

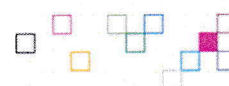
Prof. dr hab. Małgorzata Grabarczyk
Katedra Chemii Analitycznej,
Instytut Nauk Chemicznych,
Wydział Chemii UMCS w Lublinie

Lublin 03.08.2026

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Darii Tarkowskiej
pt. „Analiza leków przeciwdrobnoustrojowych i klinicznych izolatów bakteryjnych przy użyciu
łączonych technik analitycznych opartych na spektrometrii mas”**

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska mgr Darii Tarkowskiej zrealizowana w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Szulcki-Młyńskiej, prof. UMK. Badania stanowiące podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej realizowane były również w laboratoriach Interdyscyplinarnego Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu. Cel pracy był złożony i wielowymiarowy, skupiał się na wielu wyzwaniach, takich jak optymalizacja metod monitorowania terapii antybiotykowej, optymalizacja procesów przygotowania próbek czy też ocena mechanizmów oporności zidentyfikowanych bakterii na wybrane antybiotyki. Przedmiotowa rozprawa doktorska wpisuje się w kluczowe wyzwania współczesnej medycyny laboratoryjnej, mikrobiologii oraz farmakokinetyki. Praca dotyczy problemu o globalnym znaczeniu klinicznym, jakim jest narastająca lekooporność drobnoustrojów, jednocześnie proponując zaawansowane rozwiązania w zakresie optymalizacji monitorowania terapii antybiotykowej.

Współczesna nauka coraz wyraźniej odchodzi od schematycznego leczenia pacjentów na rzecz medycyny zindywidualizowanej. To nowoczesne podejście rozwija się na styku wielu dyscyplin, w tym nauk chemicznych, genetyki czy informatyki medycznej. Jego głównym celem jest projektowanie schematów leczenia dopasowanych do konkretnego organizmu. Taka strategia staje się bezcenna w zwalczaniu groźnych zakażeń bakteryjnych. Stanowią one obecnie jedno z największych zagrożeń epidemiologicznych na świecie, głównie z powodu powszechności ich występowania oraz stale malejącej skuteczności popularnych antybiotyków. Przez lata w laboratoriach medycznych polegano na standardowych procedurach identyfikacji mikroorganizmów, obejmujących m.in. analizy biochemiczne i genetyczne. Choć techniki te są powszechnie znane, ich największą wadą jest długi czas oczekiwania na wyniki oraz trudności z rozróżnieniem blisko spokrewnionych gatunków. W sytuacjach krytycznych opóźnia to podanie właściwego leku. Przełomem w diagnostyce okazało się wdrożenie zaawansowanych technik fizykochemicznych, a w szczególności spektrometrii mas z

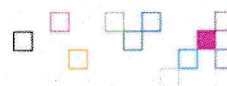


desorpcją/ionizacją laserową wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF MS). Narzędzie to diametralnie zmieniło pracę mikrobiologów, upraszczając i skracając cały proces badawczy. Technika ta umożliwia badania specyficzne profili białkowych drobnoustrojów, co pozwala błyskawicznie określić ich dokładną przynależność gatunkową. Co istotne, technologia ta potrafi znacznie więcej niż tylko nazywać bakterie. Pozwala ona również na bieżąco sprawdzać, w jaki sposób dany szczep broni się przed lekami. Łącząc te dwie informacje, lekarze zyskują solidną podstawę do natychmiastowego podjęcia precyzyjnej terapii. Zastosowanie MALDI-TOF MS rewolucjonizuje mikrobiologię kliniczną, umożliwiając szybką identyfikację patogenów i wykrywanie mechanizmów oporności w ciągu kilku godzin zamiast dni, co jest niezmiernie ważne i pozwala na szybkie wprowadzenie odpowiedniego leczenia. Dlatego uważam, że wybrana przez mgr Darię Tarkowską tematyka badań mających na celu lepsze zrozumienie mechanizmów oporności mikroorganizmów oraz optymalizację metod monitorowania terapii antybiotykowej, z wykorzystaniem między innymi spektrometru mas MALDI-TOF MS jest w pełni uzasadniona na polu naukowym i wnosi istotny wkład do aktualnych zagadnień związanych z analizą leków przeciwdrobnoustrojowych i klinicznych izolatów bakteryjnych. Aktualność przeprowadzonych badań potwierdza również fakt, że oceniana praca doktorska powstała przy wsparciu finansowym w ramach projektu NCBR TANGO V "Nowe podejście w identyfikacji mikroorganizmów w matrycach środowiskowych i klinicznych dla rutynowych laboratoriów mikrobiologicznych" oraz projektu IDUB: BioSep Centrum Doskonałości ToPerMed „W kierunku medycyny spersonalizowanej”.

