

Dr hab. Paulina Czaplewska
Laboratorium Spektrometrii Mas
Zespół Laboratoriów Specjalistycznych
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet
Medyczny
Paulina.Czaplewska@ug.edu.pl

Gdańsk, 30.01.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Moniki Sztandery-Tymoczek

pt. „ Biochemiczna charakterystyka oraz ocena potencjalnych właściwości alergizujących grzybów mikroskopijnych w badaniu *in vitro*”

Rozprawa doktorska mgr Moniki Sztandera-Tymoczek została przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Szuster-Ciesielskiej na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie. Prace wchodzące w skład rozprawy finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu Opus 18 „Mikroskopijne grzyby fitopatogenne – charakterystyka biochemiczna i potencjalny wpływ na rozwój alergii u ludzi”, którego kierownikiem jest prof. dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska.

Praca napisana jest w języku polskim w klasycznym układzie przyjętym dla tego typu prac. Przedstawiony do recenzji manuskrypt liczy 370 stron (Wykaz skrótów 6 stron, Streszczenie 1 strona, Abstract 1 strona, Wstęp 53 strony, Hipoteza i cel pracy 1 strona, Materiały 2 strony, Metody i Metody 15 stron, Wyniki 173 strony, Dyskusja 17 stron, Wnioski 3 strony, Piśmiennictwo 24 strony, Suplement 32 strony oraz Wykaz rycin 12 stron i Wykaz tabel 4 strony oraz Aneks z CV i dorobkiem kandydatki). Praca zawiera 162 ryciny, 6 tabel oraz 306 pozycji piśmiennictwa. Mgr Sztandera-Tymoczek jest współautorką dwóch publikacji (2021 r. *Cemico-Biological Interactions* IF 5,1 oraz 2020 r. *Applied Organometalic Chemistry* IF 3,9, 100 punktów MNiSW) i pierwszą autorką jednej publikacji w *Journal of Fungi* z 2023 roku (IF 4,7, 20 punktów MNiSW) wzmiankowanej w CV oraz drugiej, którą znalazłam w Web of Science, również z 2023 roku w *Journal of*

Inflammation Research (IF 4,5, 140 punktów MNiSW). Jest to bardzo dobry dorobek doktorantki uzyskany podczas czterech lat Szkoły Doktorskiej.

Wstęp pracy czyta się bardzo dobrze, jest opatrzony profesjonalnie przygotowanymi rycinami. Dostęp do programów graficznych znacznie ułatwia nam obecnie pracę i przygotowanie jasnych, przyciągających wzrok rysunków. Podczas przygotowywania pracy kandydatka korzystała z programu BioRender i taka informacja została zawarta pod każdą ryciną. Hipoteza i cel pracy są przedstawione na jednej stronie i dotyczy potencjalnego działania prozapalnego mikroskopijnych grzybów, które to leży u podłoża reakcji alergicznych. Zaś celem pracy była i) charakterystyka biochemiczna zarodników fitopatogennych grzybów mikroskopijnych, identyfikacja i analiza składu kwasów tłuszczowych oraz węglowodanów z wykorzystaniem chromatografii gazowo-cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GLC-MS); ii) analiza potencjalnych zdolności surowych ekstraktów grzybowych do indukowania odpowiedzi prozapalnej wobec komórek dwóch linii A549 i BEAS-2B. Najpierw pojawia się cel badań – identyfikacja i analiza składu kwasów tłuszczowych oraz węglowodanów za pomocą chromatografii GLC-MS, a dalej cel pracy w postaci analizy potencjalnych zdolności surowych ekstraktów grzybowych do indukowania odpowiedzi prozapalnej wobec komórek dwóch linii. Cele pracy są dla mnie jasne, jednak osobiście ułożyłabym je trochę inaczej. Część poświęcona stosowanym materiałom i metodom jest opisana prawidłowo, choć w paragrafie poświęconym spektrometrii mas zabrakło mi kilku informacji jak jasne określenie, czy wszystkie czynności wykonane były własnoręcznie przez kandydatkę, czy też część z udziałem pracowników danej pracowni; brak informacji o rozdzielczości i dokładności pomiaru masy aparatu GLC-MS, wyjaśnienia do jakich struktur odnoszą się jony na podstawie których były identyfikowane kwasy i cukry. Czy stosowana była gotowa biblioteka/baza do identyfikacji, jeśli tak to jaka?

