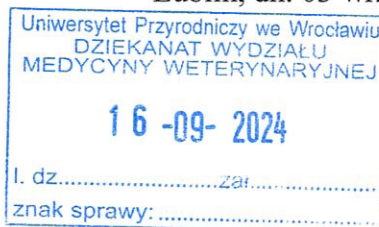


Prof. dr hab. Aneta Nowakiewicz

Lublin, dn. 03 września 2024 r



Recenzja

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

Podstawą formalną wykonania niniejszej recenzji jest Uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, z dnia 25 czerwca 2024 roku.

Tematyka przedstawiona przez Panią mgr Paulinę Janicką w niniejszej rozprawie doktorskiej obejmuje dość szeroką analizę norowirusów z uwzględnieniem wpływu na organizm gospodarza (w oparciu o zwierzę modelowe), opracowanie szybkiej metody diagnostycznej oraz ocenę skuteczności bójczej w stosunku do norowirusów, wyciągów roślinnych i surowców pochodzenia naturalnego.

Badania przedstawione przez Doktorantkę mają niezwykle aktualny charakter. Ponad połowę zakażeń przewodu pokarmowego u ludzi na świecie wywołują czynniki wirusowe, w tym norowirusy, rotawirusy, adenowirusy, astrowirusy i sapowirusy. W krajach rozwijających się ostre stany zapalne żołądka i jelit znajdują się wśród dziesięciu najczęściej występujących chorób zakaźnych. Również ostatnie dane z Polski (Państwowy Zakład Higieny) wskazują na niemalże dwukrotny wzrost liczby przypadków zakażeń norowirusami w bieżącym półroczu, w porównywalnym okresie w poprzednim roku. Co prawda zakażenia norowirusowe wywołują gwałtowne ale samoograniczające się infekcje, niemniej objawy związane z silnym odwodnieniem i zaburzeniami gospodarki wodno-elektrolitowej (szczególnie u dzieci i osób starszych) mogą prowadzić do poważnych zaburzeń, a nawet śmierci. Ponadto łatwość rozprzestrzeniania się, szczególnie drogą



oralno-fekalną oraz często występujące infekcje asymptomatyczne, związane z okresowym wydalaniem wirusa, czynią tę grupę patogenów trudną w prewencji i kontroli. Ostatnie badania wykazały również, iż dawka zakaźna w przypadku norowirusów jest znacznie niższa niż chociażby w przypadku SARSCoV-2 (odpowiednio 10 i 100-400 cząstek wirusowych). Ze względu na najczęstszą drogę zakażenia, należy również zaznaczyć, iż wirus ten jest relatywnie odporny na warunki środowiskowe, zatem może utrzymywać się przez dłuższy czas w kontaminowanej żywności.

Pomimo bardzo szeroko zakrojonych badań i obiecujących wyników, na dzień dzisiejszy nie ma zatwierdzonej szczepionki przeciwko norowirusom. Niewiele jest również wiadomo w zakresie biologii ludzkiego norowirusa, szczególnie jego replikacji, immunogenności i patogenności, z powodu braku możliwości w hodowli komórkowej czy na modelu zwierzęcym. Niemniej badania na modelu mysim w oparciu o norowirusa mysiego mogą zapewnić pewien wgląd w interakcję komórki gospodarza z norowirusem w trakcie infekcji, co może przełożyć się nie tylko na lepszą kontrolę infekcji ale również na wskazanie potencjalnych biomarkerów pozwalających na szybsze wykrycie obecności norowirusa w organizmie gospodarza. Zatem bieżące rozwiązania powinny opierać się na stworzeniu szybkich, powtarzalnych i ogólnodostępnych metod diagnostycznych, wykorzystywanych zarówno w diagnostyce klinicznej jak i szybkim wykrywaniu obecności wirusa w żywności, co zapobiegnie powstawaniu i rozprzestrzenianiu się infekcji. Drugim istotnym elementem powinny być badania mające na celu zapobieganie zakażeniom norowirusowym poprzez stworzenie skutecznych preparatów profilaktycznych (szczepionki), a także wzmacniające leczenie objawowe w przypadku już rozwiniętych objawów klinicznych.

