



**UNIWERSYTET MEDYCZNY
w LUBLINIE**

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

**Katedra Chemii
Zakład Chemii Fizycznej
ul. Chodźki 4a, 20-093 LUBLIN
telefon: + 48 81 535 73 77 / centrex: 3377 / fax: + 48 81 756 48 30**

Lublin, 11 lipca 2023 r.

Ocena

**rozprawy doktorskiej P. mgr chem. Katarzyny Joanny Pauter-Iwickiej – doktorantki
w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii**

Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

**– pt. „Badanie molekularnych mechanizmów biotransformacji antybiotyków dla potrzeb diagnostyki
biomedycznej”**

wykonanej pod kierunkiem Prof. zw. dr hab., dr h.c. Bogusława Buszewskiego, czł. rzec. PAN,

przy współdziałaniu promotora pomocniczego dr Viorici Railean

Oceniana praca pochodzi z toruńskiego ośrodka naukowego, z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z Katedry Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii którą kierował od 1994 r. Prof. zw. dr hab., dr h.c. Bogusław Buszewski, promotor dysertacji doktorskiej, co zapewnia, że poziom naukowy tej rozprawy jest bardzo wysoki i co w pełni potwierdza jej lektura. Dysertacja doktorska zawiera pięć prac naukowych, w czterech z nich doktorantka jest pierwszym autorem. Wszystkie prace są zredagowane w języku angielskim, co może sprzyjać adaptacji wyników przez światową społeczność naukową. Rezultaty są wynikiem eksperymentów przeprowadzonych przez P. mgr chem. Katarzynę Joannę Pauter-Iwicką w czasie Jej Studiów Doktoranckich na UMK w Toruniu. Prace te były opublikowane w międzynarodowych specjalistycznych czasopismach z listy filadelfijskiej: *Molecules*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *Electrophoresis*, *Journal of Clinical Medicine*, *Applied Microbiology and Biotechnology* o uznanym poziomie naukowym, o czym mogą świadczyć sumaryczne, naukometryczne parametry tych prac, a mianowicie: *Impact Factor* (IF) = 22,617 oraz punkty MEiN = 550. Na uwagę zasługuje fakt, że dysertacja doktorska powstała w wyniku realizacji projektu Preludium 19 o nr 2020/37/N/ST4/02358 finansowanego z Narodowego Centrum Nauki. Część badań współfinansowana była także w ramach projektu Opus 11 nr 2016/21/B/ST4/02130, a także Opus 19 nr 2020/37/B/ST4/02136 finansowanych z

Narodowego Centrum Nauki oraz z Grantów Młodych o nr 2092/2019, 492/2020 i PDB/grantów wydziałowych pochodzących ze środków Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

I wreszcie nie ulega wątpliwości, że opublikowanie na przestrzeni trzech lat pięciu doświadczalnych prac z dziedziny chromatografii i technik separacyjnych, o deklarowanym przez Doktorantkę w stosownym oświadczeniu (na str. 137) Jej udziale w ich realizacji polegającym na współuczestnictwie: w opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, a także przygotowaniu wstępnych wersji manuskryptów dowodzi bardzo dużego wkładu pracy, czasu i naukowych umiejętności P. mgr chem. Katarzyny Joanny Pauter-Iwickiej omówionych dokładniej poniżej.

We wprowadzeniu do rozprawy Doktorantka opisała rolę biomarkerów, które w przyszłości mogłyby odegrać ważną rolę we wczesnej, nieinwazyjnej diagnostyce zakażeń bakteryjnych i podkreśliła jak niezwykle istotne byłoby zidentyfikowanie jednego czułego markera, którego oznaczenie i identyfikacja w próbce ułatwiłyby potwierdzenie i interpretację zakażenia bakteryjnego. Słusznie zauważyła, że obecnie w dobie narastającej antybiotykooporności, prosta, szybka i tania identyfikacja zakażenia bakteryjnego oraz określenie odpowiedzi na antybiotyki są niewątpliwie niezbędne do optymalizacji terapii indywidualnego pacjenta oraz zmniejszenia ryzyka wystąpienia zjawiska oporności. Dodam, że również coraz częściej występującej sepsy wśród pacjentów leczonych w warunkach szpitalnych. Z tych powodów, niezwykle istotne jest poszukiwanie nowych leków oraz nowych sposobów postawienia właściwej diagnozy i zastosowania odpowiedniego skutecznego leczenia i farmakoterapii.