Rozdział Wyniki to najobszerniejsza część pracy (173 strony). Odzwierciedla on poszczególne etapy prowadzonych prac. Opatrzony jest dużą liczbą rysunków (150 rycin z 162 w całej pracy). Każdy rozdział to kolejny grzyb mikroskopijny, dla którego kandydatka przeprowadziła serię pomiarów i analiz pozwalających na identyfikację gatunku (morfologia i analiza flogenetyczna), charakterystykę biochemiczną (analiza składu kwasów tłuszczowych i węglowodanów), dalej ocena aktywności biologicznej ekstraktu na liniach komórkowych A549 i BEAS-2B (żywołność komórek, wytwarzanie reaktywnych form tlenu oraz wytwarzanie cytokin prozapalnych), a na koniec ocena poziomu integralności komórek nabłonkowych

(zdolność wytwarzania metaloproteinaz, obecność białek połączeń międzykomórkowych). Dalej schemat powtarza się dla kolejnych wybranych grzybów mikroskopijnych. W moim odczuciu można by przemyśleć inny sposób prezentacji wyników aby łatwiej było recenzentowi porównać ze sobą badane grzyby. Tabela zbiorcza dla zidentyfikowanych kwasów tłuszczowych i cukrów itd. pozwoliłaby szybko porównać wyniki. W obecnej formie trzeba wertować sporo stron aby ogarnąć wszystkie dane. Każdy rozdział czyta się dobrze, rysunki i tabele są poprawne, osobiście wolę jednak mieć dane w formie tabeli zbiorczych.

Uważam, że zastosowane w pracy techniki i przeprowadzone analizy uzyskanych wyników pozwoliły na realizację założonych przez Doktorantkę celów. Kandydatka podczas realizacji założonych prac zapoznała się i z sukcesem zastosowała techniki pozwalające na izolację DNA, powielanie materiału genetycznego PCR, sekwencjonowanie genetyczne oraz opanowała narzędzia bioinformatyczne pozwalające na analizę uzyskanych danych genomowych. Praca obejmowała również hodowle komórek ludzkich, gdzie trzeba wykazać się dobrym warszatem laboratoryjnym. Opanowała testy kolorymetryczne oraz pracę z cytometrem przepływowym, spektrometrię mas oraz mikroskopię. Jest to doskonała podstawa do dalszej pracy naukowej, a osoby posiadające takie doświadczenie są cennymi pracownikami.

Podsumowując, dla ośmiu gatunków grzybów pozyskanych ze środowiska naturalnego *Erysiphe palczewskii*, *Erysiphe convolvuli*, *Phyllactinia guttata*, *Podosphaera fusca*, *Tranzschelia pruni-spinosae*, *Phragmidium rubi-ideaei*, *Peronosporales: Peronospora ficariiae*, *Albuginales Wilsoniana bliti* przeprowadzona została:

- **Identyfikacja gatunku**, charakterystyka morfologiczna, analiza filogenetyczna;
- **Analiza biochemiczna**, określenie składu kwasów tłuszczowych węglowodanów;
- **Ocena aktywności biologicznej** ekstraktów grzybowych na liniach komórkowych A549 (ATCC#CCL-185) i BEAS-2B (ATCC# CRL-9609), gdzie udało się określić:
 - żywotność komórek (obecność komórek apoptotycznych, nekrotycznych itd.);
 - wytwarzanie reaktywnych form tlenu przez badane linie pod wpływem ekstraktów grzybowych;
 - wytwarzanie cytokin prozapalnych pod wpływem badanych ekstraktów;

- o ocena poziomu integralności komórek nabłonka poprzez określenie wytwarzania metaloproteinaz przez badane linie komórkowe, oraz obecność białek połączeń międzykomórkowych.

Wnioski jakie wysunęła kandydatka na podstawie uzyskany wyników:

- Badane grzyby mikroskopijne mają specyficzne dla gatunku profile kwasów tłuszczowych i węglowodanów jednak nie pozwoliły one na określenie zależności między wzbudzeniem reakcji alergicznej a składem biochemicznym zarodników;
- Największą cytotoksyczność w przeprowadzonych badaniach wykazywały *Erysiphe paczewskii*, *Erysiphe convolvuli* i *Peronospora ficariae*;
- Duża liczba komórek nekrotycznych i apoptotycznych w stosunku do spadku żywych komórek koreluje ze zdolnością ekstraktów do wzbudzania produkcji reaktywnych form tlenu, które mogą być przyczyną cytotoksyczności;
- Pod wpływem ekstraktów komórki intensyfikowały produkcję cytokin prozapalnych istotnym znaczeniu w rozwoju reakcji alergicznych, a w przypadku *Erysiphe paczewskii* oraz *Erysiphe convolvuli* także TNF- α , co pozwala na wnioskowanie o potencjalnych zdolnościach do indukowania reakcji alergicznych;
- Ekstrakty *Eysiphe paczewskii*, *Erysiphe convolvuli* oraz *Peronospora ficariae* powodują zmniejszenie integralności komórek zaburzając utrzymanie funkcji bariery komórek nabłonkowych.

Wynika z tego, że z ośmiu badanych grzybów potencjalnie najbardziej alergenne i wymagające dalszych badań są trzy z nich: *Eysiphe paczewskii* występujący na syberyjskiej akacji żółtej, *Erysiphe convolvuli* występujący na powoju polnym oraz *Peronospora ficariae* występująca na ziarnopłonie wiosennym.