Zatem tematyka podjęta przez Doktorantkę bardzo mocno wpisuje się w aktualne potrzeby diagnostyczne i terapeutyczne zakażeń norowirusowych, szczególnie w kontekście aplikacyjnym. W mojej opinii badania w zakresie interakcji gospodarz-wirus stanowi cenny wkład w poszerzenie dotychczasowej wiedzy w zakresie kolejnych czynników/markerów modulowanych w trakcie zakażenia norowirusami. Z drugiej zaś strony opracowanie innowacyjnego urządzenia wykrywającego antygeny norowirusa, które może być wykorzystane w szybkiej i powszechnej diagnostyce, a także ocena właściwości wirusobójczych wybranych ekstraktów pochodzenia naturalnego posiada niezaprzeczalne znaczenie aplikacyjne, ponieważ uzyskane wyniki z bardzo dużym prawdopodobieństwem zostaną skomercjalizowane w odpowiedzi na realne potrzeby rynkowe.



Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa posiada skompilowaną formę monografii oraz dwóch publikacji powiązanych tematycznie. Wyniki dotyczące oceny markerów stresu oksydacyjnego oraz zmian histopatologicznych w odpowiedzi na zakażenie mysim norowirusem w oparciu o model zwierzęcy (myszy), zostały opublikowane jako wieloautorski artykuł naukowy:

Oxidative stress markers and histopathological changes in selected organs of mice infected with murine norovirus 1 (MNV-1). **Paulina Janicka**, Dominika Stygar, Elżbieta Chelmecka, Piotr Kuroпка, Arkadiusz Miązek, Aleksandra Studzińska, Aleksandra Pogorzelska, Katarzyna Pala, Barbara Bażanów *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25(7), 3614; <https://doi.org/10.3390/ijms25073614> (IF=4,9). Na podstawie CRediT (oświadczeń autorów), można jednoznacznie stwierdzić iż udział Doktorantki w powstawaniu pracy był dominujący; Doktorantka deklaruje swój udział w tworzeniu idei pracy, gromadzeniu danych, opracowaniu metodyki, przeprowadzeniu wybranych części eksperymentalnych, przygotowaniu manuskryptu oraz poprawkach porecenzyjnych.

Aplikacyjna część pracy dotycząca opracowania i zastosowania innowacyjnego immunosensora, umożliwiającego szybkie wykrywanie norowirusa w różnych typach próbek żywności została również opublikowana jako wieloautorski artykuł:

Sensitive electrochemical gold nanoparticle-based immunosensor for norovirus detection in food samples. **Paulina Janicka**, Sylwia Baluta, Juliusz Winiarski, Kinga Halicka-Stępień, Aleksandra Pogorzelska, Joanna Cabaj, Katarzyna Pala, Barbara Bażanów. *RSC Adv.* 2024,14, 6028-6040. <https://doi.org/10.1039/D3RA08586D> (IF= 3,9). W tej pracy nie został przedstawiony udział autorów w postaci CRediT, natomiast w opisie współautorów zostało wyszczególnione, iż Doktorantka realizuje badania i przygotowuje pracę doktorską w zakresie stworzenia szybkiego zestawu diagnostycznego do wykrywania norowirusów w próbkach żywności. Pomimo, iż badania opisane w niniejszej publikacji stanowią centralny element doktoratu, sugeruję aby dla porządku zostały dołączone oświadczenia Doktorantki oraz pozostałych współautorów odnośnie udziału zadaniowego w powstawaniu pracy aby jednoznacznie potwierdzić wiodący udział Pani mgr Pauliny Janickiej w niniejszej publikacji.

Wyniki dotyczące bójczego działania wybranych ekstraktów roślinnych w stosunku do norowirusa zostały przedstawione w formie opisowej jako integralna część monografii.



Rozprawa doktorska została napisana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami dla tego typu opracowań: liczy 148 stron, w tym załączone kopie dwóch opublikowanych prac obejmują 26 stron. Pozostałe rozdziały to: wykaz skrótów, którymi Doktorantka posługiwała się w niniejszej pracy (2 strony), wstęp (10 stron), cele pracy (1 strona), materiał i metody (9 stron, niemniej część eksperymentalna została również szczegółowo opisana w dołączonych publikacjach), wyniki (21 stron, w tym 3 tabele i 12 rycin o dobrej rozdzielczości) dyskusja (14 stron), podsumowana trzema wnioskami, oraz piśmiennictwo, obejmujące łącznie 175 pozycji literaturowych. Praca została również opatrzona streszczeniem w języku polskim i w języku angielskim. Doktorantka załączyła także suplement szczegółowo opisujący zasadę działania prototypu urządzenia do wykrywania norowirusów w próbkach żywności, jego opis, metodykę przygotowania próbek do oznaczenia oraz procedurę walidacji. Suplement łącznie z rycinami obrazującymi uzyskane wyniki obejmuje 38 stron.

