UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 23 września 2026 r.

Dr hab. Jolanta Kochana, prof. UJ
Zakład Chemii Analitycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
tel. 12 686 24 18
email: jolanta.kochana@uj.edu.pl

Recenzja
pracy doktorskiej **mgr Darii Tarkowskiej**
zatytułowanej
„Analiza leków przeciwdrobnoustrojowych i klinicznych izolatów bakteryjnych przy użyciu łączonych technik analitycznych opartych na spektrometrii mas"

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska powstała w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki na Wydziale Chemii oraz w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Szultki-Młyńskiej, prof. UMK.

Tematyka badań podjętych przez Doktorantkę jest wysoce aktualna i istotna zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Wpisuje się ona w jeden z najważniejszych problemów współczesnej medycyny, jakim jest narastająca antybiotykooporność drobnoustrojów. Szczególne znaczenie mają badania ukierunkowane na szybką identyfikację klinicznych izolatów bakteryjnych, wykrywanie mechanizmów oporności oraz monitorowanie terapii antybiotykowej, gdyż umożliwiają one trafniejszy dobór leczenia i ograniczanie rozwoju szczepów opornych. Istotnym aspektem prowadzonych prac jest również ich związek z rozwijającą się medycyną spersonalizowaną, zakładającą dostosowanie terapii do indywidualnego stanu pacjenta oraz charakterystyki patogenu. Badania te mają zatem znaczenie nie tylko dla rozwoju nowoczesnej diagnostyki mikrobiologicznej, lecz również dla doskonalenia strategii terapeutycznych stosowanych w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Ponadto ich interdyscyplinarny charakter, lokujący się na styku

bioanalityki i diagnostyki medycznej, mikrobiologii i nauk farmaceutycznych, podkreśla zarówno wartość naukową, jak i potencjał praktycznych zastosowań przeprowadzonych badań.

Podstawą rozprawy doktorskiej jest spójny cykl prac obejmujący trzy oryginalne publikacje naukowe oraz trzy artykuły przeglądowe. Artykuły oryginalne zostały opublikowane w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się w bazie czasopism JCR, w szczególności w czasopismach *Molecules* (IF 4,927), *ACS Omega* (IF 3,700) oraz *Materials* (IF 3,748). Jedna z prac przeglądowych ukazała się w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu *International Journal of Molecular Sciences* (IF 5,600), natomiast dwie prace przeglądowe zostały opublikowane w polskich czasopismach, znajdujących się na ministerialnej liście czasopism naukowych: w *Wiadomościach chemicznych* i w czasopiśmie *Analityka: nauka i praktyka*. Ponadto, w rozprawie Autorka zawarła wyniki badań odnoszące się do identyfikacji mikroorganizmów wyizolowanych z próbek pobranych od pacjentów, oraz przedstawiła zastosowania testów MBT-STAR-BL oraz MBT-ASTRA, opartych na technice MALDI-TOF MS, służących do wykrywania antybiotykoodporności.

Rozprawę otwiera bardzo przydatny podczas czytania pracy wykaz stosowanych symboli i skrótów. Następnie Autorka umieściła wprowadzenie oraz cel i założenia pracy. Kolejno, w czterech rozdziałach, zaprezentowała główne zagadnienia badawcze podjęte w toku realizacji rozprawy, uzasadniając ich znaczenie naukowe, aktualny stan wiedzy oraz przedstawiając zastosowane podejście badawcze. Tę część rozprawy rozpoczyna przybliżenie zagadnień odnoszących się do roli i znaczenia mikroorganizmów w mikrobiologii klinicznej i przemysłowej, następnie opisane zostały aspekty klasyfikacji i mechanizmy działania antybiotyków oraz zjawisko antybiotykooporności. Trzeci rozdział został poświęcony MALDI-TOF MS jako zaawansowanej technice spektrometrii, ze szczególnym zwróceniem uwagi na jej wykorzystanie w badaniach mikrobiologicznych. W ostatnim rozdziale Doktorantka przedstawiła zagadnienie terapeutycznego monitorowania leków. Po biografii obejmującej 197 pozycji literaturowych, umieszczone zostały teksty sześciu publikacji, wchodzących w skład dysertacji, podsumowanie i wnioski, dorobek naukowy Doktorantki, oświadczenia współautorów oraz streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim. Całość obejmuje 233 strony.