Nadrzędnym i słusznie określonym celem rozprawy doktorskiej było opracowanie nowej procedury analitycznej pozwalającej na ocenę wartości terapeutycznej i przydatności leków przeciwbakteryjnych i ich metabolitów jako wyznaczników antybiotykooporności w oparciu o analizę profili białkowych i metabolicznych. Wyszczególnione cele badawcze, podczas realizacji kolejnych etapów eksperymentów są określone prawidłowo i w sposób logiczny zaplanowane. Podczas realizacji badań Doktorantka w kolejnych etapach realizowała następujące cele:

- dobór warunków separacji wybranych antybiotyków i ich metabolitów z zastosowaniem chromatografii cieczowej;
- oznaczenie i identyfikację wybranych antybiotyków i ich metabolitów w próbkach moczu ludzkiego za pomocą elektroforezy kapilarnej;
- ocenę skuteczności wybranych antybiotyków wobec bakterii tworzących biofilm z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej i technik pokrewnych;
- identyfikację mikrobiomu śliny człowieka i monitorowanie zmian profilu molekularnego pod wpływem wybranych antybiotyków.

Podczas realizacji eksperymentów Doktorantka dokonała wyboru prawidłowych narzędzi badawczych i technik instrumentalnych. Pani mgr chem. Katarzyna Joanna Pauter-Iwicka podczas

eksperymentów zastosowała m.in. wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) z detektorem z matrycą fotodiodową (DAD); elektroforezę kapilarną (CE) z detektorem DAD oraz sprzężoną z tandemowym spektrometrem mas (CE-MS/MS); spektrometrię mas z jonizacją/desorpcją laserową wspomaganą matrycą oraz analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF MS) a także stosowała mikroskop fluorescencyjny, skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) oraz pomiar potencjału zeta.

Trafnie i szczegółowo został opisany przez Doktorantkę problem badawczy, który stanowią popularne grupy antybiotyków m.in. β -laktamy, makrolidy, tetracykliny, chinolony, aminoglikozydy, sulfonamidy i glikopeptydy, oksazolidynony. Przykłady leków przeciwbakteryjnych z poszczególnych grup, a także struktury chemiczne zostały przez nią scharakteryzowane i zestawione w tabeli 1. Ze względu na silną aktywność przeciwdrobnoustrojową antybiotyków niezwykle istotna jest analiza mechanizmów tego zjawiska. Jak słusznie zauważyła Doktorantka mechanizm antybakteryjny jest niezwykle zróżnicowany i nie ma jednej uniwersalnej interpretacji działania wszystkich antybiotyków. Popularność stosowania związków przeciwbakteryjnych w farmakoterapii zawdzięczają one swojemu selektywnemu działaniu na komórki bakteryjne i jednoczesnemu braku działania na komórki zwierzęce. Oczywiście związane jest to z ich budową, właściwościami fizykochemicznymi oraz przebiegającymi szlakami metabolicznymi odpowiadającymi za mechanizm antybakteryjny. Pani mgr chem. Katarzyna Joanna Pauter-Iwicka przedstawiła docelowe miejsca działania poszczególnych grup antybiotyków wraz z ich przykładami a także szczegółowo opisała mechanizmy działania związków przeciwbakteryjnych: blokowanie poprzez zahamowanie syntezy ściany komórkowej bakterii; hamowanie poprzez zaburzenie metabolizmu komórki; oddziaływanie na strukturę błony cytoplazmatycznej; hamowanie syntezy białek; hamowanie transkrypcji oraz replikacji kwasu DNA.