Ocena szczegółowa

Wstęp został podzielony na aż dziewięć krótkich podrozdziałów, w których Doktorantka naświetliła problem infekcji norowirusowych, ich znaczenie w epidemiologii, krótko scharakteryzowała cząsteczkę norowirusa w aspekcie najistotniejszych antygenów, historię badań nad norowirusami, dotychczas wykorzystywane techniki diagnostyczne, a także dwa podrozdziały zatytułowane „Stres oksydacyjny” oraz „Wyciągi roślinne wykorzystywane w walce z norowirusami”. Intencją Doktorantki było zapewne przybliżenie wszystkich poruszanych w pracy aspektów, niemniej poszczególne podrozdziały nie tworzą płynnego ciągu informacji. Być może gdyby wstęp został podzielony na mniej części, tj. *Ogólna charakterystyka wirusa, Patogeneza zakażeń i znaczenie epidemiologiczne, Dostępne metody i wyzwania diagnostyczne oraz Możliwości terapeutyczne*, poszczególne zagadnienia utworzyłyby spójną całość, stanowiącą wprowadzenie do planowanych badań.

Cele badawcze pracy zostały również przedstawione jako odrębne zagadnienia. Zabrakło mi nieco, syntetycznego wskazania scalającej myśli zaproponowanych badań, a przecież celem Doktorantki było udoskonalenie i skrócenie diagnostyki (zaprojektowanie prototypu urządzenia do wykrywania norowirusów oraz wykazanie potencjalnych markerów, wskazujących na rozwój infekcji norowirusowej) oraz udoskonalenie profilaktyki i leczenia wspomagającego zakażeń norowirusowych (aktywność bójcza preparatów pochodzenia naturalnego w stosunku do norowirusów)

Warto podkreślić, iż Doktorantka założyła przeprowadzenie wielokierunkowej analizy w



oparciu o badania *in vivo*, badania histopatologiczne i enzymatyczne, badania *in vitro* (ocena właściwości bójczych) oraz badania mające na celu analizę biosensoryczną, tj. przekształcenie sygnału biologicznego, pochodzącego z analitu w sygnał analityczny, przydatny w diagnostyce. Tak wielokierunkowe badania wymagają rozległej wiedzy i umiejętności, co z pewnością stanowi wartość dodaną pracy Doktorantki, dlatego z dużym uznaniem odnoszę się do tak przekrojowo skonstruowanej i zastosowanej metodyki.

Część eksperymentalna została dobrze zaprojektowana i jasno przedstawiona. Rozdział „Materiały i metody” obejmuje co prawda kilka stron przedstawiających ogólny opis wykorzystanej aparatury, odczynników, procedur oraz użytych materiałów biologicznych, w tym zwierząt laboratoryjnych, niemniej załączone publikacje oraz suplement doskonale dopełniają tę część, umożliwiając powtórzenie przedstawionych eksperymentów. Może nieco zbyt ogólnie została opisana część eksperymentalna dotycząca badania aktywności bójczej naturalnych związków roślinnych, mniemam jednak, że przy przygotowywaniu do publikacji tej części wyników Doktorantka metodycznie i szczegółowo przedstawi zastosowane protokoły oraz ich celowość na każdym etapie eksperymentu.

Rozdział „Wyniki” rozpoczyna się od prezentacji wyników opisujących zmiany histopatologiczne w różnych narządach u myszy zakażonych norowirusem. Zmiany te zostały zilustrowane 6 rycinami o bardzo dobrej jakości. Następnie Doktorantka przedstawiła wyniki dotyczące parametrów stresu oksydacyjnego, mierzonych w różnych tkankach (mózg, mózdzek, wątroba, płuca, nerka) u zwierząt zakażonych norowirusem w odniesieniu do grupy kontrolnej, które zostały zilustrowane za pomocą Tabeli 1.

