

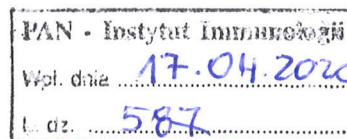
Dr hab. n med. Jolanta Zalejska-Fiolka, prof. SUM

Zabrze, 2020.04.15

Katedra i Zakład Biochemii

Wydział Nauk Medycznych w Zabrze

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach



## OCENA

### **rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Razim pt.: *Określenie epitopów białek powierzchniowych Clostridium difficile oraz charakterystyka immunochemiczna koniugatu epitopu z nośnikiem i nanoadiuwantu***

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod opieką Promotora Prof. dr hab. Andrzeja Myca oraz Promotora pomocniczego dr hab. Sabiny Górskiej w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk.

Doktorantka - mgr Agnieszka Razim jest wysoce utalentowanym pracownikiem naukowym o imponującym i spójnym dorobku. Jest współautorką 6 publikacji o łącznym współczynniku oddziaływania impact factor 25,789 oraz 14 komunikatów zjazdowych. Jest także współautorką 3 zgłoszeń patentowych. Brała udział w realizacji 5 grantów badawczych, w jednym będąc Kierownikiem. Odbyla 4 staże naukowe oraz uzyskała 5 nagród, w tym 3 wyjazdowe.

Przedłożona mi do oceny rozprawa na stopień doktora stanowi istotny element w badaniach dotyczących zakażeń bakterią *Clostridium difficile/Clostridioides difficile* (CD). Realizacja pracy była możliwa dzięki środkom uzyskanym w ramach grantów OPUS i PRELUDIUM.

Wskutek powszechnie stosowanej antybiotykoterapii dochodzi do zaburzeń w obrębie flory jelitowej i patogennego rozplemu bakterii CD, która po dostaniu się do organizmu wytwarza wyniszczające toksyny doprowadzające do stanu zapalnego i silnej biegunki. Formą leczenia jest również, kosztowna i długotrwała antybiotykoterapia, a co więcej wyizolowano już szczepy odporne na to leczenie. Z uwagi na powyższe niezwykle istotnym jest poszukiwanie nowych metod prewencji oraz leczenia zakażeń CD.

W przedłożonej pracy opisano nowe, immunoreaktywne białka CD, które mogą posłużyć jako antygeny szczepionkowe lub być zastosowane do wytwarzania leczniczych przeciwciał. Celem określenia epitopów, szczegółowemu mapowaniu poddano białko Cwp22. W pracy opisano proces analizy epitopów pod kątem ich przydatności szczepionkowej, a immunoreaktywne peptydy w/w białka posłużyły do badania właściwości nowego adiuwantu dośluzówkowego. W ramach pracy przygotowano i scharakteryzowano zestaw nanoadiuwantów o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych i potwierdzono ich właściwości adiuwantowe w badaniach *in vivo*.

Przedstawione w pracy rozwiązania są uniwersalne i mogą być zastosowane także w przypadku innych zakażeń bakteryjnych i wirusowych. Praca ma więc ogromny potencjał zarówno naukowy jak i aplikacyjny.

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja doktorska obejmuje 181 stron tekstu podzielonego na rozdziały: streszczenie/summary, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i piśmiennictwo. Autorka zamieściła także na początku pracy wykaz skrótów używanych w tekście rozprawy, a na końcu spis rycin i tabel oraz dorobek naukowy obejmujący osiągnięcia naukowe, w tym publikacje, doniesienia zjazdowe, granty badawcze, patenty, stypendia i otrzymane nagrody.

Zamieszczone informacje świadczą o **dojrzałości naukowej Autorki** a przedłożona mi do oceny rozprawa stanowi bardzo wartościowe osiągnięcie i wskazuje jasno dalszy kierunek badań Doktorantki. **Na podkreślenie zasługuje fakt, że uzyskane wyniki posiadają charakter aplikacyjny oraz są przedmiotem zgłoszeń patentowych.**

Rozprawa została napisana bardzo starannie oraz poprawnie pod względem formalnym, językowym, stylistycznym i interpunkcyjnym.

Celem realizacji założeń, została podzielona na trzy części. Pierwsza dotyczy zagadnień związanych z nowymi antygenami szczepionkowymi CD, druga – z pracami nad nowym adiuwantem dośzluzówkowym (nanoadiuwantem), a trzecia – charakterystyki przykładowej formułacji złożonej z koniugatów zawierających immunoreaktywne peptydy CD i nanoadiuwanta.

