

## Streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim

Lizozym ludzki, zaliczany do lizozymów typu c, jest enzymem będącym jednym z kluczowych elementów nieswoistej odporności u człowieka. Obecny jest w większości płynów ustrojowych, między innymi w ślinie, łzach, krwi oraz limfie. Chroni organizm przed atakiem drobnoustrojów, pochodzących zarówno ze środowiska zewnętrznego, jak i wewnętrznego. Drożdżak *Candida albicans* jest przykładem patogenu oportunistycznego, ponieważ z jednej strony występuje w organizmie człowieka jako komensal, z drugiej natomiast, w warunkach sprzyjających może stać się przyczyną infekcji o charakterze powierzchniowym lub układowym. Korzystnymi warunkami do rozwoju takiego zakażenia są stany prowadzące do obniżenia odporności organizmu, a zalicza się do nich między innymi: długotrwałą antybiotykoterapię, chemioterapię i radioterapię oraz zabiegi chirurgiczne. Także okres noworodkowy, ciąża oraz karmienie piersią mogą przyczynić się do rozwinięcia kandydozy.

Przeciwdrobnoustrojowa aktywność lizozymów typu c, których najintensywniej badanym przedstawicielem jest lizozym białka jaja kurzego (ang. *egg white lysozyme*; EWL), jest dobrze poznana w kontekście bakteryjnym. Polega ona na hydrolizie wiązań glikozydowych pomiędzy cząsteczkami N-acetyloglukozaminy (NAG) i kwasu N-acetylmuraminowego (NAM) w peptydoglikanie, czego efektem jest rozluźnienie oraz utrata stabilności struktury ściany komórkowej prowadząca do śmierci komórki bakteryjnej [Ragland i Criss, 2017; Sahoo i in., 2012].

Poza działaniem przeciwbakteryjnym, EWL wykazuje aktywność przeciwgrzybową wobec drożdżaków i grzybów strzępkowych, w tym izolowanych od pacjentów, m.in. *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium sp.*, *Acremonium sp.* [Samaranayake i in., 1997; Woods i in., 2011]. W przypadku *C. albicans* opisano enzymatyczną hydrolizę wiązań N-glikozydowych, łączących polisacharydy oraz białka strukturalne ściany komórkowej, aktywację syntetazy mannanu oraz syntetazy chityny, która zachodzi w odpowiedzi na uszkodzenia osłon komórki przez lizozym [Samaranayake i in., 1997], a także wpływ EWL na metabolizm proteaz aspartylowych Sap [Wu i in., 1999]. W badaniach, w których jako substratu użyto (GlcNAC)<sub>5</sub>, wykazano, że lizozym ludzki, podobnie jak EWL, może hydrolizować wiązania glikozydowe i katalizować reakcje transglikozylacji w chitooligosacharydach. Pomimo tego, działanie przeciwgrzybowe lizozymu ludzkiego nie zostało w pełni wyjaśnione.

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy była analiza oddziaływania lizozymu ludzkiego, będącego przedstawicielem rodziny lizozymów typu c, na komórki drożdżaka *C. albicans*. W badaniach wykorzystano szczep dziki *C. albicans*, będący izolatem klinicznym z jamy ustnej człowieka, oraz dwa mutanty w ścianie komórkowej: *C. albicans* NGY 357 oraz *C. albicans* Myco 3.

W początkowej fazie badań, określono przeżywalność drożdżaka *C. albicans* traktowanego lizozymem ludzkim. Stosując metodę zliczania kolonii na płytkach z podłożem stałym stwierdzono, że lizozym ludzki w najniższym zastosowanym stężeniu (0,5  $\mu\text{M}$ ) obniżał przeżywalność komórek *C. albicans* do 85,2% w porównaniu do kontroli. W przypadku mutantu *C. albicans* NGY 357 obserwowano przeżywalność na poziomie 67,39%, natomiast przy *C. albicans* Myco 3 - 104,96%. Działanie bójcze lizozymu wobec Myco 3 obserwowano dopiero przy stężeniu 1  $\mu\text{M}$ . Przeżywalność mutantu Myco 3 przy tym stężeniu lizozymu wynosiła 83,24%. Test przeżywalności w przypadku pozbawionych ściany komórkowej protoplastów, nie wykazał ich wrażliwości na lizozym, nawet w najwyższym zastosowanym stężeniu – 4  $\mu\text{M}$ . Ustalono na tej podstawie, że w oddziaływaniach na linii drożdżak *C. albicans* – lizozym ludzki istotną rolę odgrywa ściana komórkowa. Kolejno, wykonano badanie aktywności metabolicznej, posługując się gotowym zestawem LIVE/DEAD Yeast Viability Kit. Wykazano, że lizozym powodował spadek aktywności metabolicznej u wszystkich zastosowanych szczepów. I tak, w przypadku szczepu dzikiego aktywność ta spadła z 79,66% w przypadku kontroli, do 55,55% po traktowaniu komórek lizozymem ludzkim. Mutant *C. albicans* NGY 357 wykazał spadek aktywności metabolicznej z 88,76% do 63,66%, natomiast mutant *C. albicans* Myco 3 z 82,88% do 48,33%.