Najciekawsze wyniki dotyczą jednak efektów stworzenia i oceny parametrów biosensora, który ma za zadanie wykrywać obecność norowirusa w próbkach żywności. Ocenę przeprowadzono wielokierunkowo, zarówno pod względem jakości jak i stabilności zastosowanej matrycy, selektywności w stosunku do innych patogenów generujących podobne objawy kliniczne jak norowirusy, a także różnych rodzajów próbek, które dobrano pod względem najczęstszego występowania w nich norowirusów (niepoddane obróbce technologicznej owoce morza, surowe warzywa i owoce). Jako kontrolę pozytywną wykorzystano metodę amplifikacji materiału genetycznego, poprzedzoną odwrotną transkrypcją, która uznawana jest za złoty standard w detekcji norowirusów. Badania wykonano zarówno na próbkach „ślepych” (próbki żywności bez obecności wirusa, płyn znad hodowli komórkowej oraz ich kompilacja), próbkach żywności zmieszanych z



cząsteczkami wirusa, próbkach żywności zmieszanych z innymi patogenami wywołującymi objawy zakażeń żołądkowo-jelitowych. Należy podkreślić, że badania przeprowadzono na reprezentatywnej puli próbek pozytywnych i negatywnych, co potwierdza wiarygodność uzyskanych wyników.

W przypadku analizy wirusobójczej Doktorantka przebadła 10 różnych ekstraktów roślinnych, analizując nie tylko aktywność wirusobójczą ale również zawartość fenoli, flawonoidów i zdolność antyoksydacyjną ekstraktów. Aktywność bójcza w przypadku wszystkich substancji była relatywnie wysoka (od 99,9 do 99,99%), natomiast ekstrakty różniły się znacznie w przypadku pozostałych oznaczanych parametrów.

Uzyskane wyniki stały się podstawą do interesującej dyskusji, ukierunkowanej głównie na unikalne dla badań Autorki zmiany histopatologiczne oraz zmiany w układzie red-oks, które mogą być przyczyną nasilających się objawów klinicznych. Doktorantka na tym etapie badań uzyskała dość ciekawe wyniki związane z wykazaniem zmian histopatologicznych w tkance nerwowej zakażonych norowirusem myszy, co oznacza że pomimo iż dotychczas norowirusy powiązane były głównie z zakażeniem przewodu pokarmowego i przyległych węzłów chłonnych, istnieje ryzyko iż również ta grupa wirusów może być potencjalną przyczyną zakażeń w obrębie układu nerwowego. W dobie coraz częstszych chorób na tle niedoborów immunologicznych, taki scenariusz bardzo szybko może stać się rzeczywistym zagrożeniem. Wyniki badań Doktorantki wykazały również iż w przypadku zakażenia norowirusem odpowiedź układu antyoksydacyjnego może być zróżnicowana w zależności od badanej tkanki, niemniej infekcja obniża całkowitą pojemność antyoksydacyjną, co finalnie może przyczyniać się do pogłębiania objawów klinicznych i pogorszenia stanu pacjenta.

Przyznam, że jestem pod wrażeniem osiągnięcia związanego z opracowaniem prototypu urządzenia, mającego na celu wykrywanie norowirusów w próbkach żywności. Doktorantka dołożyła wszelkiej staranności w ocenie możliwości detekcyjnych urządzenia, jego czułości oraz specyfiki. W przypadku wszystkich rodzajów badanych próbek wyniki potwierdziły oczekiwane działanie metody. Doktorantka jest już współtwórcą patentu metody wykrywania wirusa SARS CoV-2, co rokuje sukcesem wdrożeniowym zaprojektowanego urządzenia, natomiast zaproponowany w niniejszej pracy test cechuje się dodatkowo łatwością i szybkością wykonania (czas wykrywania to ok 20 min, w porównaniu do RT-PCR zajmującego od 6 do 48 godzin) i ze względu na niewielkie wymagania odnośnie jego



obsługi może być szeroko wykorzystywany na różnych etapach oceny bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności. Z informacji na stronie producenta wynika iż test ten jest już na etapie przygotowania (<https://fishfarmsolutions.eu/>).