Wstęp (37-mio stronicowy) wprowadza w tematykę zagadnień, a opisy są podparte rysunkami i tabelami, co dodatkowo ułatwia analizę tekstu. We wstępie Autorka powołuje się na 227 pozycji piśmiennictwa (a w całej pracy na 354 pozycje). W początkowych podrozdziałach opisuje zagadnienia dotyczące immunologii śluzówki oraz szczepionek i dróg ich podawania. Autorka słusznie zauważa, że wszelkie utrudnienia dotyczące stosowania szczepionek mogą zostać przezwyciężone dzięki zastosowaniu odpowiednich adiuwantów, szczególnie takich, które wiązałyby się do powierzchni śluzówki, stymulowały mechanizmy wrodzonej odporności i wzbudzały odpowiedź adaptacyjną specyficzną względem patogenu.

W dalszej części wstępu Doktorantka przedstawia definicję i charakterystykę adiuwantów oraz mechanizmy ich działania, a podrozdział kończy syntetyczna tabela.

W rozdziale 4.4. obejmującym 16 stron Autorka przedstawia zagadnienia bezpośrednio związane z tematem pracy, a mianowicie dotyczące badań nad szczepionką przeciwko *Clostridium difficile*, zakażeń, odpowiedzi wrodzonego i adaptacyjnego układu odpornościowego na zakażenie, odpowiedzi na toksyny CD oraz odpowiedzi adaptacyjnej na antygeny powierzchniowe CD.

Z uwagi na to, iż dotychczas nie opisano antygeny szczepionkowego spełniającego wszystkie wymagania stawiane szczepionce skierowanej przeciwko CD (co Autorka uzasadniła we wstępie pracy),

a stosowane sposoby zarówno prewencji, jaki leczenia zakażeń CD są niewystarczające, Doktorantka postawiła nadrzędne cele pracy, którymi było:

1. znalezienie nieopisanych epitopów białek CD, które mogłyby być zastosowane w szczepionce lub do produkcji przeciwciał leczniczych,
2. zaprojektowanie i scharakteryzowanie nowego adiuwantu do zastosowania w szczepionkach dośluzówkowych.

Autorka założyła także cele szczegółowe pracy, w tym:

- ✓ pozyskiwanie szczepów klinicznych CD;
- ✓ identyfikację nowych białek immunoreaktywnych CD;
- ✓ mapowanie sekwencji aminokwasowych białek CD;
- ✓ uzyskanie koniugatów epitopów z białkiem nośnikowym;
- ✓ syntezę zestawu nanoadiuwantów o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych;
- ✓ dokładną charakterystykę fizykochemiczną nanoadiuwantów;
- ✓ zbadanie właściwości biologicznych nanoadiuwantów *in vitro*;
- ✓ analizę właściwości immunogennych protoszczepionki złożonej z koniugatu oraz nanoadiuwantu w modelu *in vivo* z użyciem myszy.

Założenia badawcze zostały sformułowane poprawnie i przejrzyste i świadczą o dojrzałości naukowej Autorki. Doktorantka podjęła się trudnego i pracochłonnego zadania, którego efekt końcowy może w przyszłości pozwolić na opracowanie nowej szczepionki, a więc skuteczniejsze leczenie zakażeń CD.

Przedłożony w rozprawie eksperyment był wieloetapowy i został bardzo dobrze zaplanowany. Przeprowadzenie badań wymagało ogromnej wiedzy, doświadczenia i współpracy poszczególnych jednostek. Materiały i metody zostały opisane bardzo szczegółowo. W rozdziale 6.1.2. opisano dokładnie szczepy i ich hodowlę. W badaniach wykorzystano 2 szczepy kliniczne CD20 i CD27 oraz szczep kontrolny R20219. Charakterystykę szczepów pobranych od pacjentów przedstawiono w tabeli nr 3. W kolejnym rozdziale 6.1.3. opisano stosowane surowice (pozyskane z krwi obwodowej pacjentów zakażonych i zdrowych ochotników oraz z krwi pępowinowej zdrowych kobiet). Na badania uzyskano wymagane zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. W rozdziale 6.1.4. opisano izolację i identyfikację białek immunoreaktywnych (elektroforeza SDS-PAGE, metoda srebrowa, Western blot, LC-MS-MS/MS Orbitrap). Identyfikacja została przeprowadzona w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Zastosowane metody badawcze są w pełni dopracowane i poprawne analitycznie.

W rozdziale 6.1.5. przedstawiono analizę bioinformatyczną białka Cwp22 obejmującą analizę podobieństwa sekwencji aminokwasowej, modelowanie struktury białka i przewidywanie epitopów dla limfocytów. Niestety, z uwagi na brak białek o odpowiednio wysokim podobieństwie sekwencji, które posiadałyby rozwiązaną strukturę krystaliczną, nie udało się stworzyć wiarygodnego modelu 3D białka Cwp22. Analiza sekwencji aminokwasowej pod kątem struktury białka oparta została o identyfikację konserwatywnych domen (program BLAST) oraz o modelowanie struktury II-go rzędowej. Wyniki przewidywań oraz stworzone modele strukturalne białek zostały użyte do zaprojektowania zestawu potencjalnych epitopów.

