



RECENZJA
Wniosek o wydanie

Prodziekan
Wydział Lekarskiego
ds. Nauki
prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska

UNIWERSYTET MEDYCZYNY W LUBLINIE
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

ul. dr W. Chodźki 1, 20-093 Lublin; tel. (fax) 81-448-71-00

Lublin, 29 sierpnia 2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pt.: „*Wpływ czynników stresowych na wybrane cechy fenotypowe i genotypowe badanych szczepów *Listeria monocytogenes**” wykonanej przez Panią mgr Natalię Wiktorczyk-Kapischke w Katedrze Mikrobiologii Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Rozprawę doktorską wykonano pod kierunkiem dr. hab. inż. Krzysztofa Skowrona, prof. ucz., z Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, oraz dr hab. inż. Ewy Wałeckiej-Zacharskiej, prof. ucz., z Katedry Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Badania mające na celu poznanie bakterii oportunistycznych egzogennych dla człowieka są obecnie traktowane jako priorytetowe. Patogenne pałeczki Gram-dodatnie z gatunku *Listeria monocytogenes*, będące przedmiotem pracy doktorskiej, są w ostatnich latach intensywnie badane ze względu na ich znaczące zdolności adaptacyjne oraz potencjalne zagrożenia zdrowotne dla człowieka i innych organizmów, wynikające z powszechnego występowania tych bakterii w otoczeniu, w tym w pokarmie, wodzie, gnijącej roślinności, organizmach żywych (np. ryby, ptaki i różne ssaki), a także w zakładach przetwórstwa i produkcji żywności. Pałeczki *Listeria* spp. są poznawane m.in. pod kątem chorobotwórczości, patomechanizmu zakażeń, czynników wirulencji, zdolności adaptacyjnych i wpływu różnych czynników, w tym stresowych, na ich cechy fenotypowe. Bakterie te mogą być czynnikiem etiologicznym zakażeń pokarmowych (nieinwazyjnej lub inwazyjnej listeriozy) u ludzi i u zwierząt oraz przyczyną różnych powikłań, w tym groźnych dla życia (np. sepsa czy zakażenie ośrodkowego układu nerwowego, zapalenie opon mózgowych, itp.). Listerioza może mieć bardzo zróżnicowany i ciężki przebieg, nierzadko powiązany z hospitalizacją pacjentów. Skutkuje ona wysoką śmiertelnością wśród chorych, sięgającą nawet 30%. W 2021 r. została ona zakwalifikowana jako piąta najczęściej zgłaszana choroba odzwierzęca w Unii Europejskiej. Szczególnie narażone są osoby starsze, kobiety w ciąży, noworodki i osoby z zaburzeniami funkcji układu immunologicznego. Do zagrożenia życia lub innych, poważnych konsekwencji zdrowotnych, dochodzi również u pacjentów nowotworowych, zwłaszcza poddawanych chemioterapii, u osób po przeszczepach czy mających problemy z nadużywaniem alkoholu, narkotyków lub innych używek.

Ocena pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa posiada układ typowy dla prac o charakterze doświadczalnym. Stanowi ona zwarte opracowanie liczące łącznie 151 stron, składające się z dwunastu rozdziałów z podrozdziałami. Na początku rozprawy umieszczony został „Wykaz Używanych Skrótów”. Wymienione w Spisie treści części pracy stanowią „Wstęp”, „Hipoteza badawcza i cel pracy”, „Materiał i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Wnioski”, „Streszczenie” w języku polskim oraz w języku angielskim, następnie „Piśmiennictwo” zawierające 301 pozycji, w tym 75 dokumentów lub publikacji z lat 2018-2023. W układzie rozprawy znajdują się również Spisy rycin (33 ryciny), fotografii (4 fotografie) i tabel (21 tabel). Na końcu pracy zamieszczona została kopia zgody Komisji Bioetycznej UMK w Toruniu na przeprowadzenie badań. Po Spisie treści umieszczona została informacja na temat artykułów opublikowanych przez Panią Wiktorczyk-Kapischke we współpracy z innymi autorami, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. W dwóch z tych publikacji zawarte są dane wykorzystane we Wstępie, kolejna wymieniona publikacja zawiera część wyników zamieszczonych w dysertacji. Fakt wykorzystywania przez Doktorantkę podczas pisania rozprawy doktorskiej trzech prac, których jest współautorką, uważam za szczególnie istotny, tym bardziej, że jedna z publikacji była już wielokrotnie cytowana. Dodatkową wartość stanowią również informacje na temat pozyskiwania przez Panią Magister środków finansowanych na realizację prac badawczych zarówno z grantów przeznaczonych dla słuchaczy studiów doktoranckich jak i z Grant4NCUStudent.

