

Prof. dr hab. Kinga Wieczorek,
Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego
Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

OCENA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Magdaleny Gonet

**pt. „Ocena stabilności, podatności na proteolizę oraz efektu
enteropatogennego enterotoksyn SEC i SEL *Staphylococcus aureus* oraz
Staphylococcus epidermidis”**

**przygotowanej w Katedrze Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Jacka Bani oraz promotora pomocniczego
dr inż. Justyny Schubert**

Podstawę prawną do wykonania recenzji rozprawy doktorskiej stanowi uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 24 stycznia 2023 r.

Gronkowcowe zatrucia pokarmowe należą do najczęstszych chorób przenoszonych przez żywność. Zachorowania u ludzi kojarzone są zwykle ze *Staphylococcus aureus*, którego chorobotwórczość opiera się głównie na zdolności do produkcji szeregu toksyn. W ostatnich latach, ze względu na postęp w biologii molekularnej, zidentyfikowano szereg typów tych białek, jednak jedynie enterotoksyny, dla których wykazano potencjał wymiotny u małą określane są jako właściwe. Gronkowce zdolne do wytwarzania enterotoksyn stanowią poważny problem zdrowia publicznego ze względu na to, że procesy stosowane przy przetwarzaniu żywności nie dezaktywują ich toksyn. Należy także dodać, że niektórzy badacze sugerują, że enterotoksyny gronkowcowe mogą odgrywać znaczącą rolę w wywoływaniu nie tylko chorób układu pokarmowego u człowieka, ale także są kojarzone z układem oddechowym oraz rozwojem objawów autoimmunologicznych. Przez lata uważano, że tylko koagulazododatnie szczepy *Staphylococcus aureus* mają zdolność produkcji enterotoksyn, a

1. 1

jednocześnie uznawano gronkowce nie wytwarzające koagulazy za niepatogenne dla człowieka. Jednak istnieje coraz więcej doniesień, że niektóre gronkowce koagulazoujemne mogą produkować enterotoksyny, a tym samym uczestniczyć w wywoływaniu zakażeń u ludzi.

Ze względu na powyższe aspekty, temat badań podjętych przez Doktorantkę jest w pełni uzasadniony i bardzo dobrze wpisuje się w aktualne problemy naukowe. Ponadto, biorąc pod uwagę ograniczony zakres dostępnych badań z tego zakresu, praca ma istotny charakter nowatorski i duże walory poznawcze.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się ze wszystkich niezbędnych w tego typu opracowaniach elementów. Doktorantka umieściła w niej 7 rozdziałów, w tym wstęp, materiał i metody, wyniki oraz dyskusję i wnioski, a także wykaz skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Łącznie praca liczy 70 stron maszynopisu, 24 ryciny, a także 8 tabel. Układ rozprawy jest logiczny i bardzo przejrzysty, a jej tytuł w pełni odzwierciedla treści zawarte w pracy doktorskiej.

We wstępie Doktorantka w sposób syntetyczny dokonała wprowadzenia w tematykę prowadzonych badań. Opisała ona cechy bakterii należących do rodzaju *Staphylococcus*, z uwzględnieniem gatunków chorobotwórczych. Ważnym elementem tego rozdziału jest przedstawienie obecnego stanu wiedzy w zakresie enterotoksyn wytwarzanych zarówno przez gronkowce koagulazododatnie jak i szczególnie koagulazoujemne, które są głównym tematem rozprawy doktorskiej. Ponadto, w końcowej części wstępu Doktorantka scharakteryzowała wrażliwość enterotoksyn na temperaturę oraz działanie enzymów proteolitycznych. Omawiane zagadnienia poparte są prawidłowo dobranym piśmiennictwem. Wstęp rozprawy doktorskiej wskazuje na dobrą znajomość przez Doktorantkę poruszanych zagadnień i uzasadnia podjęcie opisanych w dalszej części pracy badań. Jednak myślę, że zyskałby on na wartości gdyby oparto go na obszerniejszej literaturze, zwłaszcza z uwzględnieniem najnowszych pozycji. Należy jednak podkreślić fakt, że podjęte przez lek. wet. Magdalenę Gonet badania mają charakter pionierski ze względu na wybór grupy gronkowców koagulazoujemnych oraz produkowanych przez nie enterotoksyn.

