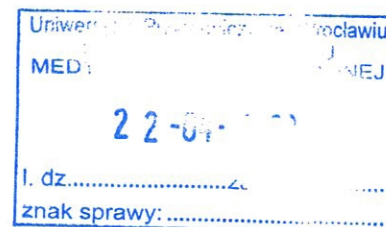


Katedra i Zakład Mikrobiologii  
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu  
Wyb. Ludwika Pasteura 1  
50-367 Wrocław



Prof. dr hab. Beata Sobieszczńska  
Katedra i Zakład Mikrobiologii  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
e-mail: [beata.sobieszczanska@umw.edu.pl](mailto:beata.sobieszczanska@umw.edu.pl)

Wrocław, 2022-04-20

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani lek. wet. Agaty Mikołajczyk-Martinez na temat:  
„Rola fimbrii typu 1 w adhezji i inwazji oraz przeżywalności i cytotoksyczności pałeczek  
*Salmonella Gallinarum* i *Salmonella Enteritidis* wobec kurzych linii komórkowych”**

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Ugorskiego w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Formalna podstawą przygotowania recenzji było pismo od Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, prof. dr hab. Wojciecha Niżańskiego. Merytoryczną podstawą przygotowania recenzji była przedstawiona mi dysertacja doktorska Pani lek. wet. Agaty Mikołajczyk-Martinez.

**Zasadność podjęcia tematu dysertacji**

Tematem rozprawy doktorskiej była ocena wpływu powszechnej wśród pałeczek jelitowych z rodziny *Enterobacteriaceae* adhezyny, tj. fimbrii typu 1 (T1F) na interakcje pałeczek *Salmonella* z komórkami gospodarza. Fimbrie T1F zostały na przestrzeni ostatnich 50 lat dość dokładnie scharakteryzowane pod względem strukturalnym i funkcjonalnym. Tym nie mniej, choć rola T1F w adhezji i inwazji pałeczek jelitowych do komórek nabłonka gospodarza jest dobrze poznana, udział tych adhezyn w patomechanizmie zakażeń wywoływanych przez różne gatunki *Salmonella* nadal nie jest satysfakcjonujący, o czym świadczą rozbieżne wyniki niektórych badań. Pałeczki *Salmonella* to duża grupa gatunków patogennych dla ludzi i zwierząt, różniących się zakresem gospodarzy oraz spektrum objawów klinicznych zakażenia. Zakażenia pałeczkami *Salmonella* są rozpowszechnione i częste na całym świecie, zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, przyczyniając się do znaczącej zachorowalności i śmiertelności. Wg raportu CDC każdego roku

pałeczki *Salmonella* powodują w USA ponad milion zakażeń u ludzi a ponad 400 osób umiera z ich powodu. W Europie w 2019 r. drobnoustroje te spowodowały prawie 90 tys. zakażeń wśród ludzi, w tym 140 przypadków śmiertelnych, stawiając te patogeny na drugim miejscu, po *Campylobacter*, pod względem częstości wywoływanych zakażeń. *Salmonella* jest także jednym z najczęstszych patogenów drobiu, który w 2019 r. spowodował epidemię u 2,34% stad drobiu w Europie. Dane te obrazują skalę problemu jakim są zakażenia *Salmonella*. Co więcej, wzrost poziomu higieny wśród ludzi oraz wystrzone normy hodowli drobiu nie przekładają się na spadek częstości zakażeń salmonellą. Wydaje się, że najlepszym sposobem redukcji zakażeń tym patogenem może być szczepionka dla zwierząt, zapobiegająca rozprzestrzenianiu się salmonelli wśród zwierząt. Szczepionki takie są obecnie testowane, jednak wyrafinowany patomechanizm zakażeń pałeczek *Salmonella* oraz ich zdolność do szybkiej zmiany ekspresji genów wirulencji i mutacji utrudnia opracowanie skutecznych preparatów. Szczegółowa znajomość patomechanizmu zakażeń wywoływanych przez salmonelle ma więc kluczowe znaczenie dla opracowania skutecznych szczepionek. Temat rozprawy doktorskiej Pani lek. wet. Agaty Mikołajczyk-Martinez stanowi więc cenny wkład naukowy w poznanie roli jednego z ważniejszych czynników wirulencji pałeczek *Salmonella*, które w przyszłości mogą stanowić antygen szczepionkowy.