We Wstępie Autorka szeroko omówiła dane literaturowe dotyczące bakterii z gatunku *L. monocytogenes* oraz w mniejszym zakresie innych gatunków rodzaju *Listeria*, w tym o nieznanym w chwili obecnej wpływie na zdrowie człowieka. Przedstawiona została charakterystyka tych bakterii, z uwzględnieniem aktualnej wiedzy na temat występowania *L. monocytogenes* m.in. w żywności i w produktach różnego pochodzenia oraz ich zdolności adaptacyjnych i obronnych. Bardzo dokładnie została omówiona epidemiologia, patogeneza oraz patomechanizm zakażeń przez nie wywoływanych. Przekazane zostały interesujące dane na temat antybiotykoodporności, zdolności tworzenia biofilmu, oporności na różne czynniki stresowe oraz ich wpływu na *L. monocytogenes*. Informacje te zostały wzbogacone interesującymi i dopracowanymi rycinami, które pozytywnie wpływają na zrozumienie i pogłębienie prezentowanych zagadnień.

W części „Hipoteza badawcza i cel pracy” Doktorantka sprecyzowała i uzasadniła powody podjęcia pracy badawczej na temat pałeczek *L. monocytogenes* i zagrożeń dla ochrony zdrowia publicznego wynikających z możliwości szybkiej adaptacji tych bakterii do zmieniających się warunków. Zwróciła uwagę na możliwe konsekwencje związane m.in. z ich lekoopornością i zdolnością wzrostu w strukturze biofilmu. Obok postawionej hipotezy i celu głównego

proszonych badań zostały sformułowane trzy cele szczególowe, dotyczące oceny podobieństwa genetycznego izolatów *L. monocytogenes* objętych badaniem, a następnie wpływu wybranych czynników stresowych na wzrost i przeżywalność badanych szczepów, zmiany cech fenotypowych oraz poziom ekspresji genów *sigB* i *agrA* istotnych dla wczesnych etapów adhezji i tworzenia biofilmu względem genu referencyjnego *gap*.

Odpowiedzi na postawioną hipotezę miały dostarczyć badania prowadzone zgodnie z metodyką przedstawioną w części „Materiał i metody”, w tym z wykorzystaniem różnych genetycznie szczepów *L. monocytogenes* poddawanych działaniu wybranych czynników stresowych. Przedstawione metody zostały starannie przemyślane i dobrane do zakresu prowadzonych badań, umożliwiając uzyskiwanie wiarygodnych i powtarzalnych wyników.

