli. Po pierwszym pasażu na powyższych podłożach ponownie wyznaczono wartości MIC dla posakonazolu itrakonazolu i worikonazolu. **Wartości MIC badanych związków dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu z dodatkiem poszczególnych azoli były identyczne jak wartości MIC przed pasażami.** Dla tych samych izolatów oznaczono poziomy ekspresji genów *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF*, *CYP51A*, *CYP51B* i zaobserwowano zmiany w poziomach ich ekspresji.

Mimo że mutacje w genie *CYP51A* są głównym mechanizmem oporności na związki azolowe, ważną rolę odgrywają również pompy błonowe ABC i MFS. Pompy te są niezbędne u organizmów eukariotycznych do usuwania toksyn z komórki [Jasiński M, 2003]. Dlatego nadekspresja genów odpowiedzialnych za wytwarzanie pomp błonowych może prowadzić do lepszego wypompowywania antymikotyków z wnętrza komórki grzybów na zewnątrz, a tym samym oporności na azole. W toku badań nad wpływem azoli w medium hodowlanym na grzyby z gatunku *A. fumigatus* wyznaczono wartości MIC po hodowli izolatów na podłożach z antymikotykami.

Dodatkowo w związku z tym, że istnieje mało doniesień na temat oporności na azole w skutek nadekspresji genów *A. fumigatus* postanowiono przyjrzeć się poziomom ekspresji genów kodujących pompy błonowe (*MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF*). Ponieważ mechanizm oporności na azole oparty o mutacje w genie *CYP51A* jest stosunkowo dobrze poznany, a mało wiadomo o zmianach w jego ekspresji [Paul S, 2016] postanowiono sprawdzić ekspresję genów *CYP51A* i *CYP51B*. W związku z tym, w badaniach własnych po pierwszym pasażu na podłożach zawierających różne stężenia posakonazolu / itrakonazolu bądź worikonazolu izolaty charakteryzowały się wartościami MIC identycznymi jak przed pasażem. Zaobserwowano jednak zmiany w poziomach ekspresji genów *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *MDR4*, *CYP51A*, *CYP51B* i *ATRF*. U grzybów z gatunku *A. fumigatus* pomimo dużej liczby istniejących genów kodujących transportery błonowe, niewiele wiadomo na temat ich związku z opornością na triazole. Do tej pory udało się potwierdzić udział tylko pięciu genów z opornością na azole: *MDR1*, *MDR2*,

*MDR3*, *MDR4* i *ATRF* [Rivero-Menendez O, 2016]. W badaniach własnych poziomy ekspresji wyznaczane były metodą Pfaffla, która zakłada porównanie ekspresji badanego genu w próbce badanej (po pasażach na podłożu z antymikotykami) w stosunku do próbki wyjściowej (ten sam izolat przed pasażami). **W toku badań zaobserwowano, iż azole powodują zmiany w poziomach ekspresji wszystkich badanych genów.** Na wzrost ekspresji genu *CYP51A* największy wpływ miał worikonazol, którego obecność w podłożu powodowała wzrost ekspresji tego genu u niespełna 40% izolatów, zaś spadek u 29%. Posakonazol powodował wzrost ekspresji u 34% izolatów a spadek u 30% a itraconazol wpływał najmniej na poziom ekspresji genu *CYP51A* bo wzrostem ekspresji charakteryzowało się 29% izolatów a spadek u 22%. Na wzrost poziomu ekspresji genu *CYP51B* największy wpływ również miał worikonazol, który spowodował wzrost ekspresji u 37% izolatów a spadek u 29%. Itraconazol spowodował wzrost ekspresji genu *CYP51B* u 33% a spadek u 21% izolatów zaś posakonazol spowodował wzrost u 22% a spadek u 39% izolatów. Na zmiany w ekspresji genu *MDR1* największy wpływ miał posakonazol Spowodował on wzrost ekspresji tego genu u 33% oraz spadek ekspresji u 42% izolatów. Itraconazol spowodował wzrost poziomów ekspresji tego genu u 41% izolatów zaś spadek u 26%. Worikonazol skutkował wzrostem poziomów ekspresji u 33% i spadkiem u 31% izolatów. Największy wpływ na zmiany ekspresji genu *MDR2* miał worikonazol, który spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 45% izolatów, zaś wzrost u 30%. Posakonazol spowodował spadek poziomu ekspresji tego genu u 37% izolatów a wzrost u 30%. Itraconazol spowodował wzrost poziomu ekspresji genu *MDR2* u 40% izolatów, zaś spadek u 20%. Na zmiany poziomów ekspresji genu *MDR3* największy wpływ miał itraconazol. Spowodował on wzrost poziomu ekspresji genu u 41% izolatów, zaś spadek u 37% izolatów. Posakonazol i worikonazol powodowały podobne zmiany w poziomach ekspresji: spadek poziomu ekspresji u (kolejno) 39% i 37%, oraz wzrostu u (kolejno) 33% i 34%. Na zmiany poziomów ekspresji genu *ATRF* największy wpływ miał posakonazol, który spowodował spadek poziomu ekspresji u 45% i wzrost u 30%. Worikonazol powodował wzrost poziomu ekspresji tego genu u 37% izolatów, zaś spadek u 29%. Itraconazol w najmniejszym stopniu wpłynął na zmiany w poziomach ekspresji genu *ATRF*. Spowodował 30% spadek i 30% wzrost poziomów ekspresji tego genu. **Analiza statystyczna pozwoliła wyciągnąć wnioski, że obecność w podłożu itraconazolu lub worikonazolu powoduje znaczący wzrost ekspresji wszystkich badanych genów izolatów *A. fumigatus* bez względu na obecność bądź brak mutacji w genie *CYP51A*. Obecność w podłożu posakonazolu powoduje wzrost poziomu ekspresji wszystkich badanych genów izolatów bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H (bez względu na to, czy występują inne mutacje czy sekwencja genu jest typu dzikiego) natomiast w przypadku izolatów charakteryzujących się mutacją TR<sub>34</sub>L98H powoduje spadek poziomu ekspresji genów *CYP51B*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF* oraz nie powoduje istotnych zmian w poziomie ekspresji genów *CYP51A* i *MDR1*.**

Analizując zmiany poziomów ekspresji poszczególnych genów po pasażach izolatów na podłożach z dodatkiem antymikotyków porównano także różnice w ich poziomach pomiędzy izolatami. W tym celu posłużono się metodą komparatywną, która umożliwia porównywanie izolatów między sobą. Dzięki zastosowaniu tej metody,



udało się wyciągnąć wnioski, że **średnie poziomy ekspresji wszystkich badanych w tej pracy genów (*MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF*, *CYP51A*, *CYP51B*) były wyższe u izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud bez dodatku antymikotyków, charakteryzujących się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H niż u izolatów bez tej mutacji**. Podobne wyniki dla ekspresji genu *CYP51A* zaobserwowane zostały przez Zhang i wsp. [Zhang J, 2017]. Zaobserwowano, że izolaty *A. fumigatus* charakteryzujące się występowaniem mutacji TR<sub>46</sub><sup>3</sup>/Y121F/M172I/T289A/G448S miały znacząco wyższe poziomy ekspresji genu *CYP51A* niż izolaty typu dzikiego. **Po statystycznej analizie uzyskanych wyników zaobserwowano, że poziom ekspresji genu *CYP51A* izolatów *A. fumigatus* charakteryzujących się brakiem mutacji TR<sub>34</sub>L98H, opornych wyłącznie na itraconazol (izolaty gęsie) był wyższy niż w przypadku izolatów wrażliwych na wszystkie badane azole. Na podstawie uzyskanych wyników, można wysnuć hipotezę, że oporność na itraconazol występująca u tych izolatów jest warunkowana nadekspresją genu *CYP51A***. Lelievre i wsp. zaobserwowali w badaniach, że poziom ekspresji genu *CYP51A* wskutek obecności mutacji TR<sub>34</sub>L98H jest do ośmiu razy wyższy niż w grupie izolatów bez tej mutacji [Lelievre L, 2013]. W wyniku badań własnych zaobserwowano, że poziom ekspresji tego genu był wyższy ponad 4,5- krotnie od poziomu ekspresji izolatów bez mutacji. Maksymalny wzrost ekspresji genu *CYP51A* jaki zaobserwowano w wyniku badań nad niniejszą rozprawą u izolatu z mutacją był ponad 9-krotny.

Analizując zmiany w poziomach ekspresji poszczególnych genów izolatów *A. fumigatus* pasażowanych na różnych stężeniach posakonazolu, itraconazolu i worikonazolu zaobserwowano, że **poziomy ekspresji genów *ATRF*, *CYP51A*, *CYP51B*, *MDR1*, *MDR2*, *MDR3* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H i bez tej mutacji zmieniają się i nie ma statystycznie istotnych różnic pomiędzy wyższym i niższym stężeniem badanych azoli. Poziom ekspresji wszystkich badanych genów izolatów *A. fumigatus* bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H wzrasta po hodowli na podłożu z dodatkiem posakonazolu zaś poziom ekspresji wszystkich badanych genów izolatów *A. fumigatus* charakteryzujących się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>L98H po hodowli na podłożach z dodatkiem posakonazolu maleje**.

Obecność w medium hodowlanym itraconazolu powoduje istotny wzrost poziomu ekspresji genu *CYP51A* i *MDR3*. Istotny statystycznie był również wzrost poziomu ekspresji genu *CYP51B*, *MDR1*, *MDR2* i *ATRF* izolatów bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H, a także spadek ekspresji tych genów izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H po hodowli na podłożach z dodatkiem itraconazolu.

Obecność w medium hodowlanym worikonazolu powoduje istotne zmiany ekspresji wszystkich badanych genów za wyjątkiem *MDR3*. Worikonazol wpływa na wzrost poziomu ekspresji genów *MDR1*, *MDR2*, *ATRF* izolatów charakteryzujących się brakiem występowania mutacji TR<sub>34</sub>L98H a także istotnym obniżeniem poziomu ekspresji genów *CYP51A*, *CYP51B*, *MDR2*, *ATRF* izolatów z mutacją TR<sub>34</sub>L98H.



W związku z tym, że po hodowli izolatów na podłożach z antymikotykami zaobserwowano zmiany w poziomach ekspresji badanych genów, a nie zaobserwowano zmian w wartościach MIC postanowiono wystawić 38 wybranych izolatów na długotrwałe działanie azoli. **Po 20 pasażach na podłożach zawierających niskie stężenie itraconazolu / posakonazolu bądź vorikonazolu wyznaczono wartości MIC dla posakonazolu, vorikonazolu i itraconazolu.** Dodatkowo izolaty te hodowano równolegle na podłożu Sabouraud bez dodatku azoli – w celu kontroli. Wyniki uzyskane w trakcie pracy nad niniejszą rozprawą pośrednio potwierdzają hipotezę indukcji oporności na azole poprzez podwyższony poziom ekspresji genów w skutek obecności azoli w środowisku [Snelders E, 2009; Snelders E, 2012; Stensvold C, 2012; Verweij P, 2009].

**Wartości MIC badanych związków dla izolatów hodowanych na podłożach z antymikotykami wskazywały na nabycie przez nie oporności krzyżowej na wszystkie badane azole.** Wartości MIC badanych azoli dla większości badanych izolatów wynosiły >8 mg/L dla itraconazolu i posakonazolu i >16mg/L dla vorikonazolu bez względu na jakim związku były hodowane izolaty. **Co ciekawe równoczesne pasażę izolatów na podłożu bez antymikotyków pozwoliły zaobserwować zmniejszenie wartości MIC dla itraconazolu u 17 izolatów** (w tym pięciu klinicznych i 12 weterynaryjnych). W związku z tym, **wszystkie weterynaryjne izolaty, które charakteryzowały się opornością jedynie na itraconazol utraciły tą oporność.** Badania na temat wpływu ekspozycji izolatów *A. fumigatus* na itraconazol prowadzone były przez Escribano i wsp. [Escribano P, 2011]. W toku badań pasażowali oni izolaty *A. fumigatus* na podłożach z dodatkiem itraconazolu. Co pasaż zwiększali stężenie itraconazolu w podłożu (zaczynając od stężenia 0,5 mg/L a kończąc na stężeniu 16 mg/L). Zaobserwowali, że większość izolatów jest w stanie rosnąć na podłożu o stężeniu itraconazolu 2 mg/L (19 izolatów na 20). W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej przy takim stężeniu rosły wszystkie badane izolaty (38 izolatów). Przy kolejnych pasażach obserwowali oni, że wyrasta coraz mniej izolatów (przy stężeniu 2 mg/L – 95%; przy 4 mg/L - 75%; przy 8 mg/L – 70% a przy 16 mg/L – 50%). Izolaty pasażowane były łącznie sześć razy. Po ostatnim pasażu wyznaczono wartości MIC. Tak jak w niniejszej pracy doktorskiej zaobserwowali nabycie krzyżowej oporności na azole przez badane izolaty bez względu na to, czy charakteryzowały się występowaniem mutacji w genie *CYP51A* czy nie. Escribano i wsp. nie sprawdzali mechanizmów nabytej przez *A. fumigatus* oporności na azole. Nie sprawdzali również, czy oporność cofnie się w przypadku re-pasażowania izolatów na podłożu bez dodatku itraconazolu.

