

dr hab. Waldemar Szaroma
Zakład Fizjologii Zwierząt i Toksykologii
Instytut Biologii, Uniwersytet Pedagogiczny
im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie
ul. Podchorążych 2, 30-084 Kraków

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Ewy Koprowskiej p.t. „Ocena sezonów pyłkowych drzew ze szczególnym uwzględnieniem taksonów alergizujących w Kielcach w latach 2012-2017”

Praca doktorska Pani mgr Ewy Koprowskiej wykonana pod kierunkiem dr hab. Teodory Król, prof. UJK w Zakładzie Biologii Komórki i Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach została przygotowana zgodnie z ustawowymi wymogami stawianymi rozprawom doktorskim.

OCENA PRACY

Zakres pracy doktorskiej przedstawionej do oceny jest imponujący albowiem zawiera ona 299 stron maszynopisu, w tym 282 pozycje piśmiennictwa, zaś wykaz liczbowy materiałów graficznych zastosowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej stanowi aż 59 tabel, 178 rycin i 47 fotografii.

Rozdziały pracy zaproponowane przez Doktorantkę to: Wstęp, Patomechanizm i rodzaje alergii, Alergeny, Założenia i cel pracy, Materiał i metody badań, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie, Summary, Literatura, Spis tabel, Spis rycin, Spis fotografii oraz Spis skrótów i symboli.

Należy podkreślić, iż cała praca została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim i językowym, a moje uwagi zostały wyszczególnione poniżej.

Wstęp

Wstęp jest napisany poprawnie pod względem merytorycznym i językowym i bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę pracy doktorskiej przedstawiając w sposób

uporządkowany zagadnienia związane z chorobami alergicznymi, które stanowią aktualnie bardzo ważny problem społeczny.

Doktorantka podkreśla, że według danych Światowej Organizacji Zdrowia choroby te klasyfikuje się na trzecim miejscu listy najczęściej występujących schorzeń przewlekłych.

Postępujący rozwój chorób alergicznych może być efektem współdziałania czynników genetycznych i środowiskowych. Do czynników sprzyjających alergizacji Doktorantka zalicza między innymi: gwałtowne zmiany klimatyczne, narastające zanieczyszczenie środowiska i niewłaściwe odżywianie. W świetle danych literaturowych przyczyną wystąpienia chorób alergicznych może być stres, styl życia i stopień narażenia na różnorodne alergeny.

Wśród substancji uczulających na szczególną uwagę zasługują alergeny takie jak pyłek roślin, grzyby pleśniowe, roztocza kurzu domowego, sierść i naskórek zwierząt, niektóre produkty spożywcze, a także alergeny środowiska skażonego.

Zgodnie z danymi literaturowymi pyłki roślin stanowią najważniejsze źródło alergenów. W corocznych sezonach pylenia rośliny wytwarzają olbrzymie ilości pyłku, a ten po przedostaniu się do atmosfery stanowi istotny składnik aeroplanktonu i staje się bardzo uciążliwy dla alergików.

Biorąc pod uwagę fakt, iż nasilenie objawów alergii pyłkowej zależy od koncentracji alergenów w powietrzu atmosferycznym, bardzo ważnym zadaniem jest prowadzenie monitoringu stężenia pyłku roślin.

W rozdziale 2 (Patomechanizm i rodzaje alergii) Pani mgr Ewa Koprowska podaje, iż według Europejskiej Akademii Alergologii i Immunologii Klinicznej reakcje alergiczne podzielone zostały na IgE-zależne, do których zaliczono reakcję alergii natychmiastowej (I typ reakcji według Gella i Coombsa) oraz reakcje IgE-niezależne, w których dochodzi do aktywacji mechanizmów immunologicznych, obejmujące typy II-IV (według Gella i Coombsa). Autorka wyjaśnia ponadto nadwrażliwość typu I, II, III i IV oraz przedstawia graficznie przebieg odpowiedzi immunologicznej na alergen.

