



Dr hab. Justyna Broniarczyk, Prof. UAM
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii, Zakład Wirusologii Molekularnej
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
e-mail: justekbr@amu.edu.pl
tel. (61) 829-58-20

Poznań, 20.02.2024

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Moniki Sztandery-Tymoczek

**p.t.: „Biochemiczna charakterystyka oraz ocena potencjalnych właściwości alergizujących
fitopatogennych grzybów mikroskopijnych w badaniu *in vitro*”**

wykonanej pod kierunkiem naukowym

pani Prof. dr hab. Agnieszki Szuster-Ciesielskiej

w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Sztandery-Tymoczek dotyczy bardzo ważnej problematyki związanej z indukcją alergii przez grzyby pasożytujące na roślinach.

Obecnie gwałtownie wzrasta częstotliwość występowania chorób alergicznych na świecie. Wpływa na to między innymi kryzys klimatyczny, który poszerza grono roślin i ich grzybowych pasożytów, które mogą stać się przyczyną alergii oraz zmienia zasięg geograficzny ich występowania. Niestety ze względu na ograniczony panel testów (najczęściej obejmują one powszechnie znane alergeny), często ciężko zdiagnozować źródło alergii,

Wyniki niniejszej pracy po raz pierwszy przedstawiają biochemiczną i biologiczną charakterystykę ośmiu gatunków fitopatogennych grzybów pasożytujących na powszechnie występujących roślinach i wskazują, że część z nich może mieć prozapalny i proalergiczny potencjał. Uzyskane wyniki mogą mieć w przyszłości potencjał aplikacyjny poprzez wykorzystanie standaryzowanych ekstraktów tych grzybów w diagnostyce alergii wziewnych.

Istotność i aktualność podjętego w rozprawie problemu badawczego nie budzi żadnych wątpliwości, a lektura rozprawy potwierdza, że Doktorantka uzyskała znaczące wyniki, a tym samym wniosła swój wkład do światowej literatury przedmiotu.



Formalny opis rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Sztandery-Tymoczek jest bardzo obszerna, liczy aż 370 stron i ma typowy układ. Rozpoczyna się wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim. Następnie kolejno występują rozdziały zatytułowane: Wstęp (51 strony), Hipoteza i Cel pracy (1 strona), Materiały i metody (14 stron), Wyniki (190 stron), Dyskusja (15 stron), Wnioski (2 strony). Rozprawę kończy Suplement (28 stron, 48 tabel), Piśmiennictwo (306 pozycji), Wykaz Rycin i Wykaz Tabel. Praca została zobrazowana aż 162 Rycinami i 6 Tabelami. Na samym końcu pracy, autorka umieściła swoje czterostronicowe CV.

Ocena merytoryczna

Wstęp jest bardzo dobrze skomponowanym i solidnym wprowadzeniem do tematyki badań zamieszczonych w rozprawie. Autorka koncentruje się na dwóch kluczowych dla swojej pracy zagadnieniach: alergii i grzybach. W pierwszej części pracy Doktorantka prezentuje typy reakcji nadwrażliwości, a następnie opisuje epidemiologię, rodzaje, mechanizmy, diagnostykę i leczenie alergii. W drugiej części dotyczącej grzybów dokładnie omawia, w jaki sposób mogą one wpływać na występowanie alergii oraz przedstawia charakterystykę oddechowych reakcji nadwrażliwości inicjowanych przez alergeny grzybowe.

Bardzo wysoko oceniam dobór treści wstępu i logiczny sposób prezentowania informacji. Warto podkreślić, że ta część pracy została zobrazowana własnoręcznie przygotowanymi przez autorkę licznymi rycinami (12), które trafnie obrazują przedstawiane treści.

Moja jedyna uwaga dotycząca tej części pracy to opis rycin (Ryc. 1-4 i Ryc. 9-10). Autorka podaje tytuły i dokładnie wyjaśnia wszystkie skróty przedstawione na rysunkach, ale nie opisuje co dane rysunki przedstawiają, co utrudnia ich interpretację i wymaga od czytającego szukania wyjaśnienia w tekście.

Celem pracy była biochemiczna charakterystyka ośmiu gatunków fitopatogennych grzybów mikroskopijnych oraz ocena ich zdolności do indukcji odpowiedzi prozapalnych leżących u podstawy alergii w badaniach *in vitro*. Cele pracy zostały bardzo szczegółowo i jasno sformułowane oraz zrealizowane podczas badań.

W rozdziale **Materiały i Metody** Autorka szczegółowo i starannie opisała a także przedstawiła w formie graficznej (Ryc.13) przebieg wykonywanych doświadczeń.

