



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY  
Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ  
Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej  
15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2D  
Tel. 857485708, FAX 857485882

Białystok, 10.07.2023

Prof. dr hab. n. farm. Elżbieta Skrzydlewska

**OCENA**  
**dysertacji na stopień doktora nauk chemicznych**  
**pt.: "Badanie molekularnych mechanizmów biotransformacji antybiotyków**  
**dla potrzeb diagnostyki biomedycznej"**  
**przygotowanej przez magister Katarzynę Joannę Pauter-Iwicką**  
**Promotor: prof. dr hab. Bogusław Buszewski**  
*Promotor pomocniczy: dr Viorica Railean*

Praca doktorska mgr Katarzyny J. Pauter-Iwickiej powstała w ramach prób rozwiązywania problemów medycznych związanych z diagnostyką i terapią chorób będących efektem infekcji bakteryjnych organizmu człowieka. Biorąc pod uwagę fakt, iż właściwa terapia jest możliwa dopiero jako pozytywny feedback właściwej diagnostyki, podstawowym problemem jest jednoznaczne określenie rodzaju patogenu, a następnie identyfikacja specyficznych zmian metabolicznych w organizmie człowieka, charakterystycznych dla danego zakażenia, poprzez ocenę biomarkerów chorobowych. Nie jest to jednak proste ze względu na coraz szerszą gamę patogenów ingerujących w funkcjonowanie organizmu człowieka oraz indywidualną odpowiedź gospodarza na infekcję. Ponadto aspekt efektywności działań medycznych jest bezpośrednio zależny od szybkości i efektywności diagnostyki oraz minimalizacji inwazyjności tejże diagnostyki. Związane jest to z koniecznością poszukiwania markerów bakterii patogennych lub markerów zmian metabolicznych w płynach ustrojowych pacjenta, najkorzystniej w ślinie lub moczu, ewentualnie w krwi. Należy podkreślić, że bardziej jednoznaczne i nieco prostsze jest poszukiwanie markerów indywidualnych chorobotwórczych, chociaż biorąc pod uwagę pojawiający się coraz częściej problem ko-infekcji staje się to także wyzwaniem. W konsekwencji powyższych problemów przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy opracowania nowych możliwości diagnostycznych oraz oceny wartości terapeutycznej i przydatności leków przeciwbakteryjnych i ich metabolitów, w tym również jako wyznaczników antybiotykoodporności w oparciu o analizę profili białek oraz analizę zmian metabolicznych z wykorzystaniem nowoczesnych procedur analitycznych.

Należy podkreślić, że problem diagnostyczno-terapeutyczny w chorobach infekcyjnych będący tematem pracy doktorskiej uwidocznił się szczególnie w ostatnich latach na okoliczność pandemii SARS-COVID-2, która pokazała, że postawienie szybkiej diagnozy i zastosowanie właściwej terapii w przypadku infekcji, w tym konkretnym przypadku infekcji wirusowej, było elementem kluczowym pozwalającym często na uratowanie życia pacjenta. Było to bardzo jednoznaczne w przypadkach, kiedy pacjenci przyjmowani do szpitala z podobnymi podstawowymi zmianami metabolicznymi w konsekwencji dzielili się na tych, którzy przeżywali chorobę i tych którzy umierali. Uważa się zatem obecnie, że szybka jednoznaczna diagnostyka i wczesna efektywna terapia są podstawowym elementem dającym szansę choremu na powrót do zdrowia. Jest to tym bardziej istotne, że coraz częściej mówi się

o oporności drobnoustrojów na terapię, natomiast indywidualizacja terapii jest możliwa tylko w przypadku właściwej i szybkiej diagnostyki oraz oceny indywidualnych zmian metabolicznych zachodzących w trakcie infekcji i terapii.

W konsekwencji, wychodząc naprzeciw potrzebom analityków medycznych i lekarzy, przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy opracowania nowych procedur analitycznych mających na celu szerszą i skuteczniejszą diagnostykę oraz ocenę wartości terapeutycznej i przydatności leków przeciwbakteryjnych i ich metabolitów jako wyznaczników antybiotykoodporności w oparciu o analizę profili białek i w konsekwencji analizę zmian metabolicznych w organizmie chorego.