Uważam, iż informacje zawarte w tym rozdziale zostały przedstawione w sposób właściwy i są niezbędne dla wyjaśnienia ogólnego schematu procesu alergii.

Doktorantka szczególnie dużo uwagi poświęca rozdziałowi 3, który zatytułowała jako Alergeny (31 stron). Dokonuje w nim podziału alergenów, opisuje pyłek roślin jako źródło alergenów, przedstawia budowę ziaren pyłku oraz budowę ściany komórkowej pyłku. Ponadto omawia typy skulptury egzyny ziaren pyłku, apertury ziaren pyłku oraz skład chemiczny ziaren pyłku, alergogenne białka pyłku, a także lokalizację alergenów w ziarnach pyłku. Zwraca uwagę

na genetyczne i środowiskowe uwarunkowania alergii oraz wpływ warunków atmosferycznych na przebieg sezonów pyłkowych.

Na 11 stronach podrozdziału 7, który należy do rozdziału 3, mgr Ewa Koprowska przedstawia charakterystyczne cechy kwiatów i pyłku wybranych drzew o znaczeniu alergennym. Analizuje 9 taksonów drzew, których pyłek stanowi najczęstsze zagrożenie dla alergików i występuje w powietrzu w bardzo wysokich stężeniach. Doktorantka przedstawia krótką charakterystykę następujących taksonów drzew: *Corylus*, *Alnus*, *Betula*, *Ulmus*, *Fraxinus*, *Quercus*, *Populus*, *Salix* i *Acer* uzupełnioną o wykonane przez siebie kolorowe fotografie pokazujące pędy z kwiatami wytwarzającymi pyłek oraz kwiatostany żeńskie.

Założenia i cel pracy

W rozdziale tym Autorka wymienia sześć szczegółowych celów pracy, które zostały precyzyjnie sformułowane, jasno przedstawione i zrealizowane w toku badań. Dla zrealizowania tych celów Doktorantka wykonała następujące badania:

- ◆ dokonanie porównania sezonów pyłkowych wybranych 9 taksonów drzew o właściwościach alergennych biorąc pod uwagę zróżnicowania ich właściwości alergizujących w powietrzu atmosferycznym Kielc w latach 2012 – 2017. Te 9 wybranych taksonów drzew, które wytwarzają pyłek o silnych, średnich i niskich właściwościach alergennych to: leszczyna (*Corylus*), olsza (*Alnus*), brzoza (*Betula*), wiąz (*Ulmus*), jesion (*Fraxinus*), dąb (*Quercus*), topola (*Populus*), wierzba (*Salix*) i klon (*Acer*);
- ◆ określenie charakterystycznych cech poszczególnych sezonów pyłkowych, do których należą: początek, długość, koniec sezonu pyłkowego, wysokość maksymalnych koncentracji dobowych, data ich występowania oraz wartości sum rocznych;
- ◆ opracowanie kalendarzy pyłkowych dla wszystkich 9 badanych taksonów drzew;
- ◆ opracowanie modeli predykcyjnych dla taksonów o wysokim znaczeniu alergennym na podstawie danych z lat 2012 – 2016 w odniesieniu do przewidywania przekroczenia progu pylenia dla danych z roku 2017;
- ◆ określenie zależności między cechami badanych sezonów pyłkowych a czynnikami meteorologicznymi;
- ◆ dokonanie porównania budowy morfologicznej i ultrastrukturalnej ziaren pyłku poszczególnych analizowanych taksonów ze szczególnym zwróceniem uwagi na specyficzne zróżnicowanie wielowarstwowej ściany komórkowej u poszczególnych taksonów.

Material i metody badań

Rozdział ten zawiera cztery podrozdziały opisujące materiał i metody badań w sposób szczegółowy, a jednocześnie zrozumiały. Zastosowane procedury badawcze są jak najbardziej prawidłowe i nie budzą żadnych zastrzeżeń. Podkreślenia wymaga ogrom pracy włożonej przez Panią mgr Ewę Koprowską w wykonanie całości badań.

