

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADCY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. dnia	15-09-2021
L. dz. RN-BM/	1525/2021

Łódź, dn.25.08.2021

Dr hab. inż. Joanna Leszczyńska
Instytut Surowców Naturalnych i Kosmetyków
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
Ul. Stefanowskiego 4/10
joanna.leszczyńska@p.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Siekierzyńskiej nt: Molekularne uwarunkowania alergizujących właściwości jabłek

Podstawę do opracowania recenzji stanowiło pismo prof. dr hab. Marzenny Podhorskiej-Okołów z informacją nt. uchwały Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z dn. 17 czerwca 2021r o powołaniu mnie na recenzenta pracy doktorskiej mgr Aleksandry Siekierzyńskiej nt.: **Molekularne uwarunkowania alergizujących właściwości jabłek**

Znaczenie badań podjętych w pracy

Podjęta tematyka pracy badawczej dotyczy problemu alergii. Obiektem badań są jabłka, które są jednym z popularniejszych alergenów pokarmowych. Alergia na jabłka dotyczy w szczególności aż 50-70% pacjentów uczulonych na pyłki drzew. Pomimo, że jabłka jako źródło alergenów są jednym z najlepiej przebadanych i opisanych, to jednak stan wiedzy na temat alergii przez nie wywołanych jest nadal niewystarczający. Jedynie u kilku odmian jabłek scharakteryzowano zawartość alergenów i ekspresję genów kodujących białka alergizujące. Poza tym w opisanych badaniach stosowano różne nieporównywalne metody (ELISA z różnymi przeciwciałami, w tym z surowicami pacjentów, testy skórne, testy na wykrywanie swoistych przeciwciał u pacjentów uczulonych). Stąd wiedza na temat alergenów jabłek jest dalece niepełna. Niewiele jest również badań nad wpływem metod uprawy, stopnia dojrzałości, przechowywania na zawartość alergenów w tradycyjnych (starych) i nowych odmianach jabłoni.

Stąd podjęcie badań w tym zakresie jest jak najbardziej uzasadnione, a prezentowana praca znacznie pogłębia wiedzę na temat alergenów jabłek, a także wnosi wiele cennych,

praktycznych informacji, które mogą być wykorzystane przez pacjentów. Oceniam, że podjęta tematyka badawcza jest oryginalna i trafnie wybrana.

Ocena formalna

Podstawą przedstawionej do oceny praca są dwie publikacje:

1. A. Siekierzyńska, D. Piasecka-Kwiatkowska, A. Myszka, M. Burzyńska, B. Sozanska, T. Sozanski. Apple allergy: causes and factors influencing fruits allergenic properties. *Clinical and Translational Allergy*, in production. DOI:10.1002/clt2.12032
IF=5,16, 100 pkt MEIN
2. A. Siekierzyńska, D. Piasecka-Kwiatkowska, W. Litwinczuk, M. Burzyńska, A. Myszka, P. Karpiński, E. Zygala, N. Piorecki, E. Springer, T. Sozanski. Molecular and Immunological Identification of Low Allergenic Fruits among Old and New Apple Varieties. *Int. J. Mol. Sci* 2021, 22, 3527 <https://doi.org/10.3390/ijms22073527>
If=4,56, 140 pkt MEIN

Zaprezentowane publikacje mają dużą wartość naukową, wysokie współczynniki wpływu. Pierwsza publikacja jest autorstwa 6 autorów, natomiast druga aż 10 autorów. Doktorantka jest pierwszym autorem, jakkolwiek autorzy publikacji deklarują zakres swojego udziału w tworzeniu pracy, jednak ze względu na brak informacji na temat szczegółowego, ilościowego wkładu poszczególnych autorów ocena osiągnięcia Doktorantki jest utrudniona. Tym niemniej z deklaracji tych wynika bardzo duży i przeważający, decydujący wkład Doktorantki w realizację pracy, pozostali autorzy pełnili funkcje doradcze i kontrolne.

Na str. 2 błędnie jest podana nazwa czasopisma.

Streszczenie pracy będącej istotą rozprawy doktorskiej jest napisane w sposób bardzo jasny, czytelny, zwięzły. Załączone publikacje ułatwiają dostęp do źródłowych wyników.

Ogólnie mogę powiedzieć, że praca jest napisana w sposób jasny, poprawny i staranny. Oczywiście, Doktorantka nie ustrzegła się kilku, mało znaczących błędów korektorskich np.

Str. 3 wers 16-17 brak zgodności podmiotu z orzeczeniem

Str.3 wers 20 analizy czego? a nie „analizy przeprowadzone na...”

Str. 3 ostatni wers przecinek przed „a także...”

Str.14 wers 17 powinno być przeciwciała przeciwko IgG króliczym skoniugowane z peroksydazą, a nie „przeciwko peroksydazie...”

