



***Recenzja pracy doktorskiej opracowanej przez lekarz Malwinę Birczyńską-Zych pod tytułem "Zmiany erytrocytów w obrazie spektroskopii Ramanowskiej w toku zarażenia zarodźcem malarii"***

Promotor rozprawy I: prof. dr hab. Jacek Czepiel,

Promotor rozprawy II: prof. dr hab. Maria Łabanowska,

Recenzent: prof. dr. hab. n. med. Miłosz Parczewski, Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i Nabytych Niedoborów Immunologicznych, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie.

***Wstęp***

Malaria pozostaje kluczowym problemem zdrowia publicznego na świecie oraz jedną z naczęstszych przyczyn zgonów. Szacuje się, że blisko połowa populacji ludzkiej mieszka w regionach zagrożonych malarią a w roku 2020 odnotowano 627 000 zgonów z tego powodu; 95% tych zgonów wystąpiło w krajach Afryki. W kontekście polskim, malaria pozostaje jedną z najczęściej diagnozowanych chorób zakaźnych z tropiku i nieustannie stanowi wyzwanie diagnostyczno-terapeutyczne, co jest szczególnie ważne w kontekście relatywnie niskiej liczby przypadków obserwowanych w poszczególnych centrach co skutkuje niewielkim doświadczeniem wśród polskich specjalistów chorób zakaźnych w leczeniu tej częstej choroby. Osoby szczególnie zagrożone ciężkim przebiegiem choroby to kobiety ciężarne, osoby z niedoborami odporności włączając pacjentów leczonych immunosupresyjnie, oraz małe dzieci, które jeszcze nie rozwinęły odporności przeciw malarii. Z tego powodu analizowana praca doktorska jest pracą wysoko wartościową, wpisującą się w kluczowe zagadnienia walki z chorobami zakaźnymi takimi jak globalny program WHO opisujący zasady kontroli i eliminacji malarii (WHO Global Malaria Programme, <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme>).

Praca doktorska jest pracą interdyscyplinarną, która powstała w ramach projektu „interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej” InterDokMed realizowanych w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój co dodatkowo podnosi wartość naukową pracy, gdyż w cenny sposób połączone są aspekty medyczne jak biofizyki związane ze spektroskopią Ramanowską. Analizy biofizyczne stanowią jedną z najważniejszych badawczo zagadnień pracy.

#### *Ocena metodologiczna i merytoryczna pracy*

Praca doktorska jest obszerna, liczy 194 strony i jest oparta na czterech pracach oryginalnych, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach międzynarodowych (trzy prace w czasopismach posiadających współczynnik impact factor). Poniższe prace to:

1. Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kurdziel M, Biesiada G, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczyńska A. The aging of *P. falciparum* infected RBCs by 2D-correlation Raman and EPR spectroscopy. *J Mol Struct.* 1224 (2021) 129036.
2. Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Krainska M, Biesiada G, Moskal P, Kozicki M, Garlicki A, Wesełucha-Birczyńska A. Could Raman spectroscopy distinguish between *P. falciparum* and *P. vivax* Infection? *Clin Spectrosc.* 3 (2021) 100015.
3. Wesełucha-Birczyńska A, Kozicki M, Czepiel J, Łabanowska M, Nowak P, Kowalczyk G, Kurdziel M, Birczyńska M, Biesiada G, Mach T, Garlicki A. Human erythrocytes analyzed by generalized 2D Raman correlation spectroscopy. *J Mol Struct.* 1069 (2014) 305-312.
4. Birczyńska-Zych M, Czepiel J, Łabanowska M, Kucharska M, Kurdziel M, Biesiada G, Garlicki A, Wesełucha-Birczyńska A. Course of *Plasmodium* infection studied using 2D-COS on human erythrocytes, *Malar J.* 2023 Jun 20;22(1):188. doi: 10.1186/s12936-023-04611-5.