W pierwszym podrozdziale (Metoda wolumetryczna badania aeroplanktonu) Doktorantka informuje, iż ocenę stężenia ziaren pyłku wybranych taksonów drzew alergennych w powietrzu atmosferycznym Kielc wykonano w oparciu o pomiary aeropalinologiczne przeprowadzone w latach 2012 – 2017. Pani mgr Ewa Koprowska prowadziła swoje badania w każdym sezonie od 15 stycznia do 30 czerwca. Analizą objęto 9 taksonów drzew uwzględniając ich właściwości alergenne: **Betula, Alnus, Corylus, Quercus, Fraxinus, Ulmus, Populus, Salix, Acer.**

W badaniach stężenia ziaren pyłku roślin zastosowała metodę wolumetryczną, która polega na analizie zawartości sporomorf w określonej jednostce objętości powietrza.

Do pomiarów stężenia pyłku Autorka wykorzystwała **aparat Sampler VPPS 2000 firmy Lanzoni**, rekomendowany przez Międzynarodowe Stowarzyszenie Aerobiologiczne.

Zastosowany do badań aparat pracował w trybie ciągłym, siedmiodniowym i umieszczony był na budynku Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach przy ulicy Świętokrzyskiej 15, na wysokości 15 m nad poziomem gruntu.

Należy nadmienić, iż aparat Sampler VPPS 2000 firmy Lanzoni na terenie Kielc został uruchomiony w 2011r., a to pozwoliło Doktorantce na przeprowadzenie nowatorskich badań aeropalinologicznych na terenie Kielc w latach 2012-2017 r.

W drugim podrozdziale (Metody wykonywania i oceny preparatów) Pani mgr Ewa Koprowska szczegółowo opisuje wykonaną analizę morfologiczną i pomiary ziaren pyłku drzew z zastosowaniem mikroskopii optycznej oraz techniki kontrastu Nomarskiego przy wykorzystaniu mikroskopu Nikon ECLIPSE Ti oraz programu Nikon NIS – Elements AR.

W celu porównania ultrastruktury ziaren pyłku poszczególnych badanych taksonów drzew Autorka wykonała preparaty zgodnie ze zmodyfikowaną metodyką Marzelli i Glaumana (1980). Preparaty analizowano stosując transmisyjny mikroskop elektronowy TECNAI G2 SPIRIT (FEI Company), sporządzono dokumentację mikrofotograficzną oraz wykonano pomiary grubości ściany komórkowej ziaren pyłku przy użyciu programu TIA (TEM Imaging & Analysis 3,2 SP6).

Chcę podkreślić, iż zastosowane techniki badawcze nie budzą jakichkolwiek zastrzeżeń i w istotny sposób wpływają na końcową ocenę rozprawy doktorskiej.

Nie mam też uwag odnośnie metodyki opracowania modeli predykcyjnych dla drzew o znaczeniu alergennym oraz analizy statystycznej wyników.

Omówienie wyników

Pragnę podkreślić, iż oceniana rozprawa doktorska wyróżnia się ilością prezentowanych wyników, które zostały przedstawione aż na 170 stronach dysertacji. Wskazuje to na ogromny nakład pracy Doktorantki w celu zrealizowania przedstawionych wcześniej tak rozbudowanych założeń pracy.

Wyniki zostały przedstawione zgodnie z powszechnie przyjętą konwencją w formie tekstu oraz zilustrowane 178 nienagannie wykonanymi rycinami, 59 tabelami i 27 fotografiami.

W mojej ocenie to najważniejsze osiągnięcie naukowe zaprezentowane w przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej.