Analizując, na podstawie publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, kolejność działań naukowych Doktorantki należy potwierdzić. Jej bardzo racjonalne podejście do rozwiązania wskazanego problemu rozpoczynające się od analizy literatury dotyczącej postawionego do rozwiązania zagadnienia, a widoczne w postaci obszernej pracy przeglądowej zamieszczonej w *Molecules*, a zatytułowanej „*Determination and Identification of Antibiotic Drugs and Bacterial Strains in Biological Samples*”. Praca wprowadza czytającego w problemy antybiotykoterapii, ze zwróceniem uwagi nie tylko na działanie i potrzebę monitorowania związku biologicznie aktywnego wprowadzanego do organizmu chorego jako lek, ale także na skutki metabolizmu antybiotyku z powstawaniem często również aktywnych biologicznie metabolitów, które mogą jednak także zaburzać ogólnoustrojowy metabolizm pacjenta. Autorka prezentuje rodzaje stosowanych antybiotyków i ich metabolizm oraz aktywność antibakteryjną obu grup związków (antybiotyków i ich metabolitów). Wskazuje również, co jest bardzo istotne, oporność różnych szczepów chorobotwórczych na te związki. Kolejnym elementem pracy jest przedstawienie różnych sposobów identyfikacji oraz oznaczenia ilościowego zarówno antybiotyków jak i ich metabolitów zaczynając od klasycznych metod mikrobiologicznych i technik analitycznych, w tym oznaczeń immunologicznych, ale także technik migracyjnych, w tym głównie chromatograficznych ze wskazaniem istotnych dla analiz w materiale biologicznym limitów oznaczalności. W konsekwencji Autorka wyjaśnia potrzebę monitorowania jakościowo-ilościowego nie tylko antybiotyku, ale również jego metabolitów, pamiętając, że ich poziom w organizmie chorego jest znacząco niższy niż wprowadzanego leku, co determinuje dodatkowe problemy analityczne. W przypadku oceny ilościowej obu rodzajów związków chemicznych wymagana jest zatem stosownie czuła aparatura i oczywiście dopracowana metodologia przeprowadzenia analizy. Przedstawiona praca jest rodzajem kompendium wiedzy dotyczącej problemu identyfikacji drobnoustrojów oraz konieczności i sposobu monitorowania farmakoterapii przydatnego obecnie już nie tylko dla chemików, ale również dla analityków medycznych.

Konsekwencją w/w przemyśleń było zaproponowanie w kolejnych pracach włączonych do rozprawy doktorskiej w miarę prostych i stosunkowo szybkich metod oznaczania antybiotyków oraz ich metabolitów z różnych grup strukturalnych w materiale biologicznym pochodzącym od chorego. Biorąc pod uwagę, że matryca biologiczna jest bardzo złożona Autorka przede wszystkim postanowiła skoncentrować się na doborze warunków separacji wybranych preparatów i ich metabolitów przeciwbakteryjnych z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym (HPLC-DAD). W dalszej kolejności pokazała opracowanie i zwalidowanie nowej metody analitycznej do jednoczesnej analizy antybiotyków i ich metabolitów w ludzkim moczu. Do oznaczenia i identyfikacji badanych analitów zastosowała elektroforezę kapilarną (CE) połączoną z tandemową spektrometrią mas (MS/MS). Natomiast, za pomocą CE-DAD zbadała wpływ różnych warunków analitycznych (skład, stężenie i wartość pH buforu separacyjnego, czas i ciśnienie iniekcji, temperatura

kapilary oraz wpływ modyfikatora organicznego) na migrację i rozdzielanie antybiotyków i ich metabolitów.

W kolejnych etapach pracy Doktorantka dokonała rozdziału jedenastu antybiotyków i dziesięciu metabolitów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem różnych faz stacjonarnych oraz wykorzystaniem programu ChromSword do optymalizacją parametrów elucji oraz przewidywania warunków najlepszego rozdziału badanych biologicznie związków aktywnych oraz podejście QSRR w celu uzyskania wiarygodnych informacji o właściwościach fizykochemicznych oraz oszacowania względnej aktywności biologicznej grupy badanych analitów. Mgr K.J. Pauter-Iwicka zastosowała również rozbudowany aparat matematyczny do oceny deskryptorów molekularnych i strukturalnych. Niniejsze badanie Doktorantka przeprowadziła w celu określenia możliwego wpływu środowiska szpitalnego na zmiany mikrobiomu pacjenta po 10 dniach hospitalizacji z antybiotykoterapią lub bez niej. Dlatego też w populacji pacjentów poddanych antybiotykoterapii skupiono się na zmianie profilu, co pozwoliło na oddzielenie zmian wynikających z samej hospitalizacji od zmian spowodowanych antybiotykoterapią. W profilu pacjentów poddawanych antybiotykoterapii, Doktorantka wykazała m.in. wzrost różnorodności szczepów patogenów oraz pojawienie się bakterii kojarzonych typowo z pobytem chorego w szpitalu.

