

Powszechny i szybki rozwój nowoczesnych technologii medycznych, chociaż jest niezmiernie istotny dla całego społeczeństwa, niestety zwiększa również liczbę osób, u których system odpornościowy nie działa prawidłowo. Może to być skutkiem długotrwałej intensywnej terapii i inwazyjnych praktyk leczniczych związanych z zabiegami chirurgicznymi lub też może stanowić efekt stosowania żywienia pozajelitowego, cewników dożylnych i wentylacji mechanicznej lub długoterminowego aplikowania antybiotykoterapii. Pacjenci o osłabionej odporności stają się bardziej podatni na infekcje wywołane przez patogeny oportunistyczne, w tym mikroorganizmy należące do mikroflory fizjologicznej lub zasiedlające organizm człowieka bez żadnych szkodliwych objawów. Jednakże osłabienie odporności organizmu lub zaburzenie równowagi składu mikroflory może stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia lub życia pacjenta. Do tej grupy mikroorganizmów oportunistycznych wlicza się około dwudziestu gatunków grzybów należących do rodzaju *Candida*, które mogą być chorobotwórcze dla ludzi o osłabionej odporności.

Drożdże z rodzaju *Candida* mogą być odpowiedzialne za poważne choroby ogólnoustrojowe o śmiertelności w granicach 30-40%, ale są też przyczyną rozległych, uciążliwych i nawracających zakażeń powierzchniowych, charakteryzujących się dużą zachorowalnością, częstym występowaniem, znaczną uciążliwością i wpływem na obniżenie jakości życia. Te powierzchniowe infekcje są zlokalizowane w różnych niszach organizmu gospodarza, w tym w jamie ustnej i przewodzie pokarmowym lub w układzie rozrodczym i wiążą się z wytwarzaniem biofilmów przez te grzyby. *C. albicans* jest gatunkiem odpowiedzialnym za około 50% chorób wywołanych przez drożdżaki na świecie; jednakże częstość diagnozowanych zakażeń wywołanych przez inne patogeny z tego rodzaju—gatunki *Candida* inne niż *albicans* (NAC)—stale rośnie i jest niepokojąca ze względu na ich różne mechanizmy patogenności i występującą oporność na stosowane leki przeciwgrzybicze, w tym flukonazol, itrakonazol, worykonazol, nystatynę czy kaspofunginę.

Patogeneza rozwoju kandydozy na skórze i błonach śluzowych jest związana z zaburzeniami równowagi mikrobiologicznej, której podstawą są skomplikowane oddziaływania pomiędzy komórkami grzybów różnych gatunków i licznymi gatunkami bakterii, które współistnieją w określonych miejscach organizmu człowieka. Ten brak równowagi biologicznej jest szczególnie związany z niewystarczającym wzrostem bakterii probiotycznych z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, co skutkuje nadmiernym wzrostem grzybów, wytwarzaniem przez nie biofilmów i produkcją czynników wirulencji zaangażowanych w późniejszą inwazję drożdżaków na tkanki gospodarza. Jednym z ważnych mechanizmów fizjologii komórek grzybów i bakterii jest wytwarzanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych - małych struktur o wymiarach 30-300 nm otoczonych dwuwarstwą lipidową, w których znajdują się białka, węglowodany, kwasy nukleinowe oraz związki niskocząsteczkowe wydzielane zewnątrzkomórkowo. Te pęcherzyki mogą być zaangażowane w wirulencję patogenów i komunikację między mikroorganizmami.

Szczególnie ważnym i nowym problemem badawczym jest sprawdzenie wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wytwarzanych przez bakterie probiotyczne na biofilmy *Candida*, a także zbadanie w jaki sposób pęcherzyki wytwarzane przez jeden gatunek *Candida* mogą wpływać na biofilmy wytwarzane przez inne gatunki tych grzybów. Możliwa jest zarówno konkurencja, jak również współdziałanie pomiędzy poszczególnymi gatunkami. Dane uzyskane w trakcie realizacji projektu mogą stanowić przyczynek do obiecującego uzupełnienia terapii przeciwgrzybiczych i do wykorzystywania substancji aktywnych zawartych w pęcherzykach i chronionych przed czynnikami zewnętrznymi we wspomaganiu leczenia kandydoz. Zastosowanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych bakterii prozdrowotnych może być nowością nie tylko w medycynie, ale także w przemyśle. Dlatego głównym celem proponowanych badań jest charakterystyka udziału grzybiczych i bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w procesie tworzenia biofilmu przez drożdżaki *Candida* oraz identyfikacja molekularnych mechanizmów tego zjawiska.

Badania zostaną przeprowadzone w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem różnych gatunków *Candida* i różnych szczepów bakterii probiotycznych wybranych z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wytwarzane przez te mikroorganizmy zostaną pozyskane przez ultrawirowanie zągęszczonych nadsączy zebranych po hodowli grzybów lub bakterii w różnych pożywkach hodowlanych. Zawartość pęcherzyków zostanie scharakteryzowana z wykorzystaniem szerokiego spektrum metod spektrofotometrycznych i fluorometrycznych oraz poprzez identyfikację poszczególnych białek za pomocą spektrometrii mas. Następnie z zastosowaniem analizy ekspresji genów zostanie zbadany mechanizm wpływu pęcherzyków wytwarzanych przez drożdże *Candida* lub przez wybrane gatunki bakterii probiotycznych na proces formowania biofilmów przez różne gatunki *Candida*. Sprawdzone zostanie również wpływ pęcherzyków bakteryjnych i grzybiczych na oporność biofilmu na leki przeciwgrzybicze, w tym flukonazol, nystatynę i kaspofunginę. Ponadto będzie przeprowadzona analiza oddziaływania i wiązania się pęcherzyków lub białek pochodzących z pęcherzyków z komórkami grzybów tworzącymi biofilm oraz zostanie zbadany wpływ tych interakcji na adhezję grzybów do ludzkich komórek nabłonka.