

Streszczenie

W dobie rosnącej oporności na antybiotyki diagnostyka, która może być prostą, szybką i taną identyfikacją infekcji bakteryjnej lub określająca odpowiedź na antybiotyki, jest niewątpliwie niezbędna do optymalizacji indywidualnej terapii pacjenta i zmniejszenia ryzyka wystąpienia oporności na antybiotyki. Z tego względu, przedstawiona praca doktorska dotyczy opracowania nowej procedury analitycznej mającej na celu ocenę wartości terapeutycznej i przydatności leków przeciwbakteryjnych i ich metabolitów jako wyznaczników antybiotykoodporności w oparciu o analizę profili białkowych i metabolicznych. Pierwszym etapem badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej było opracowanie prostych, stosunkowo szybkich, a także tanich metod oznaczania antybiotyków oraz ich metabolitów z różnych grup. W tym celu, najpierw uwagę skupiono na doborze warunków separacji wybranych środków przeciwbakteryjnych oraz ich metabolitów z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym (HPLC-DAD). W dalszej kolejności, opracowano i zwalidowano nową metodę analityczną do jednoczesnej analizy antybiotyków i ich metabolitów w ludzkim moczu. Do oznaczenia i identyfikacji wszystkich analitów zastosowano elektroforezę kapilarną (CE) wraz z tandemową spektrometrią mas (MS/MS). Natomiast, za pomocą CE-DAD zbadano wpływ różnych warunków analitycznych (skład, stężenie i wartość pH buforu separacyjnego, czas i ciśnienie iniekcji, temperatura kapilary oraz wpływ modyfikatora organicznego) na migrację i rozdzielenie antybiotyków i metabolitów.

Dalsze badania ukierunkowane były na ocenie skuteczności antybiotyków (amoksycylina, gentamycyna, metronidazol) wobec modelowej bakterii (*B. tequilensis*) tworzących biofilm z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej i technik pokrewnych. Elektroforeza kapilarna wykazała zdolność do scharakteryzowania i wykazania różnic w ruchliwości elektroforetycznej pomiędzy biofilmami nieleczonymi i leczonymi antybiotykami. Zbadano również stabilność dyspersji, dokonano analizy profili molekularnych, a także przeanalizowano żywotność komórek bakteryjnych oraz ich morfologię. Badania mikroskopowe i spektrometryczne wskazały na degradację matrycy zewnątrzkomórkowych substancji polisacharydowych (ang. *Extracellular Polysaccharide Substances, EPSs*), hamowanie syntezy ściany komórkowej oraz blokowanie syntezy białek rybosomalnych przez amoksycylinę i gentamycynę. Zaobserwowano, iż komórki bakteryjne nielezione i leczone charakteryzowały się wysoką stabilnością dla systemu tworzenia biofilmu. Ponadto na podstawie rodzaju zastosowanego antybiotyku zaproponowano mechanizm działania użytych antybiotyków w zlepianiu i degradacji komórek. Kolejny etap badań dotyczył zastosowania techniki MALDI-TOF MS jako narzędzia do szybkiej identyfikacji mikrobiomu śliny i obserwacji zmian w profilach molekularnych w zależności od podanego antybiotyku. Istotne zmiany w składzie mikrobiomu śliny zauważono w zależności od stosowanych podłoży hodowlanych, antybiotykoterapii i współistniejącej mikrobioty.

Przedstawione w pracy metody mogą znaleźć zastosowanie w analizie przesiewowej pacjentów w celu wyeliminowania kombinacji leków, które nie są zalecane do jednoczesnego stosowania. Ponadto, zaprezentowane podejścia mogą pomóc w opracowaniu metod umożliwiających szybszą diagnostykę zmian chorobowych na poziomie komórkowym przed wystąpieniem zmian klinicznych.

Katarzyna Paweł-Jurkiewicz