



Bydgoszcz, dn. 06.09.2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Aleksandry Tabiś pt. „Rola adhezyny FimH fimbrii Typu 1 *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* w zakażeniu heterofili kury” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Ugorskiego z Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

1. Podstawa recenzji

Podstawę przygotowania recenzji rozprawy doktorskiej lek. wet. Aleksandry Tabiś zatytułowanej: „Rola adhezyny FimH fimbrii Typu 1 *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* w zakażeniu heterofili kury” stanowi pismo z dnia 04.07.2023 r. sygnowane przez prof. dr hab. Wojciecha Niżańskiego, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, w którym zamieszczono informację o powołaniu mnie uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 04.07.2023 r. na recenzenta niniejszej rozprawy.

Tematyka rozprawy doktorskiej lek. wet. Aleksandry Tabiś wpisuje się w moje zainteresowania naukowo-badawcze, co czyni mnie upoważnionym do przygotowania recenzji.

2. Uwagi ogólne dotyczące rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem promotora, prof. dr hab. Macieja Ugorskiego z Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Rozprawa doktorska została przedstawiona w postaci monografii. Stanowi zwarte opracowanie liczące 86 numerowanych stron maszynopisu i zawiera 24 kolejno numerowane ryciny oraz jedną tabelę. Treść rozprawy została podzielona na typowe dla tego rodzaju prac sekcje: Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Bibliografia. Całość opracowania poprzedza lista stosowanych skrótów.

W wykazie piśmiennictwa Doktorantka zamieściła 88 pozycji bibliograficznych polsko- i anglojęzycznych, w postaci artykułów, wydawnictw książkowych oraz informacji pochodzących ze stron internetowych. 99% pozycji piśmiennictwa to pozycje anglojęzyczne, z czego 85 pozycji to artykuły w czasopismach polskich i zagranicznych, a pozostałe trzy pozycje to odpowiednio: książka, rozprawa doktorska oraz dane z raportu EFSA zamieszczone na stronie internetowej.

Zamieszczone w wykazie piśmiennictwa pozycje bibliograficzne nie należą do najnowszych. Tylko 14 pozycji to prace z ostatnich 10 lat.

Reasumując, układ przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej nie budzi moich zastrzeżeń. Zarówno kompozycja pracy, jak i proporcje jej poszczególnych rozdziałów są prawidłowe. Pani Aleksandra Tabiś poprawnie dobrała także piśmiennictwo, do którego odwoływała się przygotowując swoją dysertację. Opiera się głównie na pozycjach zagranicznych, anglojęzycznych. Załączone tabela i ryciny są prawidłowo skonstruowane i wzbogacają treść rozprawy, jednocześnie ułatwiając odbiór przedstawionych treści. Praca napisana jest jasnym, zrozumiałym i naukowym językiem. Wszystko to wskazuje na dobre opanowanie przez lek. wet. Aleksandrę Tabiś zasad przygotowania i redagowania prac naukowych.

Kończąc ten punkt recenzji mam kilka drobnych uwag natury redakcyjnej:

1. Pewne zastrzeżenia budzi sposób cytowania i umiejscowienie niektórych rycin w pracy:
 - rycina 1 została przywołana w tekście pracy na stronie 16 a pojawia się dopiero na stronie 18. Moim zdaniem lepiej byłoby ją wprowadzić bezpośrednio po przywołaniu w tekście
 - ryciny 6, 9 i 10 nie zostały przywołane w tekście pracy
 - rycina 24 (podzielona na sekcje A-F) nie została przywołana w tekście jako całość, a z poszczególnych części nie przywołano sekcji A i B. Pozostałe sekcje zostały zacytowane.
2. Podpisy rycin podane przez Autorkę w spisie umieszczonym na początku pracy różnią się w wielu przypadkach od tych umieszczonych w tekście rozprawy bezpośrednio pod daną grafiką (ryc. 4, 10-24), np.:
 - ryc. 13 - w spisie znajduje się opis: „Rycina 13. Western blot. Białka powierzchniowe”, a w tekście: „Rycina 13. Wiązanie mysich monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko ATPazie Na⁺/K⁺ (A) i GAPDH (B) do frakcji białek cytoplazmatycznych (ścieżka 1) i frakcji białek błonowych (ścieżka 2) izolowanych z makrofagów stymulowanych HD11, heterofili, limfocytów T oraz limfocytów B; M – standard białek.”
 - ryc. 15 - w spisie – „Rycina 15. Wiązanie adhezyn do białek lizatów ludzkich neutrofilii”, w tekście – „Rycina 15. Wiązanie adhezyny FimH *S. Gallinarum* (GscFimH) (ścieżka 1), adhezyny FimH *S. Enteritidis* (EscFimH) (ścieżka 2) i adhezyny FimH *S. Gallinarum* z mutacją I78T (Gsc78FimH) (ścieżka 3) do białek lizatów ludzkich neutrofilii w nieobecności (A) i obecności 0,2 M D-mannozy (B).”
3. W opisach rycin brakuje informacji czy zostały one przygotowane samodzielnie przez Doktorantkę, czy pozyskane z innego źródła, a jeśli tak, to jakiego, np. Ryc. 1, Ryc. 8, itd.
4. W rozprawie doktorskiej pojawiają się liczne drobne błędy stylistyczne, interpunkcyjne, literowe, różnice w rodzaju i kolorze użytej czcionki oraz brak numeracji niektórych stron, np. strony 38, itp.

5. Łacińskie nazwy gatunkowe nie powinny być poddawane deklinacji. Zawsze powinny być pisane w mianowniku.
6. W spisie tabel i w tekście (np. streszczenie w języku angielskim) nazwy drobnoustrojów są pisane czcionką prostą zamiast kursywą lub kursywą zamiast prostą czcionką (np. rodzina *Enterobacteriaceae* lub słowo oznaczające podgatunek w zapisie *Salmonella enterica subsp. enterica*).
7. W rozdziałach 3.1. i 3.2. Doktorantka stosuje bardzo liczne zestawienie tabelaryczne nie traktując ich jako tabele i nie przywołując w tekście ani w spisie. Ponadto w podrozdziałach 3.2.1.2. Reakcja łańcuchowej polimeryzacji, 3.2.3. Ukierunkowana mutageniza Autorka odnosi się w tekście do tabel, które nie są ponumerowane, nie mają nagłówków oraz nie zostały wykazane w spisie tabel. Może w takim przypadku lepiej byłoby pisać o zestawieniu lub wykazie. Ponadto unikałbym zdrobnień, takich jak „tabelka”.
8. W zestawieniu odczynników w rozdziale 3.1.1 Odczynniki chemiczne należałoby powtórzyć nagłówek na kolejnej stronie (str. 27 i 28), podobnie w rozdziałach 3.1.8 Bufory i roztwory (str. 32 i 33), 3.1.9 Podłoża mikrobiologiczne (str. 33 i 34), 3.1.11 Podłoża hodowlane i roztwory używane do pracy z komórkami eukariotycznymi (str. 34 i 35), 3.1.13 Gotowe zestawy odczynników (str. 35 i 36), 3.1.15 Aparatura (str. 36 i 37).
9. Poczawszy od rozdziału 3.1.4.3 *E.fimH/pTrecHis2b* (str. 31) piśmiennictwo jest cytowane w nawiasach kwadratowych zamiast okrągłych. Należałoby ujednoczyć zapis.
10. Występują braki lub błędy w zakresie cytowania piśmiennictwa:
 - pozycje, które autorka wykazuje w bibliografii, natomiast brak ich w spisie:
 - Kolenda, R., Ugorski, M., Grzymajło, K., 2019. Everything you always wanted to know about Salmonella type 1 fimbriae, but were afraid to ask. *Front. Microbiol.* 10, 1–18.
 - pozycje, na które Autorka powołuje się w tekście, natomiast brak ich w spisie:
 - Kaiser i wsp., 2015;
 - Schierack i wsp., 2015;
 - Nerren i wsp., 2010;
 - Aussel i wsp., 2011;
 - Kogut i wsp., 2003 (w spisie podano wyłącznie Kogut i wsp., 2005);
 - w tekście pojawia się Rhen i wsp. 2012, Rhen 2019, Rhen i wsp 2019, natomiast w spisie jest tylko Rhen 2019;
 - Mikołajczyk-Martinez i wsp. 2023 (w spisie jest tylko Mikołajczyk-Martinez i Ugorski 2023);
 - w tekście Piper i wsp., 2017, a w spisie Pieper;
 - w tekście Kisiela i wsp., 2005, a w spisie jest Kisiela i wsp.2005a i 2005b

