

Kraków, 3 maja 2025

Recenzja pracy doktorskiej

Pani Sylwii Magdaleny Berus

Detection of microorganisms in clinical samples via surface-enhanced Raman spectroscopy

wykonanej pod kierunkiem

Pani Prof. dr hab. Agnieszki Kamińskiej

Instytut Chemii Fizycznej

Polska Akademia Nauk

Warszawa, 2025

Istnieje przekonanie, że techniki spektroskopowe mogą być alternatywą dla obecnie stosowanych metod diagnostycznych, co znajduje odzwierciedlenie w szeroko zakrojonych badaniach w tym zakresie, obiecujących wynikach, licznych publikacjach i patentach, oraz powstających firmach komercjalizujących te osiągnięcia. Recenzowana praca poświęcona jest opracowaniu nowych metod analizy techniką SERS próbek pobranych od pacjentów zainfekowanych wybranymi bakteriami, grzybami lub wirusami. Technika SERS charakteryzuje się zwiększoną czułością w stosunku do normalnej spektroskopii rozpraszania ramanowskiego i od wielu lat cieszy się zainteresowaniem jako metoda analityczna. Nie oznacza to bynajmniej, że wykorzystywana jest rutynowo, bo choć oferuje wysoką czułość (nawet do poziomu pojedynczych cząsteczek) to ma też swoje wady, m.in. problemy z powtarzalnością pomiarów i dokładnością oznaczeń. Z tego powodu oraz w celu poprawienia czułości wciąż poszukiwane są nowe strategie pomiarowe SERS oraz nowe metody analizy danych.

Recenzowana praca wpisuje się w nurt badań analitycznych techniką SERS do zastosowań diagnostycznych. Została zrealizowana w ramach Międzynarodowej Szkoły Doktorskiej pod kierunkiem Pani Profesor Agnieszki Kamińskiej, eksperta w zakresie techniki SERS, opracowującego nowe podłoża i protokoły pomiarowe do czulej i specyficznej detekcji, i analiz biomedycznych.

OGÓLNA OCENA ROZPRAWY

Praca liczy 161 stron, napisana jest w języku angielskim. Układ jest klasyczny, z podziałem na 7 rozdziałów: 1/*Wstęp*, 2/*Cel*, 3/*Materiały i Metody*, 4/*Wyniki i Dyskusja*, 5/*Podsumowanie i Perspektywy*, 6/*Suplement* oraz 7/*Osiągnięcia Naukowe*. Całość otwiera abstrakt w języku angielskim i polskim.

Wstęp (strony 17-53) to wprowadzenie do spektroskopii ramanowskiej, od podstaw czyli odkrycia efektu ramanowskiego do opisu techniki SERS. Podano przykłady zastosowań SERS, uwzględniając analizę biomedyczną. Omówiono metody chemometryczne do klasyfikacji oraz predykcji. Rozdział kończy wprowadzenie do trzech jednostek chorobowych, które były przedmiotem badań niniejszej pracy tj. zakażeń wenerycznych bakterią z rodzaju *Neisseria* spp, zakażeń grzybem z rodzaju *Candida* spp. oraz infekcji koronawirusem COVID-19. Wybrane jednostki chorobowe występują na dużą skalę, a ich rozpoznanie za pomocą zalecanych metod nie zawsze przynosi oczekiwane rezultaty. Dokładna diagnoza jest kluczowa dla wdrożenia odpowiedniego leczenia i zatrzymania postępu choroby, powikłań i skutków ubocznych.

Cele pracy zostały bardzo szczegółowo opisane w postaci 8 punktów, i generalnie obejmują opracowanie protokołu pomiarowego próbek klinicznych trzech jednostek chorobowych tj. rzeżączki, infekcji pochwy i COVID-19 oraz metod analizy techniką SERS, uwzględniając różne czynniki biologiczne, które mogą wpływać na wyniki.

W rozdziale trzecim (56-65) omówiono procedurę poboru próbek dla 3 typów badanych chorób i standardowe metody diagnostyczne. Opisano preparatykę próbek do pomiarów SERS oraz wykorzystywany sprzęt pomiarowy.

Wyniki i Dyskusja (strony 66-121) zostały podzielone na trzy podrozdziały poświęcone poszczególnym jednostkom chorobowym.