W badaniach własnych nad niniejszą pracą doktorską, po 20 pasażach na podłożach z dodatkiem azoli sprawdzono, czy izolaty utracą oporność w wyniku re-pasaży na podłożach bez dodatku azoli. Po pięciu re-pasażach ponownie wyznaczono wartości MIC. **Wszystkie izolaty które przed pasażami na podłożach z azolami charakteryzowały się wrażliwością na badane leki lub opornością wyłącznie na itraconazol (izolaty weterynaryjne) w skutek re-pasaży na podłożu Sabouraud utraciły oporność na wszystkie badane azole.** Izolaty, które charakteryzowały się





mutacją TR<sub>34</sub>L98H powróciły do wyjściowego stanu oporności. Obserwując wyniki przedstawionych w niniejszej pracy badań można wyciągnąć wniosek, że nabywanie oporności na azole w skutek ekspozycji środowiskowej jest możliwa. **Być może izolaty weterynaryjne – charakteryzujące się pierwotnie wyłącznie opornością na itraconazol – miały kontakt w środowisku naturalnym z azolami i wskutek tego nabyły na nie oporności poprzez nadekspresję jakichś genów. Warto w tym miejscu wspomnieć, że analiza statystyczna poziomów ekspresji genów tych izolatów przed pasażami wskazywała na nadekspresję genu *CYP51A*.**

U większości izolatów weterynaryjnych (u wszystkich poza izolatem nr 197) zaobserwowano wyższą niż średnia dla izolatów wrażliwych ekspresję różnych genów, która może być podstawą do postawienia hipotezy, że pierwotna oporność na itraconazol była wynikiem nadekspresji pomp błonowych bądź białek ściany komórkowej grzybów. Należy jednak podkreślić, że jest to jedynie hipoteza, której potwierdzeniem byłoby stworzenie odpowiednich mutantów. **Izolat 197, który charakteryzował się opornością na itraconazol i brakiem nadekspresji badanych genów, charakteryzował się występowaniem mutacji cichej w genie *CYP51A*: C672.** Ciężko jednak uwierzyć w to, że ta mutacja spowodowała czasowe nabycie oporności na itraconazol, które zniknęłoby w skutek pasaży na podłożu bez antymikotyków, zwłaszcza, że w grupie izolatów charakteryzujących się mutacją TR<sub>34</sub>L98H oporność na azole nie zniknęła w skutek re-pasaży. **Prawdopodobnie u tego izolatu istnieje inny mechanizm oporności.** Analizując wyniki uzyskane metodą komparatywną dla pozostałych izolatów weterynaryjnych - które przed pasażami charakteryzowały się opornością na itraconazol, a w skutek pasaży na podłożu bez antymikotyków utraciły oporność – obserwuje się nadekspresję różnych genów. Z uwagi na to, że izolaty te stanowią specyficzną grupę, również poprzez liczne mutacje punktowe w genie *CYP51A*, warto się im szczególnie przyjrzeć i zastanowić się, co stanowi przyczynę ich pierwotnej oporności na itraconazol. W związku z tym, że izolaty te utraciły oporność w wyniku pasaży, mało prawdopodobne wydaje się być to, by oporność ta była warunkowana mutacjami w genie *CYP51A*. Przyczyny oporności należy zatem szukać w nadekspresji genów. Poza wspomnianą powyżej nadekspresją genu *CYP51A* izolat 191 charakteryzuje się nadekspresją genów *CYP51B* i *MDR1*; izolat 193 nadekspresją genu *MDR1*; izolat 196 nadekspresją genów *MDR2* i *MDR3*; izolat 200 nadekspresją gen *ATRF*; izolat 201 nadekspresją genu *MDR1*; a izolat 203 nadekspresją genów *CYP51B* i *MDR3*. Warto również zaobserwować, że dwa izolaty weterynaryjne charakteryzujące się występowaniem sekwencji genu *CYP51A* typu dzikiego i wrażliwością na badane azole również charakteryzowały się nadekspresją różnych genów: izolat 198 charakteryzował się nadekspresją genów *CYP51A* i *MDR2* a izolat 192 nadekspresją genów *MDR1*, *MDR2* i *MDR3*. Zastanawiające zatem jest, dlaczego izolaty te mimo nadekspresji genów były wrażliwe na itraconazol a pozostałe izolaty weterynaryjne odporne. W literaturze opisano, że nadekspresja genów *MDR1* i *MDR2* może przyczynić się do wzmożonej oporności na azole poprzez wypompowywanie azoli na zewnątrz komórki [Tobin M, 1997]. Udokumentowano wpływ nadekspresji genu *ATRF* na oporność izolatów *A. fumigatus* na itraconazol,

zaobserwowano 5-krotny wzrost poziomu ekspresji genu *ATRF* izolatów opornych na itraconazol niż u tych wrażliwych [Slaven J, 2002].

W dostępnej literaturze istnieją także doniesienia na wpływ nadekspresji genów *MDR3* i *MDR4* na nabywanie oporności na triazole. Nascimento i wsp. wykazali, że oporne na azole izolaty *A. fumigatus* wykazywały albo konstytutywną nadekspresję obu transporterów, albo indukcję nadekspresji po ekspozycji izolatów na itraconazol. Dwa z 23 izolatów charakteryzowały się odpornością na itraconazol prawdopodobnie właśnie w skutek nadekspresji tych genów [Nascimento A, 2003].

To co można uznać za pewnik analizując wyniki przedstawione w tej rozprawie, to że oporność na azole może być nabywana w skutek długotrwałej ekspozycji na te antymikotyki. Wyniki niniejszej pracy są analogiczne do wyników wcześniej prowadzonych na świecie badań. W 2012 roku udowodniono, że azolowe fungicydy obecne w medium hodowlanym mogą powodować powstawanie oporności krzyżowej na medycznie stosowane leki azolowe u grzybów z gatunku *A. fumigatus* po zaledwie trzech pasażach izolatów na podłożach z dodatkiem antymikotyków [Snelders E, 2012]. Zaobserwowano także, że pasażowanie izolatów *A. fumigatus* na różnych stężeniach azolowych fungicydów jest w stanie spowodować nabywanie przez nie oporności bez względu na zastosowane stężenie związku. W badaniach prowadzonych przez Snelders i wsp. - podobnie jak w niniejszej pracy - stwierdzono znaczny wzrost wartości MIC badanych antymikotyków u wszystkich badanych szczepów. Na przykład izolat o początkowym MIC równym 0,25 mg/L dla itraconazolu, 0,015 mg/L dla posakonazolu i 0,25 mg/L dla worikonazolu po hodowli z tebukonazolem charakteryzował się wartością MIC 2 mg/L dla itraconazolu, 1 mg/L dla posakonazolu i 16 mg/L dla worikonazolu [Jingbei R, 2017]. **Warto zauważyć, że wartości MIC izolatów przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej są znacznie wyższe niż wartości MIC uzyskane przez inne zespoły badawcze. Po 20 pasażach na podłożach z antymikotykami wartości MIC właściwie przekraczały oznaczane wartości. Może to być wynikiem większej liczby pasażów testowanych izolatów a w konsekwencji może wynikać z dłuższych czasów ekspozycji grzybów na badane związki azolowe. Przyczyną może być również fakt, że w niniejszej pracy pasażowano izolaty na klinicznie stosowanych azolach (posakonazol, worikonazol i itraconazol) zaś w badaniach Snelders i wsp. izolaty hodowane były na podłożach z dodatkiem stosowanego w rolnictwie tebukonazolu. Z tą drugą przyczyną wyjaśniającą tak dużą różnicę w zmianach wartości MIC pomiędzy przedstawionymi opracowaniami trudno się jednak w 100% zgodzić, gdyż azole używane w rolnictwie i te stosowane w medycynie mają taki sam mechanizm działania na komórki grzybów. Jednak bez przeprowadzenia dalszych badań trudno tę hipotezę odrzucić. W badaniach prowadzonych przez Zhang i wsp. [Zhang J, 2017] zaobserwowano, że azole stosowane w środowisku mogą wpływać na nabywanie przez izolaty *A. fumigatus* oporności. W toku badań pobrano próbki z dwóch kompostów: jeden z azolowymi fungicydami w składzie (głównie propionidazol i tebukonazol) i drugi – wolny od azoli. Z kompostów wyizolowano izolaty *A. fumigatus* i sprawdzono ich wrażliwość na antymikotyki. W toku badań zaobserwowano iż izolaty pochodzące z kompostu z dodatkiem azoli w 91% były na nie oporne (41/45 izolatów) zaś w kompoście bez azoli opornych było tylko 2% (1/50 izolatów). W badaniach tych**



przeanalizowano także sekwencje genu *CYP51A* i zaobserwowano, że w izolatach pochodzących z kompostu bez dodatku azoli, 98% charakteryzowało się sekwencją typu dzikiego a 2% charakteryzowało się mutacją TR<sub>43</sub>L98H. U izolatów wyizolowanych z kompostu z dodatkiem azoli zaobserwowano większą różnorodność genetyczną w genie *CYP51A*: tylko 9% izolatów charakteryzowało się sekwencją typu dzikiego, 80% izolatów charakteryzowało się mutacją TR<sub>46</sub>Y121F/T298A a 2% charakteryzowało się mutacją TR<sub>46</sub>Y121F/M172I/T289A/G448S [Zhang J, 2017].

**W niniejszej rozprawie opisane zostały również różnice w poziomach ekspresji genów *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF*, *CYP51A* i *CYP51B* u grzybów *A. fumigatus* po 20 pasażach na agarze Sabouraud i agarze Sabouraud z dodatkiem worikonazolu / posakonazolu / itrakonazolu oraz po ich re-pasażach (pięć razy na Sabouraud bez dodatku azoli). Do badań wybrano cztery izolaty: dwa z mutacją TR<sub>34</sub>L98H i dwa bez tej mutacji. W toku tych eksperymentów zaobserwowano zmiany w poziomach ekspresji badanych genów co może pośrednio potwierdzać hipotezę indukcji oporności na azole przez obecność azoli w środowisku [Snelders E, 2009, Snelders E, 2012, Stensvold C, 2012, Verweij P, 2009]. Wszystkie badane azole: posakonazol, itrakonazol i worikonazol powodowały znaczący wzrost poziomów ekspresji różnych genów. Obecność worikonazolu powodowała wzrost ekspresji genów *CYP51A* i *MDR1* u wszystkich badanych izolatów. Dodatek do podłoża itrakonazolu również spowodowała wzrost poziomu ekspresji genów *CYP51A* i *MDR1* u wszystkich izolatów. Dodatkowo zaobserwowano, że spowodował on spadek poziomu ekspresji genu *CYP51B* u wszystkich izolatów. Hodowla izolatów *A. fumigatus* na podłożu z dodatkiem posakonazolu spowodowała wzrost ekspresji genów *CYP51A* i *ATRF* u wszystkich izolatów oraz spadek poziomu ekspresji genów *CYP51B* i *MDR2* u wszystkich badanych izolatów. Jak można zaobserwować, wszystkie badane azole powodowały wzrost poziomu ekspresji genu *CYP51A*. Jeśli skorelujemy te wyniki z wynikami oznaczania wartości MIC, które wskazują, że wszystkie badane izolaty nabyły oporność na azole, to właśnie w nadekspresji genu *CYP51A* można upatrywać przyczynę nabytej oporności. Dodatkowo analiza zmian poziomów ekspresji badanych genów metodą Pfaffla pozwoliła zauważyć, że w wyniku re-pasaży poziom ekspresji izolatów hodowanych na podłożu z dodatkiem posakonazolu i worikonazolu w większości zaczął wracać do poziomów wyjściowych co jest zbieżne z utratą oporności na azole przez te izolaty. W przypadku izolatów hodowanych na podłożu z itrakonazolem, po re-pasażach większość genów charakteryzowała się dalszym wzrostem poziomów ekspresji pomimo utraty oporności na azole. Tę obserwację trudno wyjaśnić. Być może oporność na itrakonazol warunkowana jest innym mechanizmem niż oporność na posakonazol i worikonazol. Warto jednak zaznaczyć, iż wszystkie badania dotyczące zmian w poziomach ekspresji genów w skutek pasaży i re-pasaży były przeprowadzone na bardzo małej puli badawczej – cztery izolaty – dlatego konieczne są dalsze. Dodatkowo, jeden z izolatów wrażliwych był izolatem weterynaryjnym i istnieje prawdopodobieństwo, że w miał kontakt w środowisku naturalnym z azolami. Badania dotyczące wpływu azoli na ekspresję różnych genów prowadzili również da Silva Ferreira i wsp. W trakcie prowadzonych przez nich badań, inkubowali izolaty *A. fumigatus***

z dodatkiem worikonazolu przez krótki czas (30, 60, 120 i 240 minut) i zaobserwowali wzrost poziomu ekspresji transporterów błonowych [da Silva Ferreira M, 2006].