Ocena formalna pracy doktorskiej oraz dorobku i osiągnięć Doktorantki

Rozprawa doktorska mgr Darii Tarkowskiej została przedstawiona w formie oprawionego manuskryptu obejmującego 233 strony, zawierającego wprowadzenie do problematyki badawczej wraz z przeglądem literaturowym, cykl 6 publikacji wraz z oświadczeniami ich współautorów określającymi zakres udziału w ich powstanie, podsumowanie, wnioski oraz bibliografię obejmującą 197 pozycji. W celu bardziej przejrzystej prezentacji uzyskanych wyników rozprawa doktorska została wzbogacona o 9 rysunków i 7 tabel oraz spis skrótów i symboli stosowanych w pracy. Dodatkowo dołączony został opis sylwetki Doktorantki wraz z jej dokonaniem naukowymi.

Dysertacja oparta jest na cyklu czterech artykułów opublikowanych w czasopiśmie z bazy *Journal Citation Reports*, takich jak *Materials*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Molecules*, *ACS Omega* należące do kwartyłu Q1 lub Q2 oraz dwóch artykułów z poza bazy *JCR*, takich jak *Wiadomości Chemiczne* i *Analityka: nauka i praktyka*. Sumaryczny IF prac z bazy *JCR* wynosi 17,975, co daje średni IF na pracę 4,49, uważam, że jest to wysoka wartość, świadcząca o wysokim poziomie merytorycznym zaprezentowanych badań. Sumaryczna punktacja MNiSW wszystkich sześciu artykułów wynosi 590, co daje 88,33 punktów na pracę. Artykuły wchodzące w skład rozprawy są wieloautorskie, ale należy zaznaczyć, że w czterech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem,



co może świadczyć o Jej wiodącej roli w ich powstanie. Potwierdzają to również dołączone oświadczenia współautorów artykułów, z których jednoznacznie wynika, że Doktorantka brała udział w opracowaniu koncepcji prac badawczych oraz ich wykonaniu, interpretacji uzyskanych wyników, przeglądzie literatury, przygotowaniu manuskryptów i ich korekcie.

W tym miejscu chciałabym jeszcze dodać, że oprócz sześciu publikacji stanowiących podstawę ocenianej dysertacji, Doktorantka jest również współautorką jeszcze dziewięciu publikacji, z czego sześć ukazała się w czasopiśmie z bazy JCR. Doktorantka prezentowała swoje osiągnięcia naukowe na piętnastu konferencjach, w tym trzynastu konferencjach o zasięgu międzynarodowym. Na podkreślenie zasługuje fakt, że większość wystąpień, bo aż osiem były to komunikaty ustne, pozostałe prezentacje miały formę posteru.