Doktorantka na 170 stronach przedstawia sezony pyłkowe wybranych 9 taksonów drzew alergennych (*Corylus*, *Alnus*, *Betula*, *Quercus*, *Ulmus*, *Fraxinus*, *Populus*, *Salix*, *Acer*) w Kielcach w latach 2012-2017. Pani mgr Ewa Koprowska oddzielnie szczegółowo analizuje sezony pyłkowe dla poszczególnych badanych taksonów drzew alergennych. Autorka na bardzo dobrze wykonanych rycinach przedstawia między innymi porównanie sum rocznych stężeń maksymalnych ziaren pyłku w latach 2012-2017, porównanie dat początku i końca sezonów pyłkowych, a także porównanie dat maksymalnych stężeń pyłku i długości sezonu. Demonstruje ponadto na oddzielnych rycinach dynamikę stężenia pyłku w poszczególnych latach na tle zmian temperatury i prędkości wiatru oraz zmian wilgotności powietrza.

Zdaniem Doktorantki uzyskane wyniki z przeprowadzonych badań pokazują dużą zmienność, jeśli chodzi o czas występowania i przebieg poszczególnych sezonów pyłkowych w Kielcach. Opracowane na podstawie tych badań kalendarze pylenia oraz zaproponowane modele prognostyczne jednoznacznie wskazują na konieczność prowadzenia corocznego regionalnego monitoringu pyłkowego, przydatnego w diagnostyce i leczeniu alergii pyłkowej jak również w profilaktyce.

Moim zdaniem zastosowany przez Doktorantkę taki układ przedstawienia tak dużej ilości wyników jest przejrzysty i właściwy.

Chciałbym się odnieść w szczególny sposób do zamieszczonych w tym rozdziale mikrofotografii przygotowanych z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego TECNAI G2 SPIRIT-FEI Company, które dokumentują zmiany ultrastrukturalne ziaren pyłku badanych 9 taksonów drzew alergennych, ze szczególnym uwzględnieniem skomplikowanej

budowy ściany komórkowej. **Mikrofotografie obrazujące fragment ziarna pyłku badanych 9 taksonów drzew wykazujących działanie alergenne są znakomicie wykonane. Podobnie nie budzą zastrzeżeń zamieszczone fotografie (11.1-19.2) ziarna pyłku w technice mikroskopii świetlnej i w technice kontrastu Nomarskiego.**

Stosując te techniki Doktorantka wykazała, że ściana komórkowa ziaren pyłku analizowanych taksonów wykazuje budowę warstwową o silnie zróżnicowanej grubości warstw. Ściany komórkowe taksonów produkujących ziarna pyłku zawierające silnie uczulające alergeny (brzoza, olsza, leszczyna) charakteryzują się masywnym tektum, szeroką egzyną i bardzo cienką intyną. Z kolei w przypadku drzew, których pyłek wyzyskuje średnie lub słabe właściwości alergenne wykazano w ścianie komórkowej pyłku cienkie tektum i grubą, rozbudowaną intynę.

W tym miejscu chciałby podkreślić, iż porównanie średnich wartości tektum, egzyny i intyny ziaren pyłku badanych taksonów o właściwościach alergennych doskonale ilustruje rycina 13.1. zamieszczona w tym rozdziale na stronie 196.

Zdaniem Autorki stwierdzone znaczne zróżnicowanie ultrastrukturalne ziaren pyłku badanych taksonów, a zwłaszcza specyficznej budowy ściany komórkowej, może być związane z właściwościami alergennymi pyłku.

Dyskusja

Rozdział liczący 26 stron tekstu jest solidnym omówieniem uzyskanych wyników na tle współczesnych danych z literatury naukowej. Rozdział ten jest podsumowaniem wszystkich uzyskanych danych doświadczalnych i w sposób oczywisty odwołuje się do kwestii zamieszczonych w rozdziale Wyniki, uzupełniając je o dodatkową wnikliwą i szczegółową analizę. **W mojej opinii rozdział ten jest bardzo dobrze opracowany.** Z zamieszczonych pozycji piśmiennictwa cytowanego w rozdziale Dyskusja rozprawy doktorskiej Pani Ewy Koprowskiej aż 85,65 % stanowią pozycje z ostatnich dziesięciu lat (2010-2019 r.), w tym 35,68 % to pozycje z ostatnich czterech lat (2015-2019 r.), co niewątpliwie świadczy o tym, że analizowany problem bardzo interesuje wielu badaczy.