Głównym celem dysertacji było opracowanie i integracja nowoczesnych technik analitycznych przeznaczonych do identyfikacji mikroorganizmów, zaawansowanego badania ich mechanizmów oporności wobec antybiotyków, a także opracowanie nowych metod przygotowania próbek do monitorowania stężeń antybiotyków wykorzystywanych w terapii pacjentów. Doktorantka rozpoczęła badania od analizy aktualnego stanu wiedzy w zakresie podejmowanej tematyki. W pierwszej publikacji o charakterze przeglądowym przedstawiła możliwości zastosowania technik „-omicznych" do identyfikacji mikroorganizmów oraz wykrywania antybiotykooporności. Pierwszy etap doświadczeń, przedstawiony w dysertacji, objął proteomiczną identyfikację mikroorganizmów w próbkach pacjentów z infekcjami górnych dróg oddechowych oraz w próbkach trudnogojących się ran pooperacyjnych, co zostało opisane w publikacji P2. Problemowi wykrywania antybiotykoodporności dedykowane były badania z wykorzystaniem komercyjnych zestawów MBT STAR-Carba IVD oraz MBT-ASTRA, oba bazujące na technice MALDI-TOF MS. Badania te, opisane przez Doktorantkę w rozprawie, objęły opracowanie nowej metody wykrywania antybiotykoodporności oraz walidację metody,

z wykorzystaniem spektrometru Zybio EXS2600. W pracy P3 przedstawiono badania nad skróceniem czasu wykrywania mikroorganizmów skupione na zweryfikowaniu możliwości krótszej inkubacji bakterii przetrwalnikujących, wyizolowanych z próbek żywności, przy zachowaniu dokładności i wiarygodności procesu detekcji. Innym kierunkiem zainteresowań badawczych Doktorantki było oznaczanie antybiotyków beta-laktamowych oraz ich metabolitów. Przedstawienie tego zagadnienia, w aspekcie technik *in vitro*, *in vivo* oraz modelowania *in silico* zawarto w pracy przeglądowej P4. Doktorantka opisała również wykorzystanie alternatywnej metody badania metabolitów leków, generowanych na drodze elektrochemicznego utleniania w reaktorze elektrochemicznym, połączonym *on-line/off-line* z tandemowym spektrometrem mas (EC MS/MS). Kolejne dwie prace, P5 i P6, dotyczyły badań nad możliwością wykorzystania ekstrakcji MIP-SPME do wyizolowania i wzbogacenia antybiotyków beta-laktamowych i ich metabolitów z osocza ludzkiego w procedurze terapeutycznego monitorowania farmaceutyków.

Specyfika rozpraw doktorskich opartych na cyklu publikacji naukowych sprawia, że rola recenzenta w ocenie merytorycznej przedstawionych badań jest do pewnego stopnia odmienna niż w przypadku klasycznych dysertacji. Publikacje tworzące rozprawę przeszły wcześniej proces recenzyjny prowadzony przez ekspertów z danej dziedziny, co stanowi niezależną weryfikację jakości naukowej uzyskanych wyników oraz oryginalności podjętej tematyki badawczej. O randze prac świadczy również ich opublikowanie w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, indeksowanych w uznanych bazach naukowych. W tej sytuacji szczególnej uwagi wymaga analiza zakresu zaangażowania Doktorantki w realizację poszczególnych etapów badań oraz w przygotowanie publikacji, zwłaszcza że wszystkie prace wchodzące w skład osiągnięcia doktorskiego zostały opracowane we współautorstwie. Na podstawie przedstawionych oświadczeń współautorów można stwierdzić, że wkład mgr D. Tarkowskiej w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy był znaczący. Należy zauważyć, że Doktorantka jest pierwszym autorem czterech spośród sześciu prac oraz drugim autorem dwóch pozostałych artykułów. Wskazuje to na jej kluczową rolę w realizacji badań oraz przygotowaniu publikacji, które stanowią podstawę ocenianego osiągnięcia naukowego.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionej rozprawy doktorskiej, stanowiących elementy nowości naukowej, zaliczam:

- opracowanie szybkiej procedury bazującej na technice MALDI-TOF MS do identyfikacji bakterii w próbkach pobranych z trudno gojących się ran pooperacyjnych oraz próbek pobranych z dróg oddechowych pacjentów;
- zaproponowanie procedury umożliwiającej skrócenie czasu inkubacji bakterii przetrwalnikujących, co pozwala na ich szybszą identyfikację i szybsze wdrożenie terapii; jest to kluczowe w przypadku ostrych infekcji bakteryjnych zagrażających życiu pacjenta, np. przy sepsie, czy wielolekoopornych zakażeniach szpitalnych;
- objęcie badaniami nad antybiotykoopornością zróżnicowanych pod kątem zakresu działania terapeutycznego i mechanizmów działania antybiotyków; prace te objęły imipenem, cefotaksym, piperacylinę, ciprofloksacynę, lewofloksacynę oraz azytromycynę;

- opracowanie procedury elektrochemicznej syntezy polimeru z odwzorowaniem molekularnym, stosowanego jako sorbent w ekstrakcji SPME; otrzymany polimer umożliwił izolację i wzbogacenie amoksycyliny, cefotaksymu i metronidazolu z osocza ludzkiego; oznaczenie tych antybiotyków z wykorzystaniem techniki SPME-LC-MS/MS
- zweryfikowanie możliwości wykorzystania spektrometru MALDI Zybio EXS2600 do wykrywania antybiotykoodporności; sprawdzenie zgodności w klasyfikacji szczepów opornych z wykorzystaniem Zybio, podejścia bioinformatycznego CLOVER Biosoft oraz testów MBT-STAR-BL i MBT-ASTRA.

