

## 1. STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU POLSKIM

Kandydoza pochwy i sromu pozostaje drugim co do częstości zakażeniem ginekologicznym i dotyczy ok. 75% kobiet w wieku rozrodczym na całym świecie. Dotychczas diagnostyki tej infekcji dokonywano na podstawie objawów klinicznych, a leczenie dobierano w sposób empiryczny. Postępowanie takie obarczone jest stosunkowo dużą liczbą niepowodzeń terapeutycznych oraz ryzykiem nawrotów. Dodatkowe utrudnienie kliniczne stanowi fakt nadal nieznanego szczegółowego patomechanizmu rozwoju objawowej infekcji grzybiczej pochwy oraz ograniczonego zasobu konwencjonalnych leków przeciwgrzybiczych skutecznych wobec *C. albicans* oraz grzybów z grupy NCAC. W poszukiwaniu kluczowych czynników patogenności *Candida* na błonie śluzowej pochwy, duże znaczenie przypisuje się roli formowania wysoce odpornej struktury biofilmu na powierzchni epitelium. Z tego powodu testowanie nowych opcji terapeutycznych opiera się m. in. na analizowaniu nowych związków pod kątem aktywności nie tylko przeciwgrzybiczej, ale i przeciwbiofilmowej. Obiecującymi substancjami spełniającymi te kryteria są ultrakrótkie kationowe lipopeptydy. Za te, posiadające największy potencjał wobec grzybów izolowanych z kandydozy pochwy uznano ostatnio dwie pary analogów o strukturze liniowej i cyklicznej w postaci: C<sub>16</sub>-KKKK-NH<sub>2</sub> i C<sub>16</sub>-CKKKKC-NH<sub>2</sub> oraz C<sub>16</sub>-KRKK-NH<sub>2</sub> i C<sub>16</sub>-CKRKKC-NH<sub>2</sub>.

Celem pracy doktorskiej było określenie wpływu wymienionych związków oraz flukonazolu wobec 64 szczepów klinicznych i referencyjnych różnych gatunków *Candida* izolowanych z kandydozy pochwy oraz biofilmu tworzonego przez te grzyby. Dodatkowo zbadano możliwość terapii skojarzonej lipopeptydów z flukonazolem. Weryfikację rezultatów uzyskanych klasycznymi metodami laboratoryjnymi *in vitro* przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch modeli badania biofilmów: nowo opracowanego modelu *ex vivo* z zastosowaniem tkanek zwierzęcych oraz modelu mikroprzepływowego uzyskanego dzięki technologii BioFlux.

Wszystkie cztery badane lipopeptydy okazały się skuteczne wobec analizowanej puli szczepów zarówno w formie planktonowej, jak i wobec biofilmu. Poza jednym wyjątkiem w postaci jednego szczepu *C. lusitaniae*, flukonazol również okazał się aktywny wobec *Candida*, jednak nie był zdolny do eradykowania struktury biofilmu. Badania nad wzajemnymi interakcjami azolu z lipopeptydami wykazały możliwość działania addytywnego obu rodzajów substancji – najprawdopodobniej dzięki wzajemnemu uzupełnianiu się ich różnych mechanizmów działania. Dzięki terapii skojarzonej możliwe byłoby użycie tych substancji w stężeniach znacznie niższych i mniej toksycznych, niż przy ich stosowaniu osobno.

Zastosowanie modelu *ex vivo* wykorzystującego fragmenty tkanki pochwy mysiej oraz modelu badania biofilmu *Candida* w warunkach mikroprzepływowych w BioFlux wykazało istnienie zasadniczych różnic w rezultatach uzyskanych poszczególnymi metodami. W modelach tych nie udało się uzyskać potwierdzenia wyników uzyskanych za pomocą standardowych metod laboratoryjnych *in vitro*. Dojrzały biofilm grzybiczy utworzony na powierzchni epitelium pochwy (zwierzęcej) oraz w mikrokanałach BioFlux nie był skutecznie eradykowany przez badane lipopeptydy w stężeniach równych MBEC ani przez ich połączenia z flukonazolem w stężeniach odpowiadających FIC. Przyczyny obserwowanych różnic w zachowaniu się i lekowrażliwości biofilmu *Candida* na płytkach polistyrenowych vs na błonie śluzowej pochwy i na powierzchni mikrokanałów pozostają nieznanne.

