Prof. dr hab. Michał Ciborowski
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Zakład Biochemii Lekarskiej

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt.:

„Analiza leków przeciwdrobnoustrojowych i klinicznych izolatów bakteryjnych przy użyciu łączonych technik analitycznych opartych na spektrometrii mas"

przygotowanej przez mgr Darię Tarkowską
w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki Wydziału Chemii
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Szultki-Młyńskiej, prof. UMK.

Przedłożona mi do oceny rozprawa poświęcona jest wykorzystaniu technik analitycznych opartych na spektrometrii mas do identyfikacji mikroorganizmów, oceny ich oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe oraz oznaczania antybiotyków i ich metabolitów w materiale biologicznym. Tematyka pracy łączy zagadnienia chemii analitycznej i bioanalityki z mikrobiologią kliniczną oraz potrzebami monitorowania farmakoterapii. Szybkie i wiarygodne rozpoznanie drobnoustroju, określenie jego wrażliwości na antybiotyki oraz oznaczenie stężenia zastosowanego leku stanowią istotne elementy postępowania klinicznego w zakażeniach. Podjęty temat uważam za istotny zarówno poznawczo, jak i z punktu widzenia potencjalnych zastosowań praktycznych. Pierwsza część badań obejmowała wykorzystanie techniki MALDI-TOF MS do identyfikacji mikroorganizmów w izolatach bakteryjnych oraz ocenę antybiotykooporności z zastosowaniem testów MBT-STAR-BL i MBT-ASTRA. Druga natomiast była poświęcona opracowaniu włókien do mikroekstrakcji do fazy stałej, selektywnych dla wybranych antybiotyków dzięki wykorzystaniu polimeru z odciskiem molekularnym, oraz ich wykorzystaniu do izolacji leków i metabolitów z osocza, które następnie były analizowane z wykorzystaniem chromatografii cieczowej i spektrometrii mas. Na uwagę zasługuje wykorzystanie w badaniach rzeczywistego materiału klinicznego, dzięki czemu opracowywane rozwiązania były testowane również w warunkach złożonej matrycy biologicznej.

Rozprawa liczy 233 strony, została napisana w języku polskim i obejmuje wprowadzenie, cel i założenia pracy, rozbudowany rozdział zatytułowany „Problem badawczy", bibliografię, publikacje włączone do dysertacji, podsumowanie i wnioski, wykaz dorobku naukowego, oświadczenia współautorów publikacji oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Całość poprzedzają spis treści oraz wykaz skrótów. W skład rozprawy wchodzi sześć publikacji naukowych oznaczonych jako P1–P6 oraz wyniki dodatkowych badań określonych jako badania własne B1 i B2. Artykuły P1–P6 zostały opublikowane w latach 2021–2023. Są to trzy prace doświadczalne (P2, P3 i P5) oraz trzy przeglądowe (P1, P4 i P6). Doktorantka jest pierwszą autorką czterech prac (1 badawczej i 3 przeglądowych) oraz drugą autorką pozostałych prac. Cztery z nich to prace anglojęzyczne opublikowane w czasopismach: *International Journal of Molecular Sciences* (przeglądowa), *Molecules*, *ACS Omega* i *Materials* (badawcze) oraz dwie przeglądowe w języku polskim, które ukazały się w Wiadomościach Chemicznych oraz w czasopiśmie Analityka: nauka i praktyka. Prace anglojęzyczne zostały opublikowane w czasopismach, które w bazie *Web of Science* są sklasyfikowane w pierwszym lub drugim kwartylu (Q1-Q2) najlepszych czasopism w swoich kategoriach. Według zestawienia zamieszczonego na stronie 11 rozprawy, sumaryczny współczynnik oddziaływania (z ang. *impact factor*) tych prac wynosi 17,975, a suma punktów ministerialnych to 530. Prace anglojęzyczne mają już łącznie 57 cytowań.

Układ rozprawy jest nietypowy. Bezpośrednio po trzystronicowym wprowadzeniu umieszczone są cele i założenia pracy. Cel główny rozprawy obejmuje identyfikację mikroorganizmów i ocenę antybiotykooporności bakterii oraz opracowanie metod przygotowania próbek do monitorowania stężeń antybiotyków. Został on rozwinięty w postaci siedmiu celów szczegółowych dotyczących wykorzystania podejść omicznych w mikrobiologii, zastosowania MALDI-TOF MS do identyfikacji bakterii z materiału klinicznego, walidacji metody do identyfikacji mikroorganizmów uwzględniającej skrócony czas inkubacji bakterii przetrwalnikujących oraz opracowania i walidacji metod oceny antybiotykooporności. Pozostałe cele szczegółowe poświęcone są antybiotykom beta-laktamowym (ich biotransformacji oraz przygotowaniu próbek biologicznych do ich izolacji), a także identyfikacji i oznaczaniu leków oraz ich metabolitów metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Do każdego celu szczegółowego przyporządkowane są konkretne publikacje, a przy niektórych są ponadto badania własne. Wprowadzenie różnych kodów dla prac przeglądowych i badawczych ułatwiłoby rozróżnienie celów doświadczalnych od zagadnień omawianych w pracach przeglądowych. Zamiast rozdziału Materiały i metody Autorka umieściła spis aparatury i metod badawczych, z których korzystała, wskazując, że metody badawcze zostały szczegółowo opisane w pracach oryginalnych i badaniach własnych umieszczonych w rozprawie.