Str. 14 wers 20 Jest H2SO4 powinno być H₂SO₄

Str. 17 podpis pod tabela 8 stopniem a nie „stpniem”

Str. 17 wers 19 uprawy a nie „urawy”

Str. 19 wers 7 od dołu i w kilku innych miejscach, powinno być niniejszych a nie „niniejszych”

Str. 21 wers 8 od dołu, rozumiem, że chodzi o „ slot dot” a nie „slot bot”

Streszczenie w języku polskim, wers 19: „materiał do badań stanowiły” lub „materiałem do badań były”, a nie „materiałem do badań stanowiły”.

Uchybienia te są bardzo nieliczne, wspominam o nich tylko z obowiązku recenzenta i w niczym nie umniejszają pracy. Praca jest poprawna pod względem językowym, stylistycznym i interpunkcyjnym. Oceniam, że praca jest starannie przygotowana, w sposób klarowny, logiczny, przyjazny dla czytelnika.

Ocena merytoryczna

Podstawą prac są dwie publikacje. Pierwszą z nich jest praca przeglądowa dotycząca alergenów jabłek. Doktorantka dokonała bardzo dobrego, rzetelnego opartego na najnowszych publikacjach przeglądu literatury na temat badań alergenicności jabłek. Opisała bardzo szczegółowo właściwości, funkcje czterech podstawowych alergenów jabłek: trzy pierwsze są to białka obronne: Mal d 1 (rybonukleaza, białko z rodziny PR10, Mal d 2 (białko podobne do taumatyny), Mal d 3 (białko przenoszące tłuszcze LPT) oraz profilina Mal d 4. Doktorantka opisuje również izoformy Mal d 1, podkreślając związek ekspresji, szczególnie Mal d 1.04 i Mal d 1.06 z alergenicnością. Znacznie mniej badań poświęcono alergenom Mal d 2, Mal d 3 i Mal d 4, ale Doktorantka również te alergeny opisała bardzo szczegółowo.

Opisane na podstawie literatury badania nad alergenicnością jabłek dotyczyły głównie związku odmiany tych owoców z alergenicnością. W sposób bardzo przejrzysty Doktorantka zestawiała te

badania w tabeli 1. Najwięcej badań poświęcono, oczywiście, Mal d 1, określając zawartość tego alergenu różnymi metodami, stąd jednoznaczna ocena alergogeniczności badanych odmian jest trudna. Również temat ekspresji genów kodujących alergeny w jabłkach jest mało zbadany. Te nieliczne prace wskazują na to, że niektóre stare odmiany jabłoni cenne pod względem wartości odżywczych, smaku i przetwórstwa, o niskim potencjale alergizującym, są również odporne na choroby (parch), co pozwala na obniżenie stosowania pestycydów, które dodatkowo mogą zwiększać alergeniczność.

Co więcej, Doktorantka, opisała także wpływ stopnia dojrzałości, warunków przechowywania i odporności na choroby na zawartość alergenów. Temat ten jest rzadko poruszany i dość słabo reprezentowany w badaniach. Dotychczasowe wyniki badań [poz. lit. 43] wskazują, że zawartość Mal d 1 prawdopodobnie rośnie podczas przechowywania w owocach niedojrzałych i przejrzałych, w przeciwieństwie do owoców dojrzałych, w których pozostaje stała. Jednak wyniki nie są jednoznaczne, inni badacze nie potwierdzają tych wyników, a badania nad innymi alergenami jabłek wskazują na zmniejszenie ekspresji genów kodujących Mal d 3 i Mal d 4. Okazało się również, że w uprawach ekologicznych ekspresja genów kodujących Mal d 1 jest niższa, ale ze względu na to, komercyjne, nowe odmiany jabłoni są nieodporne na choroby nie nadają się one tego typu upraw. Odmiany stare nadają się do nowoczesnego rolnictwa ekologicznego, charakteryzują się większą bioróżnorodnością, mogą być źródłem genotypów o niższej potencjalnej alergeniczności. Stąd sugestia powrotu do starych odmian jabłoni i konieczność dalszych badań nad alergenicznością tych owoców. Zasadne jest również badanie wpływu warunków uprawy, przechowywania, stopnia dojrzałości na zawartość alergenów w celu zidentyfikowania produktów potencjalnie hipoalergicznymi.

Doktorantka zwraca także uwagę na oddziaływania polifenoli z białkami, które mogą wpływać na alergeniczność jabłek. Temat ten jest bardzo mało przebadany i reprezentowany w literaturze.

