

**Recenzja rozprawy doktorskiej na stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne, mgr Gabrieli Lucyny Brzuski pt.: „Rekombinowane cząstki wirusopodobne jako potencjalne antygeny szczepionkowe przeciwko wirusowi Zika”.**

Śląski Uniwersytet  
Medyczny w Katowicach

Katedra i Zakład  
Mikrobiologii  
i Wirusologii

41-200 Sosnowiec,  
ul. Jagiellońska 4  
[www.mikrowir.sum.edu.pl](http://www.mikrowir.sum.edu.pl)

KIEROWNIK KATEDRY  
Prof. dr hab. n. med.  
Tomasz J. Wąsik  
[twasik@sum.edu.pl](mailto:twasik@sum.edu.pl)

tel.: (+48 32) 364 16 20

SEKRETARIAT  
tel.: (+48 32) 364 16 21  
fax: (+48 32) 364 16 22  
[mikrob@sum.edu.pl](mailto:mikrob@sum.edu.pl)

Oceniana rozprawa powstała w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, dzięki finansowaniu ze środków projektu „Szczepionka przeciwko wirusowi Zika - innowacyjne otrzymywanie antygenów podjednostkowych” (LIDER/1/0031/L-7/15/NCBR/2016) realizowanego w latach 2017-2021 pod kierownictwem dr hab. Eweliny Król, prof. UG w ramach konkursu LIDER Narodowego Centrum Badań i Rozwoju.

Mimo iż od odkrycia wirusa Zika (ZIKV) minęło już 75 lat oraz wysiłków podejmowanych przez wiele zespołów badawczych, do chwili obecnej nie dysponujemy skutecznymi narzędziami czynnej prewencji chorób związanych z zakażeniami tym patogenem. Biorąc pod uwagę powyższe oraz fakt, iż zakażenia ZIKV mogą prowadzić do zaburzeń rozwojowych płodów i noworodków czy rozwoju zespołu Guillain-Barré, uważam podjęte przez doktorantkę badania nad otrzymywaniem i immunogennością rekombinowanych cząstek wirusopodobnych opartych o modyfikowane białka wirusa Zika za ze wszech miar celowe. Ponadto uważam, że opracowanie metod tworzenia cząstek wirusopodobnych i określenie ich przydatności jako antygenów stanowi istotny wkład w zrozumienie interakcji pomiędzy białkami wirusowymi a układem odpornościowym gospodarza, a znaczenia tego typu badań nie można przecenić zarówno ze względów poznawczych jak i z perspektywy zdrowia publicznego.

Praca ma typowy dla tego typu dysertacji układ z podziałem na rozdziały: Wykaz skrótów, Streszczenie, Wstęp, Cele, Materiały, Metody, Wyniki i dyskusja, Wnioski i Referencje obejmujące 309 pozycji. Uzyskane wyniki przedstawione są w postaci 40 rycin i 9 tabel. Poruszanie się po obejmującym 172 strony opracowaniu utrudniał fakt, że w spisie treści niektóre rozdziały pracy nie zostały uwzględnione, a numeracja poszczególnych rozdziałów nie jest zgodna ze spisem, np.:

- w spisie treści brak odnośnika do Streszczenia, które w pracy stanowi rozdział 2, a w spisie treści rozdziałem 2 jest Wstęp,
- rozdział Cele w spisie treści ma nr 3, a w tekście pracy to rozdział 5, nawiasem mówiąc rozdział ten powinien nosić tytuł: „Założenia i cele pracy”.
- w spisie treści pominięto całkowicie rozdział Wnioski.

Zasadniczą część rozprawy poprzedza obszerne Streszczenie w języku polskim i angielskim, które w opinii piszącego te słowa mogłoby być ujęte bardziej syntetycznie. We Wstępie Doktorantka w sposób przejrzysty, logiczny i w oparciu o prawidłowo dobraną literaturę przedmiotu przeprowadza czytelnika przez ogólną charakterystykę wirusa Zika, jego pozycję systematyczną, przebieg zakażenia i epidemiologię oraz cykl replikacyjny. W dalszych podrozdziałach Wstępu doktorantka przechodzi do zasadniczych treści stanowiących podstawę teoretyczną swojej dysertacji, a mianowicie charakteryzuje białka powierzchniowe prM/M i E ze szczególnym uwzględnieniem ich udziału w cyklu replikacyjnym wirusa oraz ich roli w generowaniu odpowiedzi immunologicznej w zakażeniu ZIKV. Następujący po tej części podrozdział 4.1.4. „Przegląd testowanych technologii szczepionkowych oraz terapii antywirusowych” w opinii piszącego te słowa jest niepotrzebnym wtrętem w skądinąd logicznie skonstruowanym „Wstępie” i bez obniżenia poziomu pracy mógłby być pominięty, natomiast zmykający Wstęp podrozdział 4.2. „Cząstki wirusopodobne” winien stanowić jego zasadniczą część wprowadzającą czytelnika w „Cel” pracy.

