

Puławy, 2023-09-08

Prof. dr hab. Elżbieta Samorek-Salamonowicz,  
Instytut Nauk Weterynaryjnych  
Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR  
31-120 Kraków Al.Mickiewicza 24/28

## **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**mgr Beaty Gromadzkiej**

**pt."Konstrukcja i zastosowanie cząstek wirusopodobnych (VLPs) do  
monitorowania i zapobiegania niektórym infekcjom wywoływanym przez  
wirusy RNA"**

wykonanej w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego  
Wydziału Biotechnologii UG-GU Med. w Gdańsku pod kierunkiem  
Prof. dr hab. Bogusława Szewczyka.

Podstawa wykonania recenzji:

1. Uchwała Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GU Med.
2. Praca doktorska mgr Beaty Gromadzkiej
3. Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r, wraz z późniejszymi zmianami (Dz.U.2003,nr 65, poz.595)

W ostatnich latach pojawiają się choroby, których czynnikiem etiologicznym są wirusy dotychczas nie występujące lub występujące w zmienionej formie. Sytuacja taka grozi powstaniem nowych epidemii lub pandemii. Z tych powodów prowadzone są intensywne badania nad uzyskaniem skutecznych biopreparatów oraz nad opracowaniem nowych technik diagnostycznych pozwalających szybko poznać nowe zagrożenia. Nastąpił rozwój badań nad konstrukcją szczepionek nowej generacji opartych na DNA, mRNA, rekombinowanych wektorach wirusowych oraz nad wykorzystaniem biologicznych nanostruktur. Szczepionki te sporządzone przy użyciu

cząsteczek wirusopodobnych są bezpieczne, immunogenne i nie budzą obaw rewersji do formy zjadliwej.

Zainteresowania naukowe mgr Beaty Gromadzkiej dotyczą właśnie możliwości otrzymania i zastosowania cząstek wirusopodobnych do opracowania nowoczesnych szczepionek oraz testów diagnostycznych, Pierwszym modelem badawczym w ocenianej dysertacji jest wirus grypy ptaków. Jest to bardzo istotny i aktualny wybór modelu badawczego. Cytując Prof. R.G.Webstera z St.Jude Children`s Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA " grypa należy do jednej z ostatnich plag ludzkości, których do chwili obecnej nie udało się w pełni ujarzmić"

Drugim modelem badawczym mgr Beaty Gromadzkiej był kaliciwirus króliczy będący czynnikiem etiologicznym choroby krwotocznej królików.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Wydziału Biotechnologii UG i GUMed w Gdańsku. Praca wiernie wpisuje się w działalność naukową Zakładu, który jest uznanym ośrodkiem wiodącym w tego typu badaniach. O dużej aktualności i ogromnym znaczeniu zarówno naukowym jak i praktycznym problematyki badawczej realizowanej przez ten zespół naukowy świadczy fakt finansowania badań, w tym ocenianej dysertacji, w formie grantów ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju Nauki, Naukowego Centrum Nauki oraz współautorstwo w grantach europejskich. Ponadto badania te zaowocowały uzyskaniem 6 patentów.

Oceniana rozprawa ma strukturę i układ typowy dla prac doktorskich. Manuskrypt przedstawionej pracy liczy 162 strony wydruku komputerowego i składa się z dziewięciu rozdziałów, stanowiących typowy układ dla pracy eksperymentalnej. Obszerną, ale przejrzystą część rozprawy stanowi materiał w postaci 55 rycin wkomponowanych w tekst rozprawy.

Wstęp poprzedzono wykazem używanych skrótów pomocnym w ich zrozumieniu. Obszerny wstęp pracy składa się z 8 podrozdziałów. Pierwsze poświęcone są charakterystyce i klasyfikacji szczepionek, w następnych omówiono zagadnienia związane z cząstkami wirusopodobnym (VLPs), ich otrzymywaniem w różnych systemach, z konstrukcją preparatów profilaktycznych oraz mechanizmami powstawania odpowiedzi immunologicznej po ich wprowadzeniu do organizmu gospodarza. Następnie omówiono różne zastosowania VLPs.

. Ostatnie podrozdziały poświęcone są omówieniu i scharakteryzowaniu wirusów, którym poświęcona jest rozprawa. Autorka w tej części dysertacji szczegółowo

omawia klasyfikację, budowę, replikację, molekularne mechanizmy zmienności i główne strukturalne białka wirusa zarówno wirusa grypy jak i wirusa gorączki krwotocznej królików. W sposób jasny, chociaż skrótowy, przedstawiony został charakter zoonotyczny wirusa grypy i zagrożenie pandemią, co sprawia, że badania nad otrzymaniem nowych i skutecznych szczepionek przeciwko grypie są bardzo istotne i ważne.

Podkreślić należy staranne opracowanie i przedstawienie w sposób jasny i zrozumiały zagadnień związanych z poruszonymi zagadnieniami. Dodatkowo umiejętne wkomponowanie ilustracji znacznie ułatwia percepcję tekstu. Taki układ wstępu uważam za prawidłowy i korzystny, ponieważ pierwsze podrozdziały wstępu omawiające szczegółowo zagadnienia związane z cząstkami wirusopodobnymi doprowadzają czytelnika do zwrócenia uwagi na możliwość wykorzystania ich do sporządzenia preparatów immunologicznie czynnych i opracowania skutecznych szczepionek a ostatnie rozdziały omawiają modelowe wirusy.