Po przeczytaniu rozprawy nasunęło mi się kilka pytań. Najważniejsze z nich zamieszczam poniżej i proszę mgr Darię Tarkowską o ustosunkowanie się do nich podczas obrony pracy.

- W rozdziale 4.1 *Oznaczanie i identyfikacja antybiotyków oraz ich metabolitów w płynach ustrojowych* przedstawiono m.in. aspekt badania metabolitów leków na drodze elektrochemicznego utleniania farmaceutyku. Informacje zawarte w tym fragmencie (str. 66-68) są w zasadzie opisem przeprowadzonych doświadczeń, niestety nie podano jakie leki poddano badaniom, nie przedstawiono wyników tych badań, Doktorantka ograniczyła się do sformułowania „Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż .....". Z jakiego powodu wyniki tych badań nie zostały zamieszczone w pracy?
- Czy w oparciu o przeprowadzone badania można wyciągnąć wnioski odnośnie możliwości zaprojektowania polimeru z odwzorowaniem molekularnym do konkretnego antybiotyku?
- Jak Autorka rozumie pojęcie walidacji? W podsumowaniu (str. 214) napisano: „Zastosowanie tej technologii przyczyniło się do skrócenia czasu diagnostyki oraz zwiększenia jej precyzyjności w porównaniu do tradycyjnych metod. *Wyniki te stanowią potwierdzenie walidacji metody* w diagnostyce klinicznej, ..." (punkt 1), *„Walidacja tych metod pozwala na szybsze wykrycie zagrożeń* zarówno w kontekście infekcji klinicznych, jak i w przemyśle spożywczym" (punkt 2) oraz *„Walidacja tej metody pozwala na precyzyjne monitorowanie stężenia leków*, co jest kluczowe w kontekście personalizacji leczenia „ (punkt 5). Proszę o wyjaśnienie.

Ogólnie praca jest napisana starannie, treść jest zobrazowana klarownymi rysunkami i tabelami. Podsumowanie trafnie uwypukla wszystkie najważniejsze etapy i wyniki badań. Biorąc pod uwagę strukturę pracy, w moim odczuciu rozprawa jest napisana trochę chaotycznie, brak jest wyraźnego oddzielenia doniesień literaturowych od przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Przykładowo, we wspomnianym wcześniej rozdziale 4.1., po wprowadzeniu i opisie badań własnych oraz wyciągnięciu wniosków, Autorka, w oparciu o literaturę, ponownie wyjaśnia podejście EC MS/MS, pokazuje schemat układu pomiarowego, m.in. przytacza informacje, które podała już wcześniej, przed opisem badań własnych. Taki sposób podania informacji utrudnia stwierdzenie jaki był zakres prac doświadczalnych Autorki. Zaskakujące dla mnie jest wymienienie stosowanej aparatury na początku rozprawy, jako części *Celu i założeń pracy*, przed opisem zagadnień badawczych. W dysertacji, jak w każdej pracy, można znaleźć niefortunne sformułowania oraz pewne powtórzenia treści, których przykładów nie będę szczegółowo przytaczać. Wspomniane niedoskonałości nie rzutują na bardzo pozytywny odbiór pracy.

W pracy widać bardzo dobrą znajomość interdyscyplinarnej tematyki badawczej oraz duże zaangażowanie Doktorantki w szeroko prowadzone badania. Znaczne zróżnicowanie stosowanych technik pomiarowych pozwala wnioskować o szerokiej wiedzy z zakresu technik badawczych i świadczy o doskonałym przygotowaniu Doktorantki do dalszej pracy badawczej.

Całkowity dorobek naukowy mgr Darii Tarkowskiej jak na młodego naukowca, należy również uznać za wyróżniający. Jest ona współautorem 6 publikacji odnoszących się do tematyki rozprawy doktorskiej oraz 9 innych publikacji; sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania przekracza 34. Doktorantka wielokrotnie uczestniczyła w konferencjach krajowych i zagranicznych. W swoim dorobku ma 8 wystąpień ustnych oraz 7 prezentacji posterowych. Na swoje badania zdobyła Grant dla Doktorantów oraz Młodych Naukowców (finansowanie wydziałowe), a obecnie kieruje realizacją grantu NCN Preludium.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż przedstawiona praca doktorska całkowicie spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnoszę do Rady Dyscypliny Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Darii Tarkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z przedstawionych osiągnięć Doktorantki wynika, iż jest ona bardzo obiecującym młodym badaczem. Wyniki badań, które przeprowadziła w ramach realizacji pracy doktorskiej mają duży potencjał aplikacyjny w nowoczesnej diagnostyce medycznej i terapeutycznym monitorowaniu farmaceutyków. Aktualność i znaczenie podjętej tematyki badawczej nie budzą żadnych wątpliwości. Zważywszy na szeroki zakres badań i ich wartość merytoryczną, oraz dorobek naukowy Doktorantki, **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Darii Tarkowskiej**