### **Formalna charakterystyka rozprawy doktorskiej**

Rozprawa doktorska Pani lek. wet. Agaty Mikołajczyk-Martinez składa się ze 114 stron i obejmuje kolejno: streszczenie w języku polskim i angielskim, które poprzedza wykaz skrótów używanych w pracy, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, spis piśmiennictwa oraz materiały uzupełniające, prezentując format typowy dla dysertacji doktorskich.

Wstęp pracy, liczący 19 stron, obszernie charakteryzuje pałeczki z rodzaju *Salmonella*, ich czynniki wirulencji, zakażenia u zwierząt oraz patomechanizm tych zakażeń na podstawie bogatej literatury. Przegląd obszernego piśmiennictwa wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Pani Agaty Mikołajczyk-Martinez do podjętych badań doświadczalnych. Dwustronicowy Cel pracy wskazuje kierunek badań, podyktowany odmiennym przebiegiem klinicznym zakażeń wywoływanych przez gatunki *S. Gallinarum* oraz *S. Enteritidis* u drobiu. Cel pracy jest jasno sformułowany i zakłada badania roli fimbrii typu 1 wybranych gatunków *Salmonella* w zakażeniach u kur. Niepotrzebnie, moim zdaniem, Cel pracy poprzedza przydługie wprowadzenie, będące powtórzeniem wiadomości zawartych we Wstępie pracy. W rozdziale Materiały i Metody, Doktorantka prezentuje spis odczynników oraz ich źródło, skład buforów, gotowych zestawów odczynników oraz stosowanych podłoży hodowlanych, a także sekwencje oligonukleotydydowe zastosowane do analiz. Doktorantka sporządziła również dokładny spis

stosowanej aparatury oraz programów komputerowych do analizy wyników badań. Do badań zostały wybrane dwa serowary *Salmonella*, tj. *S. enterica* serowar Enteritidis oraz *S. enterica* serowar Gallinarum – oba izolowane z klinicznych przypadków salmonellozy oraz tyfusu kurzego u drobiu. Do badań interakcji szczepów *Salmonella* z komórkami gospodarza Doktorantka wybrała dwie linie komórkowe – linię nabłonka jelita kury (HD11) oraz linię monocytarno-makrofagową ptasiej białaczki, transformowaną wirusem MC29 (CHIC-8E11). W pracy Doktorantka wykorzystwała różnorodne metody badawcze m.in. techniki molekularne (PCR, sekwencjonowanie), cytometrię przepływową, fluorescencję oraz badania na liniach komórkowych (adhezja, inwazja, cytotoksyczność) i podstawowe metody hodowli drobnoustrojów. Zastosowane metody są opisane jasno i szczegółowo, pozwalając na odtworzenie doświadczeń, co zasługuje na uznanie. Metodologia badań jest właściwie dobrana i umożliwia realizację postawionych celów badawczych. Rozdział Wyniki kolejno opisuje uzyskane rezultaty przeprowadzonych badań wraz z ich interpretacją. Wyniki badań zostały udokumentowane 11 rycinami. Dodatkowo, praca zawiera Materiały Uzupełniające, prezentujące wyniki sekwencjonowania oraz wyniki badań cytometrii przepływowej. W Dyskusji Doktorantka skonfrontowała uzyskane wyniki badań z obecnym stanem wiedzy. Pracę wieńczy siedem wniosków oraz Spis Literatury.

### **Ocena merytoryczna pracy doktorskiej**

Praca Doktorantki skupiła się na jednym z ważniejszych czynników wirulencji jakim są fimbrie typu 1, dzielone na mannozo-wrażliwe MST1F i mannozo-oporne MRT1F. Dotychczas nie badano wpływu fimbrii T1F na interakcje pałeczek *Salmonella* z komórkami kurzymi, co wskazuje na nowatorski charakter podjętych badań. Dobór linii komórkowej swoistej dla danego gospodarza ma ogromny wpływ na poznanie patomechanizmu zakażenia.

W celu ustalenia roli badanych fimbrii w adhezji i inwazji pałeczek *Salmonella* do komórek gospodarza, Doktorantka uzyskała poprzez nokaut genu *fimH* izogenne mutanty delecyjne *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis*. Oba mutanty wykazały ponad dziesięciokrotnie obniżoną zdolność syntezy tych fimbrii, co zostało potwierdzone w pracy immunofluorescencją pośrednią z przeciwciałami przeciw białku *fimH* oraz metodą cytometrii przepływowej. Uzyskane mutanty nie różniły się od szczepów dzikich pod względem morfologii oraz szybkości proliferacji.