Kolejna część rozprawy, zatytułowana „Problem badawczy", została podzielona na cztery punkty. Pierwsze dwa przedstawiają zagadnienia teoretyczne związane z rolą i znaczeniem mikroorganizmów w przemyśle oraz ich wpływem na zdrowie człowieka, a także z antybiotykami i antybiotykoopornością. Doktorantka zwraca szczególną uwagę na zagrożenia związane z zakażeniami bakteryjnymi oraz na trudności w identyfikacji bakterii przetrwalnikujących. Przedstawia zarys historii rozwoju antybiotyków, ich klasyfikację i mechanizmy działania, a także uzasadnia wybór leków uwzględnionych w badaniach własnych. Charakteryzuje również oporność naturalną i nabytą oraz najważniejsze mechanizmy warunkujące nieskuteczność antybiotykoterapii. Ponadto porównuje metody oceny antybiotykooporności, uwzględniając ich zalety, ograniczenia oraz rozróżnienie między zastosowaniami badawczymi a diagnostyką kliniczną.

Trzeci punkt poświęcony jest technice MALDI-TOF MS. Autorka przybliża tę technikę czytelnikowi, omawiając przebieg desorpcji i jonizacji analitów, rolę matrycy oraz znaczenie parametrów promieniowania laserowego dla jakości uzyskiwanych widm. Charakteryzuje dodatni i ujemny tryb jonizacji oraz najczęściej stosowane matryce, wskazując na wykorzystanie kwasu α-cyjano-4-hydroksycynamonowego w badaniach własnych. Następnie wyjaśnia zasadę działania analizatora czasu przelotu i porównuje jego tryb liniowy oraz reflektronowy, uwzględniając ich możliwości i ograniczenia w analizie różnych grup związków. Fragment ten stanowi wprowadzenie do dalszego omówienia zastosowań MALDI-TOF MS w badaniach mikrobiologicznych, czemu poświęcony jest punkt 3.1. Doktorantka omawia w nim zastosowanie techniki MALDI-TOF MS do identyfikacji mikroorganizmów i oceny antybiotykooporności, systematycznie odnosząc przedstawiane zagadnienia do własnych badań. Na przykładzie pracy P2 wskazuje na wpływ podłoża hodowlanego na jakość widm i wyniki identyfikacji, natomiast w odniesieniu do pracy P3 oraz badań B1 omawia dobór sposobu przygotowania próbek oraz trudności w rozróżnianiu gatunków blisko spokrewnionych. Charakteryzuje również wykorzystywane platformy aparaturowe oraz porównuje wyniki uzyskane za pomocą różnych systemów i narzędzi do analizy danych. Ponadto przedstawia zastosowane w badaniu B2 testy MBT-STAR-BL oraz MBT-ASTRA służące do oznaczania antybiotykoodporności. W umieszczonym w tej części rozprawy badaniu B1 Doktorantka analizowała wymazy z nosa i nosogardzieli oraz ślinę pobrane od 85 pacjentów z chorobami układu oddechowego. W badanym materiale dominowały mikroorganizmy z rodzajów *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Corynebacterium*; zidentyfikowano również grzyby z rodzaju *Candida*. Autorka wskazuje na trudności w jednoznacznym rozróżnianiu niektórych gatunków. Natomiast w badaniu własnym B2 Pani mgr Daria Tarkowska wykorzystała testy MBT-STAR-BL i MBT-ASTRA do analizy antybiotykoodporności u *Klebsiella pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*. Badania obejmowały leki z grup beta-laktamów, fluorochinolonów i makrolidów. Próbki oznaczała za pomocą spektrometrów mas różnych

producentów, a uzyskane dane analizowała przy użyciu różnych narzędzi do analizy danych oraz interpretacji widm. Uzyskane wyniki weryfikowała za pomocą testu krążkowego. Przedstawione rezultaty wskazały, iż możliwe jest wykorzystanie zastosowanych rozwiązań do oceny oporności, ale jednocześnie ujawniły rozbieżności między metodami, szczególnie w przypadku niektórych szczepów wytwarzających enzymy typu OXA-48. Na uwagę zasługuje rozszerzenie zastosowania MBT-ASTRA o ocenę odpowiedzi *Staphylococcus aureus* na lewofloksacynę i azytromycynę oraz podjęcie próby adaptacji procedury wykrywania hydrolizy antybiotyku do innej platformy aparaturowej. Autorka dostrzega potrzebę dalszej optymalizacji oraz potwierdzenia wyników w większym, bardziej zróżnicowanym zbiorze izolatów, co świadczy o Jej dojrzałości naukowej.