Niestety, rozpoczynając czytanie tego rozdziału na str. 16 w pierwszym akapicie natknąłem się na zdanie z poważnym błędem merytorycznym: ” Wirusy z tej rodziny to wirusy osłonkowe, których genom jest w postaci dodatnio naładowanego, niesegmentowanego, jednoniciowego RNA (ssRNA (+)) – mam nadzieję, że to tylko brak staranności i że Pani Magister wie, iż kwasy nukleinowe ze względu na reszty fosforanowe są ujemnie naładowanymi cząsteczkami, a znak „+” w notacji ss RNA(+) oznacza polarność jednoniciowego RNA, a nie jego ładunek.

Z kolei na stronie 39 autorka pisze: „Szczepionka z inaktywowanym wirusem jest wytwarzana poprzez zabicie żywego wirusa przez wysoką temperaturę, substancje chemiczne lub proces fizyczny.”, a na str 40 „Żywy-atenuowany wirus (ang. live-atenuated virus, LAV) Zika powstaje przez delecję fragmentu regionu 3’ UTR” – takie sformułowania będące kalką z angielskiego „live vaccines” i w tego typie dysertacji są dla mnie nie do zaakceptowania, gdyż wirusy nie są organizmami żywymi i jako takich zabić ich nie można.

Na str. 51 omawiając oddziaływanie VLPs z ludzkim układem immunologicznym doktorantka była uprzejma napisać iż: „Po internalizacji VLPs stymulują dojrzewanie komórek APC, przez wydzielanie prozapalnych cytokin, a VLPs mogą dalej być procesowane, aby peptydy z nich pochodzące mogły zostać zaprezentowane na MHC klasy I lub II.” – zdanie to nie oddaje stanu faktycznego, gdyż epitopy egzogennych antygenów białkowych nie będą prezentowane na MHC klasy I, a jedynie na MHC klasy II i z tego względu nie będą rozpoznawane przez limfocyty Tc CD8+. Stąd różnica w generowaniu reakcji immunologicznej między szczepionkami opartymi o wirusy atenuowane lub kwasy nukleinowe a szczepionkami podjednostkowymi lub z wirusem inaktywowanym. Mam nadzieję, że jest to niefortunny skrót myślowy, a nie brak wiedzy z podstaw immunologii.

Rozdział „Cele” nie budzi zastrzeżeń merytorycznych. Doktorantka stawia sobie dwa główne cele badawcze, z których każdy w mojej ocenie mógłby stanowić założenia oddzielnej dysertacji doktorskiej. Pierwszy w założeniu miał określić wpływ genetycznych modyfikacji białka E na proces składania

rekombinowanych VLPs oraz systemu ekspresji genów na produkcję VLPs, ich antygenowość oraz immunogenność. Drugi miał w założeniu polegać na zaprojektowaniu nowego typu rekombinowanych VLPs w celu zwiększenia ich produkcji w systemie komórek ssaczych i ocenić ich przydatność jako antygenu szczepionkowego przeciwko wirusowi Zika w modelu mysim.

Jako recenzujący tę dysertację z dużym zadowoleniem stwierdzam, że cele te Pani mgr Gabriela Lucyna Brzuska w pełni zrealizowała.

Dwa kolejne rozdziały, czyli „Materiały” i „Metody” wymieniają bardzo szczegółowo wszystkie odczynniki i aparaturę zastosowaną w badaniach oraz prawidłowo dobrane i powszechnie stosowane techniki i metody badawcze. Rozdziały te mogłyby być połączone w jeden „Materiał i Metody” i mieć bardziej charakter opisu poszczególnych eksperymentów a nie raportu z badań. W rozdziale Metody brakuje podrozdziału opisującego stosowane metody statystycznego opracowania wyników. Chciałbym, by w dalszych etapach postępowania doktorantka wyjaśniła, dlaczego do rozdziału białek metodą ultrawierowania zdecydowała się na zastosowanie wirowania w gradiencie skokowym sacharozy zamiast w gradiencie ciągłym chlorku cezu. Ponadto lekko razi sformułowanie „miareczkowanie” stosowane do określania miana wirusów.

Kluczową część ocenianej dysertacji stanowi rozdział „Wyniki i Dyskusja”. Sądzę, że ze względu na duży zakres podjętych badań i złożoność poszczególnych eksperymentów doktorantka zdecydowała się na dyskutowanie wyników cząstkowych uzyskanych podczas realizacji poszczególnych celów badawczych, co jest dopuszczalne, jednakże piszącemu te słowa brakuje syntetycznej dyskusji prezentowanych rezultatów. Wyniki licznych eksperymentów opisane są w sposób przejrzysty i spójny w oparciu o 37 rycin i 2 tabele. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż wyniki prezentowane na przejrzystych rycinach zostały opatrzone szczegółowymi opisami, stanowiąc logiczną całość, co w mojej ocenie powoduje, że opis wyników stanowi najlepiej napisaną część rozprawy. Ponadto znacznie ułatwia śledzenie toku rozumowania doktorantki dyskutującej swoje wyniki. Sposób poprowadzenia dyskusji, formułowane obserwacje, opisy i wyjaśnienia zaobserwowanych zjawisk

świadczą o dobrym przygotowaniu doktorantki i zrozumieniu badanych zagadnień.

Jak już wcześniej zaznaczyłem, doktorantka zdecydowała się na dyskutowanie wyników cząstkowych uzyskanych w poszczególnych eksperymentach. Konsekwencją takiego podejścia jest nieujęty w spisie treści rozdział 9. „Wnioski,” który zawiera 13 punktów, które w istocie są niczym innym jak streszczeniem wyników, a nie wnioskami *sensu stricto*. Jest to niestety częsty błąd występujący w tego typu opracowaniach.

W opinii piszącego te słowa najistotniejszą, niezaprzeczalną wartością prezentowanych badań o charakterze nowości naukowej jest opracowanie sytemu ekspresji zaprojektowanych VLPs ZIKV oraz wykazanie, iż w modelu *mysim* wartość neutralizująca generowanych po prezentacji otrzymanych cząstek wirusopodobnych przeciwciał skierowanych przeciwko wirusowi Zika jest w istotnym stopniu zależna od zmian postranslacyjnych budujących je białek, a szczególnie O-glikozylacji glikoproteiny E oraz od schematu podawania rekombinowanych VLPs.

Należy podkreślić iż prezentowane w recenzowanej rozprawie wyniki są rezultatem wielu eksperymentów, w których adekwatnie stosowano dobrze udokumentowane w literaturze techniki badawcze: od konstrukcji genów *in silico*, poprzez ich syntezę i transfekcję komórkową, po mikroskopię elektronową i badanie immunogenności otrzymanych cząstek wirusopodobnych w modelu *mysim*. Z przyczyn oczywistych nie jest możliwe, by doktorantka sama zaprojektowała i przeprowadziła tak rozległy projekt. Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym określa, że rozprawa doktorska powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, przedstawiać wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej, znajomość literatury przedmiotu oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Prezentowana rozprawa bezsprzecznie stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z tym chciałbym by w dalszych etapach postępowania doktorantka określiła, które eksperymenty przeprowadziła samodzielnie, jaki był jej udział w doświadczeniach przeprowadzonych w

zespołe badawczym, a które wyniki pochodzą z badań zleconych innym ośrodkom. Niestety w rozprawie nie zostało to określone, choć w mojej ocenie powinno. Proszę również o odniesienie się do pozostałych wyrażonych przeze mnie uwag.

W związku z tym, że otrzymane w prezentowanej pracy wyniki niosą istotne wartości poznawcze, a ich siła oddziaływania przeważa nad niedociągnięciami redakcyjnymi uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa Pani mgr Gabrieli Lucyny Brzuski zatytułowana: "Rekombinowane cząstki wirusopodobne jako potencjalne antygeny szczepionkowe przeciwko wirusowi Zika." spełnia wymogi określone w art. 13 ust. ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595, z późn. Zm.) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (dz. U. poz. 1669, z późn. zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Gabrieli Lucyny Brzuski do dalszych etapów postępowania doktorskiego.