Wyniki uzyskane w toku pracy badawczej wskazują na istnienie pewnych kluczowych, nieznanych mechanizmów zależnych od grzybów z rodzaju *Candida*, ale także zależnych od komórek gospodarza, istotnych w patomechanizmie kandydozy pochwy. Mechanizmy te są najprawdopodobniej odpowiedzialne za istnienie niezgodności rezultatów badania lekowrażliwości grzybów drożdżopodobnych różnymi metodami. Mogą być one także odpowiedzialne za obserwowane niepowodzenia terapeutyczne oraz rozwój nawrotowej postaci kandydozy pochwy. Sugeruje to potrzebę weryfikacji skuteczności obecnie stosowanych metod badawczych, ich ujednolicenie oraz ewentualną modyfikację tak, aby jak najlepiej odzwierciedlały one procesy realnie zachodzące podczas objawowego zakażenia grzybiczego w pochwie.

## **2. STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU ANGIELSKIM**

Affecting approximately 75% of women of reproductive age worldwide, vulvovaginal candidiasis remains the second most common gynecological infection. Until now, this infection has been diagnosed on the basis of clinical symptoms, and treatment has been selected empirically. Such approach can lead to a relatively large number of therapeutic failures and carries a risk of recurrence. The still unknown detailed pathomechanism of symptomatic mycotic vulvovaginitis and the limited supply of conventional antifungal drugs effective against *C. albicans* and NCAC fungi constitute an additional clinical difficulty. The formation of a highly resistant biofilm structure on the surface of the epithelium is of great importance for research on the key factors of *Candida* pathogenicity on the vaginal mucosa. Therefore, testing of new therapeutic options is based, among others, on analyzing new compounds in terms

of not only antifungal, but also antibiofilm activity. Ultrashort cationic lipopeptides are promising substances that meet the above two criteria. Two pairs of analogs with a linear and cyclic structure in the form of C<sub>16</sub>-K<sub>4</sub>KKK-NH<sub>2</sub> and C<sub>16</sub>-CK<sub>4</sub>KKKC-NH<sub>2</sub> and C<sub>16</sub>-KR<sub>4</sub>KK-NH<sub>2</sub> and C<sub>16</sub>-CKR<sub>4</sub>KKC-NH<sub>2</sub> have recently been recognized as having the greatest potential against fungi isolated from vulvovaginal candidiasis.

The aim of the doctoral dissertation was to determine the effect of the above compounds and of fluconazole on 64 clinical and reference strains of various *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis and on the biofilm created by these fungi. In addition, the possibility of combination therapy including lipopeptides with fluconazole was investigated. The results obtained by classical *in vitro* laboratory methods were verified using two biofilm research models: a newly developed *ex vivo* model using animal tissues and the BioFlux microfluidic open model.

All four tested lipopeptides turned out to be effective against the analyzed pool of strains, both in planktonic and biofilm form. With a single exception (one strain of *C. lusitaniae*), fluconazole was also found to be active against *Candida* spp. but it was not able to eradicate the biofilm structure. Studies on the interactions of azoles with lipopeptides have shown the possibility of an additive effect of both substances – most likely owing to the mutual complementarity of their various mechanisms of action. In combination therapy, these substances could be used in concentrations much lower and less toxic than if administered separately.

The two models of investigating *Candida* biofilm, i.e. the *ex vivo* model using fragments of mouse vaginal tissue and the BioFlux microfluidic open model, showed significant differences in the results obtained by individual methods. These models failed to confirm the results obtained by standard *in vitro* laboratory methods. The mature fungal biofilm formed on the epithelial surface of the (animal) vagina and in BioFlux microchannels was not effectively eradicated by the tested lipopeptides at concentrations equal to MBEC or by their combination with fluconazole at FIC concentrations. The reasons for the observed differences in the behavior and drug susceptibility of *Candida* biofilm on polystyrene plates vs. on the vaginal mucosa and on the surface of microchannels remain unknown.

The results obtained in the course of our research indicate the existence of some key, unknown mechanisms dependent both on *Candida* and on the host cells which play an important role in the pathomechanism of vaginal candidiasis. These mechanisms are most likely responsible for the discrepancies in the results of yeast-like fungi drug susceptibility testing obtained using different methods. They may also be responsible for the observed therapeutic

failures and for the development of recurrent vulvovaginal candidiasis. This suggests the need for verification of the effectiveness of currently used research methods, their unification and possible modification so that they would best reflect the real processes occurring during symptomatic fungal infection in the vagina.