



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

dr hab. Ewa Dworniczek
Katedra i Zakład Mikrobiologii
Wydział Lekarski

Wrocław 15.03.2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Magdaleny Gonet, pt.: "Ocena stabilności, podatności na proteolizę oraz efektu enteropatogennego enterotoksyn SEC i SEL *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*"**, wykonanej pod kierunkiem naukowym promotora prof. dr hab. Jacka Bani oraz promotora pomocniczego dr inż. Justyny Schubert, w Katedrze Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Podstawę formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej lek. wet. Magdaleny Gonet stanowi pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria, prof. dr hab. Wojciecha Nizańskiego, z dnia 24 stycznia 2023 r, zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Choroby przenoszone przez żywność (*foodborne diseases*) są uznawane za jeden z głównych problemów zdrowia publicznego na całym świecie, w tym również w krajach rozwiniętych. Są one ważną przyczyną zachorowalności i umieralności, a tym samym wpływają na ograniczenia w światowym rozwoju społeczno-gospodarczym.

Szeroki wachlarz drobnoustrojów chorobotwórczych, które mogą zanieczyszczać żywność, sprzyja rozwojowi wielu stanów patologicznych w organizmie człowieka. Gronkowcowe zatrucia pokarmowe powodowane przez enterotoksyny, są jednymi z najczęstszych chorób przewodu pokarmowego na świecie. Jednak proces chorobowy trwa krótko, a skutkiem tego jest często brak identyfikacji czynników etiologicznych, a co za tym idzie brak wystarczających badań i publikacji w tym zakresie. Temat rozprawy doktorskiej dotyczący analizy porównawczej wybranych właściwości enterotoksyn SEC i SEL wytwarzanych przez gronkowce koagulazododatnie i koagulazoujemne, uważam za istotny i uzasadniony. Badania te należy uznać za kolejny krok w kierunku poszerzenia naszej wiedzy w obszarze zagrożeń dla bezpieczeństwa żywności i uwypuklenia znaczenia enterotoksyn bakterii z gatunku *Staphylococcus epidermidis*.

Przedstawiona praca zawarta jest na 70 stronach maszynopisu, a klasyczna konstrukcja zawiera typowy dla rozpraw doktorskich układ, który obejmuje: wstęp (9 stron), cel pracy (2 strony), materiały i metody (9 stron), wyniki (25 stron), dyskusję (7 stron), wnioski (1 strona) i wykaz literatury (7 stron). Tekst nie zawiera istotnych usterek językowo-stylistycznych, interpunkcyjnych czy ortograficznych.

W spisie literatury Autorka zebrała 68 pozycji, od roku 1959 do roku 2022, z których ok. 42% to publikacje z ostatnich 10 lat. Nieliczne piśmiennictwo, jak mogę się domyślać,

wynika z ograniczonej liczby publikacji z tego zakresu. Dla wzbogacenia treści Autorka zastosowała 24 ryciny i 8 tabel, których nie znajdziemy niestety w żadnym spisie. Wstęp poprzedzony jest bardzo przydatnym wykazem skrótów stosowanych w rozprawie i ich rozwinięć w językach polskim i angielskim.

Wstęp ocenianej pracy doktorskiej to staranne wprowadzenie do podjętego tematu badań. Znalazły się w nim, w pierwszej kolejności, ogólna charakterystyka bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, zagadnienia dotyczące występowania i nosicielstwa tych drobnoustrojów, ich fizjologii i podziału taksonomicznego. W dalszej kolejności, Autorka opisała chorobotwórczość gronkowców, w oparciu o dane literaturowe z okresu 2001-2019. Moją uwagę zwrócił akcent w końcowej części podrozdziału dotyczący biofilmu tworzonego przez gronkowce koagulazoujemne. Uważam, że tę część należało przedstawić w sposób bardziej obszerny zważywszy na fakt częstego udziału tych bakterii w zakażeniach powodowanych przez biofilm i bogatej literatury światowej w tym temacie. W przypadku *S. aureus* jak wykazano, enterotoksyny mają istotny udział we wzroście i rozwoju biofilmu, a konsekwencją tego zjawiska jest zwiększona oporność szczepów na leki i problemy terapeutyczne. Jednocześnie zwracam uwagę iż właściwość tworzenia biofilmu nie jest unikatową cechą tej grupy gronkowców gdyż posiada ją większość, o ile nie wszystkie bakterie.

W kolejnym podrozdziale zostały scharakteryzowane enterotoksyny *S. aureus*, patomechanizm ich działania oraz rola enterotoksyn jako superantygenów. Przedstawiono również aktualną wiedzę na temat enterotoksyn wytwarzanych przez gronkowce koagulazoujemne, *S. epidermidis*. W tym miejscu Doktorantka krytycznie odniosła się do sfery metodycznej licznych badań opublikowanych przez innych autorów ale też wskazała na prace, które w sposób przekonujący dostarczyły dowodów na istnienie genów enterotoksyn *sec_{epi}* i *sel_{epi}*, ortologów genów enterotoksyn *sec* i *sel* gronkowca złocistego. Znalazły się tu także informacje pochodzące z okresu 2011-2018, a dotyczące niskiej częstości występowania enterotoksycznych szczepów gatunku *S. epidermidis* izolowanych z żywności i materiałów klinicznych.