Ze względu na rolę recenzenta przedstawię również swoje subiektywne uwagi dotyczące pracy, która biorąc pod uwagę ogrom materiału w niej zawarty została przygotowana bardzo starannie. Jak na tak obszerną pracę, nie znalazłam wielu literówek czy błędów stylistycznych. Praca nad tak dużym tekstem wymaga sporego skupienia i wytrwałości. Chciałabym zwrócić uwagę jedynie na kilka spraw, które mogą w przyszłości pomóc w przygotowaniu i prezentacji opracowań naukowych:

- Praca zawiera wiele zdjęć mikroskopowych; ze względu na to, iż w druku tracą one dużo na wartości można przemyśleć załączenie tego typu danych na płycie lub zdeponować w dedykowanym repozytorium i przesłać recenzentom dostęp do danych. Można wtedy oglądać zdjęcia bezpośrednio na ekranie z lepszą rozdzielczością.
- We wstępie skupiła się Pani na alergii, jej rodzajach, mechanizmach, diagnostyce i leczeniu oraz w drugiej części na grzybach jako problemie zdrowotnym; Ponieważ duża część badań dotyczyła pracy na komórkach jako modelach do badań reakcji prozapalnych, szkoda że nie opisała Pani tego problemu czyli jakie modele komórkowe układu oddechowego są stosowane w badaniach, jakie są za i przeciw przy wyborze danej linii komórkowej. Skróciłabym część dotyczącą alergii na rzecz modeli komórkowych;
- Komórki A549 wyizolowano z tkanki płuc białego, 58-letniego mężczyzny chorego na raka płuc. W całej pracy nie wspomina Pani o charakterze nowotworowym tej linii komórkowej. Stosuje się ją głównie do analizy leków nienowotworowych in vitro, a także jako model do badania chorób płuc, do odkrywania leków związanych z chorobami układu oddechowego, w tym przewlekłą obturacyjną chorobą płuc i infekcjami dolnych dróg oddechowych. Są za i przeciw stosowania linii nowotworowych do badań związanych z alergią więc warto taką informację umieszczać w pracy.

Z pytań do Kandydatki chciałabym prosić o wypowiedz lub wyjaśnienie kilku kwestii związanych z pracą

- We wstępie odnosi się Pani w znacznej większości do wyników badań przeprowadzonych na terenie USA (np. str. 34 i 35 i dalej). Jak wygląda sytuacja w przypadku Europy/Polski? Czy są analogiczne dane, czy może jest mniej badań prowadzonych w kwestii alergii, alergenów i ich występowania?
- Czy i jeśli tak to na ile miała Pani możliwość wykonywania samodzielnie lub pod opieką operatora samych pomiarów GLC-MS i rejestracji zdjęć mikroskopowych?
- Jaka jest rozdzielczość i dokładność pomiaru masy dla stosowanego systemu GLC-MS?
- W pracy pojawiło się oznaczenie jonu molekularnego i pozostałych jonów identyfikacyjnych w postaci $[M]^+$, $[M-31]^+$ itd. Nie spotkałam się jeszcze z takim oznaczeniem więc z ciekawości swojej chciałam dopytać skąd pochodzi taki sposób zapisu jonów.

- Proszę o wyjaśnienie do jakich struktur, utraty jakich fragmentów odnoszą się jony na podstawie, których identyfikowała Pani kwasy tłuszczowe: „Nasycone i jednonasycone kwasy tłuszczowe określono na podstawie jonów 74 i 87 m/z, jonu molekularnego [M]⁻ oraz jonów [M-31]⁻, [M-32]⁻, [M-29]⁻ [M-43]⁻ [M-116]⁻.”
- Czy mogłaby Pani przedstawić jedno wybrane identyfikacyjne widmo masowe dla zidentyfikowanych kwasów tłuszczowych i jedno wybrane dla reszt cukrowych? Nie ma przykładów w pracy ani w suplemencie.
- Jakie modelowe linie komórkowe stosowane są w badaniach układu oddechowego (oprócz stosowanych w pracy)? Które z nich wybrałaby Pani do badań w ramach doktoratu mając do nich nieograniczony dostęp?

Wniosek końcowy:

W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Sztandery-Tymoczek całkowicie spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawa z dnia 20 lipca 2018 - Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 oraz Dz.U. 2020 r., poz. 85, z późniejszymi zmianami. Założone cele, ich realizacja i uzyskane wyniki są spójne i mogą być przydatne w dalszych pracach. Doktorantka udowodniła, że potrafi samodzielnie sformułować problem naukowy i go rozwiązać. Poddaje analizie uzyskane wyniki i przeprowadza ich dyskusję odnosząc się do danych literaturowych, wyciąga prawidłowe wnioski. **W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej dopuszczenie mgr Moniki Sztandery-Tymoczek do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.**

Paulina Czaplewska

Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii UG-GUMed
Zespół Laboratoriów Specjalistycznych
Paulina Czaplewska
dr hab. Paulina Czaplewska, prof. UG