W kolejnym podrozdziale przedstawiono metodę chemicznej syntezy peptydów (PEPSCAN) i badania immunoreaktywności otrzymanych peptydów metodą ELISA.

Wybrane 16-aminokwasowe sekwencje zostały następnie poddane dalszej analizie i badano immunoreaktywność (z surowicami pacjentów z CDI, zdrowych ochotników i surowicami krwi pępowinowej) skróconych sekwencji i identyfikowano epitopy. Przeprowadzono i potwierdzono koniugację peptydów z białkiem nośnikowym KLH.

W kolejnym etapie przeprowadzono badania nad kandydatami na nanoadiuwanty (NAC; rozdział 6.2.). Otrzymane NAC poddane zostały charakterystyce fizykochemicznej i biologicznej oraz zbadano ich cytotoksyczność i wpływ na indukcję czynnika martwicy nowotworów TNF- $\alpha$ . Zbadano także wpływ nanoadiuwantów na pochłanianie i przekazywanie antygeny.

Toksyczność NAC zbadano także *in vivo* (na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej) na 40 myszach. NAC podawano donosowo (w dawce 20%) oraz domięśniowo (w dawce 2.5%).

Przeprowadzono badanie właściwości immunogennej protoszczepionek.

Uzyskane wyniki poddano prawidłowej i wystarczającej analizie statystycznej z użyciem testów 1-way, 2-way ANOVA oraz testu t.

Uzyskane wyniki zostały przedstawione i omówione w sposób przejrzysty (rozd. 7.1. – badania nad nowymi epitopami CD; rozdz. 7.2. – badania nad nanoadiuwantami CD; rozdz. 7.3. – badania *in vivo* nad właściwościami protoszczepionki złożonej z koniugatów epitopów CD z białkiem nośnikowym). Autorka przedstawiła wyniki na 29 rycinach i w 16 tabelach. Wyniki stanowią solidną podwalinę do przeprowadzonej dyskusji.

W dyskusji Autorka jeszcze raz podkreśliła wagę przeprowadzonych badań powołując się na wysoką i stale rosnącą liczbę zachorowań (dane z bazy europejskiej) z jednoczesnym prognozowaniem pogorszenia sytuacji, z uwagi na zwiększającą się antybiotykooporność bakterii CD. Autorka zauważa pilną potrzebę poszukiwania nowych sposobów leczenia oraz prewencji zakażeń. Uzasadnia także (w tym miejscu i we wstępie) celowość włączenia do szczepionek antygenów, które są dostępne dla przeciwciał na wcześniejszym etapie zakażenia.

Jako nowatorskie podejście do badanego tematu, Autorka podaje zastosowanie surowicy krwi pępowinowej do poszukiwania nowych białek immunoreaktywnych CD oraz mapowanie ich epitopów. **Jest to w pełni zasadne podejście i zasługuje na szczególne podkreślenie.** W badaniach wykazano bowiem, że surowica krwi pępowinowej jest wzbogacona w specyficzne przeciwciała przeciw-CD w stosunku do surowicy pobranej od osób zdrowych. Przeciwciała potencjalnie mogą przyczyniać się do odporności noworodków na zakażenia CD.

Na podkreślenie zasługuje również możliwość zastosowania ewentualnej szczepionki poza granicami kraju, pomimo, iż przeprowadzone badania odnoszą się ściśle do warunków polskich. Jest to możliwe z tego powodu, że rybotyp 027 występuje na całym świecie.

W przedłożonej do oceny pracy, zidentyfikowanym białkiem immunoreaktywnym jest białko Cwp22. Z uwagi na silną konserwatywność wśród szczepów CD oraz małą homologię z białkami o podobnej funkcji występującymi u innych organizmów, jest ono bardzo dobrym kandydatem na antygen szczepionkowy.

Z uwagi na to, że peptyd może być bardziej korzystny do szczepionki niż całe białko oraz, że szczepionka oparta o krótsze peptydy jest prostsza w produkcji i umożliwia przygotowanie szczepionki poliwalentnej przez połączenie kilku epitopów z jednym białkiem nośnikowym, przeprowadzono badanie immunoreaktywności wybranych 16-aminokwasowych peptydów z surowicami pacjentów celem określenia epitopów białka Cwp22. W wyniku mapowania w/w białka wybrano 3 peptydy o najwyższej immunoreaktywności, a w ich sekwencjach zlokalizowano 3 epitopy białka Cwp22: <sup>54</sup>EFRVAT<sup>59</sup>, <sup>201</sup>KVNGKM<sup>206</sup> i <sup>268</sup>WQEKNKGKYY<sup>277</sup>. Co bardzo ważne, badanie sekwencji w/w epitopów pod kątem występowania w poznanych autoepitopach nie wykazało powiązanych sekwencji, jak również nie znaleziono w bazie NCBI ludzkich białek, w których występują w/w sekwencje. W bazie danych nie znaleziono także białek budujących mikrobiom człowieka, które zawierałyby sekwencje jakiegokolwiek z 3 badanych epitopów. Ponadto, analiza homologii sekwencji nieograniczona do mikrobiomu człowieka wykazała, że epitop <sup>268</sup>WQEKNKGKYY<sup>277</sup> jest charakterystyczny tylko dla CD, sekwencja <sup>54</sup>EFRVAT<sup>59</sup> została zlokalizowana w białku o znikomym znaczeniu klinicznym (u bakterii występującej w systemach korzeniowych roślin). W reakcje krzyżowe mógłby wchodzić jedynie epitop <sup>201</sup>KVNGKM<sup>206</sup>. Badania te są więc wysoce obiecujące w aspekcie zastosowania epitopów w szczepionkach przeciwko CD.

Drugim celem pracy było stworzenie i scharakteryzowanie nowego adiuwanta do zastosowania w szczepionkach dośluzówkowych. W tej części dyskusji Autorka bardzo szczegółowo opisała uzyskane w tym zakresie wyniki badań zestawiając je z wytycznymi dotyczącymi właściwości NAC, jako nanoadiuwanta i wykazała, że NAC są bezpieczne zarówno w podaniu domięśniowym, jaki i donosowym. **Podobne badania nie zostały dotąd opisane w literaturze, stąd należy podkreślić innowacyjność przeprowadzonych badań.**

W wyniku szczepienia myszy protoszczepionką składającą się z NAC (3, 7 lub 13) i zestawu koniugatów (K1, K2, K3) zawierających epitopy białek powierzchniowych CD i białko nośnikowe KLH uzyskano specyficzną odpowiedź humoralną. Stopień indukcji przeciwciał IgG był taki sam dla tych samych protoszczepionek, ale podawanych domięśniowo lub donosowo. Równocześnie zaobserwowano bardzo interesujący efekt supresji poziomu IgG w przypadku szczepienia donosowo myszy koniugatem NAC7. Najprawdopodobniej chodzi tu o odpowiedź śluzówkową, która w tym przypadku skierowana była na antygen w odróżnieniu do domięśniowej skierowanej bardziej na nośnik.

Pod względem indukcji przeciwciał klasy IgA wydaje się, że protoszczepionki z NAC są bardziej efektywne po podaniu donosowym. A w porównaniu do grupy szczepionej domięśniowo z powszechnie stosowanym adiuwantem - alum - z zestawem koniugatów, powodują indukcję wyższych poziomów całkowitych IgA.

Analiza występowania specyficznych przeciwciał IgG przeciwko podanym w szczepionce epitopom CD wykazała, że użycie NAC spowodowało uzyskanie wysokiego miana przeciwciał IgG, przy czym bardziej specyficzna była odpowiedź na szczepionkę donosową. W zakresie produkcji przeciwciał IgA, żadna z formacji podana domięśniowo nie wywołała wytwarzania IgA w surowicy w przeciwieństwie do podania donosowo.

Reasumując, Doktorantka przedstawiła w dyskusji bardzo dokładną analizę i interpretację uzyskanych wyników i odnosiła uzyskane wyniki przede wszystkim do badań własnych oraz obowiązujących wytycznych. Bardzo dobrze poprowadziła dyskusję, choć nie było to proste, gdyż przedstawione badania są w większości nowatorskie, a więc nie opisane w piśmiennictwie. Stąd też trudność w przedyskutowaniu uzyskanych wyników w odniesieniu do innych badań.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz szczegółowej i trafnej analizy uzyskanych wyników Doktorantka przedstawiła uzasadnione wnioski, które stanowią odpowiedź na założenia zawarte w celu pracy. Jednak uważam, że w pewnej części niektóre wnioski są opisem wyników.

Podsumowując, uzyskane wyniki badań posiadają charakter nowatorski, poznawczy, jak i duży potencjał aplikacyjny a pracę mgr Agnieszki Razim pt.: Określenie epitopów białek powierzchniowych *Clostridium difficile* oraz charakterystyka immunochemiczna koniugatu epitopu z nośnikiem i nanoadiuwantu, oceniam bardzo wysoko. Praca stanowi wartościowe, prawidłowo zaplanowane i zrealizowane opracowanie naukowe, a uzyskane wyniki są podstawą do dalszych badań oraz skonstruowania nowych, skuteczniejszych szczepionek.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.).

Z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu wniosek **o dopuszczenie** mgr Agnieszki Razim do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę bardzo duży wkład pracy Doktorantki, dużą wartość praktyczną pracy oraz duży dorobek naukowy Autorki, **wnioskuję o wyróżnienie** przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej.

  
Jolanta Ząlejska-Fiolka

