

Dr hab. Robert Czajkowski, prof. UG
Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych
Tel: +48 58 5236333
Fax: +48 58 5236426
E-mail: robert.czajkowski@ug.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Beaty Gromadzkiej zatytułowanej:
„Konstrukcja i zastosowanie cząstek wirusopodobnych (VLPs) do monitorowania i
zapobiegania niektórym infekcjom wywołanym przez wirusy RNA”,
wykonanej pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Bogusława Szewczyka**

Historia szczepionek i szczepień przeciwko bardzo wielu chorobom zakaźnym trapiącym ludzkość jest przykładem wielkiego tryumfu nauki i myślenia naukowego. Początki idei zastosowania szczepień sięgają XVIII wieku, kiedy to brytyjski doktor i naukowiec Edward Jenner z powodzeniem zastosował preparaty zawierające wirusa ospy krowiej (wirus krowianki), do zapobiegania infekcjom ospy prawdziwej u ludzi. W chwili obecnej, po prawie 250 latach od tych badań, szczepienia są postrzegane jako jedno z największych osiągnięć ludzkości nie tylko ostatnich stuleci, ale również zapewne będą tak postrzegane i w XXI wieku. Jak podaje Światowa Organizacja Zdrowia (WHO - World Health Organization) w chwili obecnej istnieje 25 szczepionek dostępnych globalnie, a 15 następnych jest w końcowej fazie ich opracowania. Szacuje się, że coroczne stosowanie tych szczepionek chroni przed śmiercią nawet 100 milionów ludzi.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Beaty Gromadzkiej, wykonana pod kierunkiem Pana prof. Bogusława Szewczyka w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed w Gdańsku podejmuje temat wykorzystania tzw. cząstek wirusopodobnych (ang. - *virus-like particles*, VLPs) do monitorowania i zapobiegania zakażeniom powodowanym przez wirusy RNA. Wirusy RNA, czyli takie, których materiał genetyczny istnieje w postaci kwasu rybonukleinowego, powodują epidemie ludzi i zwierząt w skali globalnej. Do wirusów RNA zalicza się takie niebezpieczne patogeny jak np. wirus zapalenia wątroby typu C (HCV), wirus Ebola, wirus SARS, wirus grypy, wirus HIV powodujący AIDS, czy ostatnio najczęściej dyskutowany i badany wirus SARS-CoV-2, który był czynnikiem sprawczym pandemii COVID-19. Do chwili obecnej tylko dla niektórych chorób powodowanych przez wirusy RNA udało się opracować skuteczne szczepionki i metody leczenia powodowanych przez nie

chorób. Brak efektywnych szczepionek przeciwko chorobom powodowanym przez wirusy RNA skutkuje poszukiwaniem nowych, alternatywnych, a przez to także innowacyjnych, metod immunizacji zarówno ludzi jak i zwierząt.

W swojej pracy doktorskiej Doktoranta wykorzystata wspomniane wcześniej cząstki wirusopodobne (VLPs) do monitorowania i zapobiegania zakażeniom powodowanym przez wirusa grypy typu A, wysokopatogennego szczepu H5N1 (*pierwszy model badawczy*) oraz wirusa gorączki krwotocznej królików (RHDV) (*drugi model badawczy*). Temat wykorzystania cząstek wirusopodobnych do opracowywania szczepionek jest innowacyjny i niewątpliwie posiada bardzo duży potencjał aplikacyjny. Z tego względu, temat pracy doktorskiej uważam za niezwykle istotny i posiadający wszystkie walory bardzo dobrych badań naukowych.