3. Tematyka rozprawy doktorskiej i jej kontekst

Tematyka rozprawy doktorskiej lek. wet. Aleksandry Tabiś jest, w mojej opinii, aktualna i niezwykle istotna, zarówno w aspekcie badań podstawowych, jak i jej przełożenia na praktykę weterynaryjną. Ponadto przeprowadzone badania są także ważne z punktu widzenia bezpieczeństwa zdrowotnego konsumentów.

Gram-ujemne pałeczki *Salmonella enterica* subsp. *enterica* uznawane są za patogenne względem ludzi i zwierząt. Dotychczas scharakteryzowano 2600 serowarów tego gatunku. W odniesieniu do zakażeń u ludzi, *Salmonella* spp. dzieli się na dwie grupy: durowe (*S. enterica* serowar Typhi, Paratyphi i Sendai) oraz niedurowe (m.in. *S. enterica* serowar Typhimurium, Enteritidis i Dublin). Niezmiennie, salmonelloza zajmuje czołowe miejsce wśród chorób przenoszonych za pośrednictwem żywności na terenie Europy. Salmonelloza ma zwykle łagodny przebieg, ale zdarzają się przypadki, w których może zagrażać życiu. Według danych przedstawionych przez Europejski Urząd do Spraw Bezpieczeństwa Żywności, w roku 2021 potwierdzono 60 050 przypadków salmonellozy u ludzi. Najczęściej izolowanymi serowarami z zakażeń u ludzi były: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis* i *S. Derby*. Istnieje wiele źródeł zakażenia *Salmonella* spp., z których najważniejsze to żywność, m.in. jaja, mięso, produkty mleczne, warzywa i woda. Jednakże, mięso drobiowe i jego produkty były głównym źródłem pałeczek z rodzaju *Salmonella*, które powodowały choroby ludzi i zwierząt, a także istotne straty ekonomiczne w przemyśle drobiarskim. Najwyższy odsetek zanieczyszczenia żywności pałeczkami *Salmonella* spp. w roku 2021 stwierdzono dla próbek brojlerów (14,0%), indyków (7,4%), świń (1,7%) i owiec (1,4%). Zgodnie z obowiązującym Rozporządzeniem, częstość występowania pałeczek z rodzaju *Salmonella* spp. wynosi 1% lub mniej dla stad hodowlanych *Gallus gallus*, brojlerów oraz indyków hodowlanych i rzeźnych oraz 2% dla kur niosek. Podkreślić należy, że *S. Gallinarum* jest patogenna wobec drobiu i stanowi przyczynę znacznych strat ekonomicznych w przemyśle drobiarskim w krajach rozwijających się. Kontrolowanie obecności pałeczek z rodzaju *Salmonella*, zwłaszcza w przemyśle drobiarskim jest kluczowe dla zapewnienia bezpieczeństwa żywności oraz ograniczenia rozprzestrzeniania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe.

Pierwszym i kluczowym etapem patogenezы pałeczek z rodzaju *Salmonella* jest adhezja do komórek gospodarza. W etap ten zaangażowanych jest wiele czynników, z czego najważniejszą rolę odgrywają fimbrie typu 1. Przebieg zakażenia uzależniony jest od gospodarza, jego stanu czynnościowego i predyspozycji genetycznych oraz określonych czynników wirulencji wytwarzanych przez dany serowar *Salmonella* spp.. Chociaż poczyniono znaczne postępy w charakteryzowaniu mechanizmów molekularnych leżących u podstaw zakażeń pałeczkami *Salmonella* spp., nadal pozostaje wiele pytań. Niewiele badań dotyczy udziału fimbrii typu 1 w adhezji i inwazyjności serowarów *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum* względem heterofili podczas zakażenia u kur. Mimo znacznego, w ostatnich latach, postępu wiedzy dotyczących fimbrii wytwarzanych przez *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, czy *S. Gallinarum*, nadal niewiele wiadomo na temat ich roli jako czynnika wirulencji. Oprócz zrozumienia mechanizmów adhezyjnych, potrzebne są dalsze badania, aby poznać sposoby blokowania receptorów lub adhezyny fimbrialnej *Salmonella* spp., aby ograniczyć zakażenia tym drobnoustrojem.