Rozdział „Wyniki” został starannie opracowany, wzbogacony wieloma rycinami, tabelami i fotografiami. Pierwszy etap badań prowadzono na 80 izolatach *L. monocytogenes* pochodzących z kolekcji Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum w Bydgoszczy, izolowanych wcześniej z materiału klinicznego oraz z żywności. W drugim etapie badania prowadzono na trzech wybranych szczepach w wariacie kontrolnym (bez czynnika stresowego) oraz po ekspozycji na warunki stresowe w celu określenia ich wpływu na cechy fenotypowe (tworzenie biofilmu, wrażliwość na antybiotyki i zdolność do ruchu) oraz poziom ekspresji genów *sigB* i *agrA* względem genu *gap*. Oceniano wpływ stresu osmotycznego, kwasowego i zasadowego, niskiej temperatury, ciepłego oraz cyklicznego zamrażania i rozmrażania, a także niedoboru lub nadmiaru składników odżywczych na namnażanie i przeżywalność badanych bakterii. Zastosowanie dużej liczby izolatów jednego gatunku pozwoliło uzyskać wiarygodne i bardzo istotne informacje na temat potencjalnych zachowań badanych bakterii w obecności różnych czynników stresowych w otoczeniu, a tym samym na ich wzrost, przeżywalność, zdolność wzrostu w postaci biofilmu i inne cechy utrudniające zwalczanie tych oportunistycznych patogenów, takie jak np. oporność na różne czynniki fizyczne i chemiczne czy antybiotyki. Zastosowanie badań molekularnych i ocena ekspresji genów związanych z czynnikami wirulencji i patomechanizmem pozwoliła ocenić, co wpływa na adaptację do warunków panujących w otoczeniu oraz które z czynników stresogennych mogą w zasadniczy sposób oddziaływać na zwiększoną wirulencję i przeżywalność bakterii tego gatunku w ekstremalnych warunkach oraz zmiany cech fenotypowych i genotypowych. Oceniono czynniki, które są powszechne w zakładach przetwórstwa spożywczego, tj. wysoka (procesy dezynfekcji i sterylizacji) i niska temperatura (przechowywanie produktów w chłodniach), niskie pH (owoce), zasolenie (przemysł ryb wędzonych), czy niedobór składników odżywczych. Ekspozycja pałeczek *L. monocytogenes* na czynniki stresowe

skutkowała zmianami cech fenotypowych i poziomu ekspresji genów *sigB* i *agrA*, a w konsekwencji zróżnicowaną przeżywalnością w środowisku bytowania.

Do ważnych spostrzeżeń należy to, że pochodzenie bakterii nie determinuje ich zdolności adaptacyjnych czy podatności na stres, a wynika z indywidualnych cech danego szczepu. Różne profile genów determinujących czynniki wirulencji i pochodzenie bakterii nie wpływały bezpośrednio z ich przynależności do określonej grupy serologicznej czy wrażliwości na antybiotyki. Za cenny ze względów praktycznych uważam wniosek, że niska dostępność substancji pokarmowych nie ograniczała wzrostu badanych szczepów *L. monocytogenes*, natomiast ich nadmiar promował wzrost badanych bakterii. Kolejnym cennym spostrzeżeniem jest wykazanie wyższej tolerancji na warunki stresowe szczepów izolowanych z materiału klinicznego, co może mieć znaczenie dla zrozumienia problemów związanych z przetrwałym zakażeniem *L. monocytogenes*.

Podsumowanie

W trakcie czytania rozprawy zauważyłam pewne braki i nieścisłości oraz błędy edytorskie, stylistyczne, interpunkcyjne, drobne pomyłki czy niezręczności językowe. Poniżej przedstawiam niektóre spostrzeżenia i sugestie:

- W przypadku niektórych odczynników i wykorzystywanego sprzętu brakuje bardziej dokładnych danych na temat ich wytwórców lub producentów, np. kraju, w którym jest siedziba firmy lub linku do strony internetowej. Nie podano bardziej dokładnej informacji na temat depozytorów szczepów wzorcowych, w tym np. *L. monocytogenes* IW 41 z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów.
- W Tabeli 7 (Wyniki) do 14 klastrow zostało przyporządkowanych 46 izolatów, w tekście wskazanych zostało 45 izolatów.
- Uważam, że przykładowe elektroforegramy produktów amplifikacji (Fotografie 1-4) dla badanych szczepów można było umieścić w części Metody.
- Pomimo, że cała dysertacja dotyczy jednego gatunku bakterii, sugeruję, aby tytuły rycin, tabel, schematów konstruować w sposób umożliwiający ich zrozumienie w sytuacji, gdy będą one przedstawiane jako odrębne części, poza tekstem pracy (przykłady: np. ryciny 17, 25, lub 29, podobnie niektóre tabele - np. 17, 18 lub 19 – w tytule zabrakło informacji, o szczepie jakiego gatunku chodzi Autorce).
- Uważam, że tekst byłby bardziej czytelny, gdyby przed i po myślniku, poza wyrażeniami wskazującymi na zakresy wartości, używana była spacja (np. w wyrażeniach „K-materiał

kliniczny, Ł-łosoś, W-wędliny, M-mrożonki warzywne” lub „kolor czerwony-wzrost w stosunku do wariantu podstawowego, kolor biały-bez zmian”, itp.).