Docelowym miejscem działania antybiotyków może być ściana komórkowa, której syntezę na różnych etapach powstawania one zaburzają. Doktorantka opisała istotę działania przeciwbakteryjnego wybranych leków (m.in. β -laktamów, glikopeptydów oraz fosfomycyny), która polega na hamowaniu tworzenia mostków łączących podjednostki peptydoglikanu w integralną całość. Proces ten katalizowany jest przez enzymy bakteryjne zwane białkami wiążącymi penicyliny (ang. *Penicillin Binding Proteins*, PBP), zlokalizowane w błonie komórkowej bakterii, które wiążą antybiotyk. W wyniku trwałego związania z antybiotykiem, funkcja enzymów (PBP) zostaje zablokowana, a w konsekwencji dojrzewanie i podziały komórkowe zostają zahamowane. W tej części dysertacji opisała również antybiotyki (sulfonamidy, trimetoprym), które mogą również wpływać na aktywność ważnych szlaków metabolicznych w komórce. Jednym z najbardziej znanych przykładów jest hamowanie syntezy kwasu foliowego, co prowadzi do zaburzenia syntezy DNA. W opisie zinterpretowała również mechanizm działania środków przeciwbakteryjnych z grupy polimyksyn, które wpływają na rozpad błony komórkowej i zwiększenie jej przepuszczalności dla jonów, co w konsekwencji skutkuje utratą jej szczelności. A także daptomycyny,

której mechanizm działania polega na jej nieodwracalnym wiązaniu się z błoną komórkową bakterii Gram-dodatnich, w obecności jonów wapnia, czego efektem jest tworzenie kanałów prowadzących do depolaryzacji błony komórkowej i wypływu potasu oraz innych jonów z wnętrza komórki, co z kolei powoduje zniszczenie błony protoplazmatycznej i poważnego zaburzenia syntezy makrocząsteczek.

Zazwyczaj cząsteczki leków (m.in. aminoglikozydy, makrolidy, linkozamidy oraz tetracykliny) wiążą się z różnymi cząsteczkami białka rybosomalnego lub cząsteczkami rybosomalnego RNA zarówno w podjednostce 30S, jak i 50S, powodując śmierć komórki. Natomiast chinolony i ich pochodne, takie jak fluorochinolony (leki II i III generacji) zaburzających syntezę DNA. Antybiotyki te są specyficznymi inhibitorami domen ligazowych topoiizomerazy II (gyrazy) oraz domen topoiizomerazy IV.

W części rozprawy doktorskiej opisującej antybiotykooporność Doktorantka przedstawiła molekularne mechanizmy oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe u bakterii. Bardzo trafnie w rozprawie doktorskiej posługiwała się odnośnikami literaturowymi. W wykazie bibliografii znajduje się 45 pozycji literaturowych; większość z nich to publikacje anglojęzyczne oraz rozdziały monograficzne z ostatnich dziesięciu lat. Acar i Moulin zaproponowali klasyfikację, w której wyróżniono następujące mechanizmy oporności na leki przeciwbakteryjne: 1) efflux – usuwanie antybiotyku z komórki bakteryjnej przy pomocy pomp białkowych; 2) zmniejszenie przepuszczalności błony komórkowej bakterii; 3) modyfikacja antybiotyku w jego nieaktywnej formie z udziałem enzymów wytwarzanych przez bakterie; mogą one zmieniać antybiotyk wewnątrz lub na zewnątrz komórki bakteryjnej, eliminując jego działanie przeciwbakteryjne; 4) zmiana celu działania antybiotyku, zmniejszająca jego powinowactwo do niego; 5) mutacje bakteryjne skutkujące eliminacją bakterii opornych na antybiotyk; 6) występowanie mieszanej populacji bakterii wrażliwych i opornych na antybiotyki.

W kolejnej części dysertacji doktorskiej Pani mgr chem. Katarzyna Joanna Pauter-Iwicka przedstawiła koncepcję metabolizmu antybiotyków w wątrobie i opisała metody oznaczania antybiotyków i ich metabolitów. W pierwszej publikacji przeglądowej [P1] włączonej do rozprawy zatytułowanej „*Determination and identification of antibiotic drugs and bacterial strains in biological samples*” opisano i szczegółowo przedyskutowano dotychczasowo stosowane techniki do oznaczania antybiotyków a także zestawiono najczęściej wykorzystywane warunki chromatograficzne oraz elektroforetyczne w zależności od grupy oznaczanych antybiotyków oraz matrycy, z której zostały one wyizolowane.