Dodatkowo, w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej postanowiono sprawdzić wrażliwość 100 izolatów *A. fumigatus* na izawukonazol. Izawukonazol jest stosunkowo niedawno wprowadzonym do klinicystryki azolem, w którym upatruje się możliwości skutecznego leczenia pacjentów chorujących na zakażenia grzybicze. **W toku przeprowadzonych badań własnych mających na celu oznaczenie lekowrażliwości izolatów *A. fumigatus* na izawukonazol zaobserwowano, iż w Polsce istnieje problem tej oporności i dotyczy zarówno szczepów klinicznych (sześć z 64 klinicznych izolatów – 9,4%) i środowiskowych (trzy z 22 izolatów środowiskowych – 13,6%). Wśród przebadanych 14 izolatów weterynaryjnych nie zaobserwowano problemu oporności na izawukonazol.** Ze 100 przebadanych izolatów dziewięć izolatów charakteryzowało się opornością na izawukonazol (9%) Cztery izolaty (trzy kliniczne: 13, 55 i 129 oraz jeden środowiskowy: 145) charakteryzowały się opornością na izawukonazol oraz itraconazol, posakonazol i worikonazol. Dwa kliniczne izolaty (117 i 134) charakteryzowały się opornością na izawukonazol oraz itraconazol i posakonazol. Wyniki badań poszerzają dostępne w literaturze dane na temat oporności na izawukonazol izolatów *A. fumigatus*, gdyż do tej pory opublikowano jedną pracę, wskazującą na brak tej oporności [Sulik-Tyszka B, 2016]. Warto jednak zwrócić uwagę, na małą grupę badanych izolatów (3 izolaty *A. fumigatus*) wykorzystywane do oznaczenia oporności na izawukonazol. Badania prowadzone przez Gregson i wsp. wykazały wyższe wartości MIC izawukonazolu w szczepach o zmniejszonej wrażliwości na inne triazole i wykazywał wysoki stopień korelacji z wynikami wrażliwości na worikonazol [Gregson L, 2013]. **W badaniach uzyskanych w ramach niniejszej rozprawy nie zaobserwowano korelacji wyników MIC izawukonazolu i worikonazolu. Jedynie 39% izolatów charakteryzowało się taką samą wartością MIC dla tych związków, 4% izolatów niższą wartością MIC izawukonazolu, zaś aż 57% izolatów wyższą wartością MIC dla izawukonazol.** Dodatkowo w toku badań własnych nad niniejszą pracą dokorską zaobserwowano występowanie izolatów *A. fumigatus* opornych wyłącznie na izawukonazol (jeden kliniczny: 140 i dwa środowiskowe: 187 i 188) czego nie opisano do tej pory w dostępnej na ten temat literaturze. Do tej pory zaobserwowano, że oporność na izawukonazol występuje jedynie łącznie z opornością na itraconazol [Pfaller M, 2013] a także, że wartości MIC dla izawukonazolu odzwierciedlają wyniki MIC dla worikonazolu [Gregson L, 2013]. Inne dane – pochodzące z Chin wskazują na to, że izawukonazol ma podobną aktywność do itraconazolu ale niższą niż posakonazol i worikonazol [Deng S, 2017]. Dane te również nie są porównywalne do wyników uzyskanych w niniejszej pracy doktorskiej. **Jedynie 55% izolatów charakteryzowało się taką samą wartością MIC itraconazolu i izawukonazol, 21% izolatów charakteryzowało się wartością MIC wyższą dla izawukonazolu niż itraconazolu zaś 24% izolatów charakteryzowało się niższą wartością MIC izawukonazolu. Warto również zaznaczyć, że w tej ostatniej grupie (izolaty charakteryzujące się niższą wartością MIC izawukonazolu) znajdują**

**się przede wszystkim izolaty weterynaryjne, który były odporne wyłącznie na itrakonazol.**

## WNIOSKI KOŃCOWE

1. W Polsce występują zarówno kliniczne, środowiskowe i weterynaryjne izolaty *A. fumigatus* odporne na azole. Wśród przebadanych 200 izolatów oporność wynosiła 8,5% (w tym wśród klinicznych 3,6%, wśród środowiskowych 2,2% wśród weterynaryjnych 78,6%).
2. Wśród izolatów *A. fumigatus* występujących w Polsce istnieją różne mechanizmy oporności na azole. Należą do nich mutacja TR<sub>34</sub>L98H w genie *CYP51A* oraz nadekspresja genów kodujących pompy błonowe i genów odpowiedzialnych za poprawną budowę ściany i błony komórkowej grzybów.
3. Obecność w medium hodowlanym posakonazolu lub itraconazolu może powodować zmiany w kolorze grzybni grzybów z gatunku *A. fumigatus*.
4. Obecność w medium hodowlanym badanych azoli indukuje u grzybów z gatunku *A. fumigatus* zwiększoną produkcję zarodników.
5. Długotrwała obecność itraconazolu, posakonazolu albo worikonazolu w środowisku może indukować oporność na azole wśród szczepów *A. fumigatus*.
6. Obecność w medium hodowlanym itraconazolu i worikonazolu powoduje wzrost ekspresji genów *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF*, *CYP51A*, *CYP51B* grzybów *A. fumigatus* bez względu na mutacje występujące w genie *CYP51A*.
7. Obecność w medium hodowlanym posakonazolu powoduje wzrost poziomu ekspresji genów *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF*, *CYP51A*, *CYP51B* izolatów *A. fumigatus* bez mutacji TR<sub>34</sub>L98H, zaś w przypadku izolatów z tą mutacją powoduje spadek poziomu ekspresji genów *CYP51B*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF* a także nie powoduje istotnych zmian w poziomach ekspresji genów *CYP51A* i *MDR1*.
8. Nadekspresja genów kodujących transportery błonowe oraz genów odpowiedzialnych za poprawną budowę ściany i błony komórkowej grzybów z gatunku *A. fumigatus* może przyczynić się do nabycia oporności na azole.
9. Izolaty *A. fumigatus* odporne wyłącznie na itraconazol charakteryzują się nadekspresją genu *CYP51A*.
10. Izolaty odporne na worikonazol, itraconazol i posakonazol nie są wrażliwe na działanie izawukonazolu, a inne izolaty *A. fumigatus* mogą być odporne na izawukonazol pomimo braku oporności na pozostałe triazole.



## PERSPEKTYWY

Wyniki badań własnych przedstawione w niniejszej pracy stanowią istotne informacje na temat problemu oporności na azole izolatów *A. fumigatus* w Polsce. Warto zauważyć, że są to pierwsze doniesienia na ten temat w naszym kraju. Ze względu na ich ograniczony charakter (pula 200 izolatów) trudno jednak traktować je jako odzwierciedlające ogólny stan w Polsce dotyczący oporności izolatów *A. fumigatus* na azole. Stanowią one przyczynek do dalszych badań w tym kierunku.

Patrząc przez pryzmat uzyskanych wyników, ważne wydaje się być przeprowadzenie badań w większej ilości ośrodków zdrowia - idealnym byłoby wprowadzenie obowiązkowych badań lekowrażliwości wszystkich izolowanych od pacjentów izolatów *A. fumigatus* oraz prowadzenia statystyk określających procent opornych szczepów. Umożliwiłoby to rzetelne odzwierciedlenie obecnego problemu oporności na azole oraz monitorowanie ewentualnych tendencji zwykłych. W związku z wyizolowaniem w trakcie badań własnych środowiskowego izolatu opornego na azole koniecznym wydaje się również poszerzenie badań o większą pulę izolatów środowiskowych.

Istotne wydaje się również porównanie wpływu azoli stosowanych w rolnictwie na nabywanie oporności przez grzyby z gatunku *A. fumigatus* do wyników uzyskanych w niniejszej pracy dla azoli stosowanych w medycynie oraz poszerzenia ich o większą ilość próbek. W Kolumbii przeprowadzono badania nad wpływem azolowych fungicydów na *A. fumigatus*. Zaobserwowano, że większość opornych na azole izolatów charakteryzowała się występowaniem jednej z trzech mutacji w genie *CYP51A*: TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A, TR<sub>34</sub>L98H i TR<sub>53</sub> [Alvarez-Moreno C, 2017]. Również Ren i wsp. zaobserwowali, że azole wykorzystywane w rolnictwie mogą przyczynić się do powstania krzyżowej oporności na azole wykorzystywane w klinicyście. W toku badań przeanalizowano 144 próbki gleby z dodatkiem różnych azolowych fungicydów (epoksykonazol, tebukonazol, propikonazol, heksakonazol, metkonazol) i zaobserwowano, że 5,8% analizowanych próbek było odporne na medycznie stosowane azole. Dwie próbki charakteryzowały mutacją TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A i były odporne na worikonazol. Jedna próbka była oporna na itrakonazol i charakteryzowała się występowaniem mutacji TR<sub>34</sub>/L98H/S297T/F495I [Ren J, 2017]. Istnieją również doniesienia, o braku nabywania oporności na klinicznie stosowane azole w skutek stosowania rolniczych azolowych fungicydów. Przeprowadzone przez Kano i wsp. badania dotyczyły 50 izolatów *A. fumigatus* wyizolowanych z pola spryskiwanego dwa razy do roku od 15 lat tertakonazolem. W toku badań nie zaobserwowano opornych na klinicznie stosowane azole izolatów. Nie zaobserwowano także izolatów opornych na tertakonazol. Dodatkowo, nie wykazano żadnych mutacji w genie *CYP51A* [Kano R, 2015]. W związku z tak różnymi danymi dotyczącymi możliwości nabywania

na klinicznie stosowane azole w skutek stosowania azolowych fungicydów, konieczne są dalsze badania w tej dziedzinie.

W Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej trwają obecnie prace nad sprawdzeniem wpływu azolowych fungicydów na nabywanie oporności przez grzyby z gatunku *A. fumigatus* na klinicznie stosowane azole (posakonazol, itraconazol i vorikonazol). Prace prowadzone są w ramach dyplomu magisterskiego przez Panią Joannę Pleńkowską pod opieką doktorantki Pani Martynty Mroczyńskiej i pod promotorstwem Pani dr hab. inż. Anny Brillowskiej-Dąbrowskiej, prof. zw. PG. Badania prowadzone są na czterech izolatach *A. fumigatus* (izolaty nr: 2, 13, 192 i 145) i dotyczą wpływu propikonazolu i tebukonazolu na wartości MIC i poziomy ekspresji genów *CYP51A*, *CYP51B*, *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *MDR4*, *ATRF*. Izolaty *A. fumigatus* pasażowane są na podłożach o stężeniu 40mg/L tebukonazolu i propikonazolu. Stężenie azoli zostało dobrane tak, by odpowiadało stężeniu stosowanemu do oprysków upraw.

Przy pierwszym pasażu zaobserwowano zmiany w morfologii hodowanych grzybów. Grzybnia charakteryzowała się kremowo-białym zabarwieniem (podobnie jak w przypadku pierwszego pasażu izolatów na podłożach z itraconazolem i posakonazolem). Dodatkowo zaobserwowano problemy ze wzrostem jednego izolatu (nr 192) na podłożu z tebukonazolem – jednak po przesianiu z podłoża z propikonazolem wyrósł bez problemu na podłożu z tebukonazolem dodatkowo wytwarzając toksyny.

Po drugim pasażu wszystkie izolaty charakteryzowały się kremowo-białym kolorem grzybni, dodatkowo zaobserwowano wytwarzanie toksyn przez izolat nr 13 hodowany na podłożu z propikonazolem.

Cztery izolaty *A. fumigatus* będą dalej pasażowane, a następnie wyznaczone zostaną wartości MIC dla posakonazolu, itraconazolu i vorikonazolu, a także sprawdzone zostaną poziomy ekspresji genów *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *MDR4*, *ATRF* i *CYP51A*, *CYP51B*. Planowana jest także analiza wytwarzanych przez *A. fumigatus* toksyn.

Warto byłoby także kontynuować przedstawione w niniejszej rozprawie badania własne w kierunku analizy sekwencji genu *CYP51A* izolatów wykorzystywanych w badaniach własnych po pasażach na podłożach z antymikotykami, w celu sprawdzenia występowania ewentualnych mutacji.

