



**HIRSZFELD INSTITUTE OF IMMUNOLOGY  
AND EXPERIMENTAL THERAPY,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES**

Centre of Excellence: IMMUNE

**Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLAND**

Phone: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl



Wrocław, dnia 01.10.2021

Dr hab. Łukasz Łaczmański, prof. IITD PAN  
Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki IITD PAN

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Ewy Siekierzyńskiej  
„Molekularne uwarunkowania alergizujących właściwości jabłek” wykonanej pod opieką  
dr hab. Doroty Piaseckiej-Kwiatkowskiej oraz dr hab. Tomasza Sozańskiego**

Przyjmuje się, że obecnie objawy alergii deklaruje ok 40% Polaków. Odsetek ten w ostatnich latach stale rośnie. Można ten efekt powiązać z coraz bardziej „sterylnym” stylem życia. Wśród całej grupy pacjentów z alergiami znaczny odsetek stanowią osoby cierpiące na alergie pokarmowe. Niewątpliwie ciekawym zagadnieniem jest reakcja krzyżowa nadwrażliwości na alergen pochodzący z pyłku brzozy z alergenem występującym w jabłkach. Szczególnie ważny jest ten efekt w Polsce, ponieważ jabłka stanowią najczęściej spożywaną owoc. Również populacja brzozy jest w naszym kraju bardzo rozwinięta. Warto podkreślić, że ponad 50% pacjentów wykazujących objawy alergii na pyłki brzozy wykazuje alergię jamy ustnej po spożyciu jabłek. Dlatego temat podjęty przez Doktorantkę wpisuje się w zapotrzebowanie zbadania mechanizmu powstawania nadwrażliwości na jedno z najczęstszych alergenów w naszej populacji. Warto również podkreślić, że poznanie tego mechanizmu będzie miało wydzźwięk nie tylko naukowy ale również społeczny i ekonomiczny. Szczególnie jeśli te badania przełożą się na ograniczenie objawów alergicznych u pacjentów z opisywaną nadwrażliwością.

W rozprawie doktorskiej Doktorantka oceniła alergenicność 21 starych oraz 9 nowoczesnych odmian jabłek. Dokonała tego poprzez ocenę obecności oraz ilości białka Mal d 1, poziomów ekspresji czterech genów kodujących główne alergeny jabłek, immunoreaktywności surowic. Rozprawę doktorską stanowią dwie opublikowane prace w renomowanych czasopismach z Listy Filadelfijskiej. Łączny współczynnik wpływu obu tych prac wynosi 9.72 (odpowiednio 5.16 oraz 4.56). Obie prace ukazały się w roku 2021. W każdej z tych prac Doktorantka miała znaczący wkład w ich powstanie, co jest niezbędnym warunkiem włączenia do cyklu doktoratu. Pierwszy z artykułów (o tytule: „Apple allergy: Causes and factors influencing fruits allergenic properties-Review”) jest pracą poglądową. Została w nim przedstawiona najnowsza wiedza dotycząca molekularnych podstaw alergenicności jabłek oraz czynników, które mogą wpływać na jej intensywność. Praca ta stanowi bardzo dobry przegląd dostępnej literatury i świadczy o dogłębnej analizie tematu dokonanej przez Doktorantkę. Takie podejście do problemu pozwoliło na odpowiednie sformułowanie tez badawczych, które zostały w kolejnym etapie potwierdzone eksperymentalnie.







**HIRSZFELD INSTITUTE OF IMMUNOLOGY  
AND EXPERIMENTAL THERAPY,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES**

Centre of Excellence: IMMUNE

**Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLAND**

Phone: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337  
21 71

[www.iitd.pan.wroc.pl](http://www.iitd.pan.wroc.pl)

Drugi artykuł (o tytule: „Molecular and Immunological Identification of Low Allergenic Fruits among Old and New Apple Varieties.”) jest pracą eksperymentalną. Przedstawia wyniki identyfikacji molekularnych oraz immunologicznych czynników związanych z alergiennością jabłek zarówno starych jak i nowych odmian.

Materiałem w badaniach Doktorantki były owoce 21 starych oraz 9 nowoczesnych odmian jabłoni. Pobrano również surowicę od czterech pacjentów uczulonych na pyłek brzozy. Z owoców zostało wyizolowane całkowite RNA przy użyciu zmodyfikowanej metody chloroformowej. Ekstrakcję białek Doktorantka przeprowadziła poprzez wytrząsanie miąższu jabłek z buforem PBS.

