

18-09-2023

l. dz.....zał.....  
znak sprawy: .....

Prof. dr hab. Andrzej Koncicki  
Katedra Chorób Ptaków  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 06.09.2023 r.

## O C E N A

rozprawy doktorskiej **lek. wet. Aleksandry Tabiś** pt. „**Rola adhezyny FimH fimbrii Typu 1 *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* w zakażeniu heterofilii kury domowej**” wykonanej w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Ugorskiego i promotora pomocniczego dr hab. Krzysztofa Grzymajło, prof. UPWr

Podstawę formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej lek. wet. Aleksandry Tabiś stanowi pismo przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria, prof. dr hab. Wojciecha Nizańskiego (MDDD0000.400.2.2015) z dnia 4 lipca 2023 r., zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

W literaturze weterynaryjnej dotyczącej ptaków wyróżnia się zazwyczaj zakażenia wywołane dwoma swoistymi dla gospodarza serowarami – *Salmonella* (*S.*) Pullorum, jako czynnik etiologiczny pulorozu i *S. Gallinarum* wywołującą tyfus kur. Zakażenia drobiu tymi serowarami, pomimo że w dużej mierze zostały wyeliminowane z komercyjnych stad drobiu, w niektórych regionach chowu drobiu na świecie stanowią jeszcze przyczynę znacznych strat gospodarczych, zwłaszcza w stadach kur utrzymywanych systemem klatkowym oraz w małych przydomowych stadach drobiu.

Pozostałe, bardzo liczne orzęsione serotypy *S. enterica* wywołują paratyfusy. Są to ubikwitarne bakterie w środowisku i łatwo mogą być wprowadzone na fermy drobiarskie za pośrednictwem gryzoni, owadów, ptaków oraz przedmiotów. Mogą one zakażać wiele różnych gospodarzy, w tym bezkręgowce, zwierzęta dziko żyjące i domowe oraz ludzi. Zdolność serowarów *Salmonella* do zakażenia i przeżywania oraz namnażania w różnych gatunkach zwierząt zależy z jednej strony od czynników wirulencji wytwarzanych przez bakterie, z drugiej zaś od wrażliwości gospodarza na zakażenie. Chociaż zakażenia paratyfusowe drobiu są dość częste, rzadko powodują chorobę o ostrym przebiegu klinicznym, z wyjątkiem bardzo wrażliwych młodych ptaków narażonych na stres. Częściej infekcje paratyfusowe drobiu charakteryzują się bezobjawową kolonizacją przewodu pokarmowego i narządów wewnętrznych, co stanowi potencjalną przyczynę zanieczyszczenia tuszek. Niektóre serowary,

zwłaszcza *Salmonella* (*S.*) Enteritidis, są często izolowane z jaj składanych przez bezobjawowo zakażone nioski. Stąd należy podkreślić, że wysiłki podejmowane w celu kontrolowania i ograniczania zakażeń bakteriami z rodzaju *Salmonella* wśród drobiu domowego wynikają nie tyle z dążenia do znaczącego zwiększenia wydajności produkcji drobiarskiej, co z troski o zdrowie publiczne. Bakterie te są bowiem istotnym czynnikiem zoonotycznym jako przyczyna toksykoinfekcji pokarmowych u ludzi. Zakażenia pałeczkami *Salmonella* zalicza się do jednych z najczęstszych chorób ludzi przekazywanych drogą pokarmową, a zanieczyszczone tymi bakteriami mięso drobiowe i jaja stanowią podstawowe źródło zakażenia. Zakażeniu mogą ulegać również pracownicy obsługujący fermy drobiu zakażonego tymi bakteriami. Obecnie najczęściej zakażenia u ludzi wywołują *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*.

Z powyższego wynika, że salmonellozy stanowią dzisiaj duży problem epidemiologiczny zarówno w krajach rozwiniętych gospodarczo, o wysokich standardach higieny, jak i w krajach biednych, o niedostatecznej higienie. Wynika to z trudności w zwalczaniu zakażeń tymi bakteriami, na co składają się między innymi nie do końca poznane mechanizmy patogenez, jak i bardzo liczne źródła zakażenia oraz szerzenie zakażeń drogą transowarialną. Sprawia to, że na świecie obserwuje się gwałtowny wzrost liczby intoksykacji pokarmowych u ludzi wywołanych przede wszystkim pałeczkami *Salmonella* Enteritidis.