Rozprawa doktorska Pani mgr Beaty Gromadzkiej została przygotowana w postaci monografii, w języku polskim (praca zawiera również streszczenie w języku angielskim) i ma formę powszechnie stosowaną w opracowaniach eksperymentalnych tego rodzaju, to znaczy zawiera takie rozdziały jak: Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki oraz Dyskusję wraz z Podsumowaniem i Bibliografią. Rozprawa doktorska jest bardzo bogato ilustrowana - zawiera wiele rycin (ponad 50) i tabel, bardzo dobrze ilustrujących tekst pracy. Autorka w swojej pracy przytacza 268 oryginalnych eksperymentalnych i przeglądowych prac naukowych, które wykorzystuje do dyskusji otrzymanych przez Nią wyników eksperymentów. **Za bardzo cenną część pracy uważam wykaz publikacji i patentów, które są efektem niniejszej rozprawy doktorskiej, oraz wykaz szkoleń i staży odbytych przez Doktorantkę w czasie wykonywania tejże pracy.** Te elementy bardzo dobrze ilustrują naukową i aplikacyjną ważność badań prowadzonych przez Panią mgr Beatę Gromadzką w ramach Jej pracy doktorskiej.

Szczegółowe omówienie poszczególnych części rozprawy doktorskiej:

Wykaz stosowanych skrótów - wykaz skrótów został bardzo dobrze przygotowany, jest niezwykle rozbudowany i zawiera wszystkie skróty stosowane przez Doktorantkę w pracy doktorskiej. Taki wykaz bardzo ułatwia śledzenie treści pracy i bardzo dobrze, że znalazł się na jej początku.

Streszczenia w języku polskim i języku angielskim - tożsame w formie i treści, przedstawiają główne założenia pracy, stosowane modele i metody badawcze, otrzymane wyniki oraz ich wpływ na dalsze badania oraz na rozwój dyscypliny i dziedziny naukowej. Streszczenia są bardzo dobrym wprowadzeniem do pracy doktorskiej i bardzo dobrze ilustrują problem badawczy, którego rozwiązania podjęła się Doktorantka.

Wstęp - na 38 stronach wstępu, Doktorantka, z dużą biegłością, wprowadza czytelnika w zagadnienia pracy doktorskiej. Kolejno przedstawia takie zagadnienia jak: szczepionki i ich rodzaje, historię opracowania szczepionek i ich skład, porównuje tradycyjne preparaty szczepionkowe i szczepionki oparte na cząstkach wirusopodobnych, przedstawia rodzaje cząstek wirusopodobnych oraz metody ich wytwarzania.

- Na stronie 20 rozdziału Wstęp, Autorka podaje, że jedną z zalet szczepionek opartych na cząstkach wirusopodobnych jest to, że nie zawierają one alergenów (Rysunek 2, żółta ramka po lewej stronie). Czy mógłbym prosić Doktorantkę o omówienie pokrótce tego zagadnienia? Z czego wynika brak alergenicności cząstek wirusopodobnych?

W dalszej części Wstępu, Doktorantka przedstawia także systemy opracowane i wykorzystywane do produkcji cząstek wirusopodobnych. W ostatniej części tego rozdziału zostały natomiast bardzo dokładnie opisane i przedstawione dwa modele badawcze: wirus grypy typ A H5N1 oraz wirus gorączki krwotocznej królików (RHDV). **Wstęp jest wyczerpujący i szczegółowy. Został napisany językiem naukowym. Doktoranta cytuje wiele prac innych autorów, również prace najnowsze. Ponadto, Wstęp jest bardzo bogato ilustrowany, zawiera liczne schematy i zdjęcia. Elementy ilustracyjne Wstępu zostały bardzo dobrze przygotowane.** Moim zdaniem, część Wstępu, poświęcona szczepionkom opartym na cząstkach wirusopodobnych, mogłaby zostać w przyszłości wydana jako krótka publikacja przeglądowa w języku polskim bądź w języku angielskim. Uważam, że Pani Beata Gromadzka powinna rozważyć taką możliwość zaprezentowania informacji obecnych w tym rozdziale pracy doktorskiej, szerszej publiczności.

