



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Funkcjonalnej i Ekologii
Zakład Immunologii
prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska



Warszawa, 19.02.2024r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Sztandery-Tymoczek,

zatytułowanej:

**Biochemiczna charakterystyka oraz ocena potencjalnych właściwości alergizujących
fitopatogennych grzybów mikroskopijnych w badaniu *in vitro***

Praca doktorska mgr Moniki Sztandery-Tymoczek została wykonana w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska.

Tematyka ocenianej pracy dotyczy potencjalnych zdolności do wywołania alergii przez grzyby pasożytujące na roślinach, których zarodniki łatwo przenoszą się w powietrzu i mogą być źródłem alergenów. Te natomiast, mogą wywoływać szereg powikłań związanych z układem oddechowym i innymi narządami, co stanowi ważny problem o zasięgu światowym. Trwają nieustanne poszukiwania nowych potencjalnych alergenów, opartych na nich testów diagnostycznych i nowoczesnych terapii.

W ten nurt poszukiwań wpisują się badania prowadzone przez mgr Monikę Sztandery-Tymoczek. Podjęła się zadania oceny wybranych gatunków fitopatogennych grzybów mikroskopijnych jako potencjalnych alergenów. Należy uznać tę inicjatywę za ważne poznawczo zadanie naukowe z potencjałem aplikacyjnym.

Rozprawa doktorska Pani Moniki Sztandery-Tymoczek została przygotowana w formie manuskryptu w języku polskim. Zawiera 370 stron, a treść podzielono na 14 typowych dla tego rodzaju opracowań rozdziałów. Zawarte opisy są ilustrowane 162 rycinami i 6 tabelami. Bibliografia obejmuje 306 pozycji piśmiennictwa i 20 źródeł internetowych.

Wstęp jest bardzo dobrym wprowadzeniem do tematyki rozwijanej w rozprawie, opartym na przeglądzie wielu pozycji z literatury przedmiotu, a wybór publikacji świadczy o

swobodnym poruszaniu się Doktorantki w tematyce. Dobór i kolejność przedstawionych treści są logiczne i właściwe. Wprowadza czytającego rozprawę w zagadnienia związane z mechanizmami rozwoju alergii, diagnostyką i leczeniem tych zaburzeń, ze szczególnym uwzględnieniem roli grzybów. Doktorantka przedstawiła kluczowe informacje niezbędne do zrozumienia celów pracy i oceny uzyskanych wyników.

Cele pracy są opisane klarownie i zwięźle, w oparciu o dobrze zdefiniowaną hipotezę. Na podstawie aktualnej wiedzy, Doktorantka postawiła hipotezę, że powszechnie występujące mikroskopijne grzyby fitopatogenne mogą być potencjalną przyczyną reakcji prozapalnych leżących u podłoża alergii. Hipotezę weryfikowała realizując postawione cele badawcze. Do najważniejszych zaliczyła identyfikację i analizę składu kwasów tłuszczowych oraz węglowodanów zarodników fitopatogennych grzybów mikroskopijnych. Cel nadrzędny obejmował analizę potencjalnych zdolności surowych ekstraktów grzybowych do indukowania odpowiedzi prozapalnej wobec komórek dwóch linii komórkowych ludzkich dróg oddechowych, będących modelami *in vitro* komórek dolnych i górnych dróg oddechowych.

Mgr Monika Sztandera-Tymoczek zastosowała w swojej pracy szereg metod z zakresu biochemii, biologii komórki, cytometrii przepływowej, mikroskopii fluorescencyjnej, testy immunoenzymatyczne oraz chromatografię gazowo-cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas, które dokładnie opisano. Przedstawiono również założenia i schematy przeprowadzonych analiz, co czyni pracę przejrzystą i dopracowaną metodologicznie. Na uwagę zasługuje dobra dokumentacja wyników, przedstawionych w postaci 148 rycin, dokładnie opisanych. Prawidłowo zostały dobrane testy laboratoryjne i odpowiednie kontrole. Analiza i ocena wyników badań świadczy o dobrym opanowaniu przez doktorantkę metodyki badawczej stosowanej w doświadczeniach i wskazuje na Jej dużą wiedzę i umiejętności w tym zakresie.

Uzyskane wyniki doktorantka przedstawiła na 170 stronach monografii. Poszczególne gatunki grzybów zostały przedstawione osobno, w każdym rozdziale opisano zbiór materiału do analiz, w tym kryteria jakimi kierowano się przy wyborze poszczególnych gatunków do badań, mikroskopową i genetyczną identyfikację grzybów, przygotowanie ekstraktów grzybowych, badane linie komórkowe, wyniki biochemicznej identyfikacji kwasów tłuszczowych i węglowodanów, chromatografii gazowo-cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, wyniki badania cytotoksyczności, oceny apoptozy i nekrozy komórek oraz

produkcji reaktywnych form tlenu, jak również wyniki oceny stężeń cytokin oraz oznaczeń obecności markerów integralności nabłonka oddechowego. Takie przedstawienie wyników czyni je przejrzystymi, łatwiejszymi do porównania. Na końcu każdego rozdziału zamieszczono podsumowanie uzyskanych dla danego gatunku grzyba wyników badań.