Obraz kliniczny zakażeń drobiu srowarami *Salmonella* niespecyficznymi gatunkowo (*S. Enteritidis*) i specyficznymi (*S. Gallinarum*) na ogół jest różny, przy, jak by się mogło wydawać, podobnej patogenezie zakażeń. *Salmonella Gallinarum* na ogół prowadzi do występowania ostrej posocznicy lub ogólnoustrojowego przewlekłego zakażenia dorosłych kur. Natomiast większość serowarów paratyfusowych, w tym zwłaszcza *S. Enteritidis*, znacznie częściej jest przyczyną zakażenia błony śluzowej jelit ślepych i narządów układu rozrodczego. Jest wiele czynników, które mogą zwiększać prawdopodobieństwo lub dotkliwość zakażenia *Salmonella* u drobiu. Na przebieg zakażenia tymi bakteriami mają wpływ przebyte zakażenia drobiu patogenami o właściwościach immunosupresyjnych, stres spowodowany nieodpowiednimi warunkami chowu, w tym nadmiernym zagęszczeniem i utrudnionym dostępem do paszy, brak dobrostanu itp. Wyższa wewnętrzna temperatura ciała drobiu niż ssaków, a także zmieniające się warunki środowiskowe, na które są narażone serowary *Salmonella* mogą wywoływać zmiany w ekspresji genów związanych z wirulencją. Przypuszcza się, że niektóre geny tych bakterii związane z wirulencją są ważne dla inwazyjności i przeżywania w makrofagach i narządach wewnętrznych. Chciałbym jednak podkreślić, że pomimo licznych badań dotyczących patogenez zakażeń pałeczkami *Salmonella* u drobiu, w tym odmiennego przebiegu zakażenia *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* u

kur, w dalszym ciągu jest wiele pytań i wątpliwości, które wymagają wyjaśnienia. Taki cel postawiła sobie również Autorka ocenianej dysertacji, która postanowiła zbadać rolę heterofilii (granulocytów obojętnochłonnych stanowiących odpowiednik neutrofilii u ssaków) w patogenezie zakażeń kur tymi bakteriami. Jest to o tyle istotne, że heterofile, zapewniające funkcjonowanie odpowiedzi immunologicznej zarówno w zdrowym, jak i zakażonym organizmie, w leukogramie dorosłych kur stanowią największy procentowy udział. W tym miejscu chciałbym podkreślić, że Zespół prof. dr hab. Macieja Ugorskigo, którego Doktorantka była członkiem, od wielu lat prowadzi wielokierunkowe badania naukowe, bardzo zawansowane metodycznie, w oparciu o nowoczesną aparaturę naukową, nad patogenizacją zakażeń kur wymienionymi wyżej serowarami tych bakterii. Również przedłożona do recenzji dysertacja stanowi ważny i bardzo interesujący przyczynek do poznania tych niezwykle złożonych mechanizmów patogenyzy zakażeń drobiu pałeczkami *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum*.

Oceniana rozprawa doktorska jest przedstawiona na 86 stronach manuskryptu i posiada układ typowy dla tego typu opracowań na stopień naukowy. Jest podzielona na dziesięć rozdziałów poprzedzonych stroną tytułową i spisem treści w kolejności:

- lista stosowanych skrótów (1 strona),
- spis rycin i tabel (1 strona),
- streszczenia w językach polskim i angielskim (odpowiednio 3 i 2 strony),
- wstęp (12 stron),
- cel pracy (1 strona),
- materiały i metody (27 stron),
- wyniki (18 stron),
- dyskusja (6 stron),
- wnioski w liczbie 5 (1 strona),
- spis literatury - 88 pozycji (8 stron).

Dokumentacja pracy przedstawiona jest na 24 rycinach i w 1 tabeli zamieszczonych w tekście manuskryptu. Zostały one opracowane bardzo starannie graficznie, przez co są czytelne. Przegląd piśmiennictwa oparty jest na 88 starannie dobranych pozycjach, chociaż 3 publikacje z tego wykazu nie zostały zacytowane (Kogut i wsp. 2005; Kolendra i wsp. 2019; Frisch i wsp. 2013) a 8 prac cytowanych we wstępie nie zamieszczono w spisie (Kaiser i wsp. 2015; Schierack i wsp. 2015; Nerren i wsp. 2010; Rhen i wsp. 2012; Aussel i wsp. 2011; Kogut i wsp. 2003; Fu i wsp. 1994; Guo i wsp. 2016). Przedstawiona do oceny dysertacja napisana jest poprawnym językiem, z prawidłowym użyciem nazewnictwa fachowego.