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę w ramach prac [P2] oraz [P3] umożliwiły opracowanie metod do jednoczesnego oznaczania środków przeciwbakteryjnych oraz ich metabolitów z różnych grup terapeutycznych z zastosowaniem odpowiednio chromatografii cieczowej oraz elektroforezy kapilarnej. Dalszym etapem badań była ocena skuteczności działania antybiotyków wobec bakterii tworzących biofilm.

W pracach [P4] oraz [P5] opisała monitorowanie zmian zachodzących w profilach molekularnych mikrobiomu śliny człowieka pod wpływem różnych antybiotykoterapii.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania pozwoliły Pani mgr chem. Katarzynie Joannie Pauter-Iwickiej na sformułowanie trafnych wniosków:

1. Wyniki uzyskane w pracach [P1]-[P5] mogą być szczególnie przydatne w antybiotykoterapii. Wdrożenie proponowanych metod do oznaczania ludzkich próbek klinicznych, daje możliwość oceny skuteczności antybiotyków, co może być korzystne dla optymalizacji indywidualnych terapii.

2. Opracowana metoda CE-ESI-MS/MS, ze względu na wysoką czułość, precyzję i powtarzalność, może być z powodzeniem zastosowana w analizie przesiewowej u pacjentów w celu wyeliminowania kombinacji leków, które nie są zalecane do jednoczesnego stosowania. Doświadczenia te mogą także być wykorzystane w laboratoriach kryminalistycznych.

3. Elektroforeza kapilarna jest przydatnym narzędziem w charakterystyce biofilmu. Zastosowanie tej techniki umożliwia obserwację zmian ruchliwości elektroforetycznej i stabilność układu komórek bakteryjnych traktowanych i nietraktowanych antybiotykami z różnych klas (amoksycylina, gentamycyna, metronidazol).

4. Komórki bakteryjne traktowane antybiotykiem wykazały wzrost oddziaływania elektrostatycznego pomiędzy komórkami bakteryjnymi a antybiotykami oraz większą stabilność układów i większą homogenność.

5. Komórki bakteryjne w głębszych warstwach biofilmu są w stanie dostosować się do środowiska i nabyć mechanizmy oporności w wyniku działania mechanizmów molekularnych.

6. Antybiotyki, w tym β -laktamowy (amoksycylina) i aminoglikozydowy (gentamycyna) działając na biofilm doprowadziły do degradacji syntezy ściany komórkowej, a także do zaburzenia macierzy zewnątrzkomórkowej substancji polisacharydowych otaczających biofilm (EPSs) oraz zahamowania białek rybosomalnych i zaburzenia transkrypcji.

Zjawisko to jest skorelowane również z wyższą wartością bezwzględną potencjału zeta i mniejszą ilością zarejestrowanych sygnałów z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej.

7. Zaproponowany mechanizm działania badanych antybiotyków (amoksycylina, gentamycyna, metronidazol) na tworzenie biofilmu, związany jest ze zjawiskiem zlepiania (forma agregacji) i degradacji, co w znacznym stopniu może ułatwić leczenie zakażeń bakteryjnych związanych z biofilmem.

8. Występują istotne różnice między mikrobiomem śliny pacjentów leczonych oraz nieleczonych antybiotykami. Mikrobiom pacjentów podanych antybiotykoterapii charakteryzuje się większą różnorodnością bakterii.

