



prof. dr hab. inż. Remigiusz Panicz
Katedra Technologii Mięsa
Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Szczecin, 16.08.2024 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Janickiej pt. „Opracowanie zestawu diagnostycznego do detekcji norowirusów w próbkach biologicznych i środowiskowych. Częstotliwość występowania i znaczenie epidemiologiczne norowirusów” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Barbary Bażanów, prof. UPWr oraz dr Katarzyny Pali.

Podstawą opracowania recenzji jest:

- pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria prof. dr hab. Wojciecha Niżańskiego (MDDD0000.4100.5.2024), który zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 25 czerwca 2024 r. zwrócił się do mnie o opracowanie oceny ww. rozprawy doktorskiej;
- art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce;
- rozprawa doktorska w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie weterynaria Pani mgr Pauliny Janickiej pt. „Opracowanie zestawu diagnostycznego do detekcji norowirusów w próbkach biologicznych i środowiskowych. Częstotliwość występowania i znaczenie epidemiologiczne norowirusów”.

Znaczenie problematyki badawczej

Identyfikacja patogenów, poznanie mechanizmów wirulencji oraz opracowanie skutecznych metod leczenia objawów chorobowych to niegasnący kierunek w badaniach na całym świecie. Dotychczasowe badania poświęcone norowirusom nadal nie opowiedziały w pełni na pytania dotyczące reakcji organizmu w trakcie infekcji oraz nie wskazały jaka jest najskuteczniejsza metoda zwalczania tych patogenów. Jak ważne jest poznanie odpowiedzi na te pytania świadczą pojawiające się stale, choć w różnej skali, ogniska zakażeń. Powodują one rozmaite, a nierzadko również dokuczliwe, objawy chorobowe i często prowadzą do pogorszenia stanu zdrowia zainfekowanych osób. Konsekwencją jest wykluczenie zawodowe chorych, jak i straty na poziomie gospodarczym. Jedną z możliwości ograniczenia dolegliwości osób zainfekowanych norowirusami oraz zmniejszenia strat ekonomicznych są testy diagnostyczne pozwalające na identyfikację źródeł infekcji. Dostępność takich testów jest szeroka, ale ich

głównym mankamentem jest aplikacyjność, szczególnie dotycząca możliwości łatwego zastosowania testów w warunkach nielaboratoryjnych przez szeroką grupę użytkowników oraz krótki czas do uzyskania prostego w interpretacji wyniku. W związku z powyższym podjęcie przez mgr Paulinę Janicką badań dotyczących opracowania testu diagnostycznego do detekcji norowirusów w próbach biologicznych, jak i środowiskowych, jest w pełni uzasadnione i zgodne z aktualnie prowadzonymi badaniami naukowymi, i ma niezwykle istotny potencjał aplikacyjny.

Formalna ocena pracy

Oceniana praca stanowi zbiór dwóch powiązanych tematycznie oryginalnych publikacji, które ukazały się w czasopismach zamieszczonych w wykazie czasopism naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2024), tj. w International Journal of Molecular Sciences i RSC Advances. W obu publikacjach Doktorantka była pierwszym autorem, jednakże w przedstawionej dysertacji nie określono procentowego bądź opisowego wkładu poszczególnych autorów, co utrudnia ocenę zaangażowania autorów we współtworzenie koncepcji badań, prowadzeniu badań oraz redagowaniu tekstu publikacji. Publikacjom towarzyszy przygotowane przez Doktorantkę opracowanie, w którym zamieściła elementy, tj.: wykaz skrótów, wstęp, cele badawcze doktoratu, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie, summary (streszczenie w języku angielskim), bibliografia, lista tabel, lista rycin, załączniki oraz suplement. Manuskrypt łącznie stanowi 170 stron i zawiera 4 tabele (3 w podstawowym manuskrypcie, 1 w suplemencie), 74 ryciny (12 w podstawowym manuskrypcie, 62 w suplemencie), 177 pozycji piśmiennictwa (175 w podstawowym manuskrypcie, 2 w suplemencie) oraz 2 załączniki (powiązane tematycznie oryginalne publikacje). Struktura pracy generalnie odzwierciedla typowy dla tego typu opracowań układ. W mojej opinii rozdział „WSTĘP” to raczej „PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA”, zabrakło natomiast syntetycznego w formie i treści wprowadzenia w postaci „WSTĘPU”. Ogólne zakreślenie problematyki badań na początku dysertacji jest kluczowe dla zaznajomienia się z tematem i nadania głównej optyki pracy. Natomiast, przed zapoznaniem się z celem, celami szczegółowymi oraz hipotezami badań konieczne jest przedstawienie rozbudowanego tła uzasadniającego konieczność realizacji badań opisanych w dysertacji. Układ maszynopisu jest przejrzysty, aczkolwiek kolejność podrozdziałów we WSTĘPIE wydaje się nie w pełni logiczna, zwyczajowo wykorzystuje się na zasadę „od ogółu do szczegółu” bądź odwrotnie. W większości nazwy rozdziałów oraz podrozdziałów są poprawne, jednakże w przypadku rozdziału trzeciego proponowałbym formę „CELE BADAWCZE”, podrozdział 4.3

nazwałbym „Przebieg części doświadczalnej” bądź „Ogólny przebieg badań”. Niefortunna jest również nazwa podrozdziału 4.7.2 sugerująca, że analizie statystycznej zostaną poddane ekstrakty wyciągów roślinnych. Podsumowując tę część można stwierdzić, że oceniana rozprawa doktorska, pomimo kilku ww. mankamentów, przygotowana została starannie, co świadczy o dobrym warsztacie edytorskim Doktorantki.

Merytoryczna ocena pracy

Podstawą do ubiegania się mgr Pauliny Janickiej o stopień doktora jest cykl dwóch powiązanych tematycznie oryginalnych publikacji, które ukazały się w recenzowanych czasopismach zamieszczonych w wykazie czasopism naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2024). W związku z tym, że publikacje były oceniane przez niezależnych recenzentów, nie tylko w opinii recenzenta niniejszej pracy, są one wartościowe i wnoszą nową wiedzę. W części merytorycznej odniosę się do przygotowanego przez Doktorantkę manuskryptu, gdyż o wartości naukowej publikacji wypowiedzieli się wcześniej ich recenzenci, wskazując na celowość opublikowania tych prac.

Tytuł pracy doktorskiej „Opracowanie zestawu diagnostycznego do detekcji norowirusów w próbkach biologicznych i środowiskowych. Częstotliwość występowania i znaczenie epidemiologiczne norowirusów ” w sposób syntetyczny odzwierciedla zawarte w niej treści.

Informacje zawarte w rozdziale drugim (WSTĘP) w zasadzie trafnie i we właściwy sposób ukazują zagadnienia związane z uzasadnieniem podjęcia tematu. Doktorantka w zręczny sposób opisała liczne aspekty, które mają wpływ na rozprzestrzenianie się norowirusów (NoV) w środowisku, jak i wśród populacji ludzkich. Z dużą starannością opisała możliwe drogi transmisji oraz dotkliwe, a niejednokrotnie tragiczne, skutki infekcji NoV u ludzi. Dzięki precyzyjnemu doborowi zagadnień do omówienia tła dla swoich badań, Doktorantka jednoznacznie wykazała, że podjęty problem badawczy jest aktualny i wymaga szybkiego wprowadzenia do użytku szybkich, łatwych i ekonomicznie opłacalnych rozwiązań identyfikacji NoV. Na pochwałę zasługuje liczne (n = 131) piśmiennictwo źródłowe wykorzystane do przedstawienia zróżnicowanych zagadnień zawartych w tej części opracowania. Aczkolwiek, w mojej opinii ta część manuskryptu zawiera również kilka kwestii, którym nie poświęcono dostatecznej uwagi (prawdopodobnie ze względu na formę tego opracowania). W podrozdziale poświęconym ocenie przypadków infekcji wywołanych norowirusami (NoV) Doktorantka skupiła się głównie na przypadkach opisanych w pracach opublikowanych w latach 1999-2014. W mojej opinii brakuje analizy przypadków zakażenia

NoV, które wystąpiły w ostatniej dekadzie, tj. w latach od 2014 do 2023 Ciekawą formą reprezentacji tych danych byłoby przedstawienie w formie graficznej zmian liczby przypadków infekcji wywołanych NoV, które odnotowano na przestrzeni ostatnich lat. Jednak moją główną uwagę dotyczącą tej części pracy, a w szczególności podrozdziału 2.7, jest zbyt powierzchowna analiza technik detekcji NoV. Oprócz wspomnianej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym Doktorantka nie uwzględniła i nie omówiła w tym rozdziale innych dostępnych metod (m.in. ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym, testów immunochromatograficznych oraz immunoenzymatycznych), pomimo, iż powołuje się na tzw. „złoty standard” diagnostyki norowirusów w postaci RT-LAMP (strona 43 manuskryptu) oraz odnosi się do tych technik w rozdziale DYSKUSJA. W mojej opinii porównanie parametrów, takich jak: czułość, specyficzność, łatwość wykorzystania testu, koszt analizy, czas niezbędny do uzyskania wyników oraz innych parametrów dla wspomnianych ww. technik, pozwoliłoby na wskazanie konieczności opracowania testów wykorzystujących biosensory, co *de facto* jest jednym z głównych aspektów niniejszej dysertacji. Inną kwestią, która ma charakter techniczno-merytoryczny, jest logiczny przepływ informacji przez kolejne podrozdziały tej sekcji. Doktorantka właściwie wybrała zagadnienia w celu przejrzystego zobrazowania problematyki pracy, ale niedostatecznie je opisała w podrozdziałach 2.7 – 2.9 i w efekcie zabrakło logicznego związku przyczynowo-skutkowego dla przekazywanych informacji.

W rozdziale trzecim (CELE BADAWCZE DOKTORATU), Doktorantka poprawnie wskazała cele badawcze obejmujące: i) charakterystykę wpływu mysiego norowirusa (MNV) na zmiany histologiczne oraz markery stresu oksydacyjnego u myszy, ii) opracowanie prototypu sprzętu diagnostycznego oraz iii) zbadanie skuteczności ekstraktów i surowców z wybranych gatunków roślin do oceny ich wirusobójczego potencjału. W przypadku pierwszego celu Doktorantka, z właściwą starannością o szczegóły, precyzyjnie określiła działania, które będą realizowane w ramach pracy. W mojej opinii kolejne dwa cele nie zostały doprecyzowane. Drugi cel powinien zawierać informację jaki rodzaj prototypu sprzętu zostanie stworzony oraz który patogen będzie identyfikowany tym urządzeniem. Z kolei trzeci cel powinien zawierać dodatkowe informacje odnośnie do gatunków roślin, z których zostaną pozyskane ekstrakty, oraz względem którego wirusa będą testowane. Te podstawowe informacje, pomimo iż mogą się wydawać oczywiste bądź mogą stanowić częściowe powtórzenie informacji, są niezbędne dla zachowania informatywnego charakteru tej sekcji. Uważam również, że ta część manuskryptu powinna zawierać hipotezę badawczą dla podjętych działań oraz sposoby jej weryfikacji.

W ocenie zastosowanej w badaniach metodyki stwierdzam, że Doktorantka poprawnie wybrała i zastosowała wszystkie metody laboratoryjno-analityczne do przeprowadzania zaplanowanych doświadczeń. Podkreślenia wymaga szeroki i zróżnicowany wachlarz zastosowanych metod badawczych, poczynając od kontrolowanego zarażenia myszy, poprzez techniki histologiczne, oceny ekspresji genów, kinetyczne, mikroskopii świetlnej i elektronowej, kończąc na ekstrakcji. Wyróżniającym elementem pracy jest opracowanie prototypu szybkiego czujnika do wykrywania NoV. Doktoranta skrupulatnie w głównym tekście, jak i w rozbudowanym suplemencie, opisała szczegółowo proces tworzenia prototypu urządzenia oraz testu do detekcji NoV. Na uwagę zasługuje również zaawansowany warsztat badawczy Doktorantki związany z ekstrakcją wyciągów z roślin, w których następnie określono zawartość związków fenolowych oraz ich potencjalne oddziaływania wirusobójcze. Pomimo starań Doktorantki, w tej sekcji stwierdziłem kilka niedociągnięć. Począwszy od niefortunnego użycia terminu „zabarwiano” w odniesieniu do etapu barwienia preparatów histologicznych, aż do kluczowych braków w opisie metodyki. Przykładowo, w pracy niedostatecznie szczegółowo opisano sposób oceny parametrów histologicznych (np. liczba preparatów przygotowanych dla danego organu, oceniane parametry) oraz analizę statystyczną otrzymanych wyników. W pracy nie zamieszczono informacji dotyczących testów RT-PCR, testu interferonu gamma oraz testu neutralizacji wirusa u zakażonych osobników. Brak jest również informacji dotyczących detekcji przeprowadzonej na podstawie pracy Zeedan i Abdalhamed (2021). W podrozdziale 4.6 informacja o przygotowaniu ekstraktów została podana dwukrotnie, natomiast nie zamieszczono szczegółowych informacji dla tej procedury, które są bardzo ważne, bo jak podkreśliła sama Doktorantka w DYSKUSJI, jest to nowa technologia ekstrakcji na zimno.

W rozdziale WYNIKI, Doktorantka w naukowo poprawny sposób wyodrębniła podrozdziały, w których skrupulatnie starała się przedstawić otrzymane wyniki. Na uznanie zasługuje dobór formy prezentacji danych, z których znaczna część została zamieszczona w obszernym SUPLEMENCIE i jest poświęcona wynikom uzyskanym podczas przygotowywania czujnika wykrywającego NoV. Omawiane wyniki są konsekwentnie prezentowane i nawet informacje, które potencjalnie powinny znajdować się w podrozdziale poświęconym metodom opracowania testu (podrozdział 4.5), Doktorantka umiejętnie włączyła do podrozdziału 5.3.2.2 by w sposób sukcesywny i klarowny zaprezentować rezultaty z poszczególnych etapów badań. Jednakże i w tym rozdziale stwierdzono pewne niedociągnięcia. Nie znalazłem w manuskrypcie opisu wyników dla planowanego w metodyce porównawczego testu RT-PCR, testu interferonu gamma oraz testu neutralizacji wirusa

u zakażonych osobników. Na stronie 40 zamieszczona została Rycina 9a, jednakże w tekście brakuje informacji o wynikach, które przedstawia. Niedociągnięciem jest także brak szczegółowego opisu wyników dla parametru swoistości testu w podrozdziale 5.3.2.3.

W kolejnym rozdziale DYSKUSJA Doktorantka przytacza wiele wyników własnych badań i naukowo poprawnie konfrontuje je z rezultatami innych badań. Przykładowo, wskazuje, że zaobserwowany podwyższony poziom TOS w mózгах myszy, którym podano NoV, wzrasta wraz zaostrzeniem choroby, tak jak to zaobserwowali Karkhanei i wsp. (2021) w przypadku pacjentów z ostrą postacią infekcji wywołanej przez SARS-Cov-2. Innym dobrze przedstawionym elementem dyskusji jest określenie szerokiej możliwości aplikacyjnych opracowanego testu. Z kolei dyskusja poświęcona właściwościom antyoksydacyjnym oraz wirusobójczym ekstraktów jasno wskazuje na realną możliwość wykorzystania wybranych gatunków roślin, jak i metody ekstrakcji na zimno. Aczkolwiek, przygotowując tę część opracowania Doktorantka również nie ustrzegła się pewnych uchybień. W pierwszym akapicie tego rozdziału wskazała, że w pracy miała dwa cele pomijając trzeci cel, który był jednoznacznie wskazany w trzecim rozdziale, tj.: CELE BADAWCZE DOKTORATU. W dyskusji poświęconej zmianom zaobserwowanym w preparatach histologicznych zabrakło bardziej rozbudowanej analizy, która odpowiedziałaby na pytanie - Co wynika z zaobserwowania nacieków limfocytów w mózgu? Dyskusja dotycząca odpowiedzi enzymatycznej nosi znamiona zarówno wstępu, jak i opisu wyników. Opiswane są m.in. funkcje enzymów oraz różnice zestawione w Tabeli I. Doktorantka niedostatecznie przeanalizowała przyczyny zaobserwowanych różnic w aktywności enzymów w tkankach myszy zakażonych MNV oraz myszy z grupy kontrolnej, co może wynikać ze złożoności badanego problemu oraz wskazywać na konieczność kontynuowania prowadzonych niniejszych badań. Kluczowym elementem pracy było opracowanie testu wykorzystującego biosensory. Uważam, że charakterystyka dostępnych metod wykrywania NoV powinna się znajdować we WSTĘPIE, o czym już wspominałem wcześniej. Natomiast w tej sekcji należałoby położyć nacisk na porównanie cech opracowanego w niniejszej pracy testu identyfikacji NoV względem cech prezentowanych przez dostępne do tej pory metody. Ostatnia część dyskusji również nosi znamiona informacji, które powinny zostać przedstawione we WSTĘPIE. Charakterystyka roślin wybranych do badań oraz znaczenie ich ekstraktów powinny uzasadniać wybór tych gatunków przez Doktorantkę. W DYSKUSJI dotyczącej zdolności antyoksydacyjnej ekstraktów roślinnych przywołano wartości z Tabeli III, jednakże nie dochowano należytej staranności podczas podawania wartości, gdyż wartości dziesiętne są podawane arbitralnie. Z kolei wartość dla średniej zdolności antyoksydacyjnej

ekstraktu z korzenia imbiru podana jest błędnie. Nie zgadzam się ze stwierdzeniem Doktorantki „że metoda ekstrakcji na zimno ma porównywalną do innych metod bioaktywną zdolność przeciwutleniającą”. Jest to raczej niefortunne sformułowanie, ponieważ porównywano przeciwutleniającą ekstraktów roślinnych, a nie metody.

W pracy doktorantka wskazała trzy rozbudowane wnioski, które odnoszą się do każdego z trzech zasadniczych elementów pracy. Jednakże w mojej opinii nie są one wnioskami, ponieważ w znacznej mierze stanowią syntezę wyników otrzymanych w poszczególnych obszarach pracy. Wnioski wynikające z pracy powinny bazować na wynikach, ale także powinny pokazywać innowacyjny oraz aplikacyjny charakter zrealizowanych badań.

W pracy stwierdzono także błędy bądź drobne omyłki dotyczące warstwy językowej i edytorskiej, które oczywiście nie umniejszają wartości pracy i zdarzają się nawet doświadczonym pracownikom nauki. Jednakże z racji obowiązku poniżej wymieniam niektóre z nich (Strona/Linia w tekście opracowania):

Sa8/L22 – Oryginalnie jest „z”, a powinno być „ze”,

S9/L12 – Niepotrzebnie został przekreślony nawias otwierający,

S9/L13 – To zdanie nie jest poprawne stylistycznie „W badaniach serologicznych w kierunku bydłęcego norowirusa ...”,

S10/L2 – Brak spacji w tej konstrukcji „badaniaprzeprowadzono”,

S15/L11 – Oryginalnie jest kropka, a powinien być przecinek,

S17/L18 – Nazwę łacińską „*Cinnamomum verum*” należy podawać kursywą,

S17/L1317 – Brak konsekwencji w podawaniu nazw rodzajowych i gatunkowych w języku polskim. Poprawna forma powinna uwzględniać oba człony nazw, jak w przypadku jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea* L.),

S19/L17 i 18 – W zdaniu znajdują się niepotrzebne powtórzenia „chwytając ogon tuż przy podstawie ogon tuż u podstawy”,

S19/L27 – Zdanie zawiera błąd składnikowy „w plastikowych klatce”,

S20/L2 – W zdaniu należałoby użyć tylko jednego z określenia „zbadanie określenie”,

S20/L20 – Błąd w pisowni wyrazu „wykonywaano”,

S20/L 27-29 – Pomiędzy wartością a jednostkami % i °C nie wstawimy odstępu,

S37/L15 – Brak rozwinięcia skrótu NHS w WYKAZIE SKRÓTÓW,

S40/L6 – Współczynnik determinacji został podany jako R2. Powinno być podany w następującej formie R² (kwadrat),

S40/L13 – Niepoprawnie podana nazwa borówki (*Vaccinium L.*). Zapis powinien uwzględniać człony rodzajowe oraz gatunkowe, zarówno w języku polskim, jak i łacińskim,

S51/L7 i 8 – Zamiast „status edukacyjny” lepszym sformułowaniem byłby „poziom wykształcenia”,

S43 – Podpisy pod poszczególnymi słupkami histogramu (Rycina 12) zamieszczono w języku angielskim, a powinny być w języku polskim. Dodatkowo, tytuł niedokładnie wskazuje co przedstawia ta rycina.

Przedstawione w recenzji uwagi i pewne niedociągnięcia dysertacji nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę opracowania i mają na celu doprecyzowanie pewnych informacji i zagadnień, a także skłonią Autorkę do dyskusji z recenzentem. Liczę, że podczas publicznej obrony Doktorantka odniesie się do nich, a także dodatkowo do poniżej zamieszczonych kwestii:

1. Proszę porównać techniki detekcji NoV, wskazując ich wady i zalety oraz uzasadnić wybór techniki wykorzystującej biosensory.
2. Proszę doprecyzować warunki doświadczenia z myszami. Jaka była liczba klatek, w których znajdowały się myszy przed doświadczeniem? Ile myszy znajdowało się w każdej grupie doświadczalnej oraz na ile powtórzeń technicznych je podzielono?
3. Proszę o przedstawienie kwantyfikacji wyniku zawartego w stwierdzeniu „Wyniki uzyskane z pomiarów na czujniku były bardzo zbliżone do wyników RT-qPCR.”
4. Proszę wskazać, które próby kwalifikowane były jako próby biologiczne, a które jako środowiskowe w procedurze optymalizacji testu.
5. Proszę o wskazanie względem którego z wirusów był testowany potencjał wirusobójczy ekstraktów roślinnych.

Wniosek końcowy

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Pauliny Janickiej pt. „Opracowanie zestawu diagnostycznego do detekcji norowirusów w próbkach biologicznych i środowiskowych. Częstotliwość występowania i znaczenie epidemiologiczne norowirusów” stanowi nowe i samodzielne rozwiązanie problemu badawczego oraz nie budzi poważnych zastrzeżeń pod względem formalnym i merytorycznym. Doktorantka podjęła aktualny problem badawczy, scharakteryzowała wpływ norowirusa na organizm zwierzęcia modelowego, opracowała innowacyjny prototyp sprzętu diagnostycznego identyfikującego NoV oraz wykazała skuteczność wirusobójczą wybranych wyciągów roślinnych. Uważam, że właśnie stworzenie

prototypu sprzętu diagnostycznego ma wysoki potencjał aplikacyjny. W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Pauliny Janickiej spełnia w pełni kryteria stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora w Ustawie - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku i przedkładam do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o jej przyjęcie i dopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony.

Prof. Ramigierz Pami