



KM.514.2.2023

Kraków, dnia 8 września 2023 roku

Prof. dr hab. Jolanta Wąs-Gubała  
Instytut Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna  
w Krakowie

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Pietruszewskiej**  
**zatytułowanej:**  
**Analiza spektroskopowa struktury molekularnej wybranych komórek**  
**krwi organizmu żywego obserwowana w infekcji**  
**wirusem Epsteina-Barr (EBV)**

Promotorki pracy:

Prof. dr hab. Aleksandra Wesełucha-Birczyńska

Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński

oraz

Dr hab. n. med. Grażyna Biesiada, prof. UJ

Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Pietruszewskiej została wykonana w Zespole Spektroskopii Oscylacyjnej, należącym do Zakładu Fizyki Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Rozprawa powstała w trakcie realizacji Środowiskowych Studiów Doktoranckich, przy wsparciu finansowym Projektu nr POWR.03.02.00-00-I013/16 „Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej” InterDokMed, prowadzonego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, a współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

Tematyka tej interdyscyplinarnej pracy dotyczy zagadnień związanych ze zmianami zachodzącymi w limfocytach pacjentów ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną, spowodowaną wirusem Epsteina-Barr (EBV). Jako podstawową metodę badawczą Pani mgr inż. Magdalena Pietruszewska wybrała spektroskopię ramanowską, zakładając iż będzie to odpowiednie narzędzie do badań zmian biochemicznych zachodzących w komórkach limfocytów wywołanych przez infekcję wirusem EBV. Ocena tych zmian mogła dostarczyć dodatkowych informacji o mechanizmie i przebiegu choroby, która jest bardzo wyczerpującą dla organizmu i może prowadzić do poważnych powikłań. Dlatego też **wybór zarówno przedmiotu badań jak i problemu badawczego, przedstawionego w recenzowanej rozprawie doktorskiej, oceniam jako celny oraz aktualny z naukowego punktu widzenia.**

Recenzowana rozprawa doktorska liczy 104 strony, w tym na 2 z nich Doktorantka zestawiała swój dorobek naukowy. Zasadnicza część pracy, poprzedzona między innymi streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz *Wykazem skrótów i zwrotów*, została podzielona na *Część Teoretyczną* (23 strony pracy), *Cel pracy* (2 strony pracy), *Hipotezę badawczą* (1 strona pracy), *Część Doświadczalną* (55 stron pracy), *Podsumowanie* (2 strony pracy), *Wnioski* (2 strony pracy) i *Bibliografię* (96 źródeł zestawionych w kolejności ich cytowania w tekście pracy).

W *Części Teoretycznej* rozprawy, na podstawie przeglądu literatury, Doktorantka scharakteryzowała w pierwszej kolejności mononukleozę zakaźną i wirus Epsteina-Barr oraz omówiła specyfikę układu odpornościowego, w tym cechy budowy limfocytów i immunoglobulin. Następnie scharakteryzowała metodę badawczą – spektroskopię ramanowską, wykorzystaną na potrzeby badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej, zwracając uwagę między innymi na takie zagadnienia jak pomiar stopnia depolaryzacji, analiza widm ramanowskich, metoda korelacji 2D oraz zastosowanie spektroskopii w badaniach materiałów biologicznych, w tym limfocytów.

Sformułowanym przez Doktorantkę celem pracy doktorskiej było sprawdzenie wpływu wirusa EBV na limfocyty pacjentów chorych na mononukleozę zakaźną, aby określić zmiany i procesy zachodzące wówczas w nich na poziomie molekularnym, z wykorzystaniem spektroskopii ramanowskiej. Doktorantka poszukiwała równocześnie korelacji pomiędzy przebiegiem zakażenia wirusem a zmianami molekularnymi zachodzącymi w limfocytach pacjentów w celu sprawdzenia możliwości zastosowania spektroskopii ramanowskiej w nowoczesnej diagnostyce medycznej.

*Część Doświadczalną* pracy Doktorantka rozpoczęła od scharakteryzowania materiału badawczego, pobranego od pacjentów chorych na mononukleozę zakaźną i od osób zdrowych, sposobu przygotowania próbek do badań metodą spektroskopii ramanowskiej, a także procedury separowania komórek limfocytów B przy zastosowaniu technologii MACSxpress®.

Następnie scharakteryzowała widma ramanowskie uzyskane dla limfocytów B pochodzących od osób zdrowych, przypisując najbardziej istotnym pasmom ich prawdopodobne pochodzenie. Zmiany zachodzące w budowie limfocytów B u pacjentów ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną w porównaniu z wynikami analogicznych badań prowadzonych w przypadku osób, które nigdy wcześniej na tę chorobę nie chorowały były przez Doktorantkę monitorowane metodą spektroskopii ramanowskiej, z dodatkowym wykorzystaniem obrazów mikroskopowych limfocytów. Doktorantka zaobserwowała i przyjęła, że markerem immunoglobulin będzie pasmo  $520\text{ cm}^{-1}$ , pochodzące od mostków disiarczkowych SS, które nie było obserwowane w trakcie badań ramanowskich limfocytów

B pochodzących od osób zdrowych. Doktorantka zaobserwowała zwiększoną produkcję białka i ekspresję immunoglobulin podczas kontaktu komórek z antygenem u pacjentów w czwartej dobie po zdiagnozowaniu choroby. Zmienność konformacji przyjmowanej przez immunoglobuliny (przesunięcie położenia pasma markerowego  $520\text{ cm}^{-1} \pm 10\text{ cm}^{-1}$ ) przypisała jako będącą wskaźnikiem pewnej patologii funkcji limfocytów B, wywołanej aktywnością wirusa EBV. Zastosowanie przez Doktorantkę technologii MACSxpress® nie doprowadziło do uzyskania satysfakcjonujących wyników w kontekście poszukiwania aktywowanych limfocytów.