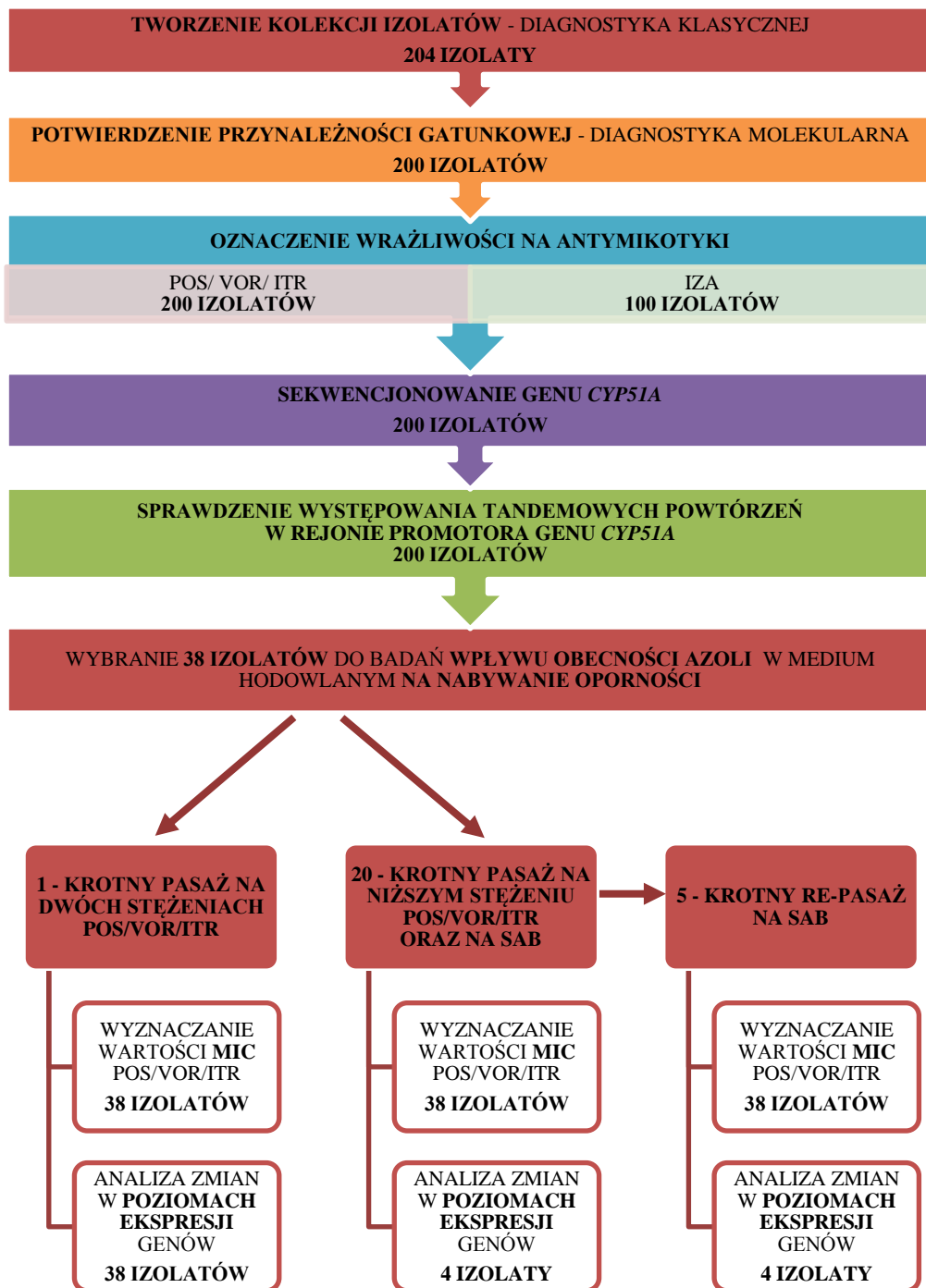
W wyniku prowadzonych badań własnych zaobserwowano problem oporności na izawukonazol wśród izolatów *A. fumigatus*. W związku z tym ważne byłoby również poszerzenie badań wrażliwości na izawukonazol na większą pulę izolatów.

W celu potwierdzenia mechanizmu opartego o nadekspresję pomp błonowych, konieczne jest wykonanie nokautów tych genów i powtórne przeprowadzenie badań.





## OGÓLNY SCHEMAT STOSOWANEJ METODYKI



## SPIS TABEL

- Tab. 1. Mutacje w genie *CYP51A* korelowane z opornością na azole
- Tab. 2. Izolaty *A. fumigatus* wykorzystywane do pracy
- Tab. 3. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR ITS
- Tab. 4. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR ITS
- Tab. 5. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR *CYP51A* z użyciem starterów CYP51Afor i P450-A2
- Tab. 6. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR *CYP51A* z wykorzystaniem starterów CYP51Afor i P450-A2
- Tab. 7. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji PCR TR<sub>34</sub>
- Tab. 8. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR TR<sub>34</sub>
- Tab. 9. Charakterystyka izolatów wykorzystywanych w badaniu wpływu azoli na *A. fumigatus*
- Tab. 10. Stężenia azoli używane do badań poziomów ekspresji genów
- Tab. 11. Stężenia azoli używane do badania wpływu długotrwałej ekspozycji *A. fumigatus* na azole
- Tab. 12. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu *CYP51A*
- Tab. 13. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu *CYP51B*
- Tab. 14. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu *MDR1*
- Tab. 15. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu *MDR2*
- Tab. 16. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu *MDR3*
- Tab. 17. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu *ATRF*
- Tab. 18. Profil temperaturowo-czasowy reakcji real-time PCR wykorzystywany do amplifikacji genu *β-tubuliny*
- Tab. 19. Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystywany do reakcji real-time PCR
- Tab. 20. Wyniki oznaczania lekowrażliwości izolatów *A. fumigatus* na posakonazol, vorikonazol i itraconazol
- Tab. 21. Wyniki analizy sekwencji fragmentu genu *CYP51A*
- Tab. 22. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud.
- Tab. 23. Poziom ekspresji genów po hodowli na podłożu Sabouraud z dodatkiem posakonazolu
- Tab. 24. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud i na podłożach z dodatkiem posakonazolu.



- Tab. 25. Poziom ekspresji genów po hodowli na podłożu Sabouraud z dodatkiem itraconazolu
- Tab. 26. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud i na podłożach z dodatkiem itraconazolu.
- Tab. 27. Poziom ekspresji genów po hodowli na podłożu Sabouraud z dodatkiem worikonazolu
- Tab. 28. Uśrednione wyniki względnych poziomów ekspresji poszczególnych genów dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych na podłożu Sabouraud i na podłożach z dodatkiem worikonazolu.
- Tab. 29. Wartości wydajności reakcji amplifikacji genów *MDR1*, *MDR2*, *MDR3*, *ATRF*, *CYP51A*, *CYP51B* i  $\beta$ -tubuliny
- Tab. 30. Wyniki zmian względnych poziomów ekspresji genu *CYP51A*
- Tab. 31. Uśrednione wyniki względnych różnic w poziomach ekspresji genu *CYP51A* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych podłożach z dodatkiem różnych stężeń azoli
- Tab. 32. Wyniki zmian względnych poziomów ekspresji genu *CYP51B*
- Tab. 33. Uśrednione wyniki względnych różnic w poziomach ekspresji genu *CYP51B* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych podłożach z dodatkiem różnych stężeń azoli.
- Tab. 34. Wyniki zmian względnych poziomów ekspresji genu *MDR1*
- Tab. 35. Uśrednione wyniki względnych różnic w poziomach ekspresji genu *MDR1* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych podłożach z dodatkiem różnych stężeń azoli.
- Tab. 36. Wyniki zmian względnych poziomów ekspresji genu *MDR2*
- Tab. 37. Uśrednione wyniki względnych różnic w poziomach ekspresji genu *MDR2* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych podłożach z dodatkiem różnych stężeń azoli
- Tab. 38. Wyniki zmian względnych poziomów ekspresji genu *MDR3*
- Tab. 39. Uśrednione wyniki względnych różnic w poziomach ekspresji genu *MDR3* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych podłożach z dodatkiem różnych stężeń azoli
- Tab. 40. Wyniki zmian względnych poziomów ekspresji genu *ATRF*
- Tab. 41. Uśrednione wyniki względnych różnic w poziomach ekspresji genu *ATRF* dla izolatów *A. fumigatus* hodowanych podłożach z dodatkiem różnych stężeń azoli
- Tab. 42. Wartości MIC badanych związków dla izolatów pasażowanych na podłożu Sabouraud
- Tab. 43. Wartości MIC badanych związków dla izolatów pasażowanych na podłożu Sabouraud z dodatkiem posakonazolu, a następnie hodowanych na podłożach bez dodatku leku

- Tab. 44. Wartości MIC badanych związków dla izolatów pasażowanych na podłożu Sabouraud z dodatkiem itrakonazolu, a następnie hodowanych na podłożach bez dodatku leku
- Tab. 45. Wartości MIC badanych związków dla izolatów pasażowanych na podłożu Sabouraud z dodatkiem worikonazolu, a następnie hodowanych na podłożach bez dodatku leku
- Tab. 46. Zmiany poziomów ekspresji genów izolatów *A. fumigatus* 20-krotnie pasażowanych na podłożach z dodatkiem azoli worikonazol, posakonazol i itrakonazol a następnie 5-krotnie re-pasażowanych na podłożu Sabouraud
- Tab. 47. Zmiany w poziomach ekspresji poszczególnych genów izolatów *A. fumigatus* pasażowanych na podłożu z dodatkiem posakonazolu i re-pasażowanych na podłożu Sabouraud
- Tab. 48. Zmiany poziomów ekspresji poszczególnych genów izolatów *A. fumigatus* pasażowanych na podłożu z dodatkiem worikonazolu i re-pasażowanych na podłożu Sabouraud
- Tab. 49. Zmiany poziomów ekspresji poszczególnych genów izolatów *A. fumigatus* pasażowanych na podłożu z dodatkiem itrakonazolu i re-pasażowanych na podłożu Sabouraud
- Tab. 50. Wyniki oznaczania lekowrażliwości izolatów *A. fumigatus* na izawukonazol

## SPIS RYCIN

- Ryc. 1. Budowa konidioforu grzybów z rodzaju *Aspergillus* na przykładzie gatunku *A. fumigatus*
- Ryc. 2. Budowa konidioforów *A. fumigatus*
- Ryc. 3. Siedmiodniowe kolonie *A. fumigatus* na podłożu Sabouraud
- Ryc. 4. Struktura itrakonazolu
- Ryc. 5. Struktura worikonazolu
- Ryc. 6. Struktura posakonazolu
- Ryc. 7. Struktura propikonazolu
- Ryc. 8. Przedstawienie powierzchni hydrofobowych i hydrofilowych w białku CYP51A szczepu dzikiego i zmutowanego
- Ryc. 9. Struktura izawukonazolu
- Ryc. 10. Mapa przedstawiająca stan oporności na azole izolatów *A. fumigatus*
- Ryc. 11. Procentowy udział izolatów klinicznych, środowiskowych i weterynaryjnych
- Ryc. 12. Wykres wartości MIC dla itrakonazolu
- Ryc. 13. Wykres wartości MIC dla worikonazolu
- Ryc. 14. Wykres wartości MIC dla posakonazolu
- Ryc. 15. Procentowy udział izolatów opornych na itrakonazol
- Ryc. 16. Procentowy udział izolatów opornych na worikonazol
- Ryc. 17. Procentowy udział izolatów opornych na posakonazol
- Ryc. 18. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR TR<sub>34</sub> dla przykładowych izolatów
- Ryc. 19. Wpływ itrakonazolu, worikonazolu i posakonazolu na zmiany poziomów ekspresji genu *CYP51A*
- Ryc. 20. Wpływ itrakonazolu, worikonazolu i posakonazolu na zmiany poziomów ekspresji genu *CYP51B*
- Ryc. 21. Wpływ itrakonazolu, worikonazolu i posakonazolu na zmiany poziomów ekspresji genu *MDR1*
- Ryc. 22. Wpływ itrakonazolu, worikonazolu i posakonazolu na zmiany poziomów ekspresji genu *MDR2*
- Ryc. 23. Wpływ itrakonazolu, worikonazolu i posakonazolu na zmiany poziomów ekspresji genu *MDR3*
- Ryc. 24. Wpływ itrakonazolu, worikonazolu i posakonazolu na zmiany poziomów ekspresji genu *ATRF*
- Ryc. 25. Różnice we wzroście grzybów charakteryzujących się mutacją TR<sub>34</sub>/L98H od pozostałych *A. fumigatus*
- Ryc. 26. Wzrost grzybów *A. fumigatus* na podłożu Sabouraud i Sabouraud z dodatkiem itrakonazolu

- Ryc. 27. Wzrost grzybów *A. fumigatus* na podłożu Sabouraud i Sabouraud z dodatkiem worikonazolu
- Ryc. 28. Wzrost grzybów *A. fumigatus* na podłożu Sabouraud i Sabouraud z dodatkiem posakonazolu
- Ryc. 29. Wzrost grzybów *A. fumigatus* na podłożu Sabouraud z dodatkiem posakonazolu
- Ryc. 30. Podsumowanie wpływu azoli – bądź ich braku - w medium hodowlanym na grupę 38 izolatów *A. fumigatus*
- Ryc. 31. Poziom ekspresji poszczególnych genów *A. fumigatus* pasażowanych na podłożu z dodatkiem posakonazolu i re-pasażowanych na podłożu Sabouraud
- Ryc. 32. Poziom ekspresji poszczególnych genów *A. fumigatus* pasażowanych na podłożu z dodatkiem posakonazolu i re-pasażowanych na podłożu Sabouraud
- Ryc. 33. Poziom ekspresji poszczególnych genów *A. fumigatus* pasażowanych na podłożu z dodatkiem itrakonazolu i re-pasażowanych na podłożu Sabouraud
- Ryc. 34. Wykres wartości MIC dla izawukonazolu
- Ryc. 35. Procentowy udział izolatów opornych na izawukonazol

