

Recenzja
Wniosek
Prodziekan
Wydziału Lekarskiego
ds. Nauki
M. Pawłowska

prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska



**ZAKŁAD DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ
i IMMUNOLOGII INFEKCYJNEJ**

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

15-269 BIAŁYSTOK

ul. J. Waszyngtona 15A

tel./fax +48857468571 POLSKA

zdmik@umb.edu.pl

Białystok, dn. 14.09.2023r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Natalii Wiktorczyk-Kapischke pt.: „*Wpływ czynników stresowych na wybrane cechy fenotypowe i genotypowe badanych szczepów *Listeria monocytogenes**” wykonanej w Katedry Mikrobiologii Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, którego kierownikiem jest Pani prof. dr hab. Eugenia Gospodarek-Komkowska. Promotorami pracy są : Pan dr hab. inż. Krzysztof Skowron, prof. UMK z Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz Pani dr hab. inż. Ewa Wałęcka –Zacharska , prof. UPWr z Katedry Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Zakażenia wywołane przez pałeczki *Listeria monocytogenes* stale pozostają problemem współczesnej medycyny. Wg raportów epidemiologicznych Światowej Organizacji Zdrowia listerioza pozostaje nadal jedną z najczęściej zgłaszanych chorób odzwierzęcych zarówno w krajach wysoko rozwiniętych jak i w krajach ubogich. Na przestrzeni ponad 20 lat XXI wieku odnotowano na świecie wiele epidemii listeriozy związanych głównie ze spożyciem zanieczyszczonej żywności. Pałeczki *Listeria monocytogenes* występują w środowisku naturalnym, mogą być izolowane z gleby, wody, gnijącej roślinności a także występują w żywności. Dotyczy to przetwórstwa w różnych zakładach przemysłu spożywczego np. produkty rybne, owoce morza, produkty mięsne, produkty mleczne oraz produkty roślinne jak : warzywa, owoce, nasiona zbóż, zioła, przyprawy i inne. Z uwagi na łatwość adaptacji w środowisku oraz wysoką tolerancję zmiennych warunków *Listeria monocytogenes* może długo bytować w miejscu zasiedlenia , a jeżeli jest to żywność staje się głównym źródłem zakażenia dla człowieka. Jest patogenem,

który po przełamaniu barier ochronnych w organizmie człowieka rozwija się wewnątrzkomórkowo. Rozwój zakażenia warunkowany jest zaangażowaniem wielu czynników wirulencji oraz czynników genetycznych jak np. budowa genomu, która charakteryzuje się dużą zmiennością i plastycznością wysp patogennych i genomowych. Powyższe czynniki warunkują występowanie oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe, do których dołączają się środowiskowe czynniki stresowe. Innym czynnikiem wzmacniającym narastanie antybiotykooporności jest często niewłaściwie prowadzona terapia, w tym nieukierunkowane i nadmierne stosowanie antybiotyków, a to z kolei prowadzi do transmisji i rozprzestrzeniania się szczepów wielolekoopornych. Ponadto, zasygnalizowany stres środowiskowy może w sposób istotny przyczynić się do rozwoju oporności. Czynniki stresowe (osmotyczny, kwasowy, temperaturowy) stosowane w przetwórstwie żywności zmieniają odpowiedź drobnoustrojów na antybiotyki m.in. poprzez zwiększenie minimalnego stężenia hamującego na wybrane antybiotyki, to zaś wpływa na skuteczność prowadzonej antybiotykoterapii w przypadku wystąpienia zakażeń *Listeria monocytogenes*.

Zakażenia wywołane przez omawiane drobnoustroje mogą mieć różny przebieg kliniczny, od postaci łagodnych do ciężkich zakażeń ogólnoustrojowych. Główną drogą zakażenia pozostaje nadal spożycie zanieczyszczonej żywności. Szczególnie ciężki przebieg zakażeń występuje u pacjentów w wieku starszym, u pacjentów z niedoborami odporności, z chorobami rozrostowymi, po przeszczepach, urazach, oparzeniach a także wśród pacjentów gdzie manifestacja kliniczna zakażenia dotyczy zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych i zakażeń ogólnoustrojowych (sepsa). Inną drogą zakażeń pałeczkami *Listeria monocytogenes* są zakażenia noworodków do których dochodzi na drodze transmisji przełożyskowej pomiędzy matką a płodem lub podczas porodu. Są one przyczyną poronień, obumarcia płodu lub wrodzonej postaci listeriozy u noworodków, której postać kliniczna w zależności od nasilenia objawów w określonych narządach wpływa niekorzystnie na dalszy rozwój niemowlęcia/dziecka.