Pierwszy podrozdział to opis analizy wydzieliny z cewki moczowej mężczyzn. Wykazano, że infekcja rzeżączką czyli widma Gon(+) charakteryzują się wyższą intensywnością i są bogatsze w sygnały pochodzące z komórek bakteryjnych, które namnażają się z powodu trwającej infekcji. Analizy przeprowadzono metodami PCA oraz nadzorowanymi PLS-DA i SIMCA, opracowano nowe podejście SERS-PCA, które umożliwia skuteczną identyfikację szczepów bakterii wyhodowanych z wydzieliny z cewki moczowej. Na podstawie unikalnej odpowiedzi widmowej szczep został zidentyfikowany jako *N. gonorrhoeae*, co pokazuje skuteczność nowego podejścia analitycznego.

Drugi podrozdział to opis analizy mikroorganizmów typu *Candida* spp. i wydzielin pochwowych w kontekście skutecznego rozpoznawania infekcji pochwy. Analizowane wydzieliny pochwowe zostały skategoryzowane zgodnie z fazą płodną/niepłodną, zaburzeniami mikroflory i stosowaniem antykoncepcji dopochwowej lub praktyką irygacji. Badania przeprowadzono na serii próbek pobranych od kobiet w trakcie infekcji (bakteryjne zapalenie pochwy BV, drożdżyca sromu i pochwy VVC, rzeżączka, koinfekcja BV i VVC) i wykazały, że diagnozę można postawić niezależnie od dnia cyklu menstruacyjnego. Przeprowadzono charakterystykę widmową infekcji pochwy VVC spowodowanej nadmiernym wzrostem *Candida* spp. Analiza oparta na algorytmie PLSR pozwoliła dokonać odpowiedniej klasyfikacji próbek.

Podrozdział trzeci to analiza dwóch rodzajów próbek (śliny i wymazów z nosogardła) w kontekście zakażenia SARS-CoV-2. W przypadku śliny wykazano znaczący wpływ metioniny, kwasów nukleinowych, białek i swoistych immunoglobulin. W przypadku wymazów z nosogardła ważny był udział neopteryny. Przeprowadzono walidację zewnętrzną (20 próbek śliny, 16 wymazów z nosogardła) wcześniej zoptymalizowanymi modelami kalibracji. Wysoka czułość analiz SERS została uzyskana metodami chemometrycznymi PLS-DA i PCA-LDA, ale najlepszą uzyskano dla SVMC (do 100% czułości).

Doktoranta nie kończy na opisie uzyskanych wyników, ale też dyskutuje potrzebę bardziej rozległych analiz na większą skalę, obejmującej setki lub tysiące pacjentów. Proponuje przeprowadzenie badań na próbkach zebranych z niezależnych placówek opieki zdrowotnej, aby zagwarantować najwyższy poziom zaufania do wyników i zbadać potencjalne źródła zmienności widmowej. Aby je minimalizować, proponuje analizy porównawcze między laboratoryjne. W tym aspekcie z pewnością kluczowe byłoby ustandaryzowanie całej procedury pomiarowej, warunków pomiaru, sprzętu i platform SERS w celu wyeliminowania czynników, które nie powinny mieć wpływu w kontekście diagnostycznym.

Pracę zamyka krótkie podsumowanie (strony 122-124). Suplement (strony 125-129) zawiera tabele z opisem analizowanych płynów pochwowych oraz zestawianie średnich widm ramanowskich pobranych w pierwszym i drugim cyklu menstruacyjnym. W moim odczuciu ten materiał mógł być włączony do głównego tekstu, bo ani główny tekst nie jest zbyt rozbudowany ani ten suplement zbyt obszerny.

Prezentacja wyników jest przejrzysta, towarzyszą jej liczne, starannie wykonane rysunki i tabele.

Osiągnięcia Naukowe Doktorantki są imponujące. To 9 publikacji, gdzie Pani Berus jest pierwszym autorem w 7-miu z nich, w kolejnym jest drugim autorem. W trzech publikacjach jest również autorem korespondencyjnym. Prace zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach, m.in. w *Sensing and Biosensing Research*, *Sensors and Actuators B*, *Biosensors and Bioelectronics*, *Spectrochimica Acta A*. Ponadto, Doktorantka w dorobku ma zgłoszenie patentowe (tu również jest pierwszym autorem) oraz 13 ustnych wystąpień konferencyjnych.

