

Badania metabolomiczne bakterii *Pseudomonas aeruginosa*

STRESZCZENIE

mgr inż. Karolina Anna Mielko

Pałeczka ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*) jest Gram-ujemną bakterią, powszechnie występującą w środowisku naturalnym. Jednocześnie szczepy tego samego gatunku są niebezpiecznymi patogenami oportunistycznymi człowieka, opornymi na antybiotyki. *P. aeruginosa* została wraz z innymi szczepami bakteryjnymi zakwalifikowana do tzw. grupy „ESKAPE”. Poszukiwanie źródeł zjadliwości niniejszych drobnoustrojów jest niezbędne do efektywnego leczenia infekcji. Mikroorganizmy stosunkowo szybko nabywają oporność na antybiotyki, co jest związane z powszechnym stosowaniem terapeutyków nie tylko w medycynie, ale również w przemyśle. Szczególnie niebezpieczne dla zdrowia i życia człowieka są szczepy wzrastające w środowiskach szpitalnych. Badanie mechanizmów oporności na antybiotyki na różnych poziomach molekularnych pozwala na znalezienie niepoznanych dotąd zmian metabolicznych oraz biomarkerów antybiotykooporności. Jedną z nauk, która może przyczynić się do poznania różnic pomiędzy wspomnianymi szczepami jest metabolomika, zajmująca się analizą niskocząsteczkowych związków odzwierciedlających „obecny stan” komórki bakteryjnej.

Głównym celem badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej było poznanie i porównanie profili metabolomicznych różnych szczepów pałeczki ropy błękitnej, pozwalające na zrozumienie procesów adaptacji mikroorganizmu do zmienionych warunków środowiskowych czy nabywania oporności na antybiotyki. Przedstawiona dysertacja doktorska stanowi zbiór spójnych tematycznie artykułów – składa się z jednego artykułu przeglądowego oraz trzech prac zawierających oryginalne wyniki eksperymentalne. W badaniach eksperymentalnych skupiono się na analizie profili metabolomicznych mikroorganizmów, ze szczególnym uwzględnieniem *P. aeruginosa*.

W pierwszej pracy, która ma charakter przeglądu literaturowego, zdefiniowano pojęcie metabolomiki oraz omówiono możliwości jej wykorzystania w doświadczeniach na drobnoustrojach. Badania te dotyczą identyfikacji mikroorganizmów, a także wpływu czynników zewnętrznych na *P. aeruginosa*.

Kolejny artykuł przedstawia rezultaty eksperymentu metodologicznego, w którym oprócz pałeczki ropy błękitnej przeanalizowano również profile metabolomiczne pięciu innych bakterii. Przeprowadzono analizę porównawczą trzech metod dezintegracji komórek bakteryjnych – sonikacji, młyna piaskowego i dezintegratora tkanek. Wyniki pokazały, że przy użyciu każdej

z wymienionych metod uzyskujemy takie same jakościowo rezultaty. Zmiany są ilościowe i dotyczą różnic w stężeniach poszczególnych metabolitów. Dodatkowo w pracy udowodniono, że spektroskopia ^1H NMR jest narzędziem dyskryminującym metabolom badanych drobnoustrojów. Wyniki potwierdzają, że w przypadku badań metabolomicznych każdy etap eksperymentu musi zostać przeprowadzony w identyczny sposób, a jakiegokolwiek zmiany podczas przygotowania próbek prowadzą do zaburzenia poprawności analiz

Druga praca eksperymentalna dotyczy porównań metabolitów wewnątrzkomórkowych szczepów pochodzących z różnych źródeł. Do analiz wykorzystano szczepy *P. aeruginosa* pochodzące ze środowiska naturalnego oraz izolowane z płwociny pacjentów chorych na mukowiscydozę. Przeprowadzono porównanie profili metabolomicznych z wykorzystaniem techniki NMR. Wyniki jedno- i wielowymiarowych analiz danych wykazały różnice w relatywnych stężeniach zidentyfikowanych związków. Zmiany te dotyczyły przede wszystkim związków zaangażowanych w szlaki przemian aminokwasów.

Ostatni artykuł to praca porównująca inną cechę *P. aeruginosa* – oporność na antybiotyki. Do badań wybrano izolowane od pacjentów szczepy, które posiadały różną wrażliwość na antybiotyki. W eksperymencie, oprócz tzw. metabolomicznego odcisku palca – pula metabolitów wewnątrzkomórkowych, przeanalizowano również tzw. metabolomiczny odcisk stopy – pulę analitów zewnątrzkomórkowych pochodzących z podłoża pohodowlanego. Przeprowadzone analizy statystyczne pozwoliły na zidentyfikowanie metabolitów różnicujących oba szczepy. Dodatkowo, wyniki porównań podłoża pohodowlanego pozwoliły na określenie związków wykorzystywanych w pierwszej kolejności w metabolizmie komórki bakteryjnej. Zmieniony metabolizm również w tym przypadku, związany jest głównie ze szlakami degradacji i syntezy aminokwasów.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazały, że szczepy pochodzące z różnych środowisk mają odmienne profile metabolomiczne. Zaprezentowane wyniki potwierdzają obecność różnic w niskocząsteczkowych związkach szczepów *P. aeruginosa* mających różną oporność na antybiotyki. Różnice te wynikały przede wszystkim ze zmienionego metabolizmu aminokwasów. Dodatkowo potwierdzono, że w eksperymentach metabolomicznych każdy z etapów przygotowania próbek powinien przebiegać identycznie, a dobór odpowiedniej metody dezintegracji ma szczególne znaczenie w przypadku analiz celowanych. Co więcej, wykazano potencjał NMR jako narzędzia do rozróżniania i identyfikacji odmiennych rodzajów bakterii. Przyszłe badania powinny skupić się na analizie zmienionych ścieżek metabolicznych z wykorzystaniem dodatkowych technik analitycznych takich jak LC- czy GC-MS.