## BIBLIOGRAFIA

1. **Ahmad S, Joseph L, Hagen F, Meis J, Khan Z. 2015.** Concomitant occurrence of itraconazole-resistant and -susceptible strains of *Aspergillus fumigatus* in routine cultures. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 412–415.
2. **Ahmad S, Khan Z, Hagen F, Meis J. 2014.** Occurrence of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR<sub>34</sub>/L98H mutations in outdoor and hospital environment in Kuwait. *Environ. Res.* 133, 20–26.
3. **Alanio A, Sitterle E, Liance M, Farrugia C, Foulet F, Botterel F, Hicheri Y, Cordonnier C, Costa J, Bretagne S. 2011.** Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 371–374.
4. **Alvarez-Moreno C, Lavergne R, Hagen F, Morio F, Meis J, Le Pape P. 2017.** Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring TR<sub>34</sub>L98H, TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A and TR<sub>53</sub> mutations related to flower Fields In Colombia. *Scientific Reports Nature.* 7, 1–8.
5. **Albarrag A, Anderson M, Howard S, Robson G, Warn P, Sanglard D, Denning D. 2011.** Interrogation of related clinical pan-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains: G138C, Y431C, and G434C single nucleotide polymorphisms in *cyp51A*, upregulation of *cyp51A*, and integration and activation of transposon *Atf1* in the *cyp51a* promoter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5113–5121.
6. **Alzacar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela L. 2008.** *Aspergillus* Section *Fumigati*: Antifungal susceptibility Patterns and sequence-based identification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 52(4), p. 1244-1251.
7. **Arabatzis M, Kambouris M, Kyprianou M, Chrysaiki A, Foustoukou M, Kanellopoulou M, Kondyli L, Kouppari G, Koutsia-Karouzou C, Lebessi E, et al. 2011.** Polyphasic identification and susceptibility to seven antifungals of 102 *Aspergillus* isolates recovered from immunocompromised hosts in Greece. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3025–3030.
8. **Araujo R, Pina-Vaz C, Rodrigues A. 2007.** Susceptibility of environmental versus clinical strains of pathogenic *Aspergillus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 29, 108–111.
9. **Astvad K, Jensen R, Hassan T, Mathiasen E, Thomse G, Pedersen U, Christensen M, Hilberg O, Arendrup M. 2014.** First detection of TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A and TR<sub>34</sub>/L98H alterations in *Aspergillus fumigatus* isolates from azole-naïve patients in Denmark despite negative findings in the environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5096–5101.
10. **Azevedo M, Faria-Ramos I, Costa Cruz L, Pina-Vaz C, Gonçalves Rodrigues A. 2015.** Genesis of azole antifungal resistance from agriculture to clinical settings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 63(34), pp.7463-7468.
11. **Badali H, Vaezi A, Haghani I, Yazdanparast S, Hedayati M, Mousavi B, Ansari S, Hagen F, Meis J, Chowdhary A. 2013.** Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR<sub>34</sub>/L98H mutations in the *cyp51A* gene in Iran. *Mycoses* 56, 659–663.
12. **Bader O, Tunnermann J, Dudakova A, Tangwattanachuleeporn M, Weig M, Gross U. 2015.** Environmental isolates of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 4356–4359.
13. **Bader O, Weig M, Reichard U, Lugert R, Kuhns M, Christner M, Held J, Peter S, Schumacher U, Buchheidt D. 2013.** *Cyp51A*-based mechanisms of *Aspergillus fumigatus* azole drug resistance present in clinical samples from Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3513–3517.

13. **Balajee S, Lindsley M, Iqbal N, Ito J, Pappas P, Brandt M. 2007.** Nonsporulating clinical isolate identified as *Petromyces alliaceus* (anamorph *Aspergillus alliaceus*) by morphological and sequence-based methods. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2701–2703.
14. **Barrs V, van Dorn T, Houbraken J, Kidd S, Martin P, Pinheiro M, Richardson M, Varga J, Samson R. 2013.** *Aspergillus felis* sp. Nov. An Emerging agent of invasive aspergillosis in humans, cats, and dogs. *PLOS One.* 8(6), 1-11.
15. **Bellete B, Raberin H, Morel J, Flori P, Hafid J, Manhungsung R. 2010.** Acquired resistance to voriconazole and itraconazole in a patient with pulmonary aspergilloma. *Med. Mycol.* 48, 197-200
16. **Berger S, El Chazli Y, Babu A, Coste A. 2017.** Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a consequence of antifungal use in agriculture? *Frontiers in Microbiology.* 8(1024), 1-6.
17. **Blatzer M, Barker B, Willger S, Backmann N, Blosser S, Cornish E, Mazurie A, Grahl N, Haas H, Cramer E. 2011.** SREBP coordinates iron and ergosterol homeostasis to mediate triazole drug and hypoxia responses in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLOS Genet.* 4, e1002374.
18. **Blosser S, Cramer R. 2012.** SREBP-dependent triazole susceptibility in *Aspergillus fumigatus* is mediated through direct transcriptional regulation of *erg11A* (*cyp51A*). *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 56(1), 248-257.
19. **Brillowska-Dąbrowska A, Saunte D, Arendrup M. 2007.** Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.* 45(4), 1200-1204.
20. **Brillowska-Dąbrowska A, Świerkowska A, Saunte D, Arendrup M. 2010.** Diagnostic PCR test for *Microsporium audouinii*, *M. canis* and *Trichophyton infections*. *Med. Mycol.* 48(3), 486-490.
21. **Brillowska-Dąbrowska A, Mroczyńska M, Nawrot U, Włodarczyk K, Kurzyk E. 2015.** Examination of *cyp51A* and *cyp51B* expression level of the first Polish azole resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolate. *Acta Biochimica Polonica,* 62(4), str. 837-839.
22. **Bromley M, van Muijlwijk G, Fraczek M, Robson G, Verweij P, Denning D, Bowyer P. 2014.** Occurrence of azole-resistant species *Aspergillus* in the UK environment. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2(4), 276-279.
23. **Brüggemann R, Alffenaar J, Blijlevens N, Billaud E, Kosterink J, Verweij P, Saravolatz L. 2009.** Clinical relevance of the pharmacokinetic interactions of azole antifungal drugs with other coadministered agents. *Clinical Infectious Diseases.* 48(10), 1441-1458.
24. **Bueid A, Howard S, Moore C, Harrison E, Bowyer P, Denind D. 2010.** Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J. Antimicrob Chemother.* 65(10), 2116-2118.
25. **Bueid A, Moore C, Denning D, Bowyer P. 2013.** High-level expression of *cyp51B* in azole-resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 68(3), 512-514.
26. **Burgel P, Baixench M, Amsellem M, Audureau E, Chapron J, Kanaan R, Honore I, Dupouy-Camet J, Dusser D, Klaassen C. et al. 2012.** High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 869–874.
27. **Burgos A, Zaoutis T, Dvorak C, Hoffman J, Knapp K, Nania J, Steinbach W. 2008.** Pediatric invasive aspergillosis: a multicenter retrospective analysis of 139 contemporary cases. *Pediatrics.* 121(5), 1286-1294.
28. **Camps S, Dutilh B, Arendrup M, Rijs A, Snelders E, Huynen M, Verweij P, Melchers W. 2012.** Discovery of a *hapE* mutation that causes azole resistance in *Aspergillus fumigatus* through whole genome sequencing and sexual crossing. *PLOS One.* 7, e50034.
29. **Camps S, van der Linden J, Li Y, Kuijper E, van Dissel J, Verweij P, Melchers W. 2012.** Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus*





- fumigatus* during azole therapy: A case study and review of the literature. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 10–16.
30. **Claire L, Parker J, Warrilow A, Kelly D, Kelly S. 2015.** Azole fungicides – understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Manag Sci.* 71, 1054-1058.
  31. **Chamilos G, Kontoyiannis D. 2005.** Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resistance Updates.* 8(6), 344-358.
  32. **Chowdhary A, Kathuria S, Randhawa H, Gaur S, Klaassen C, Meis J. 2012.** Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 67, pp.362-366.
  33. **Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Sharma C, Sundar G, Singh P, Gaur S, Hagen F, Klaassen C, Meis J. 2012.** Clonal expansion and emergence of environmental multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. *PLoS One.* 7, e52871.
  34. **Chowdhary A, Sharma C, Hagen F, Meis J. 2014.** Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms. *Future Microbiol.* 9, 697–711.
  35. **Chowdhary A, Sharma C, Kathuria S, Hage, F, Meis J. 2015.** Prevalence and mechanism of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* in a referral chest hospital in Delhi, India and an update of the situation in Asia. *Front. Microbiol.* 6, 428.
  36. **Chowdhary A, Sharma C, Kathuria S, Hagen F, Meis J. 2014.** Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with the environmental TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A mutation in India. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 555–557.
  37. **Chowdhary A, Sharma C van den Boom M, Yntema J, Hagen F, Verweij P, Meis J.F. 2014.** Multi-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment in Tanzania. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014, 69 2979–2983.
  38. **Chryssanthou E. 1997.** In vitro susceptibility of respiratory isolates of *Aspergillus* species to itraconazole and amphotericin B. Acquired resistance to itraconazole. *Scand. J. Infect. Dis.* 29, 509–512.
  39. **Croft C, Culibrk L, Moore M, Tebbutt S. 2016.** Interaction of *Aspergillus fumigatus* conidia with airway epithelial cells: a critical review. *Front Microbiol.* 7(472), 1-15
  40. **da Sliva Ferreira M, Malavazi I, Savoldi M, Brakhage A, Goldman M, Kim H, Nierman W, Goldman G. 2006.** Transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to voriconazole. *Curr Genet.* 50(1), 32-44.
  41. **Dannaoui E, Borel E, Monier M, Piens M, Picot S, Persat F. 2001.** Acquired itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 333–340
  42. **Davidson A, Chen J. 2004.** ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annual Review of Biochemistry.* 73(1), 241-268.
  43. **Deng S, Zhang J, Ji Y, Verwiej P, Tsui K, Hageen F, Houbraken J, Meis J, Abliz P, Wang X, Zhao J, Liao W. 2017.** Triazole phenotypes and genotypic characterization of clinical *Aspergillus fumigatus* isolates in China. *Emerging Microbes&Infections.* 6, 1-6.
  44. **Dening D, Venkateswarluk K, Oakley K, Anderson M, Manning N, Stevens D, Warnock D, Kelly S. 1997.** Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 41(6), 1364-1268.
  45. **Dening D, Perlin D. 2011.** Azole resistance in *Aspergillus*: a growing public health menace. *Future Microbiol.* 6, 1229–1232.
  46. **Diaz-Guerra T, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela J. 2003.** A point mutation in the 14alpha-sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(3), 1071.

