

*Staphylococcus aureus* (gronkowiec złocisty) to jeden z najczęściej występujących patogenów człowieka. *S. aureus* jest odpowiedzialny za wiele chorób, np. zakażenia skóry i tkanek miękkich, zapalenie wsierdza, kości, bakteriemia. Szacuje się, że ok. 30% światowej populacji jest nosicielami tego gatunku. Przy czym nosicielstwo dotyczy głównie błony śluzowej nosa. W przypadku niektórych grup ludzi, np. chorych na atopowe zapalenie skóry (AZS), występowanie *S. aureus* zaobserwowano na skórze nawet u 90% badanych. AZS to niezwykle uciążliwa choroba, dotyka przede wszystkim dzieci (5-20% na świecie), rzadziej występuje u dorosłych (1-3% światowej populacji). Choroba ta w znacznym stopniu obniża jakość życia pacjentów i ich rodzin ze względu na manifestację kliniczną i objawy. AZS jest chorobą przewlekłą, nawrotową i zapalną, przebiegającą ze świądem. Choroba rozwija się w efekcie współdziałania czynników genetycznych i środowiskowych. Miejscowe leczenie glikokortykosteroidami to terapia pierwszego rzutu w AZS. W leczeniu stosuje się również inhibitory kalcyneuryny, fototerapię światłem nadfioletowym (która nie jest rekomendowana u dzieci), a w przypadku pojawienia się wtórnych infekcji bakteryjnych antybiotyki. Problem polega jednak na tym, że bakterie bardzo łatwo stają się odporne na działanie antybiotyków, dlatego dermatolodzy nie rekomendują wykorzystania antybiotyków w leczeniu AZS. Antybiotyki nie działają również na czynniki wirulencji.

Kolejnym problemem w zwalczaniu gronkowca złocistego jest fakt, że potrafi on wnikać do wnętrza ludzkich komórek, np. komórek skóry takich jak keratynocyty. Antybiotyki nie przenikają do wnętrza komórek człowieka i dlatego wewnątrzkomórkowe bakterie trudno jest zabić. Dodatkowo, gronkowiec po wnikięciu do wnętrza komórki człowieka przechodzi swego rodzaju transformację. Transformacja ta polega na redukcji metabolizmu oraz zmianie produkcji czynników wirulencji. Z tego powodu poszukuje się metod, które mogłyby uzupełnić, a w niektórych przypadkach nawet zastąpić działanie antybiotyków.

W przedstawionym projekcie podejmiemy problem zwalczania wewnątrzkomórkowego *S. aureus* z wykorzystaniem fotodynamicznej inaktywacji bakterii (FIB). W pierwszym etapie pracy skupimy się na analizie procesu wewnątrzkomórkowego bytowania gronkowca w keratynocytach. Poddamy analizie dużą populację bakterii, które wyizolowaliśmy od pacjentów z AZS. Sprawdzimy, w jaki sposób oddziałują z komórkami skóry oraz jaki udział w tym procesie mają czynniki wirulencji (enterotoksyny). W kolejnym etapie opracujemy metodę, która pozwoli na zabicie wewnątrzkomórkowego gronkowca oraz inaktywację czynników wirulencji przez niego produkowanych. W tym celu zastosujemy FIB. FIB polega na wykorzystaniu związków aktywowanych światłem i światła widzialnego, których połączone działanie w obecności tlenu prowadzi do wytworzenia cytotoksycznych reaktywnych form tlenu odpowiedzialnych za niszczenie kluczowych biomolekuł bakteryjnych. Inaczej niż w przypadku terapii światłem UV, które nie wnika głęboko w skórę i ma właściwości mutagenne, w FIB wykorzystywane jest światło z zakresu widzialnego. Jest ono bezpieczne dla tkanek ludzkich i penetruje głębsze warstwy skóry. W naszych dotychczasowych badaniach pokazaliśmy, że w efekcie działania FIB, oprócz zabijania samych komórek bakteryjnych, możemy również niszczyć czynniki wirulencji produkowane przez te bakterie. Co ważne, jest to możliwe przy jednoczesnym zachowaniu bezpieczeństwa dla tkanek człowieka.

W Laboratorium Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej opracowaliśmy model zakażonych komórek skóry, dzięki któremu będziemy mogli śledzić los gronkowca złocistego w warunkach przypominających zakażoną atopową ludzką skórę. Aby śledzić los bakterii w takiej złożonym układzie zastosujemy metody immunofluorescencyjne, w których komórki bakterii będą w sposób łatwy identyfikowane za pomocą wytwarzających fluorescencję przeciwciał. Będziemy również śledzić w czasie rzeczywistym dynamikę wzrostu i podziałów zainfekowanych keratynocytów. W naszej kolekcji, dzięki współpracy z lekarzami z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, posiadamy zgromadzone liczne izolaty kliniczne pochodzące od pacjentów z AZS, które w ten sposób będziemy analizować. Uzyskane wyniki pozwolą nam odpowiedzieć na pytanie, czy są takie gronkowce, które wnikają do komórek skóry efektywniej niż inne oraz czy zastosowanie FIB będzie je wydajnie inaktywować.

Wyniki badań uzyskane w ramach tego projektu przyczynią się z jednej strony do zrozumienia ważnych aspektów oddziaływania gronkowców z komórkami gospodarza, z drugiej do opracowania metody, która pozwoli na kontrolę zakażeń skóry atopowej. Wykorzystanie metody FIB, która jest skuteczna również wobec bakterii wielolekoopornych, w tym MRSA, pozwoli na ograniczenie stosowania antybiotyków i przyczyni się w dalszej perspektywie do ograniczenia rosnącego trendu oporności mikroorganizmów.