Mgr Aleksandra Siekierzyńska w pracy doświadczalnej poddała analizie 21 starych odmian jabłoni hodowanych metodami ekologicznymi, 8 odmian nowoczesnych uprawianych metodami intensywnymi i integracyjnymi oraz dodatkowo 4 odmiany, w sumie 43 próbki. Analizom poddała skórkę i miąższ. W swoich badaniach Doktorantka wykorzystwała nowoczesne metody badawcze: metody biologii molekularnej, ELISA i in. Zastosowane metody badawcze są nowoczesne i odpowiednio, trafnie wybrane. Doktorantka opracowała metody PCR oznaczania 4 alergenów jabłek, w przypadku Mal d 1 również izoform. Okazało

się, że ekspresja genu Mal d 1.06A jest wyższa w starych odmianach jabłoni niż w nowych i wyższa w skórce niż w miąższu. Metoda uprawy nie wpłynęła istotnie na ekspresję, ale dodatnio korelowała z dojrzałością owoców. Doktorantka wykazała również, że ekspresja Mal d 1.06A była dodatnio skorelowana z immunoreaktywnością surowic. Jest to bardzo ważny wynik, ale potwierdzony tylko przez reakcje z 4 surowicami pacjentów i z pewnością wymaga kolejnych badań.

Ekspresja genu Mal d 1.01 jest istotnie wyższa w jabłkach z upraw ekologicznych niż z zintegrowanych i dodatnio koreluje z dojrzałością owoców i z immunoreaktywnością surowic pacjentów. Ekspresja Mal d 1.06A koreluje z zawartością białka Mal d 1 (szkoda, że w tabeli 7 nie podano błędu, czy odchylenia standardowego), natomiast ekspresja Mal d 1.01 nie korelowała z zawartością głównego alergenenu.

W przypadku genu Mal d 2.01 jego ekspresja ulega obniżeniu w uprawie ekologicznej w porównaniu do uprawy zintegrowanej i nie korelowała z dojrzałością owoców ani immunoreaktywnością pacjentów.

Stare i nowe odmiany nie różniły się pod względem transkrypcji genu Mal d 3.01. Uprawa ekologiczna i zintegrowana, w przeciwieństwie do zintegrowanej znacząco wpływa na wzrost ekspresji w skórce. Doktorantka nie stwierdziła korelacji między ekspresją genu, stanem dojrzałości i immunoreaktywnością surowic pacjentów.

W przypadku genu Mal d 4.01 Doktorantka stwierdziła jedynie korelację z dojrzałością, nie wykazała korelacji między metodą uprawy, czy immunoreaktywnością surowic pacjentów.

Otrzymane wyniki badań były szeroko poddane analizie statystycznej, są bardzo dobrze opracowane. Doktorantka dokonała pogłębionej analiz otrzymanych wyników. Na podstawie kryteriów grupowania przedstawiła odmiany jabłek potencjalnie hipoalergicznych: Kandil Sinap, Rumianka z Alma-Ata, Kantówka Gdańska, Reinette Coulon i Gala.

Doktorantka własne wyniki analiz poddała rzetelnej analizie, porównała z wynikami innych autorów i przedstawiła wnioski. Najważniejszym wnioskiem wynikającym z wykonanych badań jest możliwość wykorzystania szerszej gamy odmian jabłek w żywieniu pacjentów alergików. Pojawiają się dwa argumenty o zasadności powrotu do starych odmian jabłoni: ich potencjalna hipoalergenność oraz większa bioróżnorodność.

Cennym wnioskiem jest fakt, że ekspresja izoformy Mal d 1.06A determinuje kształtowanie alergenności jabłek, wpływa na poziom głównego alergenu Mal d 1.

Uważam, że mgr Aleksandra Siekierzyńska umiejętnie dobrała literaturę do podjętej tematyki badawczej, poprawnie sformułowała hipotezę badawczą i sformułowała adekwatne do niej wnioski. Na podstawie przedstawionej pracy z całą odpowiedzialnością mogę stwierdzić, że Autorka w pełni opanowała umiejętność posługiwania się warsztatem badawczym z zakresu wybranego kierunku badawczego, wykazała przy tym krytycyzm w odniesieniu do stosowanych metod analitycznych i uzyskanych wyników. Jakkolwiek przedstawiona do oceny praca jest dość skromna, bo opiera się tylko na dwóch publikacjach, w tym jedną z nich jest praca przeglądowa, to uważam, że w pełni spełnia warunki rozprawy doktorskiej, ze względu na dużą wartość naukową, poznającą i praktyczną.

W mojej ocenie przedstawiona do recenzji praca magister mgr inż. Aleksandry Ewy Siekierzyńskiej nt: Molekularne uwarunkowania alergizujących właściwości jabłek charakteryzuje się wysoką wartością merytoryczną wykonanych badań, spełnia kryteria prawidłowo zaplanowanej, zrealizowanej i udokumentowanej rozprawy doktorskiej. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie magister Aleksandry Ewy Siekierzyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. inż., prof. PŁ

Joanna Leszczyńska