

Streszczenie

Pneumocystis jirovecii jest jednokomórkowym grzybem lokalizującym się na powierzchni nabłonka płuc u ludzi. Obecność tego patogenu u osób z obniżoną odpornością może doprowadzić do rozwoju objawów oportunistycznej choroby – pneumocystozowego zapalenia płuc (ang. *Pneumocystis pneumonia*, PcP). W niektórych przypadkach zarażenie tym patogenem może utrzymywać się w postaci bezobjawowej, czyli kolonizacji, która może ułatwiać wyodrębnianie się wariantów opornych na farmakologiczne środki profilaktyczne, a ponadto stanowi rezerwuuar grzyba dla osób podatnych na zarażenie. Sama obecność *Pneumocystis* w płucach może także prowadzić do zmian zapalnych, a w konsekwencji do rozwoju chorób płuc. Wykazano, że kolonizacja może występować wśród pacjentów z różnymi chorobami układu oddechowego, z częstością zależną od rodzaju zdiagnozowanego schorzenia. Zatem zarówno kolonizacja, jak i PcP mają wciąż istotne znaczenie dla zdrowia publicznego, zwłaszcza u osób należących do grup ryzyka.

Niniejsza rozprawa doktorska stanowi zbiór trzech publikacji. Pierwsza jest artykułem przeglądowym, stanowiącym wstęp teoretyczny na temat biologii i występowania *P. jirovecii*. Kolejne dwie prace oryginalne opisują wyniki badań prewalencji i występowania wariantów genotypowych *P. jirovecii* u biorców przeszczepu nerki oraz pacjentów z różnymi chorobami układu oddechowego.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była (i) **ocena prewalencji *P. jirovecii***, (ii) **rozdzielenie pomiędzy kolonizacją a PcP** oraz (iii) **analiza różnorodności genotypowej *Pneumocystis* występujących w wybranych grupach ryzyka: biorców przeszczepu nerki oraz pacjentów z różnymi chorobami układu oddechowego**. U biorców narządów ryzyko to związane jest z leczeniem immunosupresyjnym w celu zapobiegania odrzucenia przeszczepu. Z kolei niektóre choroby płuc mogą być związane z większym ryzykiem występowania kolonizacji *Pneumocystis*.

Badania przeprowadzono z udziałem dwóch grup pacjentów będących pod opieką klinik Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu:

- (i) 105 pacjentów z różnymi chorobami układu oddechowego (Klinika Pulmonologii i Nowotworów Płuc), od których pobrano materiał w postaci popłuczyn z drzewa oskrzelowego;
- (ii) 72 biorców przeszczepu nerki, poddawanych leczeniu immunosupresyjnemu (Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej), od których pobrano materiał w postaci płwociny.

Metody molekularne (izolacja DNA, nested-PCR) zostały wykorzystane do oceny

prewalencji oraz różnorodności wariantów genotypowych *P. jirovecii*. Dodatkowo zastosowano także metody mikroskopowe z wykorzystaniem znakowania immunofluorescencyjnego, które pozwoliły na oszacowanie intensywności zarażenia. Dane ilościowe, w korelacji z występowaniem objawów PcP, posłużyły do odróżnienia kolonizacji od pneumocystozowego zapalenia płuc.

Ponadto, wśród wykrytych organizmów *P. jirovecii* przeprowadzona została analiza polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) w obrębie wybranych genów: *mtLSU* rRNA, *CYB*, *SOD* i *DHPS*. Analizę sekwencji powyższych genów przeprowadzono poprzez ich amplifikację w reakcji nested-PCR z zastosowaniem specyficznych par starterów. Otrzymane w ten sposób produkty zostały zsekwencjonowane, a wyniki poddane manualnej analizie z użyciem dostępnego oprogramowania, co umożliwiło identyfikację SNPs. W analizie statystycznej wyników badań zastosowano testy: *t* Studenta, χ^2 oraz Fishera. Projekt uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (Nr KB459/2017).