Narastająca oporność bakterii na antybiotyki uwydatnia konieczność stałego, aktywnego monitorowania lekowrażliwości, zjadliwości drobnoustrojów, genetycznej zmienności, zmian fenotypowych zależnych od czynników środowiskowych tak, aby w sposób ciągły mogły być opracowywane i wdrażane właściwe programy profilaktyki, kontroli a w przypadku zakażeń programy skutecznego leczenia. W ten cykl badawczy wpisuje się przedstawiona mi do recenzji „Praca doktorska” Pani mgr Natalii Wiktorczyk-Kapischke.

Wyniki badań przedstawione w rozprawie doktorskiej były współfinansowane z dwu grantów : jeden z nich to Grant dla uczestników studiów doktoranckich na finansowanie zadania badawczego, drugi to Grant 4NCU na finansowanie zadania badawczego w ramach programu IDUB oraz dzięki środkom finansowym na podstawową działalność badawczą Katedry Mikrobiologii na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu.

Cele pracy przedstawione przez Panią mgr N. Wiktorczyk-Kapischke zostały przedstawione w dwu przedziałach; jako : cel główny i cele szczegółowe. Celem nadrzędnym była ocena wpływu wybranych czynników stresowych na cechy fenotypowe u badanych szczepów *L. monocytogenes*. Cele szczegółowe obejmowały : ocenę podobieństwa genetycznego izolatów *L. monocytogenes* oraz charakterystykę fenotypową różnych genetycznie szczepów; ocenę wpływu wybranych czynników stresowych na wzrost i przeżywalność badanych szczepów; ocenę wpływu czynników stresowych na zmiany cech fenotypowych oraz poziom ekspresji genu *sigB* i *agrA* względem genu referencyjnego *gap*. Biorąc pod uwagę, iż otrzymane wyniki badań mogą mieć potencjał aplikacyjny, wdrożeniowy, należy podkreślić, iż badany problem jest bardzo ważny nie tylko z poznawczego, naukowego ale też możliwości praktycznego ich wykorzystania.

Wyniki badań, które dotyczą powyższego zagadnienia zrealizowano w Katedrze Mikrobiologii Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem Pana dr hab. inż. Krzysztofa Skowrona, prof. UMK, we współpracy z Panią dr hab. inż. Ewą Wałęcką-Zacharską, prof. UPWr, z Katedry Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Państwo Promotorzy są ekspertami w omawianej tematyce badawczej o czym świadczą liczne publikacje i ich cytowania w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Recenzowana rozprawa zawiera rozdziały typowe dla dysertacji poznawczych : „Wstęp”, „Hipoteza badawcza i cel pracy”, „Materiał i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Wnioski”, „Streszczenie”, „Summary”, „Piśmiennictwo”, „Spis rycin”, „Spis fotografii”, „Spis tabel”. Całość poprzedza „Wykaz stosowanych skrótów” oraz informacja o artykułach, autorstwa Pani N. Wiktorczyk-Kapischke i inn.. Zostały one wykorzystane do napisania „Wstępu” (dwie publikacje) oraz jedna publikacja cytowana w rozdziale „Wyniki”. Praca obejmuje łącznie 151 stron maszynopisu i zawiera: 33 ryciny, 21 tabel , 4 fotografie oraz 301 pozycji piśmiennictwa, w tym 66 z ostatnich 5 lat , co stanowi 22% oraz 114 z ostatnich 10 lat , co stanowi niemal 38 %. Na końcu pracy dołączono „Zgodę Komisji Bioetycznej” działającej przy Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu na prowadzenie badań będących tematem rozprawy doktorskiej.

W obszernym „Wstępie”, w pierwszej jego części Autorka szczegółowo przedstawia charakterystykę gatunku *Listeria monocytogenes*. Szczegółowo przedstawia systematykę, omawia występowanie, adaptacje do warunków środowiskowych, problem zanieczyszczenia żywności, etiopatogenezę zakażenia, czynniki wirulencji wraz z czynnikami ryzyka, które usposabiają do wystąpienia zakażenia pałeczkami *L. monocytogenes*. Za bardzo cenne uważam szczegółowy opis etapów zakażenia pałeczkami *L. monocytogenes* wraz z charakterystyką genomu. Ta część „Wstępu” dużo „waży” w całości recenzowanej pracy, jest oparta o współcześnie obowiązującą wiedzę. Posiada dużą wartość naukową, dydaktyczną i praktyczną. Jest usystematyzowanym kompendium wiedzy przydatnym, dla