Biorąc pod uwagę, iż najczęściej pierwszą drogą przenikania drobnoustrojów do organizmu są drogi oddechowe i pokarmowe, Doktorantka założyła, że analiza składu mikrobiomu śliny może dostarczać najwcześniejszych informacji o pojawieniu się patogenu w organizmie i o poczynającym się procesie chorobowym, co powoduje że właśnie analiza mikrobiologiczna śliny może pozwolić na najszybsze wdrożenie celowanej terapii i dlatego też wprowadziła do badań MALDI-TOF-MS, która stanowi obiecującą technikę na dużą skalę, nie nadmiernie pracochłonną, szybką i pozwalającą na rejestrację odtwarzalnych profili molekularnych mikroorganizmów, zwłaszcza w ślinie. Jednocześnie metoda wykorzystująca w/w aparaturę pozwala na wykrywanie zmian chorobowych na poziomie komórkowym, zanim wystąpią zmiany kliniczne ogólnoustrojowe, co pozwala na szybkie wprowadzenie celowanej farmakoterapii.

Ponadto uzyskane przez Doktorantkę wyniki sugerują, że śledzenie wewnątrzgatunkowej zmienności proteomicznej w obrębie mikroorganizmów może być obiecującym narzędziem do wykorzystania w przyszłości do badania skuteczności stosowanej kuracji antybiotykowej oraz do sprawdzenia, czy zakażenie jedno- czy wielopatogenowe, co decyduje o wprowadzeniu odpowiedniej farmakoterapii. Ponadto, ponieważ na przestrzeni wielu lat wykorzystywania antybiotyków do leczenia infekcji bakteryjnych pojawił się naturalny, będący wynikiem różnych czynników, dodatkowy problem terapeutyczny, a mianowicie lekooporność na patogeny. Aby szerokokątnie zrealizować cele pracy doktorskiej i wysnuć realne wnioski Doktorantka przeprowadziła badania z zastosowaniem różnych technik analitycznych, w tym m.in. wysokosprawną chromatografię cieczową z detektorem DAD, elektroforezę kapilarną z detektorem DAD oraz z tandemową spektrometrią mas; spektrometrię mas z jonizacją/desorpcją laserową wspomaganą matrycą oraz analizatorem czasu przelotu; mikroskopię fluorescencyjną i elektronową oraz aparat do pomiaru potencjału zeta (Zetasizer), co świadczy o Jej doskonałym przygotowaniu analitycznym do prowadzenia badań naukowych.

W konsekwencji Doktorantka wygenerowała aż 9 wniosków wskazujących na dedykowanie określonych technik analitycznych konkretnym problemom diagnostyczno-terapeutycznym w przypadku zakażeń bakteryjnych. Wyciągnięte wnioski pozwalają wskazać na zmiany metaboliczne zachodzące w organizmie chorego jak i w organizmie patogenu, co jest bardzo istotne w przypadku ratowania życia zainfekowanego pacjenta.

Praca doktorska mgr Katarzyny J. Pauter-Iwickiej zawiera omówienie zagadnień wpływających z 1 obszernej wprowadzającej w zagadnienia pracy przeglądowej oraz 4 prac eksperymentalnych zawierających omówienie wyników uzyskanych i opublikowanych przez Doktorantkę, a których całkowity IF (5 prac) wynosi 22,617. Wskazuje to na wysoką jakość wykonanych badań i publikacji, w których zostały zamieszczone. W związku z powyższym w kontekście Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, a w szczególności artykuły i przepisy; O stopniach naukowych i tytule naukowym wraz z uzupełnieniami, przedstawiona rozprawa w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani **mgr Katarzyny Joanny Pauter-Iwickiej** do dalszych etapów postępowania celem uzyskania stopnia doktora w *dyscyplinie nauk chemicznych, dziedzina nauki ścisłe i przyrodnicze*.

Jednocześnie biorąc pod uwagę ogrom przeprowadzonych badań, wnioski z uzyskanych wyników oraz implikacje kliniczne dla uzyskanych wyników *wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Joanny Pauter-Iwickiej*, której praca jest dowodem znakomitych umiejętności eksperymentalnych oraz wiedzy analityczno-biomedycznej Doktorantki.