Przy użyciu metod molekularnych *Pneumocystis* wykryto u 17 (16,2%) pacjentów z różnymi chorobami układu oddechowego oraz u 8 (11,1%) biorców przeszczepu nerki. Metodami mikroskopowymi wykazano obecność cyst *Pneumocystis* u 8 pacjentów z różnymi chorobami układu oddechowego oraz 3 biorców przeszczepu nerki. Tylko w jednym przypadku (biorca przeszczepu nerki) stwierdzono PcP, na podstawie oceny ilościowej oraz danych na temat występowania objawów. Pozostali pacjenci byli skolonizowani.

Badania przeprowadzone w grupie pacjentów z różnymi chorobami układu oddechowego wykazały istotną korelację pomiędzy stosowaniem leczenia immunosupresyjnego a kolonizacją. Wyniki te potwierdzają, że leki obniżające odporność mogą być czynnikiem ryzyka infekcji patogenów oportunistycznych, takich jak *P. jirovecii*. Ponadto, wśród biorców przeszczepu nerki zaobserwowano korelację pomiędzy zastosowaniem dwuskładnikowego leczenia immunosupresyjnego (składającego się z inhibitorów kalcyneuryny i prednizonu) a kolonizacją. Wynik ten sugeruje, że podatność na zarażenie może być także zwiększona pod wpływem specyficznych kombinacji leków immunosupresyjnych. Wśród biorców przeszczepu nerki zaobserwowano także niższy średni poziom eozynofili u osób ze zdiagnozowaną infekcją. Dotychczasowe doniesienia wykazały przeciwgrzybicze działanie tych komórek w stosunku do *P. jirovecii*. Wyniki niniejszych badań popierają więc tezę, że obniżony poziom eozynofili we krwi może stanowić kolejny czynnik ryzyka infekcji *P. jirovecii*.

W obydwu grupach pacjentów zidentyfikowano następujące genotypy: a) *mtLSU* rRNA – genotyp 1, 2 i 3; b) *CYB* – *CYB* 1, 2, 5, 6, 7 i 8; c) *DHPS* – genotyp 1; d) *SOD* – *SOD* 1 i 2. Amplifikacja *DHPS* i *SOD* powiodła się tylko w części preparatów. Niska skuteczność genotypowania tych dwóch fragmentów może wynikać z faktu, że są to geny występujące tylko w jednej kopii w genomie *Pneumocystis*. W związku z tym ich amplifikacja jest utrudniona, zwłaszcza w przypadku niskiego poziomu infekcji, typowego dla kolonizacji. Analiza różnorodności genotypowej wykazała kilka istotnych zależności. U pacjentów z różnymi chorobami układu oddechowego mutanty *CYB* wykryto jedynie u pacjentów z nowotworami płuc. Może to być spowodowane występowaniem określonych warunków u tych pacjentów, które sprzyjają kolonizacji organizmów *Pneumocystis* o określonych genotypach, lub wpływem specyficznych leków stosowanych u tych pacjentów na rozwój konkretnych polimorfizmów. Z kolei genotyp *CYB* 2 występował wyłącznie u tych biorców przeszczepu nerki, którzy w trakcie pobrania materiału przyjmowali profilaktykę anti-*Pneumocystis*. Natomiast genotyp dziki *mtLSU* rRNA w tej grupie ryzyka występował u pacjentów o niższym średnim wieku oraz czasie, jaki minął od przeszczepu, w porównaniu do pacjentów, u których zdiagnozowano zmutowane genotypy *mtLSU* rRNA. Dane te sugerują, że różne czynniki kliniczne czy demograficzne mogą korelować ze specyficznym rozkładem SNPs u wykrytych organizmów. Analiza SNPs w obrębie pozostałych genów nie wykazała żadnych istotnych zależności. Porównanie dwóch grup badanych również nie wykazało istotnych różnic w występowaniu *Pneumocystis* i w rozkładzie SNPs.

Podsumowując, wyniki niniejszej pracy potwierdzają, że pacjenci z badanych grup są narażeni na infekcję *Pneumocystis*, która nawet w kontekście bezobjawowej kolonizacji jest zjawiskiem niepożądanym. Wyniki analizy różnorodności genotypowej sugerują natomiast, że pacjenci o szczególnych cechach mogą być bardziej narażeni na infekcję patogenu o specyficznym genotypie, lub też specyficzne czynniki mogą wpływać na rozwój określonych genotypów *Pneumocystis* występujących u takich pacjentów.