Prace te *de facto* stanowią podstawę wyników pracy doktorskiej i są wysoko wartościowe, wszystkie opublikowane publikacje to prace z pierwszym autorstwem Doktorantki. Właściwie mógłby one stanowić wyłączną podstawę do uzyskania stopnia naukowego doktora nauk medycznych, należy jednak zauważyć, że Doktorantka podjęła znaczący wysiłek opracowania szczegółowego wstępu, metodologii oraz opisanie wszystkich wyników. Praca zawiera ciekawy wstęp opisujący rys historyczny malarii włączając dane

na temat terapii, ciekawie acz informatywnie opisaną etiologię i zmienność gatunkową, patogenezę i cykl życiowy oraz podstawy leczenia, charakterystykę erytrocytów (w ocenie recenzenta opis nadmierny, niemniej nie zmniejsza to żaden sposób jakości analizowanej pracy), oraz szczegółowy opis podstaw spektroskopii włączając spektroskopię Ramanowską. Opis ten jest dla recenzenta, jak specjalisty z zakresu nauk medycznych szczególnie interesujący a jednocześnie napisany przystępnie.

Praca zawiera szeroką hipotezę badawczą która raczej jest rodzajem wstępnego założenia oraz szczegółowo rozwinięte cele pracy obejmujące zarówno badanie erytrocytów zarażonych *plasmodium falciparum*, jak próbę wgląd w aktywność pasożytów *plasmodium falciparum* i *vivax* w erytrocycie. Cele uzupełnia krótka charakterystyka grupy osób zarażonych plasmodium hospitalizowanych w Szpitalu Uniwersyteckim w Krakowie co stanowi dodatkowe uzupełnienie opisowe charakterystyki pacjentów. Cele pracy są jasne i przedstawione prawidłowo.

Metodologia pracy jest opisana prawidłowo, materiał stanowi dość niewielka grupa osób (dwadzieścia dziewięć), natomiast z pewnością do wykonywanych analiz badanie większych grup nie jest konieczne. Do analiz warto dodać bezpośrednie porównanie demograficzne pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną, jest to również uwaga techniczna o niewielkim znaczeniu dla jakości pracy. Charakterystykę eksperymentów spektroskopowych i analiz statystycznych opisano prawidłowo.

Wyniki badań opisane są przejrzysto. Szczegółowo opisana jest charakterystyka kliniczna i terapeutyczna pacjentów zarażonych malarią, zgodnie z charakterystyką epidemiologiczną oraz najpopularniejszymi kierunkami podróżowania większość osób były zarażona *Plasmodium falciparum*, co ciekawe w grupie chorych dominowali mężczyźni. Alarmujący wynik jest związany z faktem że aż 66% procent osób zarażonych nie przyjmowało profilaktyki malarycznej. Przedstawione porównania wyników badań laboratoryjnych u osób chorych w porównaniu do grupy kontrolnej potwierdzają standardowe odchylenia laboratoryjne obserwowana u osób z malarią. Doktorantka właściwie zinterpretowała brak asocjacji dla części zmiennych wynikający z małej liczebności grup. Część kliniczna wyników stanowi podstawę pracy i *de facto* analizę opisową osób zarażonych malarią będących w uprzedniej obserwacji ośrodka w Krakowie; charakterystyka ta jest przedstawiona solidnie i zawiera podstawowe analizy statystyczne np. analizę związku pomiędzy wysokością parazytemii a podstawowymi parametrami laboratoryjnymi. Wyniki te nie są zaskakujące, ale potwierdzają umiejętności Doktorantki w przeprowadzaniu podstawowych analiz i wnioskowania statystycznego.