Doktorantka podczas pracy zastosowała następujące metody badawcze:

- real-time PCR – metoda ta posłużyła do oceny poziomu ekspresji genów kodujących potencjalne alergeny jabłek (*Mal d 1* – izoformy: 1.06A oraz 1.01; *Mal d 2.01*; *Mal d 3.01*; *Mal d 4.01*).
- immunobloting – technikę tą wykorzystano do oceny reakcji surowicy pobranej od pacjentów uczulonych na pyłki brzozy z alergenami jabłek.
- ELISA – za pomocą tej metody analizowano stężenie białka *Mal d 1* w ekstraktach białkowych.

Metody badawcze zostały odpowiednio dobrane do realizacji założeń doktoratu. Świadczą również o biegłości Doktorantki w technikach biologii molekularnej.

Do oceny wyników Doktorantka zastosowała szereg testów statystycznych odpowiednio dobranych do wielkości prób oraz rozkładu danych.

Otrzymane wyniki pozwoliły Doktorantce na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Ocena alergienności jabłek na poziomie genetycznym, proteomicznym oraz immunologicznym umożliwia identyfikację odmian potencjalnie nisko, średnio bądź silnie alergizujących.
2. Stare odmiany jabłek są bogatym źródłem potencjalnie hipoalergicznym jabłek.
3. Ekspresja izoformy *Mal d 1.06A* odgrywa główną rolę w kształtowaniu alergienności jabłek. Ekspresja izoformy *Mal d 1.06A* determinuje poziom głównego alergenu jabłek *Mal d 1*, a tym samym wpływa na stopień alergienności.
4. Wyniki poszerzają wiedzę na temat regulacji ekspresji genów kodujących alergeny, pod wpływem metody uprawy, stopnia dojrzałości czy rodzaju tkanki, co może być przydatne w ocenie ryzyka wystąpienia reakcji alergicznej po spożyciu jabłek o odmiennym profilu ekspresji genów.
5. Poznanie molekularnego mechanizmu alergienności jabłek i czynników modyfikujących może ułatwić poradnictwo medyczne i polepszyć opiekę nad pacjentami z alergiami pokarmowymi.



**HIRSZFELD INSTITUTE OF IMMUNOLOGY  
AND EXPERIMENTAL THERAPY,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES**

Centre of Excellence: IMMUNE

**Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLAND**

Phone: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337  
21 71

[www.iitd.pan.wroc.pl](http://www.iitd.pan.wroc.pl)

6. Wyłonione odmiany o różnym potencjale alergenicności mogą być przydatne do opracowania procedur immunoterapii alergii pokarmowej na jabłka oraz pyłek brzozy. Należy podkreślić, że wnioski z przeprowadzonej pracy badawczej mają nie tylko aspekt poznawczy ale również wymiar praktyczny. Można je potencjalnie wykorzystać w codziennej pracy z pacjentami uczulonymi na jabłka.

Całość rozprawy doktorskiej została opatrzona autoreferatem wprowadzającym w temat podjęty przez Doktorantkę. Charakteryzuje w nim alergeny jabłek, opisuje białka z rodziny Mal d i ich rolę w etiologii powstawania alergii na jabłka. Na koniec charakteryzuje czynniki wpływające na alergenicność jabłek. Wprowadzający autoreferat dowodzi bardzo dobrego merytorycznego przygotowania Doktorantki do pracy badawczej. Pokazuje dogłębną znajomość tematu. Z obowiązku recenzenta poniżej przedstawiam uwagi krytyczne:

1. Niestety czytanie bardzo utrudniają błędy stylistyczne oraz duża liczba literówek. Błędy te nie wpływają na wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej ale niestety obniżają jej czytelność.
2. Tabelki z danymi powinny również zawierać wartości testów oraz p-value. Wprawdzie są one opisane w tekście, natomiast ich obecność w tabelach znacznie ułatwiłoby analizę wyników i zwiększyłoby przejrzystość danych.

Po wnikliwym zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani mgr Aleksandry Siekierzyńskiej uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera oryginalne, bardzo wartościowe wyniki i spełnia warunki określone w art. 13 (ust. 1) Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani Aleksandry Siekierzyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*dr hab. Łukasz Łaczmanski*

*Łaczmanski*  
Kierownik Laboratorium  
Genomiki i Bioinformatyki