Ważnym aspektem potwierdzającym aktualność badań prowadzonych przez Doktorantkę jest zdobycie na nie finansowania przez NCN w ramach Grantu PRELUDIUM, którego jest kierownikiem (2026-2028) oraz Grantu dla Doktorantów oraz Młodych Naukowców na macierzystej uczelni. Również część wyjazdów na zagraniczne konferencje było finansowanych w ramach Minigrantów Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych AST UMK. Zaangażowanie i wysoki poziom prac naukowych prowadzonych przez Doktorantkę zostało zauważone przez władze macierzystej uczelni o czym świadczy uzyskana nagroda zespołowa za osiągnięcia w dziedzinie nauki i badań oraz nagroda zespołowa za osiągnięcia w dziedzinie organizacyjnej. Magister Daria Tarkowska od 2021 roku jest członkiem Centrum Doskonałości – IDUB UMK, ToPerMed „W kierunku medycyny spersonalizowanej”, czyli tematyce ściśle związanej z tematem ocenianej dysertacji. Również związane tematycznie były współorganizowane przez Doktorantkę warsztaty „Technika MALDI w rutynowej diagnostyce klinicznej – warsztaty z identyfikacji patogenów klinicznych i detekcji antybiotykooporności”.

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

W przedstawionej do oceny dysertacji po wstępnym wprowadzeniu w tematykę, Doktorantka w zwięzły sposób przedstawiła temat i cel badań wraz z wyodrębnieniem celów szczegółowych. Kluczowym celem rozprawy była analiza mikroorganizmów klinicznych oraz detekcja antybiotykooporności bakterii, ze szczególnym uwzględnieniem optymalizacji procesu identyfikacji szczepów bakterii oraz opracowanie nowych metod przygotowania próbek. Formułując cele szczegółowe, Doktorantka każdorazowo odwoływała się do publikacji prezentujących badania przeprowadzone na rzecz ich realizacji, co znacząco ułatwiło Recenzentowi ocenę stopnia ich realizacji. Dodatkowo w sposób klarowny przedstawione zostały instrumenty, które wykorzystywała w swoich badaniach. Wśród najważniejszych z nich należy wymienić: trzy różne spektrometry mas MALDI-TOF MS, spektrometr mas LC-MS/MS, spektrofotometr UV-Vis, spektrometr Spectrum 2000, spektrometr jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR), chromatograf ciekłowy, skaningowy mikroskop elektronowy (SEM), mikroskop stereoskopowy, zaawansowany odwrócony mikroskop badawczy firmy

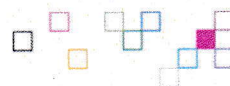


Zeiss, transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM), dyfraktometr proszkowy SAXS. Zestaw ten stanowi kompleksowe zaplecze badawcze, które umożliwia prowadzenie wieloetapowych, interdyscyplinarnych analiz na najwyższym poziomie i świadczy o szerokim spektrum prowadzonych prac badawczych, wymagających użycia unikalnych technik pomiarowych.

Przybliżając problematykę pomiarową w pierwszym rozdziale Doktorantka przedstawiła informacje na temat roli i znaczenia mikroorganizmów w mikrobiologii klinicznej i przemysłowej. Zwróciła uwagę na przełomową rolę MALDI-TOF MS w zrewolucjonizowaniu diagnostyki mikrobiologicznej, umożliwiającego szybkie i precyzyjne różnicowanie mikroorganizmów na poziomie gatunku oraz technologii omicznych jako nowoczesnego podejścia badawczego ukierunkowanego na badaniu całych zbiorów cząsteczek (np. wszystkich genów lub białek) zamiast analizowania ich pojedynczo. Odpowiedzią na to była publikacja przeglądowa, oznaczona jako P1, w której Doktorantka dokonała podsumowania zastosowania podejść omicznych w analizie metodą MALDI-TOF MS, w tym w identyfikacji bakterii oraz analizie mechanizmów oporności na antybiotyki. Publikację [P1] uważam za bardzo wartościową, stanowi ona dobre kompendium wiedzy gdzie na 33 stronach w oparciu o 273 pozycje literaturowe Doktorantka przedstawiła kluczowe informacje o technice i aktualnym stanie wiedzy z nią związanej.