W ostatnich latach na całym świecie odnotowano liczne ogniska zakażeń *Salmonella* spp., co wskazuje na konieczność poprawy programów kontroli, a także nadzoru. Poznanie patogenezы pałeczek z rodzaju *Salmonella* jest kluczem do kontrolowania i monitorowania tych bakterii w przemyśle spożywczym, ograniczeniem strat ekonomicznych, a także zmniejszeniem liczby pacjentów z rozpoznaną salmonellozą. Podejmowanie tematów badawczych

dotyczących patogenezы zakażenia *Salmonella* spp. jest aktualne i ważne celem zapewnienia ochrony zdrowia publicznego.

4. Szczegółowa ocena rozprawy doktorskiej

W części teoretycznej pracy Pani Aleksandra Tabiś poruszyła kwestę patogenności serowarów *Salmonella* spp., w szczególności pałeczek *Salmonella enterica* subsp. *enterica* jako patogenu drobiu. Doktorantka szeroko opisała patogenezę zakażeń pałeczkami *Salmonella*. Opisała zarówno pierwszy etap, czyli zapalenie żołądka i jelit, przedstawiając kolejne etapy kolonizacji, jak i drugi etap będący postacią ogólnoustrojową.

W kolejnych podrozdziałach Doktorantka opisała rolę heterofili w patogenezie zakażeń pałeczkami *Salmonella* u ptaków oraz fimbrii w patogenezie zakażeń pałeczkami *S. Enteritidis* i *S. Gallinarum*, jak również mechanizmy bakteriobójcze wykorzystywane przez fagocyty.

Tę część pracy doktorantka zilustrowała również rycinami.

Celem naukowym rozprawy doktorskiej była dokonanie charakterystyki adhezyn FimH *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* pod kątem wiązania do różnych subpopulacji krwi obwodowej kur oraz roli fimbrii typu 1 w zakażeniach leukocytów pałeczkami *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis*. Szczegółowe cele obejmowały utworzenie konstruktów genowych pozwalających na produkcję w komórkach *E. coli* wybranych białek rekombinowanych, identyfikację struktur receptorowych obecnych na limfocytach B, limfocytach T, makrofagach i heterofilach kury rozpoznawanych i wiązanych przez białka GscFimH, G78scFimH i EscFimH, przeprowadzenie analizy pałeczek *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* ekspresjonujących fimbrie typu 1 pod kątem ich adhezji i zdolności do inwazji heterofili i makrofagów kury oraz ich przeżywalności w tych komórkach, jak również ocenę zdolności bakteriobójczych heterofili i makrofagów kury zakażonych pałeczkami *S. Gallinarum* i *S. Enteritidis* poprzez oznaczenia reaktywnych form tlenu i azotu.

Plan eksperymentu jest prawidłowy, a metody badawcze są właściwie dobrane. Na podkreślenie zasługuje fakt, że metodyka jest bardzo rozbudowana, a użyte metody są zaawansowane i nowoczesne, co jednoznacznie wskazuje na dojrzałość doktorantki, jako naukowca.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wykazała, że pałeczki *S. Enteritidis* wiążą się do heterofili i makrofagów w wielokrotnie większej liczbie oraz cechują się znacznie większą inwazyjnością wobec tych komórek w porównaniu z pałeczkami *S. Gallinarum*. Ponadto przeżywalność obu serowarów jest znacznie wyższa w makrofagach i nie podlega wpływowi reaktywnych form tlenu wytwarzanych przez heterofile i makrofagi. Uzyskane wyniki dostarczają bardzo cennych i aplikacyjnych informacji. Opis ich jest prawidłowy, a tekst jest wzbogacony dużą liczbą rycin.

Wnioski przedstawione przez Doktorantkę są uprawnione i prawidłowo sformułowane.