Warto zaznaczyć, że Doktorantka korzystała w pracy z szerokiego zestawu technik bioinformatycznych (analiza filogenetyczna) i biochemicznych np. chromatografia gazowo-cieczowa



sprzężona ze spektrometrią mas (GLC-MS) oraz metod wykorzystywanych w analizach *in vitro* (np. hodowle komórkowe, cytometria przepływowa, testy Elisa, mikroskopia fluorescencyjna).

Do tej części pracy mam kilka drobnych uwag i pytań:

- Zabrakło mi w tym rozdziale informacji na temat analizy statystycznej (jaki program i testy były wykorzystywane przy analizie wyników).
- Nie mogłam również znaleźć szczegółowych informacji (np. czy przeciwciało było mysie czy królicze, numer katalogowy) dotyczących przeciwciał (Okludyna, E-kadheryna) stosowanych w analizie przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Niestety sama informacja o producencie nie jest wystarczająca, aby dokładnie poznać warunki przedstawionych doświadczeń, ponieważ firmy biotechnologiczne najczęściej dysponują kilkoma przeciwciałami rozpoznającymi ten sam antygen.

Najobszerniejsza część rozprawy to **Wyniki**, które zawierają aż 190 stron i zostały podzielone na 8 podrozdziałów przedstawiających kolejno rezultaty szczegółowych analiz ośmiu badanych gatunków fitopatogennych grzybów mikroskopijnych: *Erysiphe palczewskii*, *Erysiphe convolvuli*, *Podosphaera fusca*, *Phyllactinia guttata*, *Tranzschelia pruni-spinosae*, *Phragmidium rubi-idaei*, *Peronospora ficariae* oraz *Wilsoniana bliti*.

Każdy podrozdział zaczyna się od przedstawienia wyników dotyczących identyfikacji genetycznej wymienionych mikrogrzybów oraz ich charakterystyki biochemicznej w oparciu o analizę jakościową kwasów tłuszczowych i węglowodanów. Następnie Autorka opisuje wyniki doświadczeń *in vitro* z wykorzystaniem komórkowego modelu górnych i dolnych dróg oddechowych, które dotyczyły zdolności ekstraktów grzybowych do indukowania reakcji cytotoksycznych, wytwarzania reaktywnych form tlenu oraz do wyzwolenia produkcji cytokin uczestniczących w rozwoju odpowiedzi zapalnej leżącej u podstaw alergii, a także wpływu ekstraktów na poziom integralności bariery nabłonkowej. Każdy z podrozdziałów kończy się krótkim podsumowaniem otrzymanych wyników.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka stwierdziła, że spośród ośmiu po raz pierwszy przebadanych fitopatogennych grzybów mikroskopijnych pasożytujących na powszechnie występujących roślinach największym potencjałem prozapalnym wobec modelowych komórek górnych i dolnych dróg oddechowych cechowały się *Erysiphe palczewskii*, *Erysiphe convolvuli* oraz *Peronospora ficariae*. Ponieważ reakcje zapalne leżą u podstaw reakcji alergicznych można przypuszczać, że wymienione grzyby mają także zdolności alergizujące.

Przedstawione wyniki są przekonujące, uzyskane i opracowane poprawnie. W przeprowadzonych eksperymentach Autorka zastosowała prawidłowe kontrole doświadczalne. O wysokim znaczeniu naukowym uzyskanych wyników świadczy fakt, że ich część została już opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym *Journal of Inflammation Research*, w którym Doktorantka jest pierwszym autorem.



Do tej części pracy mam kilka drobnych uwag i pytań:

