

Warszawa, 26 maj, 2025

Autor rozprawy doktorskiej: **Shakeel Ahmad**

Promotor: **prof. dr hab. Piotr Garstecki**

Promotor pomocnicy: **Dr. Ilona P. Foik**

Temat rozprawy doktorskiej: **Deciphering the role of antibiotic exposure at the sub-Minimum inhibitory concentration on bacterial heterogeneity at single-cell level**

Streszczenie

Komórki bakteryjne mogą wykazywać różnorodne fenotypy pod względem wzrostu, namnażania, ekspresji genów, metabolizmu i innych. Ta różnorodność fenotypowa staje się niezwykle istotna w warunkach stresowych, takich jak ekspozycja na antybiotyki. W pozornie izogenicznej populacji bakteryjnej obecność zróżnicowanych subpopulacji jest określana jako heterogeniczność. Specyficzna forma heterogeniczności, znana jako heterooporność, charakteryzuje się szerokim zakresem podatności na antybiotyki w obrębie pojedynczej populacji klonalnej. Co ważne, pozwala to podgrupie populacji na tymczasowe przetrwanie ekspozycji na antybiotyki, potencjalnie działając jako rezerwuuar dla rozwoju stabilnej oporności. W przeciwieństwie do konwencjonalnej oporności, heterooporność często pozostaje niewykrywalna za pomocą standardowych metod badania wrażliwości na antybiotyki, co prowadzi do jej niedoszacowania w diagnostyce klinicznej. Jednak wyłania się jako niedoceniane, ale kluczowe zjawisko, które może skomplikować strategię leczenia i diagnostykę, ostatecznie przyczyniając się do globalnego zagrożenia opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe.

Jednym z głównych czynników heterooporności jest nieefektywne i niewłaściwe stosowanie antybiotyków, w tym dawkowanie subterapeutyczne, niekompletne cykle leczenia i nadużywanie antybiotyków. Pomimo swojego znaczenia, wpływ dawkowania subterapeutycznego na reakcje poszczególnych komórek bakteryjnych nie został dokładnie zbadany. Niniejsza rozprawa zajmuje się ważnym pytaniem w tej dziedzinie - w jaki sposób krótkie ekspozycje na antybiotyki w stężeniach poniżej wartości MIC zmieniają rozkład wrażliwości pojedynczych komórek po kolejnym ekspozycji na ten sam lub inny antybiotyk. Aby to zbadać, trzy różne stężenia dwóch antybiotyków bakteriobójczych, cyprofloksacyny i streptomycyny, zostały użyte do wstępnej ekspozycji komórek *Escherichia coli* MG1655 i *Pseudomonas aeruginosa* PA14 w niezależnych eksperymentach. Następnie, analizowano wrażliwość poszczególnych komórek przy użyciu mikroprzepływów kropelkowych po ponownym ekspozycji na którykolwiek z antybiotyków. Wyniki eksperymentów ujawniają, że wstępna ekspozycja na subletalne dawki antybiotyków może zwiększyć MIC pojedynczych komórek rosnących wewnątrz mikroprzepływowych kropelek, a także zmienić stopień heterooporności. Stwierdzono, że cyprofloksacyna, antybiotyk uszkadzający

Shakeel

DNA, jest silniejszym induktorem heterooporności przy wstępnych espozycjach poniżej wartości MIC, zarówno gdy komórki były następnie niezależnie leczone cyprofloksacyną, jak i streptomycyną. Ponadto, uzyskane wyniki zależały również od szczepu bakteryjnego, rodzaju antybiotyku i stężenia wstępnej ekspozycji.

W komórkach MG1655 wstępne narażenie na dawkę równą jeden i pół wartości MIC cyprofloksacyny w oddzielnych eksperymentach zwiększyło heterooporność komórek ponad 20-krotnie podczas późniejszego leczenia cyprofloksacyną. Co więcej, dawka równa połowie wartości MIC przed ekspozycją na cyprofloksacynę zwiększyła również heterooporność komórek o 15-krotnie, gdy wykonano badania wrażliwości ze streptomycyną, co wskazuje na możliwość krzyżowego efektu antybiotykowego.

W komórkach PA14, dawka równa połowie wartości MIC przed ekspozycją na streptomycynę zwiększyło heterooporność komórek 4-krotnie po kolejnej ekspozycji na streptomycynę i 3-krotnie po kolejnej ekspozycji na cyprofloksacynę. Co zaskakujące, dawka wynosząca jedną ósmą wartości MIC przed ekspozycją na cyprofloksacynę była bardziej skuteczna w generowaniu heterooporności niż wyższe stężenia, ale tylko w przypadku badania wrażliwości z cyprofloksacyną. Niektóre wstępne ekspozycje doprowadziły również do zmniejszenia heterooporności, co wskazuje na złożoność tych interakcji.

Odkrycia przedstawione w niniejszej rozprawie oferują nową perspektywę dotyczącą konsekwencji suboptymalnego stosowania antybiotyków, w szczególności w odniesieniu do tego, jak wpływa to na heterooporność u bakterii na poziomie pojedynczej komórki podczas kolejnych terapii. Wnioski te mogą okazać się cenne przy projektowaniu skuteczniejszych schematów leczenia antybiotykami, opracowywaniu nowych środków przeciwbakteryjnych, a także przy rozwiązywaniu szerszego problemu oporności na antybiotyki.

Staw