Punkt czwarty poświęcony jest terapeutycznemu monitorowaniu leków, ze szczególnym uwzględnieniem oznaczania antybiotyków i ich metabolitów w płynach ustrojowych. Doktorantka omawia w nim znaczenie zmienności farmakokinetycznej dla indywidualizacji dawkowania oraz możliwości wykorzystania chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas do monitorowania stężenia leku. Przedstawia również podejścia do badania biotransformacji leków, odnosząc się do własnych doświadczeń z zastosowaniem utleniania elektrochemicznego, układów mikrosomalnych oraz analizy próbek pobranych od pacjentów. Dalsza część rozdziału dotyczy przygotowania próbek biologicznych, w tym porównania metod ekstrakcji ciecz–ciecz, ekstrakcji na fazie stałej (SPE i SPME) oraz charakterystyki materiałów sorpcyjnych. Szczególną uwagę poświęca opracowanym w ramach badań własnych włóknom SPME pokrytym politiofenem i poli(3-metylotiofenem) z odciskiem molekularnym wybranych leków. Opisuje ich otrzymywanie, ocenę właściwości fizykochemicznych i stabilności oraz zastosowanie do izolacji amoksycyliny, cefotaksymu i metronidazolu wraz z wybranymi metabolitami z osocza pacjentów oddziałów intensywnej terapii. Rozdział łączy zatem przegląd metod bioanalitycznych z omówieniem własnych rozwiązań w zakresie przygotowania próbek oraz ich potencjalnego wykorzystania w monitorowaniu farmakoterapii.

Zaskakująco, kolejnym elementem rozprawy jest bibliografia. Obejmuje ona 197 pozycji, z czego prawie 60% to publikacje z ostatnich 10 lat. Następnie umieszczone są publikacje wchodzące w skład rozprawy, po których znajduje się rozdział „Podsumowanie i wnioski". W mojej ocenie powinien on zostać umieszczony jeszcze przed bibliografią. W krótkim podsumowaniu Autorka wskazuje, czego dotyczyły poszczególne prace i badania własne zamieszczone w rozprawie, a następnie formułuje sześć wniosków, które wyciągnęła z przeprowadzonych badań. Odpowiadają one wszystkim zagadnieniom badawczym przedstawionym w szczegółowych celach pracy.

Po zapoznaniu się z rozprawą nasunęły mi się następujące pytania:

1. Czy planowane jest wdrożenie opracowanych metod w praktyce klinicznej?
2. Jakie konkretne rozwiązania zaproponowałaby Pani, aby poprawić powtarzalność i wiarygodność identyfikacji gatunków blisko spokrewnionych, dla których uzyskiwała Pani rozbieżne wyniki?
3. W prowadzonych przez Panią badaniach można wyróżnić dwa obszary: analizy mikrobiologiczne oraz oznaczenia leków i ich metabolitów. Praca w którym z nich była dla Pani większym wyzwaniem?

Nie mam uwag do publikacji włączonych do rozprawy, przeszły one niezależny proces recenzji. Dorobek naukowy Doktorantki jest znaczny. Oprócz prac włączonych do rozprawy Pani magister jest współautorką 9 innych publikacji. Wyniki swoich badań prezentowała na piętnastu konferencjach naukowych, w tym ośmiokrotnie w formie prezentacji ustnej, uzyskując jedno wyróżnienie. Konferencje, na których prezentowała swoje wyniki, były w większości międzynarodowe, a udział w nich finansowała z minigrantów pozyskanych w macierzystej Szkole Doktorskiej. Dwukrotnie nagrodzona przez JM Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu: za osiągnięcia organizacyjne oraz za osiągnięcia naukowe. Pokazuje to, iż Pani magister Daria Tarkowska jest wzorowo rozwijającą się młodą badaczką, a zwieńczeniem tych ponadprzeciętnych osiągnięć jest uzyskany w Narodowym Centrum Nauki grant PRELUDIUM, którego jest kierownikiem.

Czytając rozprawę, zauważyłem kilka drobnych błędów, które w żadnym stopniu nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej ocenianego dzieła.

1. Mikroekstrakcja do fazy stałej, a nie stacjonarnej.
2. 6540 to model urządzenia, a nie jego rozdzielczość.
3. Spektrometria mas, a nie masowa.
4. Prędkość wirowania powinna być podana w postaci względnej siły odśrodkowej (RCF), a nie liczby obrotów na minutę.

Podsumowując, uważam, iż Doktorantka w pełni zrealizowała postawione cele badawcze, a zrealizowane prace mają charakter metodyczny i aplikacyjny, obejmując opracowanie i walidację procedur analitycznych oraz ich zastosowanie do rzeczywistego materiału biologicznego.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, iż oceniana rozprawa spełnia wymagania stawiane tego typu dziełom określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574), w związku z czym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Darii Tarkowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk chemicznych.

Jednocześnie, ze względu na interdyscyplinarny charakter przeprowadzonych badań, potencjał wdrożeniowy uzyskanych wyników oraz dorobek publikacyjny stanowiący podstawę rozprawy, obejmujący aż sześć powiązanych tematycznie prac, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.

KIEROWNIK
Zakładu Biochemii Lekarskiej
Ciborowski
prof. dr hab. Michał Ciborowski