Doktorantka wykazała, że profile kwasów tłuszczowych i węglowodanów są ściśle określone dla poszczególnych gatunków, mogą więc stanowić ważne narzędzie taksonomiczne.

Wykazała również, że spośród badanych ośmiu surowych ekstraktów badanych grzybów największą aktywność cytotoksyczną wykazywały trzy z nich, *Erysiphe palczewskii*, *Erysiphe convolvuli* i *Peronospora ficariae*. Wnioski wysunięto na podstawie zależnej od stężenia, ich zdolności do obniżania odsetka aktywnych metabolicznie komórek, jak również do zwiększania odsetka komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Doktorantka zaobserwowała, że wzrost odsetka komórek w apoptozie i nekrozie dodatnio korelował ze wzrostem produkcji reaktywnych form tlenu, widocznym w obecności ekstraktów badanych grzybów, co Jej zdaniem może być przyczyną obserwowanej cytotoksyczności.

Realizując kolejny cel pracy, zaobserwowała wzrost stężenia cytokin prozapalnych, IL-1 β i GM-CSF oraz TNF- α w obecności trzech ekstraktów grzybowych. Na tej podstawie wnioskowała, że wyróżnione ekstrakty grzybowe mogą posiadać potencjalne zdolności do indukowania reakcji alergicznych. Wymaga to jednak dalszych badań. Jak Doktorantka tłumaczy obserwację, że niższe stężenia niektórych ekstraktów powodowały większy wzrost syntezy cytokin prozapalnych?

Inna ważna obserwacja dotyczy integralności nabłonka dróg oddechowych, stanowiącego pierwszą linię obrony przed wdychanymi składnikami. Doktorantka zaobserwowała zmniejszenie intensywności fluorescencji okludyny i E-katheryny, ważnych białek, związanych odpowiednio z połączeniami ścisłymi i przylegającymi komórek. Sugeruje więc, że wyróżnione ekstrakty grzybowe mogą zmniejszać integralność komórek, zaburzając utrzymanie funkcji bariery komórek nabłonkowych.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć wykazanie, że badane ekstrakty grzybowe z wyselekcjonowanych fitopatogennych grzybów mikroskopijnych, pasożytujących na powszechnie występujących roślinach, mogą mieć działanie prozapalne. Doktorantka wnioskuje, że mogą wykazywać działanie alergizujące. Jest to ważna obserwacja, którą należy potwierdzić w dalszych badaniach. Czy Doktorantka, w oparciu o

swoją wiedzę oraz badania, mogłaby zasugerować dalszy kierunek poszukiwań? Na jakie parametry immunologiczne należy zwrócić uwagę?

Dyskusja zawiera podsumowanie uzyskanych wyników oraz ich interpretację na tle literatury przedmiotu. Dyskusja napisana jest dojrzale i przejrzyście. Doktorantka odnosi się do obszernego piśmiennictwa, konfrontuje własne wyniki z obserwacjami innych badaczy. Po dyskusji zamieszczono podsumowanie, podkreślające najważniejsze osiągnięcia.

Dysertacja napisana została starannie, mgr Monika Sztandera-Tymoczek w jasny sposób przekazuje założenia pracy, wyniki i ich znaczenie w badaniach światowych. Trudno też doszukać się większych uchybień edytorskich, poza nielicznymi literówkami czy niezręcznymi sformułowaniami, jak komórki T, zamiast limfocyty T itp.

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską mgr Moniki Sztandery-Tymoczek pozytywnie. Doktorantka posiada szeroką wiedzę teoretyczną w tematyce badań. Wykazała się umiejętnością samodzielnego planowania i wykonywania doświadczeń realizujących założone cele oraz zdolnością do prawidłowego wyciągania wniosków.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone przepisami Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku, „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2018r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami) oraz Ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę- Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późniejszymi zmianami). W związku z tym, zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Moniki Sztandery-Tymoczek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę również o wyróżnienie pracy. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wskazuje na ogólną wiedzę teoretyczną i praktyczną Doktorantki w zakresie prowadzonych badań. W rozprawie zawarto znaczący zbiór wyników, z których znaczna część została już opublikowana i będzie niewątpliwie inspiracją do dalszych badań dla innych badaczy.



prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska