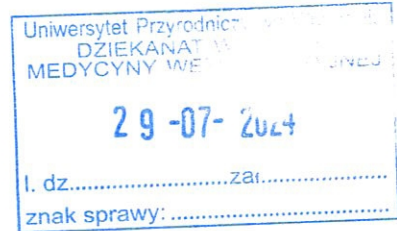




Poznań, dnia 23 lipca 2024 r.

Prof. dr hab. Michał Jank  
Katedra Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu



## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Janickiej pt. „ Opracowanie zestawu diagnostycznego do detekcji norowirusów w próbkach biologicznych i środowiskowych. Częstość występowania i znaczenie epidemiologiczne norowirusów” wykonanej w Zakładzie Mikrobiologii Katedry Patologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem Pani promotor dr hab. Barbary Bażanów, prof. UPWr.**

Opisywany w mediach na początku lipca 2024 roku przypadek masowych zakażeń przewodu pokarmowego, do których doszło u ponad tysiąca osób w miejscowości Torri del Benaco nad jeziorem Garda w północnych Włoszech, jednoznacznie wskazuje, że nawet w XXI wieku w krajach wysoko rozwiniętych możliwe jest masowe skażenie wody pitnej dostarczanej mieszkańcom wodociągiem. Zdarzenie to było spowodowane obecnością w sieci wodociągowej norowirusa, który prawdopodobnie przedostał się do zbiorników wody pitnej po trwających w okolicy tego miasteczka kilkanaście dni ulewnych deszczach. Norowirusy (NoVs), chociaż może niezbyt dobrze znane, stanowią jeden z głównych czynników etiologicznych zapalenia żołądka i jelit występującego u dorosłych i dzieci na świecie. Każdego roku wywołują miliony zachorowań, ponad 200 000 zgonów i liczone w miliardy dolarów straty ekonomiczne. Wirus może wywoływać zakażenia bezobjawowe, ale może także powodować powstawanie ognisk klinicznych w miejscach o dużym zagęszczeniu dzieci i osób dorosłych, takich jak żłobki, przedszkola, szkoły, sale zabaw, domy starości, szpitale, bazy wojskowe czy statki wycieczkowe. Szczepy norowirusa chorobotwórcze dla ludzi (HuNoV) są przenoszone głównie drogą oralno-fekalną poprzez zanieczyszczoną kałem lub wymiocinami żywność, wodę oraz powierzchnie. Ważne jest także to, że istotnym źródłem zakażenia mogą być produkty świeże i nietrwałe, w tym m.in. owoce morza oraz warzywa i klasyczne owoce. Choroba powoduje przede wszystkim zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego (biegunkę, wymioty, nudności, bóle brzucha, gorączkę, apatię i odwodnienie, utratę apetytu), a sporadycznie dreszcze. Mogą także wystąpić objawy neurologiczne. Infekcja zazwyczaj ustępuje w ciągu 3 dni, aczkolwiek skrajne odwodnienie może zagrażać życiu pacjentów. Infekcja nie ma leczenia przyczynowego, a dostępna diagnostyka jest stosunkowo kosztowna (głównie RT-PCR) i wymaga czasu.

Mając powyższe na uwadze należy docenić potencjalne znaczenie badań podjętych przez mgr Paulinę Janicką, która postawiła rozszerzyć dostępną wiedzę dotyczącą norowirusów opisując przebieg zakażenia kontrolnego myszy norowirusem mysim (MNV), stworzyć prototyp testu pozwalającego na przeprowadzenie szybkiej diagnostyki zakażeń norowirusem oraz ocenić możliwości przeciwwirusowego działania wybranych ekstraktów roślinnych przeciwko norowirusom. Tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej mgr Pauliny Janickiej jest więc jak najbardziej aktualna i ma bardzo duże znaczenie w świetle ochrony zdrowia publicznego. Jej realizację Doktorantka zaplanowała formułując trzy cele badawcze:



1. Ocenę wpływu norowirusa na organizm zwierzęcia modelowego poprzez ocenę wpływu zakażenia MNV na zmiany histopatologiczne u myszy szczepu C56B1/6J oraz markery stresu oksydacyjnego, w szczególności na:
  - a. antyoksydacyjne układy enzymatyczne: aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy glutationowej (GPx), reduktazy glutationowej (GR) w wybranych tkankach myszy C56B1/6J poddanych infekcji wirusem MNV
  - b. antyoksydacyjne układy nieenzymatyczne: całkowity statusu oksydacyjny (TOS), całkowitą pojemność antyoksydacyjną (TAC), stężenie dialdehydu malonowego (MDA) w wybranych tkankach myszy C56B1/6J poddanych infekcji wirusem MNV.
2. Opracowanie prototypu sprzętu diagnostycznego w postaci szybkich testów antygenowych do powszechnego użytku.
3. Badanie skuteczności wirusobójczej wyciągów roślinnych i surowców pochodzenia naturalnego.

Część wyników otrzymanych badań została opublikowana w renomowanych międzynarodowych czasopismach z listy JCR w dwóch oryginalnych artykułach naukowych.:

1. Janicka, P.; Stygar, D.; Chełmecka, E.; Kuroпка, P.; Miązek, A.; Studzińska, A.; Pogorzelska, A.; Pala, K.; Bażanów, B. Oxidative stress markers and histopathological changes in selected organs of mice infected with murine norovirus 1 (MNV-1) *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25 (7): 3614. <https://doi.org/10.3390/ijms25073614>.
2. Janicka, P.; Baluta, S.; Winiarski, J.; Halicka-Stępień, K.; Pogorzelska, A.; Cabaj, J.; Pala, K.; Bażanów, B. Sensitive electrochemical gold nanoparticle-based immunosensor for norovirus detection in food samples. *RSC Adv.* 2024, 14 (9): 6028-6040. <https://doi.org/10.1039/D3RA08586D>

W obu opublikowanych artykułach mgr Paulina Janicka jest pierwszym autorem. Niezależnie jednak od tego Doktorantka przedstawiła do recenzji rozprawę doktorską w postaci monografii i taka forma pracy została poddana ocenie przez Recenzenta. Taka sytuacja stwarza jednak pewnego rodzaju dysonans, ponieważ bez wątplenia wartość merytoryczna wyników przedstawionych w obu publikacjach została już wcześniej oceniona przez dwóch lub trzech niezależnych recenzentów podczas każdego procesu wydawniczego i trudno je ponownie recenzować.

Przedstawiona do recenzji praca mgr Pauliny Janickiej ma tradycyjny układ i składa się ze spisu treści, wykazu skrótów, wstępu, celu pracy, opisu materiałów i metod, omówienia wyników, dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim, bibliografii, listy tabel i listy rycin, załączników w postaci kopii ww. artykułów oraz suplementu. Praca jest napisana poprawnym językiem.

Rozdział pierwszy, czyli wstęp, składa się z dziewięciu podrozdziałów, z czego osiem z nich dotyczy norowirusów – m.in. przyczyn i konsekwencji infekcji, historii badań nad norowirusami czy patogenezy zakażenia i diagnostyki norowirusów. O wyborze omawianych



we wstępie zagadnień decydował chyba rodzaj prowadzonych badań i uzyskane wyniki, ponieważ ta część pracy, chociaż pozornie bardzo spójna, to jednak charakteryzuje niekiedy odległe od siebie zagadnienia, a niektóre z nich są przedstawione w sposób nieco zbyt powierzchowny. Dotyczy to szczególnie podrozdziału dotyczącego diagnostyki norowirusów, a ściślej biosensorów. Jest to narzędzie diagnostyczne stosunkowo nowe i mało znane, dlatego warto byłoby nieco szerzej przedstawić zasadę jego działania i potencjalne zalety. Z obowiązku recenzenta należy zauważyć, że w spisie treści nie znalazł się ostatni podrozdział wstępu zatytułowany „Wyciągi roślinne wykorzystywane w walce z norowirusami”, co zapewne było spowodowane przeoczeniem. Recenzent zakłada, że taki układ wstępu ma prowadzić czytelnika do kolejnego rozdziału prezentującego wspomniane wyżej cele pracy, które zostały poprawnie sformułowane. Trzeba jednak w tym miejscu zwrócić uwagę na fakt, że każdy z celów dotyczy zupełnie innych problemów naukowych. Zdaniem recenzenta wskazane cele badawcze są niezależne, wymagają osobnych modeli badawczych, osobnej metodyki i osobnego wnioskania. Ponieważ jednak łączy je jedno słowo, a mianowicie „norowirus”, to może warto byłoby w tym miejscu precyzyjnie uzasadnić ich połączenie w jednej rozprawie doktorskiej i podkreślić zalety takiego właśnie podejścia. A takiego uzasadnienia chyba zabrakło.

W zwyczajowo przyjętym układzie rozprawy doktorskiej kolejny rozdział opisuje wykorzystane materiały i metody. Teoretycznie w przedłożonej rozprawie ta część obejmuje metodykę wszystkich wykonanych analiz, ale w obecnej wersji pracy zawarte w tym rozdziale opisy nie pozwalają na dokładne odtworzenie wykonanych badań. Wydaje mi się, że Doktorantka powinna tę część podzielić na trzy podrozdziały, analogicznie do postawionych trzech celów badawczych pracy, a następnie szczegółowo je opisać. Wszak do badań na modelu zakażenia kontrolnego użyto innego norowirusa mysiego, w badaniach nad biosensorem użyto zarówno norowirusa mysiego jak i ludzkiego, zaś przy ocenie działania przeciwwirusowego ekstraktów roślinnych tylko norowirusa mysiego. Po zapoznaniu się z metodyką zakażenia kontrolnego myszy Recenzentowi nasunęły się następujące pytania:

- na jakiej podstawie wybrano dawkę użytą do zakażenia kontrolnego wirusem
- dlaczego przyjęto ocenę zmian patologicznych występujących u zwierząt po 3, 4 i 7 dniach od zakażenia kontrolnego
- dlaczego do oceny skuteczności zakażenia kontrolnego wykorzystano tylko wskaźniki potencjału oksy-redukcyjnego.
- czy biorąc pod uwagę objawy kliniczne zakażenia norowirusami u ludzi, w przypadku myszy należało także oczekiwać objawów klinicznych ze strony przewodu pokarmowego w przebiegu zakażenia norowirusami?

Po zapoznaniu się z metodyką stworzenia prototypu biosensora diagnostycznego zdaniem recenzenta zasadnym byłoby przeniesienie do tego podrozdziału informacji znajdujących się w Suplemencie. Ta część bowiem pracy jest najtrudniejsza dla potencjalnego czytelnika i wymaga chyba znacznie dokładniejszego przedstawienia metodyki wykonanych prac. Być może Doktorantka uznała, że te informacje znajdują się w publikacji dołączonej do pracy jako załącznik, ale z kolei z punktu widzenia formalnego przedstawiona do recenzji praca doktorska nie jest jednotematycznym cyklem prac, więc metodyka badań powinna być przygotowana niezależnie od tego, co jest w tej publikacji. Ponadto brak jest następujących



informacji:

- czym jest elektroda, czy jest ona wielokrotnego użytku czy też jest jednorazowa?
- skąd się wzięło przeciwciało użyte w teście? Czy zostało wykonane samodzielnie czy też kupione w komercyjnej firmie? Czy w teście opartym na biosensorach potrzebne jest jedno przeciwciało czy też para przeciwciał, podobnie jak w testach immunochromatograficznych?

W części metodyki dotyczącej oceny przeciwwirusowego działania ekstraktów roślinnych brakuje informacji dotyczących tego czy właściwości te były oceniane wobec jakiegoś konkretnego norowirusa (ta informacja pojawia się dopiero przy opisie wyników). Nie do końca jest także jasna metodyka oceny działania przeciwwirusowego analizowanych ekstraktów. Czy badanie cytotoksyczności w teście MTT należy utożsamiać z działaniem przeciwwirusowym? Podsumowując więc rozdział pracy dotyczący materiałów i metod – bez wątplenia wymaga on uzupełnień, aby ułatwić potencjalnemu czytelnikowi pełne zrozumienie sposobu wykonania prac badawczych. Dużą wartością byłoby przeniesienie metodologii badań nad biosensorami z Suplementu do części Materiały i metody.

W części wynikowej Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki i tutaj, podobnie jak w części „Materiały i metody” dużym ułatwieniem byłoby podzielenie tego rozdziału na trzy podrozdziały. Przedstawione wyniki zakażenia kontrolnego myszy norowirusem powinny zdaniem recenzenta jednoznacznie potwierdzić, że przeprowadzone zakażenie kontrolne było adekwatne. Tymczasem chyba nie jest jasne czy użyta dawka zakaźna nie była zbyt niska, ponieważ Doktorantka nie wspomina o jakichkolwiek objawach klinicznych występujących u myszy po zakażeniu. Doktorantka prowadziła badania na tkankach pobranych od myszy w określonych punktach czasowych po zakażeniu kontrolnym, ale nie wspomina o wykonaniu analiz mających na celu stwierdzenie obecności tego wirusa w pobranym materiale. Te pytania są kluczowe, ponieważ Doktorantka sama zauważa, że skutki zakażenia kontrolnego były łagodne, zaś zdaniem recenzenta stwierdzone w organizmie zmiany w potencjale red-ox niestety nie są zmianami patognomicznymi dla zakażenia norowirusem. Podobnie nieco dokładniej należałoby opisać wyniki dotyczące prac nad biosensorem. Trzeba bowiem zaznaczyć, że tworzenie biosensorów wymaga wiedzy, która nie mieści się w zakresie wiedzy posiadanej przez przeciętnych adeptów nauk przyrodniczych, a fakt, że część tych wyników znajduje się w Suplemencie, tylko zrozumienie uzyskanych wyników utrudnia. Tym niemniej na pewno dokładniejszego wyjaśnienia wymagają wyniki badań nad długotrwałą stabilnością stworzonego biosensora. Czy faktycznie stabilność dwutygodniowa to stabilność długoterminowa? Jakie inne czynniki mogą wpływać na uzyskiwane wyniki pomiarów? Jaki może być wpływ np. fali elektromagnetycznej na pracę biosensorów? Doktorantka deklaruje uzyskanie ponad 90% czułości i specyficzności testu. Ale jednocześnie stwierdza, że biosensor wykazał wzrost impedancji zarówno dla wirusa MNV jak i HuNoV. To by oznaczało, że biosensor rozpoznaje zarówno norowirusa mysiego jak i ludzkiego. A jeżeli tak to czy jest w stanie oba te wirusy różnicować? Dlaczego w ramach badań nad specyficznością nie próbowano wykorzystać jako kontroli negatywnej innego kaliciwirusa?

Wyniki badań aktywności przeciwwirusowej ekstraktów roślinnych są z punktu widzenia Recenzenta przedstawione w taki sposób, że niestety nie pozwalają na przeprowadzenie właściwego wnioskowania. Doktorantka bowiem o działaniu przeciwko



norowirusowi mysiemu wnioskuje na podstawie całkowitej zawartości fenoli (TPC), zawartości flawonoidów i zdolności przeciwutleniającej badanych ekstraktów. Czy jednak pod wpływem ekstraktów roślinnych faktycznie doszło do zmniejszenia liczby cząstek wirusa? Generalnie ta część pracy wymaga dopracowania, ponieważ w przypadku pracy z ekstraktami roślinnymi kluczowe znaczenie ma zawsze wskazanie substancji, na którą dany ekstrakt jest standaryzowany. Bez tego właściwie nie jesteśmy w stanie porównać ze sobą dwóch ekstraktów pochodzących z tej samej rośliny. Niestety w pracy brak jest informacji na ten temat.

Z przeprowadzonych badań Doktorantka wyciągnęła trzy wnioski, adekwatnie do trzech postawionych celów pracy. W treści wniosków znajduje się jednak także podsumowanie uzyskanych wyników, co w tym miejscu nie jest już potrzebne. Wniosek pierwszy, dotyczący zakażenia kontrolnego, bardzo dobrze odzwierciedla uzyskane wyniki, ponieważ wskazuje na niewielką skuteczność przeprowadzonego zakażenia kontrolnego myszy norowirusem. Wniosek drugi, dotyczący prac nad biosensorem diagnostycznym, wskazuje na uzyskanie oczekiwanego działania testu. Tutaj jednak rodzi się pytanie – czy stwierdzenie, że uzyskano oczekiwane działanie testu oznacza, że test taki może być oferowany komercyjnie? W trzecim wniosku Doktorantka wskazuje na wirusobójcze wobec norowirusów działanie ocenianych ekstraktów roślinnych. W opinii Recenzenta jednak nie potwierdzają tego uzyskane wyniki, ponieważ wnioskowanie nie jest oparte na wynikach analiz przeprowadzonych z użyciem metod potwierdzających spadek liczebności cząstek wirusa. Nie można także wnioskować o przydatności tych ekstraktów do leczenia zakażeń norowirusami, ponieważ nie prowadzono w tym kierunku żadnych badań.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Pauliny Janickiej ma wysoką wartość poznawczą. Szeroki zakres przeprowadzonych badań wymagał dużego nakładu pracy i zaangażowania Doktorantki. Uwagę zwracają także prace nad biosensorem diagnostycznym, ponieważ mogą mieć one dużą wartość aplikacyjną. Przed wydrukowaniem praca wymaga jednak poprawek, wyjaśnień i uzupełnień. Zdaniem Recenzenta korekty wymaga także tytuł rozprawy, ponieważ w pracy nie badano częstości występowania ani znaczenia epidemiologicznego norowirusów.

### **Wniosek końcowy**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Pauliny Janickiej pt. „Opracowanie zestawu diagnostycznego do detekcji norowirusów w próbkach biologicznych i środowiskowych. Częstość występowania i znaczenie epidemiologiczne norowirusów” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.). Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Pauliny Janickiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.