

„Bakterie przetrwałe *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* powstałe w warunkach stresowych”

mgr Adrianna Łupkowska

Problem antybiotykooporności jest jednym z najpoważniejszych zagrożeń zdrowia publicznego. Wiele badań wskazuje na to, że główną przyczyną, prócz oporności na antybiotyki, są tolerujące wysokie stężenia antybiotyków bakterie przetrwałe (ang. *persisters*). Jest to zwykle mała subpopulacja bakterii o zahamowanym lub bardzo powolnym metabolizmie. W przeciwieństwie do bakterii opornych, komórki przetrwałe nie dzielą się w obecności antybiotyku i pod względem genetycznym są identyczne jak bakterie wrażliwe, z których pochodzą. Po zakończeniu terapii antybiotykowej mogą ponownie zacząć się dzielić prowadząc do nawrotu infekcji. Bakterie przetrwałe stanowią zwykle niewielki procent populacji, dlatego są trudno wykrywalne. Z czasem mogą przejść w stan VBNC (ang. *Viable But Non-Culturable*), charakterystyczny dla komórek, które nie są zdolne do podziałów w standardowych podłożach mikrobiologicznych. Bakterie przetrwałe i VBNC mogą pojawiać się spontanicznie lub w wyniku działania różnych czynników stresowych (np. głodu, stresu oksydacyjnego, zmiany pH). Dane literaturowe wskazują, że spowolnienie metabolizmu indukujące stan przetrwały może być efektem agregacji endogennych białek. Wiadomo również, że powstawanie agregatów może zachodzić w wyniku utraty wody oraz glikacji białek w komórce bakteryjnej.

Celem tej pracy było sprawdzenie czy agregaty białek, które powstają podczas wysuszenia i rehydratacji *Escherichia coli* zawierają glikowane białka oraz czy w hodowlach *Klebsiella pneumoniae*, podobnie jak u *E. coli*, istnieje korelacja pomiędzy agregacją białek a pojawianiem się bakterii przetrwałych. W przypadku *K. pneumoniae* większość doświadczeń prowadzono wykorzystując makrokolonie, które są formą biofilmu na podłożu stałym, narażoną na stopniową utratę wody. Okazało się, że takie warunki szczególnie sprzyjały powstawaniu bakterii przetrwałych. Uzyskane w tej pracy wyniki wykazały ponadto, że w trakcie wysuszenia/rehydratacji *E. coli* większość produktów glikacji pozostawała we frakcji rozpuszczalnej i nie ulegała agregacji. Analiza poziomu agregatów i glikowanych białek

w subpopulacjach *E. coli* o różnej zawartości komórek żywych-dzielących się, VBNC i martwych pozwoliła na stwierdzenie, że agregaty białkowe prawdopodobnie pełnią rolę ochronną w trakcie stresu. Tak jak się spodziewano, w przypadku *E. coli* agregacji białek podczas wysuszenia i rehydratacji towarzyszył wzrost poziomu bakterii przetrwałych. W związku z trudnościami w izolacji agregatów białkowych z *K. pneumoniae* skupiono się na innych aspektach związanych z bakteriami przetrwałymi i zróżnicowaniem makrokolonii *K. pneumoniae*. Stwierdzono, że

w makrokoloniiach wybranych izolatów klinicznych można wyróżnić dwie subpopulacje: formę mukoidalną - centrum, oraz niemukoidalny pierścień. Subpopulacja centrum charakteryzowała się wyższym poziomem bakterii przetrwałych, VBNC i heteroopornych na kolistynę, oraz większą zawartością produktów glikacji w porównaniu z subpopulacją pierścienia. Dodatkowo badania proteomiczne wykazały, że w bakteriach z centrum znajduje się mniej białek rybosomalnych i znacznie więcej czynnika promującego hibernację rybosomów (YhbH/Hpf), co może wyjaśniać zwiększoną tolerancję tej populacji na antybiotyki .

W związku z tym, że bakterie przetrwałe są przyczyną niepowodzenia antybiotykoterapii, w ostatnich latach coraz więcej badań skupia się na poszukiwaniu związków o właściwościach „*antypersister*”. W ramach mojej pracy zbadałam wpływ sulforafanu i eutektyku *Reline*, na powstawanie oraz eliminację bakterii przetrwałych. W zależności od szczepu *K. pneumoniae*, stężenia sulforafanu lub *Reline* oraz użytej próby (całe hodowle bakteryjne lub wyizolowane bakterie przetrwałe) uzyskano różne wyniki. Oba te związki były skuteczne w zabijaniu bakterii przetrwałych izolowanych z makrokolonii *K. pneumoniae* po działaniu meropenemu. Jednak dodane do hodowli wraz meropenemem, częściowo lub całkowicie znosiły efekt działania antybiotyku, powodując wzrost poziomu bakterii przetrwałych. Doświadczenia te wykazały, że stosowanie izotiocyjanianów i cieczy głęboko eutektycznych może stanowić poważny problem, jeżeli w trakcie terapii nie będzie monitorowany poziom bakterii przetrwałych.

Prezentowane wyniki poszerzają wiedzę na temat mechanizmów, które chronią bakterie przed stresem (agregaty białek) i warunkują różne formy tolerancji lub oporności na antybiotyki (bakterie przetrwałe, VBNC i heterooporne). Kontynuowanie tych badań może w przyszłości pomóc w opracowaniu nowych strategii zwalczających bakterie przetrwałe.