W rozdziale „**Wstęp**”, Doktorantka wprowadza w problematykę zakażeń drobiu grzebiącego serowarami *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum*, zwracając szczególną uwagę na czynniki wirulencji pałeczek *Salmonella*, co jest aktualnym i ważnym problemem badawczym. Dodatkowo, Doktorantka zwraca uwagę na problem występowania zakażeń tymi bakteriami u ludzi, często bezobjawowych, których źródłem jest żywność, w tym przede wszystkim mięso drobiowe i jaja. W dalszej części tego rozdziału Doktorantka podkreśla, iż zdolność serowarów *Salmonella* do przeżywania i namnażania w organizmie różnych gatunków zwierząt jest uzależniona od czynników wirulencji wytwarzanych przez bakterie oraz od wrażliwości gospodarza na zakażenie. W tym kontekście wyjaśnia, iż te bardzo liczne serowary (warianty serologiczne) *Salmonella*, których liczba wynosi blisko 2600, z punktu widzenia patologii ptaków dzieli się na serowary inwazyjne gatunkowo specyficzne dla określonego gatunku ptaków (tzw. host-adapted), tj. *S. Pullorum* i *S. Gallinarum*, które nie wywołują zakażeń u ludzi i innych gatunków zwierząt. Druga kategoria tych bakterii to serowary inwazyjne niespecyficzne dla ptaków (non-adapted), w tym *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium*, które występują u wielu gatunków zwierząt i ptaków oraz są czynnikiem etiologicznym zakażeń i zatruc pokarmowych u ludzi. Następnie Doktorantka omawia kolejne etapy zakażenia gospodarza pałeczkami *Salmonella* drogą alimentarną, które mogą ograniczać się do przewodu pokarmowego (zapalenie żołądka i jelit) lub prowadzić do uogólnienia procesu. Zwraca przy tym uwagę na rolę, nie w pełni poznanych, czynników wirulencji w procesie patogenezy. Chciałbym dodać, że ten złożony proces zakażenia, związany z adhezją pałeczek *Salmonella* do komórek układu odpornościowego, poza formą opisową jest również przedstawiony na bardzo czytelnej rycinie. W kolejnych częściach tego rozdziału Doktorantka omówiła rolę heterofilii i fimbrii typu 1 wraz z allelicznymi wariantami adhezyny FimH oraz ich receptorów, a także mechanizmy bakteriobójcze wykorzystywane przez komórki fagocytyjające w patogenezie zakażeń pałeczkami *Salmonella* u ptaków.

„**Wstęp**”, po dokładnym przeanalizowaniu, dowodzi bardzo dobrej znajomości przez Doktorantkę problematyki oraz piśmiennictwa (w tym rozdziale zacytowano 70 pozycji, co stanowi blisko 80% ogólnej ich liczby zamieszczonej w bibliografii oraz 9 pozycji, które w wykazie nie znalazły się) z zakresu patogenezy zakażeń pałeczkami *Salmonella*. Z analizy cytowanego w tym rozdziale piśmiennictwa przekonywująco wynika również cel pracy.

„**Celem**” badań była charakterystyka adhezyn FimH *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* pod kątem wiązania do subpopulacji limfocytów B i T oraz makrofagów (monocytów) i heterofilii krwi obwodowej kur. Ponadto, określano rolę fimbrii typu 1 w zakażeniach leukocytów tymi bakteriami. W kolejnym zdaniu Doktorantka pisze, cyt. „Ponieważ, w trakcie prowadzonych

badania okazało się, że adhezyna FimH wiąże się jedynie do makrofagów i heterofili kury, badania ograniczono do tych dwóch subpopulacji leukocytów”, koniec cytatu. Chciałbym jednak podkreślić, że w prowadzonych badaniach wykazano, iż adhezyna FimH nie wiąże się z limfocytami B i T, co jest interesującym wynikiem. Skoro wykazano, iż adhezyna FimH *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* wykazuje powinowactwo do heterofilii i monocytów, to zastanawiające jest zawężenie tytułu dysertacji jedynie do heterofilii. Wobec powyższego stwierdzam, iż tytuł rozprawy nie odzwierciedla zakresu prowadzonych tak interesujących badań.