Obiecujące wyniki Doktorantka uzyskała również w przypadku oceny wirusobójczych i przeciwtleniających właściwości 10 różnych ekstraktów przygotowanych na zimno. Część wyników badań Doktorantki potwierdziła wyniki uzyskane przez innych autorów, a część różniła się znacznie lub w niewielkim stopniu. Niemniej jest to zjawisko naturalne w przypadku oceny aktywności związków przeciwdrobnoustrojowych, zawartych w wyciągach roślinnych. Mogą się one różnić w znacznym stopniu ze względu na fakt iż na zawartość związków aktywnych ma wpływ bardzo wiele czynników, m. in. jakość okresu wegetacyjnego (ilość opadów, amplitudy temperatury), jakość gleby, okres wegetacji, w którym zebrano rośliny, a także sposób ekstrakcji związków aktywnych. Niemniej uzyskane wyniki badań wydają się obiecujące i z pewnością warte kontynuowania, szczególnie że w przypadku zakażeń norowirusowych stosowane jest leczenie objawowe, a substancje naturalne mogą wspomagać ten proces poprzez aktywność wirusobójczą, wspomaganie odpowiedzi immunologicznej, działanie przeciwzapalne i przeciwtleniające. Generalnie trudno jest precyzyjnie określić wszystkie mechanizmy przeciwwirusowego działania tego typu związków, niemniej z dużym prawdopodobieństwem można je określić jako działanie wspomagające przy zwalczaniu objawów klinicznych.

Dyskusja została podsumowana trzema wnioskami. Muszę odnieść się z dużym uznaniem do wyważonego sformułowania wniosków. Z pewnością potwierdzone obserwacje, stanowią doskonały punkt wyjściowy do dalszych badań mających na celu poszerzenie wiedzy w zakresie mechanizmów patogenezы i charakteru zmian histopatologicznych w przypadku infekcji norowirusowych, opracowania kolejnego testu, o jeszcze większej czułości i przekroju badanych próbek, czy poszerzenia badania wybranych ekstraktów roślinnych, które być może doprowadzi do skomercjalizowania uzyskanych wyników w postaci biopreparatów wspomagających zwalczanie zakażeń norowirusowych.

Mimo bardzo dużej staranności włożonej przez Doktorantkę przy przygotowaniu rozprawy, nie ustrzegła się Ona kilku w większości drobnych błędów, które z obowiązku recenzenta powinnam wskazać:

Tytuł pracy: o ile pierwsza część tytułu pracy jest zgodna z treścią doktoratu, o tyle co do drugiej części mam pewne wątpliwości. Nie bardzo widzę zbieżność przeprowadzonych



analiz z częstotliwością występowania norowirusów i ich znaczenia epidemiologicznego. Doktorantka nie prowadziła badań przesiewowych w kierunku występowania norowirusów jak również nie określała wskaźników epidemiologicznych, dlatego w mojej opinii tytuł pracy doktorskiej nie jest w pełni kompatybilny z treścią.

- str 19: pojawiły się drobne literówki o charakterze błędów korektorskich (powtórzenie wyrazów, klatce-klatkach)

- Pomimo, iż Tabela 1 stanowi odwzorowanie wyników prezentowanych w publikacji, sugeruję zaznaczyć różnice istotne statystycznie (można zastosować gwiazdkę lub inny kolor czcionki) dla lepszej czytelności.

- str. 49: sugeruję zmienić „chorobie klinicznej” na „objawom klinicznym”

- str 59: wniosek nr 1 : status oksydacyjny czy stres oksydacyjny?

Wszystkie te niedociągnięcia mają jedynie charakter porządkowy i z pewnością nie wpływają na bardzo wysoką ocenę całokształtu rozprawy.

W związku z powyższym jednoznacznie stwierdzam, iż recenzowana przez mnie rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Janickiej pt. *„Opracowanie zestawu diagnostycznego do detekcji norowirusów w próbkach biologicznych i środowiskowych. Częstotliwość występowania i znaczenie epidemiologiczne norowirusów”*, odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 1 lipca z 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn zm). Należy podkreślić iż w myśl ustawy praca stanowi oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej, co powinno być celem doktoratu wdrożeniowego, a który Doktorantka bezsprzecznie osiągnęła.

Dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Pauliny Janickiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysokie walory naukowe i aplikacyjne uzyskanych wyników, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Aneta Nowalucywa