Cel pracy - został zaprezentowany na jednej stronie. Autorka przedstawiła cel nadrzędny badań oraz cele dodatkowe, wyjaśniła wybór modeli badawczych do swojej pracy doktorskiej oraz pokrótce opisała etapy pracy dla każdego z wybranych modeli badawczych. **Cel pracy jest jasno i klarownie sprecyzowany - przedstawienie celu pracy nie budzi moich żadnych zastrzeżeń.**

Materiały i Metody - te dwa osobne rozdziały przedstawiają bardzo dokładnie wszystkie materiały laboratoryjne oraz sprzęty wykorzystane w pracy doktorskiej i podobnie, wszystkie metody, których Autorka użyła w swojej pracy. **Oba rozdziały są wyczerpujące - zawierają bardzo dokładne opisy procedur razem z odnośnikami do literatury - tak szczegółowe przedstawienie materiałów i metod nie budzi wątpliwości, że eksperymenty wykonane przez Doktorantkę będzie można w przyszłości powtórzyć.** Ponadto, liczba metod przedstawionych w pracy

doktorskiej bardzo jasno uwidacznia ogrom pracy włożonej przez Autorkę w przeprowadzenie eksperymentów i analiz.

Wyniki - rozdział ten jest najbardziej interesujący, bo prezentuje bardzo dokładnie kolejne etapy tworzenia cząstek wirusopodobnych dla obu modeli badawczych oraz wyniki eksperymentów, w których opracowane cząstki wirusopodobne zostały wykorzystane do immunizacji odpowiednio kur (VLPs dla wirusa grypy A H5N1) i królików (VLPs dla wirusa RHDV).

W pierwszej części, Doktorantka najpierw przedstawia wyniki amplifikacji i charakterystyki genów kodujących białka hemaglutyniny (HA), neuraminidazy (NA) i białka rdzenia (M1) wirusa grypy typu A H5N1, później opisała wyniki optymalizacji metody produkcji cząstek wirusopodobnych wirusa grypy typu A oraz kolejne warianty cząstek wirusopodobnych, które zawierają na swojej powierzchni hemaglutyninę, hemaglutyninę oraz białko rdzenia M1, a ostatecznie także cząstki wirusopodobne zawierające wszystkie trzy białka (hemaglutyninę, neuroaminidazę i białko rdzenia M1). Nasuwa się tutaj następujące pytanie:

- **Czy zasadne byłoby opracowanie kolejnego konstruktów ekspresyjnego, zawierającego razem geny kodujące hemaglutyninę i neuroaminidazę? Albo konstruktów zawierających razem geny kodujące białko rdzenia M1 i neuroaminidazę? Te warianty ekspresyjne białek wirusowych nie zostały zaplanowane w pracy doktorskiej (zgodnie z Rysunkiem 22 na stronie 94), ale może warto byłoby je również rozważyć?**

Kolejnym zagadnieniem opisanym w rozdziale Wyniki było badanie właściwości immunogennych otrzymanych wariantów cząstek wirusopodobnych wirusa grypy typu A H5N1. W tym celu Autorka wykonała szereg eksperymentów obrazowania z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz zaszczepiła kury preparatami zawierającymi różne warianty cząstek wirusopodobnych (opisane wcześniej) w celu zbadania dynamiki odpowiedzi immunologicznej u zaszczepionych zwierząt. Analiza otrzymanych wyników pozwoliła stwierdzić, że wszystkie skonstruowane cząstki wirusopodobne wirusa grypy typu A H5N1 cechowały się zdolnością do indukowania produkcji przeciwciał neutralizujących, jakkolwiek nie wszystkie warianty w takim samym stopniu. W eksperymentach z wykorzystaniem cząstek wirusopodobnych i kompletnego/niekompletnego adjuwantu Freund, Doktorantka wykazała brak statystycznie istotnie różnic w odpowiedzi immunologicznej między preparatami zawierającymi tylko cząstki wirusopodobne, a takimi, które zawierały kompletny/niekompletny adjuwant Freund, co jednoznacznie wskazuje na wysoką samoistną immunogenność cząstek wirusopodobnych. **Taka**

wysoka immunogenność jest dobrym prognostykiem w aplikacji opracowanych cząstek wirusopodobnych jako szczepionek.