9. Stosowanie antybiotykoterapii ma duży wpływ na profil białkowy identyfikowanych mikroorganizmów, a w konsekwencji na mikrobiom pacjenta. Dodatkowo użyte podłoże do identyfikacji będzie odgrywać kluczową rolę w identyfikacji mikrobiomu. Poza tym, zaproponowane w pracach [P1-P5] podejścia umożliwiają, potwierdzenie diagnozy lekarskiej, a także monitorowanie leczenia chorób bakteryjnych poprzez zastosowanie u pacjentów specyficznej dla danego gatunku bakterii terapii przeciwdrobnoustrojowej. Ponadto zaprezentowane badania mogą być bazą do opracowania metod umożliwiających szybszą diagnostykę i wykrywanie zmian chorobowych na poziomie komórkowym przed wystąpieniem zmian o podłożu klinicznym. Reasumując można stwierdzić, że wszystkie przedstawione w rozprawie doktorskiej badania obejmują zagadnienia związane z mikrobiologią, chemią, medycyną i farmacją, co stanowi o ich interdyscyplinarnym podejściu. Dlatego wiedza uzyskana podczas realizacji badań może być wykorzystana w rutynowych badaniach klinicznych do kontrolowania zjawiska antybiooporności.

Rozprawę zamykają kopie publikacji prac składających się na rozprawę. Warto dodać, że przegląd prac w pełni potwierdza ich dobre opracowanie teoretyczne i doświadczalne oraz trafną ilustrację wywodów materiałami tabelarycznymi i graficznymi.

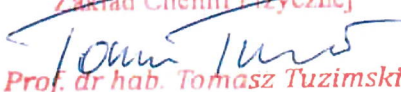
Zgodnie z wykazem naukowym zamieszczonym na str. 132-136 rozprawy doktorskiej Pani mgr chem. Katarzyna Joanna Pauter-Iwicka jest współautorem dziesięciu publikacji oraz pięciu rozdziałów w monografiach (m.in. w *Handbook of Bioanalytics*, Springer 2022). Doktorantka brała również czynny udział w dziewięciu konferencjach naukowych. Na szczególną uwagę zasługują jej zdolności do kierowania zespołami i umiejętność współpracy podczas realizacji trzech grantów naukowych (w których pełniła funkcję kierownika projektów): Grantem Preludium 19 finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki oraz dwoma Grantami Młodych Naukowców. Warto podkreślić również fakt, że Doktorantka odbyła zagraniczny staż badawczy w Szwecji w Instytucie Karolinska na Wydziale Biochemii Medycznej i Biofizyki w Sztokholmie w ramach projektu PROM - Międzynarodowej wymiany stypendialnej doktorantów i kadry akademickiej na UMK (17.08.2021 r. - 06.09.2021 r.).

Chyba teraz jest miejsce na omówienie drobnych edytorskich uchybień zawartych w rozprawie. Na stronach 5 i 6 znajduje się tabela 1 z następującymi nagłówkami kolumn „pK-COOH” i „pK-NH₃⁺”. W zdaniu nad tabelą Doktorantka napisała „Przykłady leków przeciwbakteryjnych z poszczególnych grup, a także struktury chemiczne oraz stałe dysocjacji zostały przedstawione w tabeli 1.”. Proszę o wyjaśnienie i doprecyzowanie jakie dane zostały zawarte w/w kolumnach tabeli 1.

Podsumowując niniejszą ocenę jestem głęboko przekonany, że rozprawa doktorska P. mgr chem. Katarzyny Joanny Pauter-Iwickiej pt. „*Badanie molekularnych mechanizmów biotransformacji antybiotyków dla potrzeb diagnostyki biomedycznej*” i jej dorobek naukowy są na wysokim poziomie i całkowicie spełniają ustawowe wymogi Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. 2018 poz. 1668 z póź. zm.) i dlatego wnoszę wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz powołanej przez Nią Komisji Doktorskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na liczbę publikacji, interdyscyplinarne podejście przedstawionych do oceny badań, które obejmują zagadnienia związane z mikrobiologią, chemią, medycyną i farmacją oraz mają znaczenie praktyczne, gdyż mogą stanowić bazę do opracowania metod umożliwiających szybszą diagnostykę i wykrywanie zmian chorobowych na poziomie komórkowym przed wystąpieniem zmian o podłożu klinicznym oraz mogą być wykorzystane w rutynowych badaniach klinicznych do kontrolowania zjawiska antybiotykooporności wnoszę wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz powołanej przez Nią Komisji Doktorskiej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Lublin, 11 lipca 2023 r.

Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Zakład Chemii Fizycznej

Prof. dr hab. Tomasz Tuzimski

Prof. dr hab. Tomasz Tuzimski