W opinii recenzenta dużo ciekawszą część stanowią wyniki opisujące badania spektroskopowe krwinek pozwalające na opisanie zmienności w zakażonych erytrocytach. Badanie te mają ciekawy aspekt poznawczy, zarówno w zakresie analiz podstawowych jak zagadnień klinicznych. Niestety wiedza recenzenta nie pozwala na ocenę szczegółów fizycznych, dlatego odniosę się do kluczowych wyników z perspektywy klinicznej. Istotnymi wynikami jest obserwacja zmiany intensywności pasm falowych uzyskanych po analizach błony komórkowej (recenzent celowo pomija liczby falowe) erytrocytów zarażonych malarią w porównaniu do erytrocytów zdrowych, obserwując pasma aktywności proteinaz asparaginowych, odpowiedzialnych za lizę hemoglobiny. Obserwowano zwiększony procent lipidów nieuporządkowanych w konformacji *gauche*. Dodatkowo stosując analizy spektroskopowe doktorantka potwierdziła obecność produktów rozkładu hemoglobiny. Obrazy widm 2D cieni erytrocytów osób zarażonych malarią były istotnie różne od widm osób zdrowych potwierdzając procesy degradacji błon lipidowych. Analizy spektroskopowe mogą również być stosowane do badania procesów „zdrowienia” erytrocytów. Większość analiz dotyczyła zmienności w zakresie pierścieni hemu.

Wnioski pracy zostały przedstawione prawidłowo. Analizy potwierdziły przydatność spektroskopii do różnicowania zarażonych erytrocytów oraz procesów i aktywności zarodźców w erytrocycie. Część wniosków klinicznych to wnioski opisowe, które można skrócić lub zawrzeć w podsumowaniu wyników. Dyskusja wyników jest zwięzła ale prawidłowo podsumowuje wyniki badań. Podsumowania są informatywne. Pracę uzupełnia szczegółowy słownik skrótów.

### *Podsumowanie*

Przedstawiona praca doktorska jest opracowaniem o wysokiej wartości naukowej, elegancko łączącym zagadnienia kliniczne z badaniami podstawowymi. Wszystkie wyniki zostały opublikowane w czasopismach o znaczącej renomie międzynarodowej. Wartość badawcza może przełożyć się na praktykę kliniczną i potencjalne opracowanie nowych metod badawczych odzwierciedlających ciężkość malarii. Zarówno przedstawioną do oceny pracę jak publikacje naukowe stanowiące jej podstawę oceniam jako **wysoko wartościowe, a prace będące *de facto* opracowaniami z zakresu nauk podstawowych o możliwym zastosowaniu praktycznym, za co należy się najwyższe uznanie.** W związku z powyższym zwracam się z uprzejmą prośbą do Rady Dyscypliny Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie *lekarz Malwiny Birczyńskiej-Zych* w związku z

opracowaniem pracy doktorskiej pod tytułem "*Zmiany erytrocytów w obrazie spektroskopii Ramanowskiej w toku zarażenia zarodźcem malarii*" do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnioskuję o nadanie jej najwyższego przewidzianego regulaminem Uczelni wyróżnienia (*summa cum laude*), na które ta praca z pewnością zasługuje.

Recenzent nie ma uwag merytorycznych do pracy, niemniej prosi Doktorantkę o rozszerzenie następujących zagadnień.

1. Z czego wynikała większa częstość malarii u mężczyzn?
2. Czy zastosowanie analiz spektroskopowych może mieć realne miejsce w praktyce klinicznej? Jakie są kluczowe zalety i ograniczenia tej metody w kontekście diagnozowania malarii?
3. Czy zastosowanie technik spektroskopowych może odzwierciedlić ciężkość choroby?
4. Jaki byłby optymalny punkt czasowy analiz w którym analizy spektroskopowe są w stanie określić, że pacjent zdrowieje?

#### **Uzasadnienie wyróżnienia pracy doktorskiej**

Rozprawa została opublikowana w ramach czterech manuskryptów (które wylistowano powyżej), w czasopismach o znaczącej renomie międzynarodowej, wszystkie prace zostały poddane recenzji (*peer review*). Opisują one znaczące wyniki naukowe dotyczące zastosowania technik spektroskopowych w malarii.

Rozprawa została również w całości opublikowana w prestiżowych czasopismach naukowych, a Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach.

*Recenzent deklaruje brak konfliktu interesów w związku z ocenianą pracą doktorską.*

Z poważaniem

**Prof. dr hab. n. med.**

**Miłosz Parczewski** –