W kolejnej części pracy Doktorantka zaprezentowała cel podjętych badań, a jego realizację podzieliła na cztery logicznie zaplanowane etapy. W swoich badaniach lek. wet. Magdalena Gonet podjęła się charakterystyki dwóch typów enterotoksyn SEC i SEL wytwarzanych przez *S. epidermidis*. Podatność na proteolizę, wrażliwość termiczną i chemiczną tych białek zaplanowała porównać z ich ortologami wytwarzanymi przez *S. aureus*. Dodatkowo Doktorantka zamierzała poddać ocenie właściwości enteropatogenne toksyn

wykorzystując do tego celu model myśli. Zarówno cel podjętych badań jaki i plan jego realizacji są spójne i przemyślane. Jednak, zdaniem recenzentki, w rozdziale cel pracy zbędne jest wprowadzenie, w tym uzasadnienie wyboru typów enterotoksyn gronkowcowych, gdyż są to treści zawarte już we wstępie.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka szczegółowo opisała zastosowane w badaniach szczepy bakteryjne, ale także użyte podłoża mikrobiologiczne, zestawy analityczne, odczynniki oraz aparaturę i oprogramowanie. Niezbyt jasny jest dla mnie podrozdział 3.1.3. Białka rekombinowane, a szczególnie fragment „wytworzono w laboratoryjnych szczepach *Escherichia coli* zgodnie z informacjami zawartymi w punkcie 3.1.1.”. Może należało by to raczej odnieść do rozdziału 3.2.1 gdzie opisano wytwarzanie rekombinowanych enterotoksyn SEC i SEL *S. aureus* i *S. epidermidis*. W tej części rozprawy doktorskiej zawarto także informacje odnośnie wykorzystanego szczepu myszy oraz zgody Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. W drugiej części rozdziału „Materiały i metody” Doktorantka scharakteryzowała stosowane w pracy metody badawcze. Znalazł się tu opis wspomnianego już wyżej wytwarzania enterotoksyn gronkowcowych, ich proteolizy z zastosowaniem pepsyny i trypsyny oraz sposób określenia stabilności chemicznej oraz termicznej enterotoksyn SEC i SEL *S. aureus* i *S. epidermidis*. W rozdziale tym lek. wet. Magdalena Gonet umieściła także szczegółowy protokół doświadczenia na zwierzętach, którego celem była ocena działania enteropatogennego badanych enterotoksyn, wytwarzanych zarówno przez gronkowce koagulazododatnie jak i koagulazoujemne. Określono w tym miejscu sposób przeprowadzenia badania histopatologicznego jelit myszy oraz analizy morfometrycznej. Na zakończenie Doktorantka przedstawiła metody statystycznej analizy uzyskanych wyników. Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej mogę stwierdzić, że została ona opracowana starannie i zawiera wszelkie niezbędne informacje związane z wykonaniem badań.

Najobszerniejszą część dysertacji stanowi rozdział „Wyniki”, gdzie na 22 stronach Doktorantka przedstawiła rezultaty swoich badań. W pierwszej części zaprezentowała wyniki porównania wybranych właściwości enterotoksyn SEL i SEC wytwarzanych przez *S. epidermidis* oraz *S. aureus*. Jedną z nich było określenie wrażliwości enterotoksyn na trypsynę i pepsynę, przy czym ten ostatni enzym trawienny badano przy dwóch poziomach pH. Doktorantka odnotowała m.in. istotne statystycznie różnice w czasie półtrwania enterotoksyn SEC oraz SEL w roztworze pepsyny w pH 2,0 oraz pH 4,0. Ponadto zaobserwowała, że były one znacząco dłuższe przy wyższym poziomie pH. W odniesieniu do trawienia enterotoksyn trypsyną również stwierdziła istotną różnicę w czasie półtrwania typów SEC oraz SEL. Wyniki

te Doktorantka zaprezentowała w postaci zdjęć analiz elektroforetycznych w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących oraz w postaci graficznej, a także podsumowała je w tabeli.