- Wyniki badań przedstawione są drobiazgowo, systematycznie i szczegółowo, jednak ich ogromna ilość, powoduje, że brakuje w pracy pomocniczej zbiorczej tabeli, która przedstawiłaby najważniejsze wyniki szczegółowych analiz ośmiu badanych gatunków fitopatogennych grzybów mikroskopijnych. Pozwoliłoby to na lepszą wizualizację różnych relacji pomiędzy uzyskanymi szczegółowymi wynikami analiz poszczególnych gatunków grzybów.
- Zaznaczenie na drzewach filogenetycznych pogrubioną czcionką gatunku grzyba, którego dotyczy analiza ułatwiłoby znacznie interpretację wyników (Ryc. 15-18, Ryc. 35-38).
- Pomniejszenie zdjęć z mikroskopii fluorescencyjnej i przedstawienie ich na jednej stronie ułatwiłoby interpretację wyników.
- Tytuły wykresów (Ryciny: 31, 51, 69, 87, 104, 121, 140): „Zależna od stężenia ekstraktu... produkcja metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9” nie są w pełni poprawne, ponieważ w większości przypadków Autorka nie zaobserwowała statystycznie istotnego wpływu stężenia ekstraktów na produkcję badanych metaloproteinaz. Właściwie tylko ekstrakt *Wilsoniana bliti* (Ryc. 160) wpływał statystycznie istotnie na produkcję metaloproteinaz: MMP-2 i MMP-9 przez komórki linii A549 i BEAS-2B. O małym znaczeniu tych wyników świadczy również fakt, że autorka nie wspomina o nich w dyskusji.
- Autorka twierdzi, że cytotoksyczność ekstraktów badanych grzybów można powiązać z właściwością tych ekstraktów do wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu. Dlaczego przy ekstraktach o największej toksyczności (przy ich najwyższych stężeniach), nie można było zaobserwować produkcji reaktywnych form tlenu (Ryciny: 27, 29, 47, 49, 136, 138)? W jaki jeszcze inny sposób można by potwierdzić, że obniżona żywotność komórek jest związana z nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu.
- Dlaczego w większości przypadków to niższe stężenia badanych ekstraktów grzybów (Ryciny: 30, 50, 68, 120, 139, 159) mają większy wpływ na uwalnianie cytokin? Jakby to Doktorantka wyjaśniła.
- Str. 145 zamiast „znamiennie statystyczne” powinno być: „statystycznie istotne”

Zawarta na 15 stronach **Dyskusja** jest dojrzała. Autorka wyjaśnia wiele aspektów, które mogły być niejasne po przeczytaniu samych wyników. Doktorantka zaczyna dyskusję od podkreślenia ważności podjętego problemu badawczego a następnie omawia najważniejsze wyniki i konfrontuje je z dostępnymi aktualnymi danymi literaturowymi.

Do tej części pracy mam kilka drobnych uwag i pytań:

- Dlaczego Autorka nie omawia w dyskusji części wyników np. analizy filogenetycznej czy wpływu badanych ekstraktów grzybów na produkcję metaloproteinaz?



- Na str. 287 Autorka pisze: „W wyniku przeprowadzonych badań własnych obserwowano zdolność ekstraktów *Erysiphe palczewskii*, *Podosphaera fusca*, *Tranzschelia pruni-spinosae* oraz *Peronospora ficariae* do wzbudzania produkcji RFT w komórkach A549 i BEAS-2B, co pozytywnie korelowało z osłabioną intensywnością zielonej fluorescencji E-kadheryny i okludyny w monowarstwach tych komórek”. Jak Autorka wyjaśni fakt, że trzy z badanych gatunków grzybów *Phyllactinia guttata*, *Phragmidium rubi-idaei*, *Wilsoniana bliti* mimo, że nie wzbudzają produkcji RFT w komórkach A549 i BEAS-2B, obniżają ekspresję E-kadheryny i okludyny w monowarstwach tych komórek. Czy Autorka zna inne mechanizmy, które mogłyby potencjalnie regulować ekspresję E-kadheryny i okludyny?

Po dyskusji następuje dwustronicowe podsumowanie pracy w postaci **Wniosków**.

Warto podkreślić, że w rozdziale **Piśmiennictwo** autorka cytuje aż 306 artykułów naukowych.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Pod względem edytorskim praca jest napisana bardzo starannie. Bardzo podoba mi się strona graficzna i jasny sposób prezentacji danych. Doktorantka nie ustrzegła się niestety w pracy drobnych błędów - stylistycznych i interpunkcyjnych. Ze względu jednak, na to, że nie wpływają one istotnie na całościową bardzo wysoką ocenę pracy nie będę ich jednak wymieniać.


Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Sztandery-Tymoczek podejmuje ważny i nowatorski problem badawczy. Przedstawione w rozprawie doświadczenia zostały prawidłowo zaplanowane, wykonane i zinterpretowane, co jest potwierdzone faktem ich opublikowania w międzynarodowym czasopiśmie, gdzie autorka jest pierwszym autorem. Ponadto Pani Monika Sztandera-Tymoczek jest współautorką dwóch prac eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej, co świadczy o Jej dużej aktywności naukowej. Na wielkie uznanie zasługuje również ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę przy tak dokładnej analizie aż ośmiu gatunków grzybów mikroskopijnych. Przedstawione w recenzji moje drobne uwagi i pytania nie wpływają na końcową wysoką ocenę pracy.

Oświadczam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Moniki Sztandery-Tymoczek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoką wartość prezentowanej rozprawy wnoszę o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Justyna
Branianczyk

 5