Bardzo ciekawymi badaniami są te poświęcone zanalizowaniu skróconej formy białka hemaglutyniny (tzw. HA-stalk) jako uniwersalnego źródła odpowiedzi immunologicznej przeciwko różnym typom wirusa grypy. W celu zweryfikowania, czy krótka forma białka hemaglutyniny byłaby immunogenna i powodowała powstawanie przeciwciał przeciwko wszystkim typom grypy, Doktoranta zaprojektowała syntetyczny skrócony gen hemaglutyniny, a później wykonała eksperymenty transfekcji komórek ssaczych wektorami niosącymi geny kodujące różne warianty białka HA-stalk. **Badania te, w moim odczuciu, wydają się być niedokończone.** Z uwagi na bardzo interesujący pomysł badawczy oraz obiecujące wyniki wstępne tych prac nasuwa mi się tutaj następujące pytanie:

- **Czy Doktorantka mogłaby zaprezentować i krótko omówić kolejne eksperymenty poświęcone analizie skróconej formie białka hemaglutyniny (HA-stalk) i możliwe do otrzymania wyniki, tak by jednoznacznie można byłoby określić przydatność tego białka jako uniwersalnej szczepionki przeciwko grypie?**

Drugim modelem badawczym wykorzystanym przez Doktorantkę w Jej pracy doktorskiej był wirus gorączki krwotocznej królików. W tej części pracy Pani Beata Gromadzka zastosowała podobną metodykę badawczą oraz podobnie, jak we wcześniejszej części, opisała otrzymane wyniki konstruowania i produkcji cząstek wirusopodobnych tego wirusa. Większa część podrozdziału dotyczącego tego zagadnienia jest poświęcona przygotowaniu i optymalizacji produkcji cząstek wirusopodobnych. Najbardziej interesującymi naukowo są oczywiście wyniki eksperymentów typu „challenge” w których Doktorantka potwierdziła skuteczność aplikacji cząstek wirusopodobnych jako szczepionki przeciwko zakażeniom wywołanym wirusem gorączki krwotocznej królików u tych zwierząt. **Jak napisano na stronie 122 rozprawy doktorskiej, wszystkie zwierzęta zaszczepione eksperymentalną szczepionką zawierającą cząstki wirusopodobne wirusa gorączki krwotocznej królików przeżyły eksperyment typu „challenge”.** W tym miejscu należy bezwzględnie docenić pracę Doktorantki i Jej wyniki. W czasie pracy doktorskiej udało się Jej bowiem sformułować hipotezę badawczą, przeprowadzić wszystkie potrzebne i wymagane eksperymenty oraz otrzymać obiecujące wyniki, a co najważniejsze także produkt (szczepionkę), możliwy do zastosowania komercyjnego w niedługim czasie. Rzadko zdarza się, żeby w trakcie pracy doktorskiej udało się przejść od pomysłu i idei do komercyjnego rozwiązania problemu badawczego - w tym przypadku to miało miejsce.

W rozdziale Wyniki, Doktorantka opisała również próby opracowania testów diagnostycznych z wykorzystaniem cząstek wirusopodobnych wirusa gorączki krwotocznej królików. **Również te badania zakończyły się sukcesem. Wraz z Państwowym Instytutem Weterynaryjnym PIB w Zduńskiej Woli opracowano dwa testy diagnostyczne. Testy te są wykorzystywane obecnie do monitorowania występowania wirusa krwotocznej gorączki królików na terenie Polski. Jest to kolejny sukces Doktorantki i Jej pracy doktorskiej.**

Rozdział Wyniki kończy się krótkim podsumowaniem, które bardzo dobrze i w sposób systematyczny przedstawia wszystkie najważniejsze otrzymane przez Doktorantkę wyniki.