Chociaż rozprawa jest napisana prawidłowo, zgodnie ze wszystkimi zasadami redagowania prac naukowych i dostarcza bardzo cennych wyników, to jednak mam kilka uwag, pytań i sugestii, o odniesienie się do których proszę Doktorantkę:



1. Rozdział „Cel pracy” rozpoczyna się zbyt długim wprowadzeniem. Część informacji w nim zawartych stanowi powtórzenie ze „Wstępu” rozprawy.
2. W podrozdziale 3.1.12 Doktorantka opisuje używane linie komórkowe. Wiadomym jest, że ustalone linie komórkowe charakteryzują się mniejszą zmiennością w porównaniu z liniami pierwotnymi. Heterofile, na których przeprowadzono badania zostały wyizolowane od różnych zwierząt w trakcie przeprowadzania eksperymentów. W jaki sposób Doktorantka zadbała o minimalizację różnorodności pomiędzy powtórzeniami oraz jak rozwiązała problem z niską żywotnością, jaką charakteryzują się pierwotne linie komórkowe? Czy istnieją ustalone linie komórkowe heterofili kury?
3. W składzie mieszaniny reakcyjnej PCR (str. 40-41) brakuje informacji o stężeniu dNTP.
4. W podrozdziale 3.2.5. Doktoranta wspomina o kilku pasażach bakterii do świeżego podłoża LB – jaki był tego cel?
5. Rozdział 3.2.6.4. jest zatytułowany „Komórki HD11” a zawarty jest w nim opis hodowli komórek HD11 oraz MM-ChiC klon 8E11.
6. W badaniach Doktorantka posługuje się szczepami dzikimi *Salmonella* Gallinarum oraz *Salmonella* Enteritidis. Czy model ten dostatecznie odzwierciedla rolę fimbrii typu I w adhezji i inwazji do heterofili kury domowej? Czy lepszym rozwiązaniem nie byłoby wzbogacenie modelu o mutanty delecyjne fimbrii typu I.
7. Inwazyjność to zdolność bakterii do wnikania do komórek eukariotycznych - głównie nabłonkowych. W rozdziale 3.2.8. opisany został test na inwazyjność. Skąd wiadomo, że w przypadku komórek fagocytarnych, test ten obrazuje zdolność bakterii do inwazji, a nie fagocytozę lub wypadkową obu procesów - inwazyjności i fagocytozy.
8. W rozdziale 4.1.2 Izolacja białek powierzchniowych na rycinie 13 pokazane zostało wiązanie przeciwciał skierowanych przeciwko ATPazie Na⁺/K⁺ (A) i GAPDH (B) do różnych frakcji badanych leukocytów. Wiadomym jest, że ATPazie Na⁺/K⁺ jest markerem frakcji błonowej t GAPDH frakcji cytoplazmatycznej. Na fotografii na ścieżce 2 (frakcja błonowa) widoczne jest oddziaływanie z GAPDH. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie.
9. Czy z literatury lub też innych badań Doktorantki istnieją podejrzenia co do potencjalnych receptorów dla białek FimH *S. Gallinarum* i/lub *S. Enteritidis* na błonie komórkowej heterofili i makrofagów?

5. Wniosek końcowy

Reasumując uważam, że rozprawa doktorska jest interesująca, porusza bardzo istotny i aktualny problem i w moim odczuciu z pewnością uzupełnia obecny stan wiedzy. Praca napisana jest prawidłowo, a duże wrażenie wywiera mnogość i zaawansowanie zastosowanych metod badawczych. Moje uwagi, chociaż dość liczne, mają charakter głównie edytorski lub stanowią sugestie albo prośby o uzupełnienie informacji lub doprecyzowanie opisu i w żadnym stopniu nie przekreślają pozytywnej oceny recenzowanej pracy doktorskiej.



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra Mikrobiologii

ul. Curie Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz
e-mail: kizmikrob@cm.umk.pl
tel. +48 52 585 44 80, 52 585 40 47

W związku z powyższym, stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Aleksandry Tabiś spełnia wymogi zawarte w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595) i wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. wet. Aleksandry Tabiś do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie doceniając ogromny nakład pracy, zaawansowanie warsztatu badawczego i wartość wykonanych analiz wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Kierownik
Zakładu Oceny Działań
Przeciwdrobnoustrojowych
Krzysztof Skowron
dr hab. inż. Krzysztof Skowron, prof. UMK
Katedra Mikrobiologii