Powyższe cele realizowano w oparciu o cztery następujące zadania:

1. Utworzenie konstruktów genowych pozwalających na produkcję w komórkach *E. coli* następujących białek rekombinowanych: (1) adhezyny FimH *S. Gallinarum* z przyłączonym N-końcowym fragmentem białka FimF (GscFimH), (2) adhezyny FimH *S. Gallinarum* z mutacją I78T z przyłączonym N-końcowym fragmentem białka FimF (G78scFimH), (3) adhezyny FimH *S. Enteritidis* z przyłączonym N-końcowym fragmentem białka FimF (EscFimH);

2. Identyfikacja struktur receptorowych obecnych na limfocytach B, limfocytach T, makrofagach i heterofilach kury rozpoznawanych i wiązanych przez białka GscFimH, G78scFimH i EscFimH;

3. Analiza pałeczek *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* ekspresjonujących fimbrie typu 1 pod kątem ich adhezji i zdolności do inwazji heterofilii i makrofagów kury oraz ich przeżywalności w tych komórkach;

4. Ocena zdolności bakteriobójczych heterofilii i makrofagów kury zakażonych pałeczkami *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* poprzez oznaczanie reaktywnych form tlenu i azotu.

Kolejny rozdział to „**Materiały i metody**”. W podrozdziale „**Materiały**” Doktorantka w formie tabelarycznej zestawiała wykorzystane w badaniach odczynniki chemiczne, przeciwciała mono- i poliklonalne, enzymy, wektory plazmidowe wraz z ich opisem i schematami, oligonukleotydy wykorzystywane w reakcji PCR, standardy DNA i białek, bufony i roztwory, podłoża mikrobiologiczne, szczepy bakteryjne, podłoża hodowlane i roztwory używane w pracy z komórkami eukariotycznymi, komórki eukariotyczne, gotowe zestawy odczynników wykorzystywanych w pracy z DNA, szczepy bakteryjne (*Escherichia coli*, *Salmonella* *Enteritidis* i *Salmonella* *Gallinarum*), linie komórkowe (HD-11 – kurza linia monocytarno-makrofagowa i CHICK-8E11 - linia komórkowa wyprowadzona z nabłonka jelita kury) oraz programy komputerowe i aparaturę, które znalazły zastosowanie w realizowanych badaniach.

Następnie w podrozdziale „**Metody**” zamieszczono zwięzły opis badań laboratoryjnych z podziałem na metody biologii molekularnej, w tym klasyczne metody używane w pracy z DNA i reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz metody i schemat utworzenia wektorów ekspresyjnych kodujących adhezynę FimH *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* z N-końcowym fragmentem białka FimF, a także opisano ukierunkowaną mutagenezę. Dalej opisano metodę otrzymywania rekombinowanych białek FimH z uwzględnieniem ekspresji białek rekombinowanych, ich oczyszczania na kolumnie powinowactwa, izolacji białek powierzchniowych z komórek eukariotycznych, elektroforezę białek na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) oraz metodę Western blotting i Far-Western blotting. Następnie Doktorantka opisała sposób prowadzenia hodowli pałeczek *Salmonella* w warunkach optymalnej ekspresji fimbrii typu 1. Poza opisem metody izolacji heterofilii i komórek jednojądrzastych z krwi obwodowej kury, Doktorantka przedstawiła również rozdział leukocytów krwi kury w gradiencie Ficollu w formie bardzo czytelnego schematu. Ponadto, Autorka ocenianej dysertacji opisała sposób izolacji granulocytów z krwi obwodowej człowieka, cytometryczne sortowanie komórek jednojądrzastych (limfocyty B i T) z krwi obwodowej kury i sposób prowadzenia hodowli makrofagowo-monocytarnej kurzych komórek HD11. W dalszej części tego podrozdziału zamieszczono opis testów adhezyjnego, na inwazyjność i wewnątrzkomórkową przeżywalność pałeczek *Salmonella* w heterofilach i makrofagach oraz barwienie komórek eukariotycznych oranżem akrydyny, obrazowanie za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego typu cross-beam z działem jonowym Cobra (FIB-SEM), azotynowy test Griessa, pomiar reaktywnych form tlenu (NBT) i wyznaczenie struktury trzeciorzędowej białek *in silico*. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem testów t-Studenta i Manna-Whitneya. Wymienione metody świadczą o bardzo dużym zakresie, skrupulatnie przemyślanych badań, które wykonano z zastosowaniem nowoczesnych technik. Wymagało to od Doktorantki opanowania szerokiej gamy metod badawczych, w tym z zastosowaniem technik biologii molekularnej. Zakres wykonanych badań świadczy o bardzo dobrym opanowaniu przez Doktorantkę warsztatu badawczego i o Jej ogromnej pracowitości.