47. **Dirr F, Echtenacher B, Heesemann J, Hoffmann P, Ebel F, Wagener J . 2010.** AfMkk2 is required for cell wall integrity signalling, adhesion, and full virulence of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 300(7), 496-502.
48. **Escribano P, Pelaez T, Munoz P, Bouza E, Guinea J.2013.** Is azole resistance in *Aspergillus fumigatus* a problem in Spain? *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2815–2820.
49. **Escribano P, Recio S, Pelaez T, Gonzalez-Rivera M, Bouza E, Guinea J. 2012.** In vitro acquisition of secondary azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates after prolonged exposure to itraconazole: Presence of heteroresistant populations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 174–178.
50. **Fischer J, van Koningsbruggen-Rietschel S, Rietschel E, Vehreschild M, Wisplinghoff H, Kronke M, Hamprecht A, 2014.** Prevalence and molecular characterization of azole resistance in *Aspergillus spp.* Isolates from German cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1533–1536.
51. **Fuhren J, Voskuil W, Boel C, Haas P, Hagen F, Meis J, Kusters J. 2015.** High prevalence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from high-risk patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2894–2898.
52. **García-Valcárcel A, Tadeo J. 2011.** Determination of azoles in sewage sludge from Spanish wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science.* 34(11), pp.1228-1235.
53. **García-Valcárcel A, Loureiro I, Escorial C, Molero E, Tadeo J. 2015.** Uptake of azoles by lamb's lettuce (*Valerianella locusta L.*) grown in hydroponic conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 124, pp.138-146.
54. **Georgopapadakou N, Walsh T. 1996.** Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 40(2), 279-291.
55. **Gerstl B, Weidman W, Newmann A. 1948.** Pulmonary *Aspergillosis*: Report of two cases. *Annals of Internal Medicine.* 28, 662-671.
56. **Goncalves S, Souza A, Chowdhary A, Meis J, Colombo A. 2016.** Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses.* 59, 198-219.
57. **Goodall S, Lane J, Warnock D. 1984.** The diagnosis and treatment of a case of nasal *aspergillosis* in a cat. *J. Small. Anim. Pract.* 25, 627-633.
58. **Gregson L, Goodwin J, Johnson A, McEntee L, Moore C, Richardson M, Hope W, Howard S. 2013.** *In vitro* susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to isavuconazole: correlation with itraconazole, voriconazole and posaconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 57(11), 5778-5780.
59. **Hachem R, Kontoyiannis D, Chemaly R, Jiang Y, Reitzel R, Raad I. 2009.** Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1, 3)  $\beta$ -D-glucan in diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients. *Journal of Clinical Microbiology.* 47(1), 129-133.
60. **Hagiwara D, Takahashi H, Fujimoto M, Sugahara M, Misawa Y, Gono T, Itoyama S, Watanabe A, Kamei K. 2016.** Multi-azole resistant *Aspergillus fumigatus* harboring *cyp51A* TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A isolated in Japan. *J. Infect. Chemother.* 2016.
61. **Hagiwara D, Watanabe A, Kamei K, Goldman G. 2016.** Epidemiological and genomic landscape of azole resistance mechanisms in *Aspergillus* fungi. *Front. Microbiol.* 7, 1382-1389.
62. **Harmon B. 1998.** Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poult. Sci.* 77, 972-977.
63. **Henrici A. 1940.** Characteristics of fungous diseases. *Journal of Bacteriology.* 39, 113-138.
64. **Hof H. 2001.** Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(11), 2987-2990.
65. **Hope W, Walsh T, Denning D. 2005.** Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *The Lancet Infectious Diseases.* 5(10), 609-622.



66. **Howard S, Arendrup M. 2011.** Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. *Med Mycol.* 49, 90–95
67. **Howard S, Cerar D, Anderson M, Albarrag A, Fisher M, Pasqualotto A, Laverdiere M, Arendrup M, Perlin D, Denning D. 2009.** Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerging Infect. Dis.* 15, 1068–1076.
68. **Howard S, Webster I, Moore C, Gardiner R, Park S, Perlin D, Denning D. 2006.** Multi-azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 28, 197–200.
69. **Hsueh P, Lau Y, Chuang Y, Wan J, Huang W, Shyr J, Yan J, Yu K, Wu J, Ko W, et al. 2005.** Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida species*, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus species* from Taiwan: Surveillance of multicenter antimicrobial resistance in Taiwan program data from. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 512–517.
70. **Ingen J, Lee H, Zoll J, Leenstra T, Melchers W, Verweij P. 2015.** Azole, polyene and echinocandin MIC distributions for wild-type, TR34/L98H and TR46/Y121F/T289A *Aspergillus fumigatus* isolates in the Netherlands. *J. Antimicrob Chemother.* 70, 178–181.
71. **Irinyi L, Lackner M, de Hoog G, Meyer W. 2016.** DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. *Fungal Biology.* 120(2), 125–136.
72. **Jacob S, Petraitis V, Small C, Walsh T. 2017.** Orphan drugs for the treatment of aspergillosis: focus on isavuconazole. *Orphan Drugs: Research and Reviews.* 7, 37–46.
73. **Jasiński M, Ducos E, Martinoia E, Boutry M. 2003.** The ATP-binding cassette transporters: structure, function, and gene family comparison between rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131, 1169–1177.
74. **Jeurissen A, Cooreman S, Van K, Van L, Vanhove P, Lagrou K, Heytens L. 2012.** Invasive pulmonary aspergillosis due to a multi-azole resistant *Aspergillus fumigatus*. *Acta Clin. Belg.* 67, 46–48.
75. **Jingbei R, Xiangxiang J, Qian Z, Yuan Z, Dunli L, Yunlong Y. 2017.** Fungicides induced triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with mutations of TR46/Y121F/T289A and its appearance in agricultural fields. *Journal of Hazardous Materials.* 324, pp.54–60.
76. **Kahle M, Buerge I, Hauser A, Müller M, Poiger T. 2008.** Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environmental Science & Technology.* 42(19), pp.7913–7200.
77. **Kano R, Kohata E, Tateishi A, Murayama S, Hirose D, Shibata Y, Kosuge Y, Inoue H, Kamata H, Hasegawa A. 2015.** Does farm fungicide use induce azole resistance in *Aspergillus fumigatus*? *Med. Mycol.* 53, 174–177.
78. **Kathiravan M, Salake A, Chothe A, Dudhe P, Watode R, Mukta M, Gadhwe S. 2012.** The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 20(19), 5678–5698.
79. **Kauffman C. 2006.** Clinical efficacy of new antifungal agents. *Current Opinion in Microbiology.* 9(5), 483–488.
80. **Kayser F, Bienz K, Eckert J, Zinkernagel R. 2007.** Mikrobiologia Lekarska. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. s. 334–335.
81. **Kędziora K, Słomiński J, Gil K, Porzezińska M, Gorzewska A. 2008.** Invasive aspergillosis of the paranasal sinuses, lung and brain. *Pol. Pneumonol. Allergol.* 76, 400–406.
82. **Kidd S, Goeman E, Meis J, Slavin M, Verweij P. 2015.** Multi-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* infections in Australia. *Mycoses.* 58, 350–355.
83. **Kikuchi K, Watanabe A, Ito J, Oku Y, Wuren T, Taguchi H, Yarita K, Muraosa Y, Yahiro M, Yaguchi T. 2014.** Antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates collected from various areas in Japan. *J. Infect. Chemother.* 20, 336–338.

84. **Klich M. 2006.** Identification of clinically relevant aspergilli. *Med. Mycol.* 59,39-46.
85. **Klika E, Scheuermann D, de Groodt-Lasseel M, Bazantova I, Switka A. 1996.** Pulmonary macrophages in birds (barn owl, *Tyto Tyto alba*), domestic fowl (*Gallus gallus f. domestica*), quail (*Coturnix*) and pigeons (*Columbia livia*). *Anat. Rec.* 246, 87-97.
86. **Kousha M, Tadi R, Soubani A. 2011.** Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *European Respiratory Review.* 20(121), 156-174.
87. **Kozel T, Wickes B. 2014.** Fungal Diagnostics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(4), a019299.
88. **Krishnan K, Feng X, Powers-Fletcher M, Bick G, Richie D, Woollett L, Askew D. 2013.** Effects of a defective endoplasmic reticulum associated degradation pathway on the stress response, virulence, and antifungal drug susceptibility of the mold pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell.* 12(4), 512-519.
89. **Krishnan S, Manavathu E, Chandrasekar P. 2009.** *Aspergillus flavus*: An emerging non-*fumigatus* *Aspergillus* species of significance. *Mycoses* 52, 206–222.
90. **Krzyściak P, Macura A, Skóra M. 2011.** *Atlas grzybów chorobotwórczych człowieka*. MedPharm Polska.
91. **Kurzyk E, Nawrot U, Mroczyńska M, Włodarczyk K, Ussowicz, Zdziarski P, Arendrup M, Brillowska-Dąbrowska A. 2015.** Detection of clinical *Aspergillus fumigatus* isolates resistant to triazoles. 7th Trends in Medical Mycology, Lizbona, *Mycoses.* 53 – 54.
92. **La Pape P, Lavergne R, Morio F, Alvarez C. 2015.** Description of multiple fungicide driven alterations in azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Colombia, South America. *Emerg Infect Dis.* 21–22:30–40.
93. **Lamb D, Kelly D, Kelly S. 1999.** Molecular aspects of azole antifungal action and resistance. *Drug Resistance Updates.* 2(6), 390-402.
94. **Lamoth F, Juvvadi P, Soderblom E, Moseley M, Asfaw Y, Steinbach W. 2014.** Identification of a key lysine residue in heat shock protein 90 required for azole and echinocandin resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 58(4), 1889-1896.
95. **Lane J, Clayton D, Thoday K, Thomsett L. 1974.** The diagnosis and successful treatment of *Aspergillus fumigates* infection of the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. *Journal of Small Animal Practice.* 15(2), 79-87.
96. **Lavergne R, Morio F, Favennec L, Dominique S, Meis J, Gargala G, Verweij P, Le Pape P. 2015.** First description of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A mutation in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, 59, 4331–4335.
97. **Lelivre L, Groh M, Angebault C, Maherault A, Didier E, Bougnoux M. 2013.** Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: an emerging problem. *Med. Mal. Infect.* 43, 139-145.
98. **Lepage O, Perron M, Cadore J. 2004.** The mystery of fungal infection in the guttural pouches. *Vet. J.* 68, 60-64.
99. **Lepesheva G, Hargrove T, Kleshchenko Y, Nes W, Villalta F, Waterman M. 2008.** CYP51: A major drug target in the cytochrome P450 superfamily. *Lipids.* 43(12), 1117-1125.
100. **Lescar J, Meyer I, Akshita K, Srinivasaraghavan K, Verma C, Palous M, Mazier D, Datry A, Fekkar A. 2014.** *Aspergillus fumigatus* harbouring the sole Y121F mutation shows decreased susceptibility to voriconazole but maintained susceptibility to itraconazole and posaconazole. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 3244–3247.
101. **Latgé, J. 1999.** *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 12(2), 310-350.
102. **Li J, Nguyen C, Garcia-Diaz J. 2015.** Role of new antifungal agents in the treatment of invasive fungal infections in transplant recipients: isavuconazole and new posaconazole formulations. *Journal of Fungi.* 1(3), pp.345-366.



103. **Liu W, Sun Y, Chen W, Liu W, Wan Z, Bu D, Li R. 2012.** The T788G mutation in the *cyp51C* gene confers voriconazole resistance in *Aspergillus flavus* causing aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2598–2603.
104. **Lockhar S. 2015.** Azole resistance in the Americas: Not catching up with Europe (yet). In *Proceedings of the 7<sup>th</sup> Trends in Medical Mycology*, Lisbon, Portugal, 9–12 October 2015; Volume 58, p. 20.
105. **Lockhart S, Frade J, Etienne K, Pfaller M, Diekema D, Balajee S. 2011.** Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the *cyp51A* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 55(9), pp.4465–4468.
106. **Malinowska E, Jankowski K, Wyrębek H, Truba M. 2015.** Struktura sprzedaży i zużycia środków ochrony roślin w Polsce w latach 2000–2012. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach Seria Administracja i Zarządzanie.* 104, pp.173–185.
107. **Manavathu E, Espinel-Ingroff A, Alangaden G, Chandrasekar P. 2003.** Molecular studies on voriconazole resistance in a clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. In *proceedings of 43<sup>rd</sup> Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Chicago, IL, USA, 14–17 September, 2003.
108. **Mani A, Rahwan I, Pentland A. 2013.** Inducing peer pressure to promote cooperation. *Scientific Reports.* 3(1735), pp.1–9.
109. **Mayr A., Lass-Flörl C. 2011.** Epidemiology and antifungal resistance in invasive Aspergillosis according to primary disease: review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* 16, 153–157.
110. **Mazurski J. 2009.** Statystyczna analiza wyników doświadczalnych. *Wydawnictwo Malmut.*
111. **Meis J, Chowdhary A, Rhodes J, Fisher M, Verweij P. 2016.** Clinical implication of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Biological Sciences. Phil. Trans. R. Soc. B.* 371, 1–10.
112. **Mellado E, Diaz-Guerra T, Cuenca-Estrella M, Rordiguez-Tudela J. 2001.** Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin. Microbiol.* 39(7), 2431–2438.
113. **Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fouli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela J. 2004.** Substitutions at methionine 220 in the 14 $\alpha$ -sterol demethylase (*Cyp51A*) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(7), 2747–2750.
114. **Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers W, Verweij P, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela J. 2007.** A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 51(6), 1897–1904.
115. **Micheli P. 1976.** Nova planetarium genera: *iuxta* Tournefortii methodum disposita. *Florence: Bernardi Paperinii.* 1729.
116. **Mohammadi F, Hashemi S, Zoll J, Melchers W, Rafati H, Dehghan P, Rezaie S, Toloee A, Tamadon Y, van der Lee H. et al. 2015.** Quantitative analysis of single-nucleotide polymorphism for rapid detection of TR<sub>34</sub>. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 387–392.
117. **Montesinos I, Dodemont M, Lagrou K, Jacobs F, Etienne I, Denis O. 2014.** New case of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation in Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 3439–3440.
118. **Mortensen K, Jensen R, Johansen H, Skov M, Pressler T, Howard S, Leatherbarrow H, Mellado E, Arendrup M. 2011.** *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: A laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2243–2251.