lekarzy, mikorbiologów, diagnostów, doktorantów i studentów. W drugiej części „Wstępu” Autorka koncentruje się na problemie wpływu na bakterie czynników stresowych stosowanych w przetwórstwie spożywczym. W sposób bardzo czytelny i przejrzysty na rycinach własnego autorstwa przedstawia mechanizmy odpowiedzi na stres temperaturowy, osmotyczny, kwasowo-zasadowy u *L. monocytogenes*. W ostatnim punkcie tego działu, porusza problem występowania oporności krzyżowej drobnoustrojów powstałej w wyniku narażenia na czynniki stresowe, jako ważny problem w zapewnieniu bezpieczeństwa i jakości żywności w przemyśle spożywczym.

Cele pracy zostały przedstawione w sposób bardzo czytelny, o czym już napisałam powyżej w mojej recenzji. Podkreślam przejrzysty podział na cel ogólny i cele szczegółowe, wg których Doktorantka prowadziła badania.

W rozdziale „Materiał i Metody” Autorka szczegółowo charakteryzuje materiał badawczy, który stanowiło 80 izolatów *L. monocytogenes* pochodzących z kolekcji Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu izolowanych z materiału klinicznego oraz z żywności. Protokół badawczy został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną. Dalej przedstawia metody badawcze zastosowane w badaniach mikrobiologicznych oraz do analiz biochemicznych. **Badania te zostały wykonane przy użyciu najnowszych technik współcześnie obowiązujących w mikrobiologii, biologii molekularnej, genetyce, biochemii.** Otrzymane wyniki badań zostały opracowane z zastosowaniem właściwie dobranych analiz i metod. Analiza statystyczna powstała przy współpracy Doktorantki z Panią dr hab. Katarzyną Buszko, prof. UMK oraz Panem mgr Kacprem Wnuk z Katedry Biostatystyki i Teorii Układów Biomedycznych UMK. **W tym miejscu należy mocno podkreślić umiejętność współpracy Pani mgr Natalii Wiktorczyk-Kapischke z innymi jednostkami badawczymi, co jest ważną umiejętnością i bardzo pozytywnie rokuje w Jej dalszej pracy naukowo-badawczej.**

W rozdziale „Wyniki” Autorka przedstawia bardzo dokładną, wielokierunkową analizę uzyskanych wyników badań. Są one zgodne z wytyczonymi wcześniej celami pracy. Obejmują ocenę podobieństwa genetycznego izolatów, szczegółową charakterystykę wrażliwości na antybiotyki oraz ocenę występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji. Oceniono występowanie 10 genów kodujących wybrane czynniki wirulencji. Wyodrębniono cztery profile genów wirulencji wśród badanych szczepów. Za niezwykle interesujące, a zarazem pionierskie wskazuję te wyniki badań w których Autorka wykazała istotnie statystyczny związek pomiędzy profilem genów wirulencji a pochodzeniem badanych szczepów. Kolejną grupą wyników o istotnym znaczeniu są te, które dotyczą szczegółowej analizy wpływu czynników stresowych na cechy fenotypowe i ekspresje wybranych genów wśród badanych szczepów *L. monocytogenes*. Dodatkowo ocena zdolności tworzenia biofilmu po ekspozycji na czynniki stresowe. **Te część wyników mających istotne znaczenie praktyczne w kontrolowaniu bezpieczeństwa żywności a także służące lepszemu poznawaniu patomechanizmów zakażenia pałeczkami *Listeria monocytogenes* uważam za bardzo ważne z**

naukowego znaczenia jak i ich możliwości praktycznego wykorzystania. Doktorantka podczas pracy eksperymentalnej, dokonując analizy otrzymanych wyników wykazała się szeroką, usystematyzowaną i ugruntowaną wiedzą z zakresu mikrobiologii i biologii molekularnej. Potwierdzeniem jest fakt, iż część opisanych wyników w rozprawie doktorskiej zostało już opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, o szczególnie wysokich wymogach merytorycznych i redakcyjnych. Uzyskane wyniki szczegółowo, a przy tym czytelnie i przejrzysto zostały zilustrowane w postaci **15 tabel, 23 rycin oraz 4 fotografii**. Dodatkowo, w tym miejscu pragnę podkreślić staranność wykonania i opracowania otrzymanych wyników wraz z ich wzorową prezentacją graficzną.