Dobrze zaplanowane badania i zastosowane metody badawcze pozwoliły Doktorantce uzyskać interesujące rezultaty, które przedstawiono w rozdziale „**Wyniki**”. Autorka dysertacji wykazała, iż ma miejsce wiązanie adhezyn FimH ekspresjonowanych przez serowary *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* ze specyficznymi białkami powierzchniowymi makrofagów kury, które były reprezentowane przez komórki HD11 i heterofilii oraz brak wiązania z białkami powierzchniowymi limfocytów T i B kury. Interesujące jest wykazanie *in silico* różnic w

strukturze trzeciorzędowej wariantów allelicznych białka FimH pomiędzy *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis*. Wykazano bowiem, iż bezpośrednim skutkiem podstawienia treoniny (FimH *S. Enteritidis*) izoleucyną (FimH *S. Gallinarum*) w wyniku punktowej mutacji, z uwagi na zwiększenie powierzchni tego obszaru białka (masa cząsteczkowa izoleucyny jest większa do masy cząsteczkowej treoniny), stanowi przeszkodę steryczną (brak dostępu do potencjalnego miejsca aktywnego) przy przyłączaniu potencjalnego receptora. Zatem wykazano, iż zmiana polarności aminokwasu w tym miejscu adhezyny zakłóca lub zmienia mechanizm przyłączania do potencjalnych receptorów heterofilii i makrofagów. Ponadto wykazano, iż oddziaływanie *S. Enteritidis* z heterofilami, w przeciwieństwie do *S. Gallinarum*, jest mannozo-zależne, oraz że heterofile wiążą się z 5-krotnie mniejszą liczbą pałeczek *S. Enteritidis* niż kurze makrofagi. Wykazano także, iż wiązanie pałeczek *S. Gallinarum* do obu rodzajów komórek nie różni się statystycznie istotnie. W badaniach porównawczych nad inwazyjnością obu serowarów *Salmonella* wobec kurzych heterofilii wykazano, iż liczba pałeczek *S. Enteritidis*, które wniknęły do tych komórek była 6-krotnie wyższa niż serowarów *S. Gallinarum*, przy czym oddziaływanie pałeczek *S. Enteritidis* z heterofilami było hamowane przez D-mannozę. Dowodzi to, iż w inwazyjności *S. Enteritidis* kluczową rolę odgrywają mannozo-zależne fimbrie typu 1. Natomiast w odniesieniu do wewnątrzkomórkowej przeżywalności obu serowarów *Salmonella* po wniknięciu do heterofilii kury wykazano, iż już po 6 godzinach od zakażenia niewielki odsetek bakterii pozostaje przy życiu, w porównaniu z ich liczbą, które wniknęły po 2 godzinach. Wykazano także, iż w porównaniu do heterofilii, w komórkach HD11 aktywowanych PMA, wewnątrzkomórkowa przeżywalność obu serowarów *Salmonella* była bliska 100%.

Za pomocą mikroskopu skaningowego Doktorantka wykazała, że w komórkach HD11 zakażonych pałeczkami *S. Gallinarum* już po 6 godz. od wniknięcia bakterii występują zmiany morfologiczne w postaci obrzęku mitochondriów i łączenia się z wakuolami. Natomiast po 24 godzinach od zakażenia liczba bakterii w makrofagach wzrastała, przy czym makrofagi nie wykazywały oznak śmierci komórki, podczas gdy lizosomy skutecznie trawiły bakterie. W komórkach HD11 po 6 godzinach od zakażenia pałeczkami *S. Enteritidis* obserwowano liczne wakuole wypełnione dużą liczbą bakterii, a po 24 godzinach w jądrach takich komórek występowała kondensacja chromatyny, mitochondria ulegały pęcznieniu a liczne wakuole były wypełnione żywymi bakteriami.

Tekst rozdziału „**Wyniki**”, uzupełniony wysokiej jakości rycinami, przybliży czytającemu wyniki tych bardzo złożonych eksperymentów w sposób przejrzysty i komunikatywny. Chciałbym zaznaczyć, że w tym rozdziale Doktorantka prowadzi dyskusję

nad niektórymi wynikami badań własnych, co nie powinno mieć miejsca, gdyż do tego służy rozdział „Dyskusja”, chociaż bez wątplenia ułatwia to interpretację i zrozumienie celowości tych badań. Stwierdzam, że przedłożone mi do oceny wyniki badań stanowią oryginalny wkład do lepszego poznania patogenezы zakażeń kur serowarami *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis*.