Wykonując analizę potencjału reprodukcyjnego oraz badając wpływ działania lizozymu ludzkiego na długość życia komórek, stwierdzono, że lizozym ludzki prowadzi do obniżenia potencjału reprodukcyjnego w przypadku szczepu dzikiego, mutantu NGY 357 i Myco 3, odpowiednio, 3,8-, 1,7- i 1,8-krotnie. Komórki poddane działaniu lizozymu ludzkiego nie rozpoczynały w 100% pączkowania, jak miało to miejsce w kontroli. Stwierdzono, że w przypadku szczepu dzikiego pączkowanie rozpoczęło 38,8% komórek, natomiast w przypadku mutantów NGY 357 i Myco 3 było to, odpowiednio, 61,3% oraz 57,5%. Komórki, które rozpoczęły proces proliferacji charakteryzował skrócony czas reprodukcji. Obserwowano skrócenie tego czasu dla komórek szczepu dzikiego *C. albicans*, a także mutantów NGY 357 i Myco 3, odpowiednio, 3,1-, 1,6- i 1,8-krotnie. Stwierdzono również skrócenie średniego czasu życia postreprodukcyjnego po działaniu

lizozymem, dla komórek *C. albicans* oraz mutantów NGY 357 i Myco, odpowiednio, 2,5-, 2,2- oraz 4,7-krotnie. Zatem, średni czas życia komórek *C. albicans*, *C. albicans* NGY 357 oraz Myco 3 pod wpływem działania lizozymu ludzkiego uległ istotnemu skróceniu, odpowiednio 2,3-, 1,2- oraz 1,7-krotnie. Wykorzystując zestaw do oznaczania aktywności kaspaz CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker, w badanych preparatach mikroskopowych stwierdzono obecność komórek drożdżaka zawierających aktywną metakaspazę, zarówno w przypadku szczepu dzikiego *C. albicans*, jak i *C. albicans* NGY 357. Aktywność ta w przypadku kontroli *C. albicans* wynosiła 23,83%, natomiast dla komórek traktowanych lizozymem ludzkim wzrastała do 58,5%. Mutant NGY 357 charakteryzował się aktywnością metakaspazy na poziomie 19,8% dla komórek kontrolnych, natomiast wartość ta wzrosła do 49% po działaniu lizozymu. Analiza topografii powierzchni i właściwości nanomechanicznych komórek *C. albicans* została przeprowadzona przy zastosowaniu mikroskopu sił atomowych (AFM). Lizozym ludzki prowadził do wzrostu sztywności oraz obniżenia sił adhezji powierzchni komórek szczepu dzikiego *C. albicans*, a komórki mutantu *C. albicans* Myco 3 wykazywały wzrost chropowatości powierzchni. W przypadku wszystkich trzech zastosowanych szczepów obserwowano utratę owalnego kształtu komórek pod wpływem działania lizozymu ludzkiego. Wykonano również barwienie wybranych składników ściany komórkowej *C. albicans*. Przy użyciu barwnika Calcofluor White wybarwiono chitynę, natomiast Congo Red posłużył do zobrazowania  $\beta$ -glukanu, zaś obrazowanie przeprowadzono za pomocą laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego. Komórki wszystkich trzech szczepów po działaniu lizozymem ludzkim charakteryzowały się zmianami w obrębie ściany komórkowej, a także utratą owalnego kształtu. Stosując metodę kolorymetryczną, stwierdzono brak aktywności  $\beta$ -1,3-glukanazowej oraz chitynolitycznej lizozymu ludzkiego *in vitro*. Natomiast badanie interakcji lizozymu ludzkiego z laminaryną metodą interferometrii biowarstwowej wykazało, że lizozym wiązał się specyficznie do laminaryny, która posiada w swojej strukturze wiązania  $\beta$ -1,3-glikozydowe.

Podsumowując, dowiedziono, że lizozym ludzki efektywnie ogranicza przeżywalność komórek *C. albicans* oraz *C. albicans* NGY 357 i Myco 3. Na podstawie braku wrażliwości protoplastów na działanie lizozymu, stwierdzono, że ściana komórkowa ma istotne znaczenie dla oddziaływania pomiędzy lizozymem a komórką drożdżową. Aktywność metaboliczna badanych szczepów uległa obniżeniu pod wpływem działania lizozymu. Lizozym ludzki powodował również skrócenie czasu życia komórek szczepu dzikiego oraz mutantów, zarówno w fazie reprodukcyjnej oraz postreprodukcyjnej.

Działanie lizozymu ludzkiego skutkowało spadkiem liczby komórek, które podjęły proces reprodukcji oraz spadkiem liczby podwojeń komórek wszystkich trzech zastosowanych szczepów *C. albicans*. Badania aktywności metakaspazy wykazały ponad dwukrotny jej wzrost pod wpływem lizozymu ludzkiego, co wspólnie z innymi wynikami może sugerować zaburzenia cyklu komórkowego zachodzące pod wpływem lizozymu. Pęcznienie komórek obserwowane podczas badań mikroskopowych – barwienia składników ściany komórkowej oraz obrazowania AFM sugerują zaburzenie równowagi osmotycznej. Natomiast możliwość wiązania lizozymu ludzkiego do  $\beta$ -1,3-glukanu ściany komórkowej przy braku aktywności  $\beta$ -1,3-glukanazowej oraz chitynolitycznej *in vitro* sugeruje, że w działaniu lizozymu ludzkiego wobec drożdżaka *C. albicans* może brać udział również mechanizm inny niż enzymatyczny.

Słowa kluczowe: lizozym ludzki, *Candida albicans*, mikroskopia sił atomowych, ściana komórkowa, metakaspaza, potencjał reprodukcyjny