Na zakończenie został poruszony temat stabilności termicznej i wrażliwości enterotoksyn gronkowcowych na działanie enzymów proteolitycznych, co stanowiło odpowiednie wprowadzenie do jednego z tematów realizowanych badań własnych. Kończąc ocenę tego rozdziału chcę dodać iż Autorka, która nie jest mikrobiologiem, dobrze opanowała i precyzyjnie posługuje się prawidłową terminologią z zakresu mikrobiologii medycznej.

Postawiony **Cel** badań jest jasny i zgodny z wprowadzeniem do rozprawy doktorskiej. Dotyczy on porównania właściwości takich jak podatność na proteolizę, stabilność termiczna i chemiczna oraz właściwości enteropatogenne enterotoksyny SEC_{epi} *S. epidermidis*, z najbliższymi i odległymi pod względem podobieństwa sekwencji ortologami *S. aureus*, odpowiednio SEC₃ i SEC_{bov.}. Podobny cel sformułowano w odniesieniu do enterotoksyn SEL_{epi} *S. epidermidis* i SEL wytwarzanej przez *S. aureus*.

W rozdziale **Materiały**, Doktorantka w standardowy sposób scharakteryzowała wykorzystane w pracy drobnoustroje, podłoża mikrobiologiczne, białka rekombinowane i zwierzęta laboratoryjne. Badania wykonano z użyciem dwóch szczepów *S. aureus* i jednego szczepu *S. epidermidis*, zdolnych do wytwarzania ortologicznych enterotoksyn SEC i SEL. Natomiast zabrakło w tym miejscu podobnego, bardziej szczegółowego opisu laboratoryjnego szczepu *Escherichia coli*, który pojawia się w dalszej części pracy i w którym wytworzono rekombinowane enterotoksyny *S. epidermidis* i ortologiczne toksyny *S. aureus*. Informacje dotyczące zastosowanych odczynników i aparatury badawczej zostały zebrane w

przejrzystych tabelach. Do analizy danych, w tym analizy statystycznej, wykorzystano siedem programów opisanych również w tabeli. Autorka uzyskała wszystkie wymagane zgody na badania przeprowadzone na zwierzętach, zgodnie z dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady UE.

W części doświadczalnej zastosowano szereg nowoczesnych **Metod** badawczych. Rekombinowane enterotoksyny SEC_{epi} i dwa warianty ortologicznych enterotoksyn *S. aureus* - SEC₃ i SEC_{bov}, a także SEL_{epi} i SEL *S. aureus* wytworzono w szczepie *Escherichia coli*. Tak przygotowane enterotoksyny były badane pod kątem ich podatności na działanie trypsyny i pepsyny w procesie ograniczonej proteolizy. Oceniono również ich stabilność termiczną i stopień denaturacji chemicznej białka, za pomocą odpowiednio spektroskopii dichroizmu kołowego oraz spektropolarymetru i spektrofluorymetru.

Działanie cytotoksyczne SEC i SEL obu gatunków bakterii było analizowane po dożołądkowym podaniu enterotoksyn samicom myszy domowej. Wykorzystano łącznie 105 zwierząt podzielonych na grupę kontrolną i cztery grupy traktowane toksynami. Eksperymenty były prowadzone w trzech przedziałach czasowym, po których pobierano przewód pokarmowy do badań histopatologicznych i dodatkowo oceniano cechy zatrucia. Badania histopatologiczne wykonano analizując skrawki tkanek dwunastnicy, jelita czczego i jelita krętego, w mikroskopie świetlnym. Dodatkowo, dla każdego zwierzęcia zmierzono wysokość kosmków jelitowych, głębokość krypt i liczbę komórek kubkowych w kosmkach.

Złożony warsztat pracy laboratoryjnej i rodzaje przeprowadzonych analiz świadczą, moim zdaniem, o dużej dojrzałości badawczej lek. wet. Magdaleny Gonet.

Wyniki badań zostały przedstawione szczegółowo i dają szeroki wgląd w tematykę właściwości enterotoksyn SEC i SEL *S. aureus* i *S. epidermidis* i ich wpływu na morfologię tkanki przewodu pokarmowego. Na 25 stronach tego rozdziału zamieszczono dodatkowo 24 ryciny, które demonstrują wyniki analizy elektroforetycznej enterotoksyn, zbiorcze wykresy i tabele oraz fotografie z analizy histopatologicznej. Podkreślenia wymaga fakt, że dokumentacja uzyskanych wyników jest przedstawiona bardzo starannie, z dbałością o szczegóły. Każda rycina opatrzona jest dokładnym i wyczerpującym opisem. Wraz z tekstem tworzą one spójną i logiczną całość o wartości zarówno merytorycznej jak i estetycznej.