Kolejny rozdział dysertacji pt. „Dyskusja” dowodzi umiejętności Doktorantki w analizie własnych wyników z opublikowanymi badaniami innych badaczy a także wynikami wcześniejszych badań własnych prowadzonych w Zespole kierowanym przez profesora Macieja Ugorskiego. Z dyskusji wynika zasadność prowadzenia kolejnych etapów badań dla wyjaśnienia kwestii postawionych przez Doktorantkę w celach dysertacji. Redakcja tego rozdziału stanowi dowód dużej dojrzałości naukowej Doktorantki i dogłębnej znajomości literatury przedmiotu.

Na zakończenie Doktorantka formułuje pięć wniosków, które są poprawne i odpowiadają założonym celom badań oraz znajdują pełne odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach.

Recenzowaną pracę doktorską oceniam pozytywnie ze względu na jej następujące walory:

- stanowi ona kolejne tak szczegółowe opracowanie naukowe wnoszące nowe dane do patogenezы zakażeń kur pałeczkami *Salmonella* nieswoistymi gatunkowo (*S. Enteritidis*) i swoistymi (*S. Gallinarum*), zwłaszcza dotyczące wiązania adhezyny FimH tych bakterii do swoistych białek obecnych na powierzchni heterofilii i makrofagów;

- wykazanie, iż adhezyny FimH *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum* nie wiążą się ze swoistymi powierzchniowymi receptorami białkowymi limfocytów T i B. Można zatem przypuszczać, iż zakażenie kur badanymi serowarami *Salmonella* nie prowadzi do uszkodzenia struktur immunologicznych, w których zlokalizowane są komórki T (pomocnicze limfocyty TCD4<sup>+</sup> i cytotoksyczne TCD8<sup>+</sup>) oraz B (IgM<sup>+</sup>);

- wykazanie, iż pałeczki *S. Enteritidis* wiążą się do heterofilii i makrofagów w wielokrotnie większej liczbie niż pałeczki *S. Gallinarum*, co spowodowane jest najprawdopodobniej obecnością mannozo-zależnych fimbrii typu 1 na powierzchni pałeczek *S. Enteritidis*;

- wykazanie, iż pałeczki *S. Enteritidis*, za sprawą obecności mannozo-zależnych fimbrii typu 1 na ich powierzchni, cechuje znacznie większa inwazyjność wobec heterofilii i makrofagów kury w porównaniu z pałeczkami *S. Gallinarum*;

- wykazanie, iż przeżywalność pałeczek *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum* w heterofilach jest blisko 5-krotnie niższa w porównaniu z makrofagami, w których wynosiła blisko 100%;



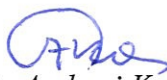
- wykazanie, iż produkcja reaktywnych form tlenu i azotu przez heterofile i makrofagi w odpowiedzi na zakażenie badanymi serowarami *Salmonella* nie ma wpływu na ich wewnątrzkomórkową przeżywalność;

- wiarygodność uzyskanych wyników podnosi fakt użycia w badaniach tak licznych i zawansowanych metod badawczych, w tym biologii molekularnej i cytometrii przepływowej.

Z obowiązku wnikliwego recenzenta zwróciłem Doktorantce uwagę na kilka niedociągnięć dotyczących głównie piśmiennictwa oraz na zawężenie tytułu rozprawy jedynie do roli adhezyny FimH fimbrii Typu 1 *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* w zakażeniu heterofilii kury domowej, chociaż badania dotyczyły również makrofagów oraz limfocytów T i B. Pewnym niedopatrzaniem Doktorantki jest również błędne napisanie w tytule rozprawy słowa heterofilii - przez jedno „i”.

Przedstawione uwagi krytyczne, które mają wyłącznie charakter porządkowy lub uzupełniający, nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy i nie wpływają na jej jednoznacznie bardzo pozytywną ocenę.

W konkluzji wyrażam opinię, że rozprawa doktorska lek. wet. Aleksandry Tabiś pt. "Rola adhezyny FimH fimbrii Typu 1 *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* w zakażeniu heterofilii kury domowej" spełnia ustawowe wymogi zawarte w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r., poz. 1669 ze zm.). Podstawę mojej konkluzji stanowi po pierwsze prezentacja oryginalnej wiedzy przez Kandydatkę do stopnia naukowego doktora w zakresie dyscypliny weterynaria, po drugie – wykazanie się przez Doktorantkę umiejętnością realizowania badań naukowych. Biorąc powyższe pod uwagę przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. wet. Aleksandry Tabiś do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
prof. dr hab. Andrzej Koncicki