Następnie Doktorantka potwierdziła udział fimbrii MST1F w adhezji *S. Enteritidis* do komórek linii CHIC-8E11, wywodzącej się z nabłonka jelit kury oraz linii HD11 kurzych makrofagów-monocytów, wykazując pięciokrotnie niższą adhezję izogenego mutantu *S. Enteritidis* *fimH::kan*. Zdolność mannozy do hamowania adhezji dzikiego szczepu *S. Enteritidis* udowodniła mannozo-wrażliwy charakter adhezyn, biorących udział w przyleganiu do komórek gospodarza. Badania te wykazały ponadto, że delecja genu *fimH* nie wpływała zasadniczo na

stopień adhezji *S. Gallinarum* do obu linii komórkowych, wskazując na udział innych niż fimbrie MST1F adhezyn uczestniczących w wiązaniu z komórkami gospodarza. Ponadto, szczep ten cechowała adhezja znacząco niższa w porównaniu z *S. Enteritidis*, co jest zaskakującym wynikiem biorąc pod uwagę, że *S. Gallinarum* jest patogenem związanym swoiście z drobiem i przenosi się drogą pokarmową.

Podobne wyniki Doktorantka uzyskała w teście inwazji do stymulowanych i niestymulowanych komórek nabłonka jelita oraz makrofagów. Pałeczki *S. Enteritidis* wnikały do komórek obu linii w liczbie znacznie wyższej niż *S. Gallinarum*. Podobnie jak w przypadku adhezji, inwazja *S. Enteritidis* była hamowana mannozą, co może sugerować udział MST1F w procesie inwazji, choć niekoniecznie bezpośredni. Izogeniczny mutant *S. Enteritidis*, pozbawiony zdolności syntezy fimbrii typu 1, był znacząco gorzej internalizowany przez komórki kurze. Niższa liczba bakterii przylegających do komórek gospodarza koreluje z niższą liczbą bakterii internalizowanych przez komórki i prawdopodobnie tym była uwarunkowana wyższa inwazja *S. Enteritidis*. Badany szczep *S. Gallinarum* cechował się niższą inwazją do obu linii komórkowych, która nie była uwarunkowana obecnością fimbrii MST1F. Co ciekawe, pomimo tak znaczących różnic w stopniu adhezji i inwazji do kurzych komórek, oba badane szczepy *Salmonella*, niezależnie od obecności lub nieobecności fimbrii MST1F, wykazały podobną przeżywalność w makrofagach i komórkach nabłonka. Stymulacja komórek HD11 endotoksyną zwiększała przeżywalność obu szczepów *Salmonella* niemal 200-krotnie.

Interesujące wyniki badań Doktorantka uzyskała badając cytotoksyczność obu szczepów *Salmonella* oraz ich izogenicznych mutantów dla komórek nabłonka i makrofagów. Pałeczki *S. Gallinarum* niezależnie od zdolności bądź niezdolności syntezy fimbrii typu 1 nie były cytotoksyczne dla badanych komórek, w przeciwieństwie do szczepu *S. Enteritidis*, pomimo, że liczba bakterii przeżywających wewnątrzkomórkowo była zbliżona dla obu serowarów. Wyższą cytotoksyczność można tłumaczyć m.in. zwiększoną wewnątrzkomórkową replikacją bakterii, prowadzącą do zniszczenia komórki gospodarza – co jednak nie miało miejsca w przypadku analizowanych serowarów *Salmonella*. Doktorantka wyjaśniła to w jednym z wniosków. Badając wpływ zakażenia pałeczkami *Salmonella* komórek kurzych na aktywację kaspazy 1, 3 i 7, Doktorantka wykazała także, że *S. Enteritidis* uśmierca komórki gospodarza na drodze apoptozy i pyroptozy a fimbrie typu 1 nie odgrywają zasadniczej roli w tych procesach.

Podsumowując, Pani Agata Mikołajczyk-Martinez wykonała logiczny cykl eksperymentów, mających na celu wyjaśnienie roli fimbrii powszechnych typu 1 u serowarów *Salmonella* Enteritidis i *S. Gallinarum* w interakcji tych drobnoustrojów z komórkami linii kurzych. Doktorantka zrealizowała postawione cele badawcze, przeanalizowała uzyskane wyniki badań i wyciągnęła ważne z naukowego punktu widzenia wnioski.