W „Dyskusji” Autorka omówiła problem zakażeń wywołanych pałeczkami *Listeria monocytogenes*, której źródłem są produkty spożywcze w Polsce i na świecie. Omówiła czynniki predysponujące do zakażenia, charakterystykę i przebieg choroby, zmienność objawów zależnych od źródła zakażenia, od czynników wirulencji, częstości występowania genów kodujących wybrane czynniki wirulencji, od profilu genetycznego drobnoustrojów a skuteczność terapii od oceny i monitorowania antybiotykowrażliwości. Dokonała szczegółowej analizy obecności *L. monocytogenes* w środowisku, jako problemu podczas produkcji żywności. Omówiła metody kontroli mikrobiologicznej żywności. We wnikliwej analizie zestawiała wyniki badań własnych w kontekście światowej literatury dotyczące odpowiedzi pałeczek *Listeria monocytogenes* na czynniki stresowe co staje się wyzwaniem w zwalczaniu drobnoustrojów w środowisku, przede wszystkim w przemyśle spożywczym. A to przekłada się na bezpieczeństwo i ochronę społeczeństwa w ramach szeroko rozumianej profilaktyki i ochrony zdrowia publicznego. Jak już podkreśliłam piśmiennictwo wykorzystane w przygotowaniu ocenianej rozprawy w niemal 38% stanowi współcześnie obejmującą wiedzę w tym temacie, w przedziale ostatnich 10 lat.

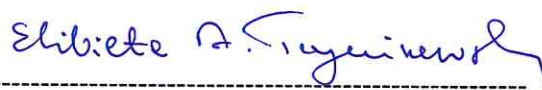
We „Wnioskach” kończących rozprawę Autorka zwraca uwagę na najważniejsze aspekty pracy formułując sześć konstruktywnych wniosków, będących pełną odpowiedzią na postawione cele. To właśnie wniosek drugi ma moc naukową i wskazuje na zależność pomiędzy występującymi wśród badanych szczepów profilami genów wirulencji a ich pochodzeniem. Jest to pierwsze doniesienie literaturowe. Podobnie wnioski : czwarty, piąty i szósty są istotne jako pierwsze doniesienia w polskich badaniach, opisują zaobserwowane trendy odpowiedzi drobnoustrojów na warunki stresowe, w tym zdolność bakterii do tworzenia biofilmu oraz wrażliwość na antybiotyki jako odpowiedź na stres środowiskowy. Są ważnym zasygnalizowaniem problemu i uzasadnionym wskazaniem aby kontynuować powyższe badania. A wszystko po to, aby poszukiwać skutecznych metod do walki z zakażeniami bakteriami *Listeria monocytogenes*.

Podsumowując, recenzowana dysertacja doktorska stanowi oryginalne i bardzo wartościowe opracowanie zarówno pod względem poznawczym jak i praktycznym. Posiada wysoką wartość merytoryczną. Jest cenną pozycją naukową. Dodatkowo, co mocno chce

podkreślić praca ta jest wykonana i opracowana bardzo starannie a strona edytorska, bez zastrzeżeń, jest przykładem wzorowej monografii.

Recenzowaną pracę oceniam bardzo wysoko. Rozprawa doktorska mgr Natalii Wiktorczyk-Kapischke spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (dz.U.2018r., 1669, z późn. zm.). **W związku z powyższym mam zaszczyt zwrócić się do Przewodniczącej Rady Dyscypliny Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy i Wysokiej Rady ds. Stopni Naukowych z wnioskiem o dopuszczenie mgr Natalii Wiktorczyk-Kapischke do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

W tym miejscu także, korzystam z przysługującego mi prawa jako recenzenta i wnioskuję do Pani Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy i Wysokiej Rady ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauk medycznych **o przyznanie wyróżnienia Pani mgr Natalii Wiktorczyk-Kapischke za wybitną, wyróżniającą się rozprawę doktorską, w której uzyskane wyniki mają wysoką wartość naukową i poznawczą. Ponad to, przekładają się na możliwość ich zastosowania i wykorzystania w praktyce.** Dodatkowo stwierdzam, że jest to pierwsze, pionierskie opracowanie w Polsce, dotyczące analizy wpływu stresu środowiskowego na wybrane cechy fenotypowe i genotypowe u bakterii *Listeria monocytogenes*. Podjęty przez Doktorantkę temat badawczy powinien być kontynuowany.



Prof. zw. dr hab. n. med. Elżbieta Anna Tryniszewska