119. **Mortensen K, Mellado E, Lass-Flörl C, Rodríguez-Tudela J, Johansen H, Arendrup M. 2010.** Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* in Austria, Denmark and Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(11), 4545-4549.
120. **Mosquera J, Denning D. 2002.** Azole cross-resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 556–557.
121. **Moye-Rowley W. 2015.** Multiple mechanisms contribute to the development of clinical significant azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Frontier in Microbiology.* 6, 70, 1-6.
122. **Nascimento A, Goldman G, Park S, Marras S, Delmas G, Oza U, Lolans K, Dudley M, Mann P, Perlin D. 2003.** Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(5), 1719-1726.
123. **Nawrot U, Kurzyk E, Arendrup M, Mroczyńska M, Włodarczyk K, Sulik-Tyszka B, Wróblewska M, Ussowicz M, Zdziarski P, Niewińska K, Brillowska-Dąbrowska A. 2018.** Detection of Polish clinical *Aspergillus fumigatus* isolates resistant to triazoles. *Med. Mycol.* 56(1), 212-124.
124. **Ngo H, Garneau-Tsodikova S, Green K. 2016.** A complex game of hide and seek: the search for new antifungals. *Med Chem Comm.* 7(7), pp.1285-1306.
125. **Nowicka U, Wiatr E, Jakubowska L, Polubiec-Kownacka M. 2011.** Alergiczna aspergiloza oskrzelowo-płucna imitująca guz płuca u chorej bez astmy oskrzelowej — opis przypadku.” *Via Medica, Pneumonol. Alergol. Pol.* 80(1), 77–81
126. **Odds F, Brown A, Gow N. 2003.** Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology.* 11(6), 272-279.
127. **Ozhak-Baysan B, Alastruey-Izquierdo A, Saba R, Ogunc D, Ongut G, Timuragaoglu A, Arslan G, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela J. 2010.** *Aspergillus alliaceus* and *Aspergillus flavus* co-infection in an acute myeloid leukemia patient. *Med. Mycol.* 48, 995–999.
128. **Ozmerdiven G, Ak S, Ener B. 2015.** First determination of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR<sub>34</sub>L98H mutations in Turkey. *J. Infect. Chemother.* 21, 581-586.
129. **O'Neill J. 2015.** Antimicrobials in agriculture and the environment. Reducing unnecessary use and waste. *The review on antimicrobial resistance tackling drug-resistant infections globally.* 2015.
130. **Panackal A, Parisini E, Proschan M. 2014.** Salvage combination antifungal therapy for acute invasive aspergillosis may improve outcomes: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases.* 28, pp.80-94.
131. **Patterson K, Strek M. 2010.** Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Proceedings of the American Thoracic Society.* 7(3), 237-244.
132. **Paul R, Rudramurthy S, Meis, J, Mouton J, Chakrabarti A. 2015.** A novel Y319H substitution in *cyp51C* associated with azole resistance in *Aspergillus flavus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 59, 6615–6619.
133. **Paul S, Diekema D, Moye-Rowley W. 2016.** Contributions of both ATP-binding cassette transporter and CYP51A proteins are essential for azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 61(5), 02748-02762.
134. **Paulsen I, Brown M, Skurray R. 1996.** Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews.* 60(4), 575-608.
135. **Pelaez T, Gijon P, Bunsow E, Bouza E, Sanchez-Yerba W, Valerio M, Gama B, Cuenca-Estrella M, Mellado E. 2012.** Resistance to voriconazole due to a G448S substitution in *Aspergillus fumigatus* in a patient with cerebral aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2531-2534.
136. **Pelaez T, Monteiro M, Garcia-Rubio R, Bouza E, Gomez-Lopez A, Mellado E. 2015.** First detection of *Aspergillus fumigatus* azole-resistant strain due to *cyp51A* TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A in an azole-naïve patient in Spain. *New Microbes. New Infect.* 6, 33–34.



137. **Perlin D, Shor E, Zhao Y. 2015.** Update on Antifungal Drug Resistance. *Current Clinical Microbiology Reports*. 2(2), 84-95. **Perveen I, Sehar S, Naz I, Ahmed S. 2016.** Prospective evaluation of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* clinical isolates in Pakistan. In *Proceedings of 7th Advances Against Aspergillosis*, Manchester, UK, 3–5 March 2016.
138. **Pfaffl M. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9), 203-207.
139. **Pfaller M, Messer S, Rhomberg P, Jones R, Castabheira M. 2013.** *In vitro* activities of isavuconazole and comparator antifungal agents tested against a global collection of opportunistic yeasts and molds. *Journal of Clinical Microbiology*. 51(8), 2608-2616.
140. **Podust L, Poulos T, Waterman M. 2001.** Crystal structure of cytochrome P450 14alpha -sterol demethylase (*CYP51*) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(6), 3068-3073.
141. **Prigitano A, Venier V, Cogliati M, De Lorenzis G, Esposito M, Tortorano A. 2014.** Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment of northern Italy, May 2011 to June 2012. *Euro Surveill.* 19, 20747.
142. **Qiao J, Liu W, Li R. 2010.** Truncated *Afyap1* attenuates antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to voriconazole and confers adaptation of the fungus to oxidative stress. *Mycopathologia.* 170(3), 155-160.
143. **Rajendran R, Mowat E, McCutchoch E, Lappin D, Jones B, Lang S, Majithiya J, Warn P, Williams C, Ramage G. 2011.** Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2092-2097.
144. **Rath P, Buchheidt D, Spiess B, Arfanis E, Buer J, Steinmann J. 2012.** First reported case of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to the TR<sub>34</sub>/L98H mutation in Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 6060–6061.
145. **Rocchi S, Daguindau E, Grenouillet F, Deconinck E, Bellanger A, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, Reboux G, Millon L. 2014.** Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolate with the TR<sub>34</sub>/L98H mutation in both a fungicide sprayed field and the lung of a hematopoietic stem cell transplant recipient with invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1724–1726.
146. **Rodriguez-Tudela J, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Cuenca-Estrella M. 2008.** Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2468-2472.
147. **Rodriguez-Tudela J, Donnelly J, Arendrup M, Arikan S, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, Denning D, Fegeler W, Gaustad P, Lass-Flörl C, Moore C, Richardson M, Schmalreck A, Velegraki A, Verweij P. 2008.** Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect.* 14, 982–984.
148. **Ramakrishnan J, Rathore S, Raman T. 2016.** Review on fungal enzyme inhibitors – potential drug targets to manage human fungal infection. *The Royal Society of Chemistry Advances.* 6(48), pp.42387-42401.
149. **Rath P, Buchheidt D, Spiess B, Arfanis E, Buer J, Steinmann J. 2012.** First reported case of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to the TR/L98H mutation in Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 6060–6061.
150. **Ren J, Jin X, Zhang Q, Zheng Y, Lin Y, Yu Y. 2017.** Fungicides induced triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with mutations of TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A and its appearance in agricultural fields. *J. Hazard. Mater.* 326, 54-60.

151. **Rivero-Menendez O, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. 2016.** Triazole resistance in *Aspergillus spp.*: a worldwide problem? *Journal of Fungi*. 2(3).
152. **Rocchi S, Daguindau E, Grenouillet F, Deconinck E, Bellanger A, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, Reboux G, Millon L. 2014.** Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolate with the TR34/ L98H mutation in both a fungicide-sprayed field and the lung of a hematopoietic stem cell transplant recipient with invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 52(5), pp.1724-1726.
153. **Sanglard D. 2016.** Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Front. Med.* 3:11, 1-10
154. **Sarfati J, Jensen H, Letage J. 1996.** Route of infections in bovine aspergillosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 34, 379-383.
155. **Seyedmousavi S, Brüggemann R, Melchers W, Rijs A, Verweij P, Mouton J. 2013.** Efficacy and pharmacodynamics of voriconazole combined with anidulafungin in azole-resistant invasive aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68, pp.385-393.
156. **Shapiro R, Robbins N, Cowen L. 2011.** Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), 213-267.
157. **Sharma C, Hagen F, Moroti R, Meis J, Chowdhary A. 2015.** Triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* harbouring G54 mutation: Is it de novo or environmentally acquired? *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2015.
158. **Shyadehi A, Lamb D, Kelly S, Kelly D, Schunck W, Wright J. 1996.** The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14 alpha-demethylase of *Candida albicans* (other names are: lanosterol 14 alphademethylase P-45014DM, and CYP51). *J Biol Chem*. 271, 12445-12450.
159. **Slaven J, Anderson M, Singlard D, Dixon G, Bille J, Roberts I, Dening D. 2002.** Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene *atrF* in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal. Genet. Biol.* 36, 199-206.
160. **Snelders E, Rijs A, Kema G, Melchers W, Verweij P. 2009.** Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(12), 4053-4057.
161. **Snelders E, Karawajczyk A, Verhoeven R, Venselaar H, Schaftenaar G, Verweij P, Melchers W. 2011.** The structure–function relationship of the *Aspergillus fumigatus* *cyp51A* L98H conversion by site-directed mutagenesis: The mechanism of L98H azole resistance. *Fungal Genetics and Biology*. 48(11), 1062-1070.
162. **Snelders E, Camps S, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Kema G, Van der Lee H, Klaassen C, Melchers W, Verweij P. 2012.** Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One*. 7(3) 1-15.
163. **Snelders E, van der Lee H, Kuijpers J, Rijs A, Varga J, Samson R, Mellado E, Donders A, Melchers W, Verweij P. 2008.** Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med.* 5, e219.
164. **Steinmann J, Hamprecht A, Vehreschild M, Cornely O, Buchheidt D, Spiess B, Koldehoff M, Buer J, Meis J, Rath P. 2015.** Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1522–1526.
165. **Sulik-Tyszka B, Cieřlik J, Snarski E, Waszczuk-Gajda A, Wróblewska M. 2016.** Aktywność *in vitro* izawukonazolu wobec klinicznych szczepów z rodzaju *Candida* i *Aspergillus*. *Forum Zakazeń*. 7(3), pp.135-139.
166. **Soubani A, Chandrasekar P. 2002.** The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *CHEST Journal*, 121(6), 1988-1999.



167. **Stanestu A, Ochiuz L, Cojocar I, Popovici I, Lupuleasa D. 2010.** The influence of different polymers on the pharmaco-technological characteristics of propiconazole nitrate bioadhesive oromucosal tablets. *Farmacia*. 58(3), 279-283.
168. **Stensvold C, Jørgensen L, Arendrup M. 2012.** Azole-resistant invasive aspergillosis: relationship to agriculture. *Current Fungal Infection Reports*. 6(3), 178-191.
169. **Sugui J, Kwon-Chung H, Juvvadi P, Letage P, Steinbach W. 2015.** *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.* 5, 1-17.
170. **Taccone F, Able V, Bulpa A, Misset P, Meersseman W, Cordaso T. 2015.** Epidemiology of invasive aspergillosis in critical ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit. Care*. 19, 7.
171. **Tell L. 2005.** *Aspergillosis* in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Medical Mycology*. 43, 71-73.
172. **Tobin M, Peery R, Skatril L. 1997.** Genes encoding multiple drug resistance-like proteins in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Gene*, 200, 11-23.
173. **Toyotome T, Fujiwara T, Kida H, Matsumoto M, Wada T, Komatsu R. 2016.** Susceptibility to azoles in clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and *A. tubingensis* from Obihiro, Japan. In *Proceedings of 7th Advances Against Aspergillosis*, Manchester, UK, 3-5 March 2016.
174. **Trösken E, Bittner N, Völkel W. 2005.** Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1083(1-2), pp.113-119.
175. **Tyburski J, Studzińska A, Daca P, Tretyn A. 2008.** PCR w czasie rzeczywistym. Metody analiz danych. *Biotechnologia*. 1(80), 86-96.
176. **Wahl E, Erickson M. 1928.** Primary pulmonary *Aspergillosis*. *Journal of the Medical Association of Georgia*. 17, 341-348.
177. **Wang D, Gricourt M, Arne P, Thierry S, Seguin D, Chermette R, Huang W, Dannaoui E, Botterel F, Guillot J. 2014.** Mutations in the *Cyp51A* gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* isolated from avian farms in France and China. *Poult. Sci.* 93, 12-15.
178. **Wei X, Zhang Y, Lu L. 2015.** The molecular mechanism of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: from bedside to bench and back. *Journal of Microbiology*. 53(2), 91-99.
179. **White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR – Protocols and Applications*. pp. 315-322.
180. **Wiederhold N, Garcia G, Lindner J. 2015.** Evaluation of Cyp51A mechanisms of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the United States. *Mycoses*. 58.
181. **Wiederhold N, Gil V, Gutierrez F, Lindner J, Albataineh M, McCarthy D, Sanders C, Fan H, Fothergill A, Sutton D. 2016.** First detection of TR<sub>34</sub>/L98H and TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A *cyp51* mutations in *Aspergillus fumigatus* isolates in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 2016, 54, 168-171.
182. **Willger S, Puttikamonkul S, Kim K, Burritt J, Grahl N, Metzler L, Barbuch R, Bard M, Lawrence C, Cramer R. 2008.** A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLOS Pathog.* 4, e1000200
183. **Wu C, Wang H, Lee J, Lo H, Dai C, Chou P, Ko W, Chen Y. 2015.** Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates carrying TR34/L98H mutations in Taiwan. *Mycoses*. 58.
184. **Valiante V, Macheleidt J, Föge M, Brakhage A. 2015.** The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Frontiers in Microbiology*. 16, 6- 32