Kolejnym etapem prowadzonych badań było określenie stabilności termicznej i chemicznej enterotoksyn. W pierwszej kolejności Doktorantka określiła udział II-rzędowych struktur białkowych dla SEC i SEL *S. epidermidis* i *S. aureus* w celu zidentyfikowania znaczenia różnic w sekwencjach poszczególnych enterotoksyn na zmiany w konformacji tych białek. Następnie lek. wet. Magdalena Gonet wykonała badania stabilności termicznej enterotoksyn gronkowcowych z użyciem spektroskopii dichroizmu kołowego. W dalszej kolejności Doktorantka określiła stabilność termodynamiczną enterotoksyn badając działanie czynnika wywołującego denaturację chemiczną białek. Jej efekt mierzono dwoma metodami, w tym z użyciem spektrofotometrii. Wyniki tej części badań Doktorantka zaprezentowała w postaci rycin przedstawiających znormalizowane krzywe denaturacji termicznej i chemicznej enterotoksyn oraz podsumowała je wraz z oceną statystyczną w tabeli.

W drugiej części rozdziału „Wyniki” lek. wet. Magdalena Gonet zaprezentowała rezultaty doświadczenia na zwierzętach, którego głównym celem było zbadanie biologicznej aktywności enterotoksyn. Przedstawiła ona kolejno ich wpływ na podstawowe parametry fizjologiczne myszy, a następnie czynniki morfometryczne dwunastnicy, jelita czczego oraz jelita krętego po 4, 24 i 48 godzinach od podania SEC i SEL. W doświadczeniu nie uwzględniono typu SEC_{bov}, nie znalazłam w dysertacji wyjaśnienia takiego postępowania. W odniesieniu do ogólnej kondycji myszy, którym podano enterotoksyny lek. wet. Magdalena Gonet rejestrowała takie parametry jak masa ciała zwierzęcia i wydalanego przez nie kału oraz spożycie paszy i wody. Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała, m.in. że po 48 h od podania SEL_{epi} wystąpiła znacząca utrata masy ciała myszy, zaobserwowano także zmniejszone spożycie paszy w przypadku podania SEC₃. W dalszych podrozdziałach Doktorantka szczegółowo opisała zmiany wybranych parametrów morfotycznych w czasie po podaniu poszczególnych enterotoksyn. Obserwacje poparte są zdjęciami wycinków dwunastnicy, jelita cienkiego i krętego z zaznaczonymi zmianami w morfologii tkanek. Ponadto, graficznie zaprezentowała zmiany w tkankach określając wysokość kosmków jelitowych, głębokość krypt, oraz liczbę komórek kubkowych. Najwięcej nieprawidłowości pojawiło się po 48 godzinach od podania enterotoksyn. W przypadku SEC₃ odnotowano m.in. obrzęk kosmków jelitowych w dwunastnicy oraz ubytek kosmków jelitowych w jelicie czczym. Podanie SEC_{epi} również wywołało szereg zmian morfotycznych w poszczególnych odcinkach