Czytając dysertację doktorską Pani lek. wet. Agaty Mikołajczyk-Martinez nasunęło mi się kilka pytań, które chciałabym Jej zadać:

1. Czy pomiędzy fimbriami T1F *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum* istnieją różnice w sekwencji aminokwasowej białka FimH, które mogły wpłynąć na wynik?
2. Jak można interpretować niski poziom adhezji i inwazji do komórek nabłonka kury prezentowany przez *S. Gallinarum*, mając na uwadze fakt, że do zakażeń tych dochodzi głównie drogą pokarmową? Uzyskane wyniki badań skonfrontowała Pani z wynikami badań innych badaczy, ale nie wyjaśniła dlaczego tak się dzieje, ani nie podała prawdopodobnych czynników wpływających na tak niską adhezję i inwazję tego serowaru.
3. Tropizm bakterii jest podstawowym czynnikiem determinującym zakres organizmów żywicielskich, które mogą one zakażać. Czy niski poziom adhezji i inwazji *S. Gallinarum* mógł być spowodowany brakiem swoistych receptorów lub izoformami receptorów wiążących na komórkach obu linii zastosowanych do badań?
4. W jakim celu w pracy zastosowano stymulację makrofagów LPS i PMA?
5. Dlaczego stymulacja makrofagów linii HD11 zwiększała przeżywalność pałeczek *Salmonella*?

**Uwagi:**

- a) Brak odnośników piśmiennictwa przy opisywanych metodach
- b) Literówki
- c) Błędna numeracja rycin w rozdziale Wyniki
- d) Zangielszczony polski np. „infekowanie gospodarza” – lepiej i poprawniej brzmiałoby „zakażenie gospodarza”, „zakażenie drogą alimentarną” – w j. polskim mówimy o zakażeniu drogą pokarmową
- e) Bardzo długie zdania, co czasem czyni je niekiedy trudnymi do zrozumienia oraz stosowanie potocznego języka np. „stąd bierze się pytanie” – pytanie może się nasuwać.
- f) Linie komórkowe HeLa i HEP-2 (str. 32 wiersz 6; obie linie opisane jako nienabłonkowe) a tymczasem obie należą do linii nabłonkowych (HeLa wywodzi się z komórek nabłonka raka jajnika, natomiast HEP-2 z komórek nabłonka raka krtani), stąd stwierdzenie to jest niepoprawne – jak sądzę Doktorantce chodziło o linie nabłonkowe inne niż jelitowe.
- g) Brak opisu linii komórkowej w wykresach prezentujących wyniki przeżywalności i cytotoksyczności, związany z koniecznością ciągłego czytania opisu rycina, utrudnia analizę wyników.

## Podsumowanie oceny rozprawy doktorskiej i wniosek końcowy

W oparciu o przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską stwierdzam, że Pani lek. wet. Agata Mikołajczyk-Martinez umiejętnie zaplanowała i zrealizowała postawione cele badawcze oraz wyciągnęła poprawne wnioski z wykonanych badań. Autorka doskonale opanowała warsztat badawczy, od technik molekularnych po badania na hodowlach komórkowych, dając wyraz swojej umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Za najważniejsze osiągnięcie pracy uważam istotny wpływ jej wyników na poszerzenie wiedzy na temat patomechanizmu zakażeń pałeczkami *Salmonella* u drobiu. Stąd, pracę doktorską Pani Agaty Mikołajczyk-Martinez oceniam bardzo wysoko. Nieliczne uwagi dotyczące redakcji pracy nie mają żadnego wpływu na naukową wartość przedstawionej mi do recenzji pracy

Biorąc pod uwagę przedstawione powyżej argumenty stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani lek. wet. Agaty Mikołajczyk-Martinez pt. „Rola fimbrii typu 1 w adhezji i inwazji oraz przeżywalności i cytotoksyczności pałeczek *Salmonella Gallinarum* i *Salmonella Enteritidis* wobec kurzych linii komórkowych” napisanej pod kierunkiem naukowym promotora prof. dr hab. Ugorskiego, spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym, i wnoszę do Rady Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani lek. wet. Agaty Mikołajczyk-Martinez do publicznej dyskusji nad Jej rozprawą doktorską oraz o wyróżnienie Jej pracy.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII  
prof. dr hab. Beata Sobieszcańska