185. **Valsecchi I, Mellado E, Beauo R, Raj S, Letage J. 2015.** Fitness studies of azole-resistant strains of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(12), 7866-7869.
186. **van der Linden J, Snelders E, Kampinga G, Rijnders B, Mattsson E, Debets-Ossenkopp Y, Kuijper E, Van Tiel F, Melchers W, Verweij P. 2011.** Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007–2009. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1846–1854.
187. **Van der Linden J, Arendrup M, Warris A, Lagrou K, Pelloux H, Hauser P, Chryssanthou E, Mellado E, Kidd S, Tortorano A, Dannaoui E, Gaustad P, Baddley J, Uekötter A, Lass-Flörl C, Klimko N, Moore C, Denning D, Pasqualotto A, Kibbler C, Arikian-Akdagli S, Andes D, Meletiadis J, Naumiuk L, Nucci M, Melchers W, Verweij P. 2015.** Prospective Multicenter International Surveillance of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerging Infectious Diseases.* 21, 6, 1041-1044.
188. **Van der Linden J, Camps S, Kampinga G, Arends J, Debets-Ossenkopp Y, Haas P, Rijnders B, Kuijper E, van Tiel F, Varga J. 2013.** Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin. Infect. Dis.* 57, 513-520.
189. **van Ingen J, van der Lee H, Rijs T, Zoll J, Leenstra T, Melchers W, Verweij P. 2015.** Azole, polyene and echinocandin MIC distributions for wild-type, TR<sub>34</sub>/L98H and TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A *Aspergillus fumigatus* isolates in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 178–181.
190. **Vazquez J, Manavathu K. 2016.** Molecular Characterization of a Voriconazole-Resistant, Posaconazole-Susceptible *Aspergillus fumigatus* Isolate in a Lung Transplant Recipient in the United States. *AAC.* 60: 2. 1129-1134.
191. **Vermeulen E, Lagrou K, Verweij P. 2013.** Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a growing public health concern. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 26, 493–500.
192. **Vermeulen E, Maertens J, De Bel A. 2015.** Nationwide surveillance of azole resistance in *Aspergillus* diseases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 4569-4576.
193. **Vermeulen E, Maertens J, Schoemans H, Lagrou K. 2012.** Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A mutation emerging in Belgium, July 2012. *Euro. Surveill.* 17, pii20326.
194. **Verweij P, Dorsthorst D, Rijs A, de Vries-Hospers H, Meis J. 2002.** Nationwide survey of in vitro activities of itraconazole and voriconazole against clinical *Aspergillus fumigatus* isolated cultured between 1945 and 1998. *Journal of Clinical Microbiology.* 40(7), 2648-2650.
195. **Verweij P, Latage P, Rijs A, Pauw P, Hoogkamp-Korstanje J, Meis J. 1995.** Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.* 33(12) 3150-3153.
196. **Verweij P, Mellado E, Melchers W. 2007.** Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N.Eng. J. Med.* 356.1481-1483.
197. **Verweij P, Snelders E, Kema G, Mellado E, Melchers W. 2009.** Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *The Lancet Infectious Diseases.* 9(12) pp.789-795.
198. **Verweij P, Chowdhary A, Melchers W, Meis J. 2016.** Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? *CID.* 62, 1-7.
199. **Xiao L, Madison V, Chau A, Loebenberg D, Palermo R, McNicholas P. 2004.** Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 $\alpha$ -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48(2), 568-574.
200. **Xiong Q, Hassan S, Wilson W, Han X, May G, Tarrand J, Matsuda S. 2005.** Cholesterol import by *Aspergillus fumigatus* and its influence on antifungal potency



- of sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(2), 518-524.
201. **Zhang M, Feng C, Chein F, He Q, Su Q, Shi Y. 2017.** Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* clinical isolates obtained in Nanjing, China. *Chinese Medical Journal*. 20(6), 665-668.
202. **Zhang J, Snelders E, Zwaan B, Schoustra S, Meis J, van Dijk K, Hagen F, van der Beek M, Kampinga G, Zoll J, Melchers W, Verweij P, Debets A. 2017.** A novel environmental azole resistant mutation in *Aspergillus fumigatus* and a possible role of sexual reproduction in its emergence. *American Society for Microbiology*. 8(3)00791-17.
203. **Zhao Y, Stensvold C, Perlin D, Arendrup M. 2013.** Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* from bronchoalveolar lavage fluid samples of patients with chronic diseases. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1497–1504.
204. **Ziółkowska G, Tokarzewski S, Nowakiewicz A. 2014.** Drug resistance of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from flocks of domestic geese in Poland. *Poultry Science*. 93(5), pp.1106-1112.
205. **Zonderland J, Strok C, Saunders J. 2002.** Intranasal infusion of enilconazole for treatment of sinonasal aspergillosis in dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221, 1421-1425.

## WYKAZ DOROBKU NAUKOWEGO

### Publikacje w czasopismach wyróżnionych w JCR:

- Nawrot U.,\* **Kurzyk E.**,\* Arendrup MC., Mroczyńska M., Włodarczyk K., Sulik-Tyszka B., Wróblewska M., Ussowicz M., Zdziarski P., Niewińska K., Brillowska-Dąbrowska A.: „Detection of Polish clinical *Aspergillus fumigatus* isolates resistant to triazoles” *Medical Mycology*, vol. 1, iss 56, str. 121-124. 2018. IF=1,979  
\*- pierwszy autor
- Nawrot U., Sulik-Tyszka B., **Kurzyk E.**, Mroczyńska M., Włodarczyk K., Wróblewska M., Basak G., Brillowska-Dąbrowska A.: „Relation of the polymorphism of CYP51A sequence and the susceptibility of *Aspergillus fumigatus* isolates to triazoles determined by commercial gradient test (Etest) and by reference methods” *Acta Biochimica Polonica*, vol 64, nr. 4, str. 631-634. 2017
- Kobylak N., Bykowska B., **Kurzyk E.**, Nowicki R., Brillowska-Dąbrowska A.: „PCR and Real-time PCR approaches to the identification of *Arthroderma otae* species *Microsporium canis* and *Microsporium audouinii*/*Microsporium ferrugineum*” *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology*, vol. 30, iss. 10. Str. 1819-1822. 2016. IF= 3,528
- Brillowska-Dąbrowska A., Mroczyńska M., Nawrot U., Włodarczyk K., **Kurzyk E.**: „Examination of CYP51A and CYP51B expression level of the first Polish azole resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolate” w *Acta Biochimica Polonica*. Vol 62., nr 4, str. 837-839. 2015. IF= 1,595
- Szweda P., Gucwa K., **Kurzyk E.**, Romanowska E., Dzierżanowska-Fangrat K., Zielińska-Jurek A., Kuś P., Milewski S.: “Essential Oils, Silver Nanoparticles and Propolis as Alternative Agents Against Fluconazole Resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* Clinical Isolates.” *Indian Journal Of Microbiology*. - Vol. 55., iss. 2 s.175-183, 2015 IF= 0,832
- Brillowska-Dąbrowska A., **Michalek E.**, Saunte DM., Nielsen SS., Arendrup MC.: “PCR test for *Microsporium canis* identification.” *Medical Mycology*, vol 51, nr 6, 2013 str:576-9, 2013. IF=1,979

### Inne publikacje:

- Nawrot U., **Kurzyk E.**, Włodarczyk K., Ussowicz M., Arendrup MC., Brillowska-Dąbrowska A.: „The first report of azole resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolate. *Acta Biochimica Polonica*, Materiały Pokonferencyjne 6<sup>th</sup> International Weigl Conference on Microbiology. Str. 104. 2015.
- **Kurzyk E.**: „Ogólna charakterystyka biofilmu drożdży z rodzaju *Candida*.” *Dokowania Młodych Naukowców* nr 5, s. 264-265, 2014



- **Kurzyk E.:** „Budowa biofilmu chorobotwórczych drożdży i jego wpływ na oporność.” *Dokowania Młodych Naukowców* nr 5 s. 266-267, 2014

#### Prezentacje ustne na konferencjach:

- **Kurzyk E.,** „Oporność izolatów *Aspergillus fumigatus* na izawukonazol” Ogólnopolska Konferencja Biotechnologów i Mikrobiologów BioMillenium 2017, Gdańsk 6-8 wrzesień 2017.
- **Kurzyk E.:** „*Quorum sensing* – rola w patogenezie drożdży *Candida*. Wpływ Młodych Naukowców na osiągnięcia Polskiej Nauk, VI Edycja, Gdańsk 25.04.2014

#### Plakaty na konferencjach:

- Nawrot U., Wieliczko A., **Kurzyk E.,** Brillowska-Dąbrowska A.: „Low frequency of itraconazole resistance fund among avian *Aspergillus fumigatus* isolates” 8<sup>th</sup> Trends in Medical Mycology, Mycoses. Serbia, 06-09.10.2017.
- **Kurzyk E.,** Mroczyńska M., Nawrot U., Włodarczyk K., Brillowska-Dąbrowska A.: „Oporność izolatów *Aspergillus fumigatus* na azole” XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Bydgoszcz 25-27.09.2016
- **Kurzyk E.,** Nawrot U., Włodarczyk K., Brillowska-Dąbrowska A.: „Występowanie tandemowych powtórzeń (TR<sub>34</sub>) w rejonie promotora genu *CYP51A* oraz mutacji w tym genie jako czynników predysponujących do oporności na azole wśród izolatów *Aspergillus fumigatus*” II Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka – Drobnoustroje oportunistyczne” Bydgoszcz 21-22.05.2016. – **praca wyróżniona I miejscem w sesji plakatowej**
- Mroczyńska M., **Kurzyk E.,** Brillowska-Dąbrowska A., Gucwa K., Szweda P.: Genotypowanie klinicznych izolatów *Candida albicans* metodą MP PCR” II Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka – Drobnoustroje oportunistyczne” Bydgoszcz 21-22.05.2016.
- **Kurzyk E.,** Mroczyńska M., Nawrot U., Włodarczyk K., Brillowska-Dąbrowska A.: „Czy istnieje konieczność oznaczania oporności na azole dla szczepów *Aspergillus fumigatus* izolowanych w Polsce?” BioMedSession, Gdańsk 12.12.2015
- **Kurzyk E.,** Nawrot U., Mroczyńska M., Włodarczyk K., Ussowicz M., Zdziarski P., Arendrup MC., Brillowska-Dąbrowska A.: Detection of clinical *Aspergillus fumigatus* isolates resistant to triazoles. 7th Trends in Medical Mycology. Vol. 58 Supplement S4. P006. str. 53-54. Lizbona 9-12 październik 2015
- Nawrot U., **Kurzyk E.,** Włodarczyk K., Ussowicz M., Arendrup MC., Brillowska-Dąbrowska A.: The first Polish report of azole resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolate. 6th International Weigl Conference on Microbiology. Acta Biochemica Polonica. Vol. 62 Supplement 2/2015. V.P.38. str. 104. Gdańsk, 8-10 lipiec 2015



- **Kurzyk E.**, Kadzewicz K., Romanowska E., Dzierżanowska-Fangrat K., Brillowska-Dąbrowska A., Szweđa P.: „Genotypowanie klinicznych izolatów *Candida krusi*. ” I Ogólnopolska Konferencja "Drobnoustroje oportunistyczne" Bydgoszcz 18-20 wrzesień 2014

#### **Uczestnictwo w konferencjach:**

- Ogólnopolska Konferencja Biotechnologów i Mikrobiologów „BioMillenium 2017”, Gdańsk 6-8 wrzesień 2017
- XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Bydgoszcz 25-27 wrzesień 2016
- II Ogólnopolska Konferencja „Drobnoustroje w świecie człowieka – Drobnoustroje oportunistyczne” Bydgoszcz 21-22 maj 2016.
- I Konferencja Doktorantów Pomorza „BioMedSession”, Gdańsk 12 grudnia 2015
- 7th Trends in Medical Mycology. Lizbona 9-12 październik 2015
- 6th International Weigl Conference on Microbiology. 8-10 lipiec 2015
- I Ogólnopolska Konferencja "Drobnoustroje oportunistyczne" Bydgoszcz 18-20 wrzesień 2014
- Wpływ Młodych Naukowców na osiągnięcia Polskiej Nauk, VI Edycja, Gdańsk 25 kwiecień 2014

#### **Stypendia i nagrody:**

- Stypendium z funduszu własnego Rektora Politechniki Gdańskiej dla najlepszych doktorantów – 2016/2017
- Stypendium z dotacji projakościowej – 2014/2015
- Stypendium z dotacji projakościowej – 2013/2014
- Stypendium w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” (projekt „InterPhD”) dla najlepszych doktorantów – 2013/2014