Badania polaryzowalności limfocytów w ostrej fazie mononukleozy zakaźnej Doktorantka prowadziła analizując stopień depolaryzacji pasma markerowego immunoglobulin, a wyniki wskazały na polaryzację anomálną.

Metoda spektroskopii ramanowskiej wzmocniona metodą korelacji dwuwymiarowej 2D-COS pozwoliła Doktorantce ocenić różne zmiany molekularne zachodzące w limfocytach B w przebiegu mononukleozy zakaźnej.

W końcowych podrozdziałach Części Doświadczalnej pracy Doktorantka dokonała analizy standardowych testów diagnostycznych pacjentów ze zdiagnozowaną mononukleozą zakaźną i osób zdrowych oraz korelacji wyników klinicznych z wynikami spektroskopowymi, uzyskanymi w ramach realizacji recenzowanej pracy doktorskiej.

W Podsumowaniu i Wnioskach Doktorantka podkreśliła, iż hipoteza badawcza została pozytywnie przez nią zweryfikowana, a przedstawione wyniki pozwalają sądzić, że opracowana metodologia może być interesującą alternatywą badań w zakresie infekcji wirusem EBV. Może ona być w przyszłości rozważana jako metoda wspomagająca badania przesiewowe, diagnostyczne, a kontynuacja rozpoczętych przez Doktorantkę badań naukowych może prowadzić do poznania mechanizmu onkogenego wirusa EBV.

**Struktura rozprawy doktorskiej** jest logiczna i uzasadniona merytorycznie. Rozprawa została opracowana na ogół starannie, w sposób przejrzysty i czytelny, niemniej zdarzają się błędy językowe, zbyt długie i trudne zdania (np. pierwsze zdanie Wniosków na stronie 93), czy np. różnice pomiędzy tytułem podrozdziału w *Spisie treści* i tekście pracy (podrozdział 4.3). Rysunki i tabele zawarte w pracy zostały gruntownie opracowane, choć odczuwalny jest brak ich spisu w końcowej części pracy. Z kolei w Bibliografii znalazła się pozycja, która jest dopiero w przygotowaniu ([75]).

Poniżej przedstawiam kilka komentarzy i pytań, które nasunęły mi się podczas zapoznawania się z treścią rozprawy doktorskiej, prosząc równocześnie Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich w trakcie obrony pracy doktorskiej:

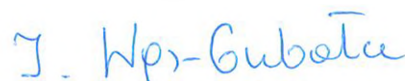
1. Doktorantka dokonała przeglądu literatury w zakresie dotyczącym tematyki pracy, niemniej mało wyraziście wyeksponowała wnioski z niego wynikające, zwłaszcza dotyczące podjętego tematu czy perspektywy dalszych badań naukowych w kierunku wykorzystania nowoczesnych metod spektroskopowych w badaniach limfocytów. Dlatego też prosiłabym, aby w trakcie obrony pracy doktorskiej Doktorantka uogólniła je, wskazując dlaczego wybrała właśnie taką ścieżkę badań i jak obecnie, na fundamencie uzyskanych przez siebie wyników, widzi możliwość kontynuacji badań.
2. W podrozdziale 4.2 *Przygotowanie próbek do badania metodą spektroskopii ramanowskiej* Doktorantka pisze, iż *podczas używania lasera 532 nm badania wykonano w zakresie spektralnym 40-2730 cm<sup>-1</sup> ... natomiast dla linii wzbudzającej 785 nm zakres spektralny wynosił 80-1520 cm<sup>-1</sup>*. Czego wynikiem było zastosowanie przez Doktorantkę właśnie takich zakresów spektralnych w podjętych badaniach?
3. Bardzo ciekawym obszarem badań, którego wyniki zostały zaprezentowane w pracy były badania optyczne limfocytów. Doktorantka odnosząc się Rysunków 22, 23 i 24, na których przedstawiła *mikrofotografie limfocytów pacjentów zakażonych wirusem EBV* donosi, iż zostały one wykonane *za pomocą mikroskopu optycznego Leica*. Moim zdaniem ta informacja jest niewystarczająca, zwłaszcza w przypadku gdy uzyskane przez Doktorantkę wyniki będą porównywane z podobnymi, otrzymanymi przez innych badaczy. Dlatego też prosiłabym o przedstawienie typu i modelu użytego mikroskopu, kamery oraz systemu do analizy obrazu, a także rodzaju zastosowanych technik badawczych i sposobu przygotowania limfocytów do prezentowanych w pracy badań optycznych.

**Podsumowując przeprowadzoną ocenę przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej stwierdzam, że jest to praca o wysokiej wartości merytorycznej.** Badania zrealizowane w jej trakcie zostały wykonane w sposób rzetelny, a cel pracy został osiągnięty. Doktorantka dysponuje dużą wiedzą w zakresie objętym tematyką pracy, potrafi samodzielnie planować i prowadzić badania oraz wyciągać właściwe wnioski.

Wykorzystując przede wszystkim metodę spektroskopii ramanowskiej dokonała ona oceny i interpretacji zmian na poziomie molekularnym, zachodzących w limfocytach B pacjentów chorych na mononukleozę zakaźną spowodowaną wirusem EBV, dostarczając tym samym cennych informacji o mechanizmie i przebiegu tej choroby. Na podkreślenie zasługuje dogłębna analiza uzyskanych wyników, przeprowadzona przez Doktorantkę na każdym etapie badań.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Pietruszewskiej spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani inż. Magdaleny Pietruszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Recenzent



Prof. dr hab. Jolanta Wąs-Gubała