UWAGI SZEGÓŁOWE

Poniżej kilka drobnych uwag/komentarzy, które nasunęły mi się podczas lektury pracy:

1/ Spis treści nie obejmuje podrozdziałów, które są w pracy. Np. *Analiza chemometryczna* to 1 punkt w spisie, podczas gdy w tekście jest podzielony na 10 podrozdziałów z różną konwencją ich numerowania. Nie jestem zwolenniczką nadmiernego rozbudowywania spisu treści, ale tu wydaje mi się, że Doktorantka potraktował go nader oszczędnie.

2/ Proszę o komentarz/ocenę na temat powtarzalności wyników. Doktorantka podaje wartości średniego błędu kwadratowego kalibracji (RMSEC) i walidacji krzyżowej (RMSECV), i nie są one duże, natomiast zmienność spektralna pomiędzy pacjentami w obrębie danej grupy wydaje się dość duża. Widać to na rys 20 dla widm Gon (+) i Gon (-)(tu zmienność dla grupy kontrolnej jest większa niż dla zainfekowanej). Nie znalazłam takiego zestawienia dla widm SERS płynów pochwowych od zainfekowanych pacjentek (jest zestawienie dla grupy kontrolnej, rys. 34). Pokazana jest zmienność dla grupy CoV(-) i CoV(+) (rys. 38).

3/ Pomiary prowadzono na przenośnym spektrometrze rymanowskim, który ma pewne ograniczenia w stosunku do wyspecjalizowanego laboratoryjnego spektrometru ramanowskiego. Czy były też prowadzone pomiary referencyjne pomiędzy taki sprzętami?

4/ Czy klasyfikacja próbek zainfekowanych może być oparta na wybranych pasmach czy konieczna jest rejestracja całego profilu spektralnego?

5/ Proszę o komentarz, na ile stosowane podłoża SERS z depozytami srebra są optymalne pod kątem wzmocnienia sygnału i powtarzalności wyników?

6/ Jak Doktorantka ocenia użyteczność metody SERS do analizy ilościowej? Czy można ją prowadzić na danym podłożu/koloidzie w dowolnym zakresie stężeń analitu? Które podłoża/koloidy nadają się do tego celu lepiej?

Powyższe komentarze czy drobne uwagi oczywiście nie zmniejszają mojej bardzo wysokiej oceny pracy.

PODSUMOWANIE

Rozprawa Pani Sylwii Berus w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Opisano w niej szczegółowo pobór próbek klinicznych do badań, ich przygotowanie, pomiar oraz analizę techniką SERS. Dla trzech jednostek chorobowych pokazano profil spektralny, pasma markerowe i metody klasyfikacji próbek zainfekowanych względem grupy kontrolnej. Opracowane protokoły jednoznacznie pokazują, że techniką SERS można wiarygodnie rozpoznawać infekcje bakterią *Neisseria* spp., grzybem *Candidia* spp oraz koronawirusem typu COVID-19. Należy też dodać, że wszystkie badania przeprowadzono zgodnie ze strategią bezznacznikową, która minimalizuje nakłady finansowe, czas i wysiłek personelu. Ponadto, wykorzystano przenośny spektrometr ramanowski, który można łatwo transportować ze względu na jego rozmiar i wagę. To rozwiązanie jest wygodne i doskonale spełnia wymagania diagnostyki przyłózkowej, a także pomiarów wykonywanych w terenie lub w specjalnie wyznaczonych punktach.

Doktorantka prezentuje wysoki poziom naukowy, zdobyła niezbędne doświadczenie i może podjąć samodzielnie dalsze badania. Jest współautorem 9 publikacji i 1 zgłoszenia patentowego. Kierowała grantem Preludium, a wcześniej była wykonawcą grantu Team-Tech. Za swoje osiągnięcia naukowe uzyskała nagrody instytutowe, a na konferencjach 3-krotnie nagrody za najlepsze prezentacje. Nie mam wątpliwości, że aktywność naukowa i jakość publikacji jest bardzo wysoka, a Doktorantka jest wiodącym autorem tych doniesień.

Podsumowując stwierdzam, że złożona rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w *Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (aktualne odniesienie do aktu prawnego - tekst jednolity: DzU z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.)* i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej PAN o dopuszczenie Pani Sylwii Magdaleny Berus do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej ze względu na wysoką wartość naukową przeprowadzonych badań opublikowanych w światnych

czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania, ponad przeciętny dorobek naukowy Doktorantki, jej aktywność w pozyskaniu środków na badania oraz upowszechnianiu wyników. Nie mam wątpliwości, że Doktorantka ma wiodący udział w prowadzonych pracach i jest gotowa podjąć samodzielnie działalność naukową.

M. Barańska