jelita. Doktorantka odnotowała w jelicie czczym uszkodzenia nabłonka w wierzchołkowych częściach kosmków oraz istotne zmniejszenie ich długości. Natomiast w jelicie krętym po podaniu SEC_{epi} zaobserwowano obrzęk warstwy podśluzówkowej. Podobne uszkodzenie jelita krętego odnotowano po podaniu myszom enterotoksyn SEL wytwarzanej zarówno przez *S. aureus* i *S. epidermidis* w ciągu 24 godzin. Z kolei po 48 godzinach Doktorantka zaobserwowała m.in. w jelicie czczym wzrost liczby komórek kubkowych. W mojej opinii, w tej części rozdziału „Wyniki” zabrakło zestawienia wszystkich najważniejszych zmian morfotycznych w jelicie z uwzględnieniem typów enterotoksyn oraz czasu ich podania. Tego typu podsumowanie, na przykład w formie tabelarycznej, znacząco ułatwiłoby przegląd uzyskanych wyników. Podsumowując, rozdział ten jest napisany poprawnie, wyniki są dobrze udokumentowane i poddane analizie statystycznej, co świadczy o rzetelnych umiejętnościach badawczych lek. wet. Magdaleny Gonet.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka dokonała wnikliwej, a jednocześnie syntetycznej interpretacji uzyskanych wyników. Zostały one również prawidłowo powiązane z rezultatami badań innych autorów. Na podstawie uzyskanych wyników własnych lek. wet. Magdalena Gonet stwierdziła, że względu m.in. na swoją stabilność enterotoksyny SEC i SEL wytwarzane przez *S. epidermidis* mogą stanowić zagrożenie dla konsumentów podobnie jak toksyny wytwarzane przez gronkowce koagulazododatnie. W tej części dysertacji Doktorantka omówiła także wyniki doświadczenia na zwierzętach. Jego głównym celem było określenie zmian morfologicznych w jelitach myszy po podaniu wybranych typów enterotoksyn wytwarzanych przez *S. aureus* oraz *S. epidermidis*. Szczególnie jest to istotne z uwagi na fakt, że wpływ tych toksyn wytwarzanych przez gronkowce koagulazoujemne na zmiany histopatologiczne w jelitach jest do tej pory bardzo mało poznany. Z tego też względu, dane literaturowe, z którymi mogłaby skonfrontować swoje wyniki Doktorantka były ograniczone. Z przeprowadzonych przez lek. wet. Magdalenę Gonet doświadczeń wynika, że badane enterotoksyny wytwarzane przez *S. epidermidis* wywołują podobne zmiany jak te produkowane przez *S. aureus*. Ogólnie, najwięcej i najsilniejsze efekty działania enterotoksyn zaobserwowano w dwunastnicy i jelicie czczym, w najmniejszym zaś stopniu dotknęły one okrężnicę. Doktorantka zaobserwowała różnice w działaniu poszczególnych enterotoksyn jeśli chodzi o czas od ich podania do wywołania zmian patologicznych oraz rodzaju efektu jakie wywoływały.

Przedstawione przez Doktorantkę wnioski końcowe korespondują z celem pracy i świadczą o umiejętności prawidłowej analizy wyników przeprowadzanych badań. Ponadto,

należy dodać, że pozostałe części rozprawy doktorskiej, takie jak streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz literatury zostały przygotowane starannie i rzetelnie.

Podsumowując, należy odnotować, że badania wykonane w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej zostały zaplanowane w sposób przemyślany i konsekwentnie zrealizowane. Doktorantka zastosowała właściwe metody badawcze, a praca ma duże walory poznawcze. Ponadto należy stwierdzić, że lek. wet. Magdalena Gonet wykazała się dobrą znajomością tematyki oraz umiejętnościami w analizie uzyskanych wyników. Zgłoszone we wcześniejszej części recenzji uwagi krytyczne nie mają zasadniczego wpływu na ogólną dobrą ocenę pracy.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani lek. wet. Magdaleny Gonet pt. „**Ocena stabilności, podatności na proteolizę oraz efektu enteropatogennego enterotoksyn SEC i SEL *Staphylococcus aureus* oraz *Staphylococcus epidermidis***” odpowiada warunkom określonym w artykule 13 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, wraz późniejszymi zmianami) i przekazuję Wysokiej Radzie Wydziału Dyscypliny Weterynaria UP we Wrocławiu wnioski o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Puławy, 15.03.2023.



prof. dr hab. Kinga Wieczorek,