Mam kilka uwag i pytanie do zaproponowanego podziału pracy:

- I. Czym Doktorantka kierowała się wyszczególniając oddzielnie pierwsze trzy rozdziały pracy:
 1. Wstęp (obejmujący 4 strony),
 2. Patomechanizm i rodzaje alergii (5 stron),
 3. Alergeny (31 stron) ?

Uważam, iż powinien być jeden rozdział Wstęp, a Patomechanizm i rodzaje alergii oraz Alergeny winny stanowić jego podrozdziały. W takim ujęciu rozdział Wstęp liczyłby 40 stron i w odniesieniu do rozdziału Wyniki (170 stron) i Dyskusja (26 stron) proporcje byłyby właściwe.

II. Streszczenie w języku polskim i angielskim, w mojej ocenie, powinno znaleźć się na początku pracy tradycyjnie tuż przed Wstępem.

III. Wykaz używanych skrótów i symboli powinien być moim zdaniem umieszczony przed Wstępem, a nie na końcu pracy po Spisie fotografii.

Moje kolejne uwagi i pytania:

I. Str. 168 podrozdział 6.C.2 - w pierwszym zdaniu jest:

„W celu oceny budowy ultrastrukturalnej poszczególnych taksonów wykonano mikrofotografie 20.1-20.9 z wykorzystaniem (.....)”.

Skąd powyższe stwierdzenie skoro Autorka nie badała budowy ultrastrukturalnej taksonów ?

II. Fotografie 11.1-19.2 powinny zostać zamieszczone bezpośrednio po podrozdziale 6.C.1. Budowa morfologiczna ziarna pyłku wybranych drzew, a nie oddzielone od niego podrozdziałem 6.C.2. Budowa ultrastrukturalna ziarna pyłku wybranych drzew. Wówczas zbędny byłby opis nad fotografią 11.1. na str.169 wskazujący na podrozdział 6.C.1. Mikrofotografie 20.1-20.9 również należało zamieścić tuż po podrozdziale 6.C.2. W takim przypadku nad mikrofotografią 20.1. na stronie 178 niepotrzebne byłoby zamieszczenie opisu dotyczącego podrozdziału 6.C.2.

III. Str.196. Rycina 13.1. Porównanie średnich wartości tectum, egzyny i intyny ziaren pyłku badanych taksonów o właściwościach alergennych (wartości podane w μm). W opisie ryciny wskazano „tectum”, natomiast w legendzie do tej ryciny jest „tektum”.

Chcę zaznaczyć, iż powyższe uwagi wyszczególnione z obowiązku recenzenta w niczym nie umniejszają wartości tej pracy.

Rozprawę doktorską Pani mgr Ewy Koprowskiej oceniam bardzo wysoko ze względu na ważny i aktualny problem podjęty w badaniach, użyte metody i różnorodność zastosowanych analiz, a także nakład pracy i oryginalność wyników. Podkreślenia wymaga fakt, iż prezentowane w niniejszej pracy badania dotyczące sezonów pyłkowych 9 taksonów drzew alergennych (Corylus, Alnus, Betula, Quercus, Ulmus, Fraxinus, Populus, Salix, Acer) w Kielcach w latach 2012-2017, zostały przeprowadzone po raz pierwszy w tym regionie i mają charakter nowatorski.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dowodzi dużej dojrzałości naukowej i ogromnej pracowitości Doktorantki, a także Jej umiejętności planowania i wykonywania doświadczeń oraz opracowywania i interpretacji wyników.

Stwierdzam, że przedłożona do oceny praca doktorska spełnia wszystkie ustawowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Wobec powyższego zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Ewy Koprowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.



dr hab. Waldemar Szaroma