Autorka postawiła sobie za cel zbadanie dużej liczby parametrów i konsekwentnie opisała je w tym rozdziale. Chcę zwrócić uwagę na część dotyczącą wpływu dożołądkowego podania enterotoksyn zwierzętom laboratoryjnym. Zgromadzono tutaj ponownie, dużą liczbę wyników, które opisano i zilustrowano w 7 podrozdziałach, w postaci:

- a) fotografii skrawków przewodu pokarmowego ilustrujących zmiany w morfologii tkanki;
- b) wykresów ze średnimi wartościami parametrów uszkodzenia tkanki.

Jednak w tej części wyraźnie zabrakło dobrego podsumowania i zestawienia wyników. Moim zdaniem, w celu przystępnego zobrazowania różnic i podobieństw ocenianych parametrów morfometrycznych, należało sporządzić czytelną tabelę z porównywanymi parametrami.

W obszernej **Dyskusji** Doktorantka przeprowadziła analizy uzyskanych wyników i porównała je z danymi z piśmiennictwa, w sposób nie budzący zastrzeżeń. W przypadku enteropatogennego działania toksyn gronkowca koagulazoujemnego, z powodu braku jak się domyślam odpowiednich danych literaturowych, dyskusja została ograniczona do rozpatrzenia własnych wyników.

Na podstawie analizy wyników i dyskusji Autorka wyciągnęła 6 następujących **Wniosków**:

- 1) enterotoksyny SEC_{epi} i SEL_{epi}, wytwarzane przez *S. epidermidis*, ze względu na niską podatność na proteolizę mogą przetrwać w przewodzie pokarmowym człowieka;
- 2) enterotoksyny SEC_{epi} i SEL_{epi}, są wysoce termostabilne więc mogą przetrwać termiczną obróbkę żywności;
- 3) enterotoksyny SEC mogą być większym zagrożeniem niż enterotoksyny SEL w przetworzonej termicznie żywności bowiem tracą swoją konformację natywną w wyższych temperaturach;
- 4) enterotoksyny SEC charakteryzują się niską, a enterotoksyny SEL wysoką kooperatywnością denaturacji chemicznej, co przekłada się na odmienną szybkość odzyskiwania przez nie konformacji natywnej i może wpływać na ich zróżnicowaną aktywność biologiczną;
- 5) badane enterotoksyny *S. epidermidis* mogą wywołać zmiany enteropatogenne w obrębie przewodu pokarmowego podobne do tych, wywoływanych przez *S. aureus*;
- 6) enterotoksyny *S. epidermidis* i *S. aureus* stanowią porównywalne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności.

Na koniec warto podkreślić, że wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę uzyskały już pozytywne recenzje i ukazały się w formie dwóch publikacji w czasopismach *Microbiology Research* i *Foodborne Pathogens and Disease*:

- A. Tabiś, **M. Gonet**, J. Schubert, A. Miązek, M. Nowak, A. Tomaszek, J. Bania. Analysis of enterotoxigenic effect of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* enterotoxins C and L on mice. *Microbiol. Res.* 2022, 258, 126979. DOI:10.1016/j.micres.2022.126979.
- **M. Gonet**, D. Krowarsch, J. Schubert, A. Tabiś, J. Bania. Stability and resistance to proteolysis of enterotoxins SEC and SEL produced by *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog. Dis.* 2023, 20, 32-37. DOI: 10.1089/fpd.2022.0059.

Recenzowaną pracę doktorską oceniam pozytywnie. Uważam, że stanowi ona wartościowe osiągnięcie naukowe o ważnych walorach praktycznych bowiem, jak podkreśla sama Autorka, „enteropatogenne właściwości enterotoksyn gronkowców koagulazoujemnych są praktycznie nieznanne”. Wyniki przeprowadzonych badań wyraźnie wskazują na wagę problemu jakim może być zagrożenie związane z żywnością zanieczyszczoną enterotoksycznymi szczepami *Staphylococcus epidermidis*. Chcę zwrócić uwagę, że tego typu prace badawcze są wciąż bardzo pożądane gdyż kształtują one wiedzę na temat podstaw chorobotwórczości i znaczenia drobnoustrojów oportunistycznych w patologii człowieka. Wiedza ta powinna przyczynić się do stworzenia nowych lub modyfikacji już istniejących procedur, które dotyczą kontroli bezpieczeństwa żywności.

Formułując ostateczny wniosek stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Magdaleny Gonet spełnia warunki określone w art.13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) i przedkładałam Radzie Dyscypliny Weterynaria, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. wet. Magdaleny Gonet do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Ewa Dworniczek