Celem badań, których wyniki są prezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej, jest konstrukcja cząstek wirusopodobnych i zastosowanie ich do sporządzenia szczepionki przeciwko grypie kur i gorączce krwotocznej królików, a następnie do opracowania nowoczesnej diagnostyki tych chorób. Cel ten jest nowatorski i w pełni uzasadniony. Do jego realizacji Autorka przemyślała i dobrze zaplanowała badania i doświadczenia. Metody stosowane w pracy przedstawiono na 33 stronach. Były one adekwatne do założonego planu badań, wykonane rzetelnie zgodnie ze sztuką laboratoryjną, z użyciem dobrego sprzętu aparaturowego i są wystarczające do osiągnięcia zamierzonych celów badawczych. Należy podkreślić, że oprócz zaawansowanych technik biologii molekularnej Doktorantka stosowała procedury związane ze szczepieniami i oceną szczepień zwierząt.

Następna część pracy "Wyniki" została opracowana na 32 stronach i jest wzbogacona wieloma rycinami umożliwiającym łatwiejsze zrozumienie tekstu. Dla przejrzystości omawiane wyniki zostały pogrupowane w podrozdziały. Każdy podrozdział przedstawia osobne doświadczenie. Omawiając ten rozdział dysertacji należy podkreślić, że podjęte cele pracy zostały zrealizowane, a mianowicie:

- dokonano pełnej charakterystyki molekularnej polskiego szczepu terenowego H5N1 wirusa grypy, wyizolowanego od ptaków podczas epizootii w 2006r. ,

- uzyskano białka HA, NA, M1 oraz skróconą formę nóżki hemaglutyniny-HA stalk wirusa grypy typu H5N1 w systemie bakulowirusowym i skonstruowano podwójne i potrójne rekombinanty,
- uzyskano w komórkach owadzych trzy typy cząstek wirusopodobnych zawierające badane białka strukturalne wirusa grypy H5N1
  - otrzymane cząstki wirusopodobne zawierające badane białka strukturalne wirusa grypy posiadały zdolności do indukcji przeciwciał u ptaków poddanych szczepieniom.
  - uzyskano hemaglutyninę pozbawioną części zmiennej tzw. główki i wykorzystano ją do otrzymania uniwersalnego antygeny. Te wyniki uważam za szczególnie wartościowe.
- opracowano testy diagnostyczne z wykorzystaniem cząstek wirusopodobnych
- wykonano charakterystykę molekularną dwóch szczepów wirusa RHD o odmiennym fenotypie,
- otrzymano cząstki wirusopodobne i użyto je jako immunogenną szczepionkę przeciwko RHD u królików i do testów diagnostycznych

Należy podkreślić, że otrzymane wyniki mają znaczenie naukowe i praktyczne. Do istotnych osiągnięć Doktorantki zaliczam uzyskanie preparatów opartych na cząstkach wirusopodobnych otrzymanych w wyniku ekspresji genów kodujących białka strukturalne wirusa grypy HA, NA, M1, a następnie wykazanie *in vivo* ich właściwości immunogennych..

Dyskusja ( rozdział liczący 21 stron) napisana jest poprawnie, Doktorantka konfrontuje wyniki swoich badań z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Autorka podzieliła ją na dwie części, w pierwszej omówiono zagadnienia związane z wirusem grypy H5N1, w drugiej z wirusem gorączki krwotocznej królików. Rozdział ten dla doktorantów zwykle stanowi najtrudniejszą do napisania część rozprawy. Dyskusja ma kilka wątków i niestety robi chwilami wrażenie chaotycznej. Doktorantka przeanalizowała wyniki własne z danymi przedstawionymi przez innych autorów, co pozwala na tle najnowszej literatury śledzić rozwój badań nad nanostrukturami, które są adekwatne do badań zaprezentowanych przez Autorkę.

Dodatkowo, po szczegółowej analizie Doktorantka nakreśliła zarys przyszłych badań, które pozwolą na dalszą kontynuację tej tematyki badawczej.

W mojej opinii rozprawa doktorska mgr Beaty Gromadzkiej stanowi wartościowe opracowanie naukowe dotyczące aktualnych zagadnień, a zastosowanie przez Doktorantkę różnorodnych, nowoczesnych metod badawczych świadczy o Jej

wszechstronnym przygotowaniu do prowadzenia tego typu badań. Praca bez wątpienia zawiera elementy postępu w sposobie przygotowania szczepionek i antygenów diagnostycznych i odpowiada wymogom naukowym stawianym rozprawom doktorskim.