Dyskusja - na 14 stronach Autorka dyskutuje wyniki własnych badań z dostępnymi danymi literaturowymi. Ten rozdział pracy doktorskiej jest, obok rozdziału Wyniki, najbardziej interesujący. Autorka najpierw dyskutuje wyniki dotyczące cząstek wirusopodobnych wirusa grypy typu A H5N1, a następnie wyniki otrzymane dla cząstek wirusopodobnych wirusa gorączki krwotocznej królików. **Dyskusja jest wyczerpująca, Doktorantka bardzo dobrze rozeznaje się w dostępnej literaturze przedmiotu i bardzo umiejętnie konfrontuje wyniki własnych badań i tych opisanych w literaturze. Dyskusja kończy się podsumowaniem jeszcze raz prezentującym najważniejsze wyniki i osiągnięcia pracy doktorskiej. Podsumowując, uważam, że dyskusja wyników została przeprowadzona rzetelnie i w sposób prawidłowy.**

Bibliografia - rozdział zawiera 268 pozycji literaturowych, bardzo dobrze pasujących do tematyki pracy doktorskiej. Rozdział ten zawiera również prace nowe (2021, 2022 rok), co wskazuje, że Autorka na bieżąco śledzi literaturę przedmiotu oraz adekwatnie modyfikuje swoją pracę naukową analizując publikacje innych grup badawczych.

Przygotowanie pracy doktorskiej i uwagi edytorskie:

Pod względem przygotowania edytorskiego i graficznego oceniam pracę bardzo wysoko. Praca jest napisana i przygotowana niezwykle starannie, Autorka z biegłością posługuje się językiem naukowym. Liczne i bardzo dobrze graficznie i merytorycznie przygotowane rysunki i schematy idealnie uzupełniają tekst pracy doktorskiej. Występujące w pracy drobne błędy edytorskie i sformułowania nieprecyzyjne są tak mało istotne, że pozwolę je sobie pominąć w mojej recenzji, bo nie wpływają one na moją bardzo wysoką ocenę merytoryczną pracy doktorskiej Pani Beaty Gromadzkiej.

Podsumowanie i Wniosek końcowy:

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Beaty Gromadzkiej stanowi oryginalny i ważny wkład Autorki w tematykę badań patogennych dla ludzi i zwierząt wirusów RNA a szczególnie w tematykę wykorzystania cząstek wirusopodobnych jako alternatywnych szczepionek przeciwko zakażeniom wirusowym.

Przedstawiona praca doktorska została poprawnie zaplanowana, przedstawia spójny ciąg myślenia naukowego oraz doprowadziła do istotnych odkryć naukowych (opracowanie szczepionki eksperymentalnej i testów diagnostycznych). Autorka posłużyła się w pracy doktorskiej różnymi metodami badawczymi z zakresu wirusologii, biologii molekularnej i mikrobiologii. **Co ważne, przedstawione metody i wyniki jednoznacznie wskazują, że Doktorantka opanowała warsztat laboratoryjny i cechuje się dużą biegłością w pracy naukowej.** Ponadto, wyniki zaprezentowane przez Autorkę definiują nowe obszary i problemy badawcze, które, dzięki Jej pracy doktorskiej, mogą zostać eksplorowane w przyszłości. **Co więcej, wyniki te są dostępne dla szerokiego grona badawczy w postaci eksperymentalnych artykułów naukowych opublikowanych w języku polskim i angielskim. Wyniki pracy doktorskiej stały się również podstawą sześciu patentów, w których Doktorantka jest współwynalazcą.**

Uważam zatem, że recenzowana praca doktorska spełnia wszystkie wymogi Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. 2018r. poz. 1668, tekst jednolity Dz. U. z 2023 r. poz 742, 1088, 1234) i dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Beaty Gromadzkiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,

Dr hab. Robert Czajkowski, prof. UG



Gdańsk, 27.08.2023