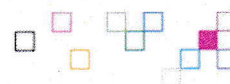
Kolejny rozdział poświęcony został antybiotykom i antybiotykoodporności, przedstawiając na Rys. 1 w sposób bardzo przejrzysty historię od 1910 roku, kiedy wprowadzony został pierwszy syntetyczny antybiotyk aż po lata dwutysięczne, kiedy to ogólnością stała się rosnąca oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe. Czytelność pracy znacząco podnosi Tabela 1, w sposób syntetyczny porządkująca najpowszechniejsze klasy antybiotyków pod kątem mechanizmu i spektrum działania. Wartościowym uzupełnieniem tekstu jest również Tabela 2, która zestawia metody oceny antybiotykoodporności, prezentując ich mocne i słabe strony. Doktorantka odniosła się tutaj do swoich prac badawczych, w których skoncentrowała się na detekcji i analizie antybiotykoodporności wybierając do badań antybiotyki o różnym mechanizmie działania [B2], analizie mechanizmów antybiotykoodporności na klindamycynę oraz piperacylinę z tazobaktamem z wykorzystaniem MALDI-TOF MS [P2] oraz wykorzystaniu techniki MIP-SPME do izolacji amoksycyliny, cefotaksymu oraz metronidazonu [P5]. Badania przeprowadzone przez doktorantkę polegały na wyodrębnieniu specyficznych sygnatur molekularnych białek oraz zbadaniu zmian w metabolizmie drobnoustrojów poddanych działaniu antybiotyków, co umożliwiło fenotypową ocenę ich oporności [P2,B2].

Trzeci rozdział poświęcono omówieniu techniki MALDI-TOF MS, którą Doktorantka przedstawia jako zaawansowaną metodę spektrometrii mas, stanowiącą przełomowe narzędzie we współczesnych analizach laboratoryjnych. Rozdział ten ma kluczowe znaczenie dla dysertacji, ponieważ autorka w szerokim zakresie wykorzystuje opisywaną technikę, dlatego przybliżenie jej specyfiki jest dla czytelnika niezwykle istotne. Technikę MALDI-TOF MS Doktorantka zastosowała w swoich badaniach zarówno do identyfikacji mikroorganizmów, jak i do oznaczania antybiotykoodporności. Na przykład w pracy [P2]



przeprowadziła analizę wpływu składu chemicznego podłoża hodowlanego na identyfikację *S. aureus* za pomocą MALDI-TOF MS, wykazując, że jakość widm masowych oraz skuteczność identyfikacji zależą od użytej pożywki. Zaś w pracy [P3] udowodniła, że MALDI-TOF MS osiąga dokładność porównywalną z tradycyjnymi metodami biologii molekularnej, takimi jak sekwencjonowanie regionu 16S rRNA, uznawanym za złoty standard identyfikacji prokariotów. W innych badaniach Doktorantka wykorzystwała tę technikę do szybkiej identyfikacji bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, jak i różnych gatunków grzybów z różnych matryc, w tym złożonych, tak jak trudno gojące się rany pooperacyjne czy też ślina i wymazy z górnych dróg oddechowych [P2,B1]. Wyniki identyfikacji poszczególnych rodzajów mikroorganizmów Doktorantka przedstawiła w formie mapy ciepła w Tabeli 3, co bardzo ułatwia szczegółową analizę różnorodności oraz częstości występowania mikroorganizmów w badanych lokalizacjach. Doktorantka przeprowadziła szczegółowe badania w celu oceny antybiotykooporności oraz identyfikacji charakterystycznych sygnatur białkowych dla *K. pneumoniae* wobec imipenemu jako antybiotyku z grupy karbapenemów o szerokim spektrum działania. W badaniach wykorzystwała cztery różne oprogramowania, takie jak Zybio, CLOVER BioSoft, MBT-STAR-BL oraz MBT-ASTRA, co pozwoliło na ocenę różnic w interpretacji wyników oraz powiązania z obecnością genów oporności i mechanizmów beta-laktamaz. Były to badania o charakterze pionierskim, w ramach których Doktorantka znalazła się wśród pierwszych badaczy wykazujących możliwość wykorzystania spektrometru MALDI firmy Zybio do analizy antybiotykooporności. Zastosowanie przez Doktorantkę zróżnicowanych technik badawczych umożliwiło wszechstronną ocenę fenotypu oporności, podkreślając znaczenie kompleksowego podejścia w diagnostyce mikrobiologicznej. Otrzymane wyniki zostały zaprezentowane w Tabeli 5. Na uznanie zasługują również pionierskie wyniki badań zaprezentowane w Tabeli 6, pozwalające na ocenę względnego współczynnika wzrostu wielu szczepów bakteryjnych w obecności wybranych antybiotyków. Podsumowując można stwierdzić, że przeprowadzone przez Doktorantkę badania potwierdzają wysoką skuteczność techniki MALDI-TOF MS w identyfikacji mikroorganizmów oraz analizy antybiotykooporności, jako niezastąpionego narzędzia w diagnostyce mikrobiologicznej.