Jednakże z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia:

- Zauważono występowanie błędów edycyjnych. Praca jest pięknie oprawiona, z poglądowym rysunkiem informującym o istocie pracy. Tytuł na okładce brzmi: *"Konstrukcja i zastosowanie cząstek wirusopodobnych (VLPs) do monitorowania i zapobiegania niektórym infekcjom wirusów RNA"*. Natomiast na stronie tytułowej jest podany w prawidłowej formie: *"Konstrukcja i zastosowanie cząstek wirusopodobnych (VLPs) do monitorowania i zapobiegania niektórym infekcjom wywoływanym przez wirusy RNA"*.
- Tytuł "obiecuje" badania nad kilkoma wirusami RNA, pracę wykonano w oparciu o dwa wirusy: wirus grypy i wirus gorączki krwotocznej królików. Moim zdaniem lepiej byłoby uściślić i zatytułować *"Konstrukcja i zastosowanie cząstek wirusopodobnych (VLPs) do monitorowania i zapobiegania infekcjom wywoływanym przez wirus grypy ptaków i wirus gorączki krwotocznej królików."*
- W "Streszczeniu" umieszczonym na początku pracy zbędne jest umieszczenie opisów ogólnych i komentarzy uzasadniających wykonane badania. Korzystniej byłoby ograniczyć się tylko do przedstawienia streszczenia wyników swoich badań wynikających z przeprowadzonych doświadczeń.
- Doktorantka opisując badania lub je komentując czasami używa 1. osoby l.p., zamiast formy bezosobowej. Np. w rozdziale "Metody" str.67: *"opisana metoda namnażania wirusa grypy typu A wykonana została przeze mnie w referencyjnym laboratorium w PIWet w Puławach, w Zakładzie Chorób Drobni, w którym odbyłam szkolenie z metody ...."*, str.137: *"postanowiłam przeprowadzić doświadczenie mające na celu"*, *"w toku badań zadałam sobie pytanie ....."* na następnych stronach pracy również zdarzają się podobne sformułowania, dlatego już nie wymieniam numerów tych stron
- W rozdziale "Metody" 6.9. Szczepienia kur:. Doktorantka używa nazwy *pisklak, kurczak, brojler, kura*. Należałoby to ujednolicić. Następnie *"Krew do*

*analizy pobierano w 22, 49, 56 oraz 63 dniu życia kur."* Zwykle podaje się w jakich terminach po immunizacji została pobrana krew od szczepionych ptaków i zostało wykonane badanie tzn. ile dni upłynęło od momentu szczepienia do badania poziomu przeciwciał. Doktorantka wprawdzie podaje te terminy w następnych zdaniach, ale nie tłumaczy dlaczego dobrano takie terminy, czym się kierowano i dlaczego wykonano drugie szczepienie? Czy była prowadzona obserwacja kliniczna i po ukończeniu doświadczenia przeprowadzono np. badanie anatomo-patologiczne szczepionych ptaków (badanie na nieszkodliwość preparatu)?


- W rozdziale "Dyskusja" str.135 Doktorantka podaje " *Doświadczenia wykonywane na kurach wolnych od patogenów są o wiele prostsze do wykonania*" . Zwracam uwagę, że zabieg szczepienia czy pobierania krwi od kur SPF czy kur komercyjnych jest wykonywany w taki sam sposób. Stopień trudności jest taki sam. Kury SPF używane są do doświadczeń w celu eliminacji możliwości interakcji pomiędzy różnymi patogenami, co może maskować prawdziwy obraz przebiegu infekcji lub szczepienia, a także dynamikę narastania przeciwciał.
- W "Dyskusji" zbyt często znajdują się fragmenty, opisujące sposób wykonania doświadczenia. Są one umieszczone w rozdziale "Metody"
- Zauważono również w innych rozdziałach powtarzanie tych samych informacji  
Wskazana by była solidna korekta. Praca zyskałaby na przejrzystości .

Jednakże, pomimo powyższych uwag, moja ocena pracy pozostaje pozytywna. Szkoda, że nie dokonano starannej korekty pracy, przez co praca traci. Jednakże wymienione przeze mnie uwagi nie mają charakteru merytorycznego. Założenia pracy, dobrze dobrana metodyka i szeroki zakres badań świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu warsztatowym Doktorantki. Recenzowana rozprawa dostarcza wiele interesujących i wartościowych wyników o charakterze poznawczym i aplikacyjnym. Praca zawiera elementy nowatorskie, a na uwagę zasługuje ogrom włożonej pracy w realizację wszystkich zadań, obszerna wiedza i umiejętność posługiwania się nią.

Reasumując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Beaty Gromadzkiej pt."Konstrukcja i zastosowanie cząstek wirusopodobnych (VLPs) do monitorowania i zapobiegania niektórym infekcjom wywoływanym przez wirusy RNA" spełnia warunki określone w obowiązującej „Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie

sztuki" (Dz. U. Nr 65, poz. 595, art. 13 z późn. zm.) z dnia 14 marca 2003 roku stawiane rozprawom doktorskim oraz Ustawie z dn. 20 lipca 2018r (Dz.U.2018, poz.1668 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce). Wnioskuje więc do Rady Dyscypliny Biotechnologia Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Beaty Gromadzkiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i o nadanie Jej stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie naukowej biotechnologia.

Puławy 2023.09.08

  
Prof. dr hab. Elżbieta Samorek-Salamonowicz