- Odnośnie prezentacji wyników badań – przykładowo: Rycina 25 – po skrócie min w rozumieniu czasu jako wielkości fizycznej została użyta kropka, tymczasem jednostki miar, wag i innych wielkości fizycznych powinny być pisane bez kropki, nawet gdy nie zawierają ostatniej litery skracanego słowa; może to również zmieniać znaczenie użytego skrótu (np. min = minuta, min. = minimum).
- Wniosek 2: czy zdanie „Wykazano istotne statystycznie wirulencji a ich pochodzeniem” oznacza, że „wykazano istotne statystyczniewirulencji” w zależności od ich pochodzenia?
- W Piśmiennictwie należy ujednoczyć sposób pisania skróconych nazw czasopism (z kropką lub bez), ponadto w poz. 176 (s. 132) nie podano roku wydania.

Uwagi, które zostały przedstawione w treści recenzji rozprawy doktorskiej **Pani mgr Natalii Wiktorczyk-Kapischke** nie pomniejszają merytorycznej wartości oraz wysokiej oceny dysertacji i praktycznego znaczenia przedstawionych wyników oraz szacunku dla pracy, jaka została włożona w ich uzyskanie. Występujące w pracy niedociągnięcia nie zmieniają wartości przedstawionych danych. Analizując przebieg i wyniki rozprawy doktorskiej stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest wartościową monografią, zarówno w aspekcie naukowo-poznawczym jak i praktycznym. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą i wytrwałością oraz konsekwencją w dążeniu do zrealizowania założonych celów. Wykonane badania były wielokierunkowe, prawidłowo zaplanowane i wymagały umiejętności zastosowania nowoczesnych technik badawczych oraz dobrej znajomości piśmiennictwa. Dane przedstawione w pracy zostały bardzo szczegółowo opracowane i udokumentowane. Wyniki przedstawionych badań wskazują na niektóre przyczyny przeżywalności i oporności na czynniki stresowe oraz powody występowania szczepów przetrwałych *L. monocytogenes*. Stanowią tym samym cenny materiał źródłowy na temat chorobotwórczości tych bakterii. Tematyka dysertacji jest też bezpośrednio powiązana z bezpieczeństwem i ochroną zdrowia publicznego, ponieważ może mieć wpływ na planowanie efektywnych procedur eradykacji i ograniczanie negatywnego oddziaływania bakterii oportunistycznych w różnych obszarach życia, w tym w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, w budynkach ochrony zdrowia czy użyteczności publicznej. Badania nad rozprzestrzenianiem tych bakterii, ich epidemiologią, wirulencją, patomechanizmem i możliwościami zwalczania mają znaczenie nie tylko w poznawaniu samego drobnoustroju i zagrożeń związanych z jego występowaniem w otoczeniu człowieka, zwłaszcza szczepów wielolekoopornych, ale również pomóc w opracowywaniu właściwych algorytmów diagnostycznych i epidemiologicznych oraz skutecznych schematów terapeutycznych, w tym w

określeniu kierunków terapii spersonalizowanej. Z tych względów dysertację doktorską oceniam jako wartościową i cenną.

Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska autorstwa mgr Natalii Wiktorczyk-Kapischke spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. roku „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) i w związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie pani mgr Natalii Wiktorczyk-Kapischke do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ponadto, w związku z wysokim poziomem naukowym pracy oraz jakością wykonanych badań i praktycznym zakresem uzyskanych wyników, wnoszę o wyróżnienie dysertacji mgr Natalii Wiktorczyk-Kapischke.

Z poważaniem,

Dr hab. Urszula Kosikowska, prof. UM