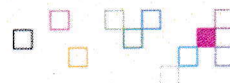
Ostatni, czwarty rozdział pracy poświęcono zagadnieniu terapeutycznego monitorowania leków. Treść skupia się wokół nowoczesnych metod oznaczania i identyfikacji antybiotyków oraz ich metabolitów w płynach ustrojowych, a także szczegółowo omawia zaawansowane techniki przygotowania próbek do analizy. Doskonałym uzupełnieniem tej części pracy jest Tabela 7. Doktorantka w przejrzysty sposób porównuje w niej najważniejsze techniki przygotowania próbek, takie jak ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE), ekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPE) oraz mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME). Szczególną uwagę zwraca technika SPME, która integruje procesy ekstrakcji i zatężania analitów w jednym kroku. Eliminuje to konieczność użycia znacznych objętości rozpuszczalników organicznych, co czyni ją rozwiązaniem znacznie bardziej proekologicznym w porównaniu do konwencjonalnych metod. Implementacja przez Doktorantkę tej techniki z



wykorzystaniem polimerów z nadrukiem molekularnym jako selektywnych materiałów sorpcyjnych (MIP-SPME), zintegrowanej z chromatografią cieczową i spektrometrią mas, pozwoliła na precyzyjną analizę stężeń wybranych leków i ich metabolitów w matrycach biologicznych. Pionierskie wykorzystanie tego rozwiązania w badaniach klinicznych stanowi istotny krok naprzód w obszarze personalizowanej medycyny [P5]. Bardzo wysoko oceniam publikację oznaczona jako [P6], w której opisano zastosowanie techniki MIP-SPME do terapeutycznego monitorowania leków w próbkach biologicznych. Choć artykuł nie jest indeksowany w bazie JCR, wyróżnia się wysokim poziomem merytorycznym i stanowi rzetelne kompendium wiedzy.

Podsumowując przedstawiony w rozprawie dorobek eksperymentalny chciałabym podkreślić, że przeprowadzone przez Doktorantkę badania wymagały szerokiej wiedzy na temat wielu technik pomiarowych i niewątpliwie pochłonęły dużo czasu. Uważam, że Autorka z powodzeniem zrealizowała założone cele badawcze, co świadczy o jej dobrym przygotowaniu naukowym, wszechstronności oraz właściwym zaplanowaniu badań. Podczas lektury dysertacji nasunęły mi się następujące pytania i sugestie, które pozwoliłam sobie przedstawić poniżej:

- Co zadecydowało o wyborze antybiotyków zastosowanych w badaniach? Proszę o wyjaśnienie, jakie kryteria zostały uwzględnione przy ich doborze – czy wynikały one z częstości stosowania w praktyce klinicznej, mechanizmu działania, profilu oporności drobnoustrojów, dostępności preparatów, czy też z wcześniejszych doniesień naukowych i wyników badań w tym obszarze.
- W publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej zastosowano szereg zaawansowanych technik pomiarowych. Proszę o doprecyzowanie, które z tych badań doktorantka wykonała samodzielnie.
- Doktorantka w Streszczeniu pisze: „Opracowane narzędzia diagnostyczne mają potencjał zastosowania w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej oraz monitorowaniu terapii antybiotykowej.” Proszę o komentarz Doktorantki jakie są szanse na praktyczne ich wykorzystanie.
- Czy wyniki badań własnych oznaczonych jako [B1] i [B2] zostaną udostępnione w formie publikacji naukowych? Jeśli tak, to kiedy planowana jest ich publikacja oraz gdzie będą dostępne?
- W odniesieniu do badań własnych oznaczonych jako B1 Doktorantka pisze: „Próbki analizowano trzykrotnie w celu oceny powtarzalności wyników oraz walidacji metody ekstrakcji i dokładności identyfikacji mikroorganizmów przy użyciu MALDI-TOF MS”. Prosiłabym o dokładniejsze informacje dotyczące uzyskanej powtarzalności, dokładności oraz na temat walidacji metod ekstrakcji.
- Zastosowanie techniki MALDI-TOF MS przyczynia się do skrócenia czasu diagnostyki oraz zwiększenia jej precyzyjności w porównaniu do tradycyjnych metod. Czy Doktorantka mogłaby odnieść się do opłacalności ekonomicznej zastosowania tej techniki w porównaniu do tradycyjnych metod.
- Brak w tekście pozycji literaturowej [26].
- Z tytułu grantu NCN PRELUDIUM, na którego realizację Doktorantka, jako kierownik projektu, uzyskała dofinansowanie w bieżącym roku, można wnioskować, że Jej zainteresowania naukowe nadal



koncentrują się na problematyce antybiotykooporności. Prosiłabym o przedstawienie bardziej szczegółowych informacji dotyczących zarówno badań objętych grantem, jak i planowanych kierunków dalszej pracy naukowej. Czy Doktorantka zamierza wykorzystać w nich technikę MALDI-TOF MS?

Przedstawione powyżej uwagi mają charakter dyskusyjny i w żaden sposób nie umniejszają wysokiej wartości recenzowanej dysertacji. Oceniając ją całościowo, uznaję, że wnosi ona istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki chemiczne. Dodatkowym atutem rozprawy jest fakt, że częściowo rozprawa opiera się na cyklu tematycznie spójnych publikacji, które zostały już wcześniej pozytywnie zweryfikowane w procesie recenzji naukowej przed ich opublikowaniem. Opracowane przez Doktorantkę procedury umożliwiają istotne skrócenie czasu badań diagnostycznych oraz zwiększenie dokładności w wykrywaniu patogenów i określaniu ich lekowrażliwości. Przeprowadzone przez Doktorantkę w tym celu badania cechują się wysokim stopniem oryginalności, starannym warsztatem badawczym oraz znacznym potencjałem poznawczym, stanowiąc solidną podstawę do prowadzenia dalszych prac naukowych.

Wniosek końcowy

Na podstawie oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Darii Tarkowskiej zatytułowanej „Analiza leków przeciwdrobnoustrojowych i klinicznych izolatów bakteryjnych przy użyciu łączonych technik analitycznych opartych na spektrometrii mas” jednoznacznie stwierdzam, że spełnia ona wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. z 2024 r. poz. 1571, z późn. zm.) a także zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Wobec powyższego wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Darii Tarkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie

Będąc w pełni przekonana o bardzo wysokiej wartości naukowej dysertacji, jej wkładu w rozwój wiedzy oraz szeroki zakres podjętych badań, potwierdzonych współautorstwem sześciu artykułów naukowych o aplikacyjnym charakterze przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani Darii Tarkowskiej.

Prof. dr hab. E. Gierczyńska

