



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

Promotor: Prof. dr hab. Andrzej Myc  
Promotor pomocniczy: Dr hab. Sabina Górńska

Rozwój higieny w krajach Europy i Ameryki Północnej i 19 i 20 wieku spowodował zmniejszenie zachorowalności na choroby wywołane bakteriami. Dalszą poprawę przyniosło stosowanie sulfonamidów a następnie antybiotyków, które znacząco ograniczyły niebezpieczeństwo śmierci spowodowanej zakażeniami. Powszechny optymizm z połowy ubiegłego wieku związany z wiarą w możliwość eliminacji każdej choroby zakaźnej powoli mija, gdyż jak wiemy stosowanie antybiotyków ma również swoją ciemną stronę. Pojawienie się szczepów bakterii opornych na większość stosowanych antybiotyków, tak zwanych superbakterii oraz związane z tym zakażenia szpitalne to jedne z głównych problemów związanych z ich nadużywaniem. Jedną z konsekwencji stosowania antybiotykoterapii jest pojawienie się zakażeń wywołanych przez *Clostridium difficile*, bakterii atakującej głównie osoby starsze w trakcie hospitalizacji i po licznych kuracjach antybiotykowych. Zakażenia tą bakterią mogą prowadzić do ciężkich powikłań a nawet śmierci. W przypadku *Clostridium difficile* jak również innych oportunistycznych bakterii atakujących ludzi zastosowanie szczepionek jest znacznie lepszym rozwiązaniem niż kolejna antybiotykoterapia. *Clostridium difficile* jest beztlenową gram-dodatnią bakterią będącą naturalnym składnikiem mikroflory jelitowej u około 3% populacji. W większości przypadków ludzie są jej bezobjawowymi nosicielami bez oznak chorobowych. Jednakże w niektórych sytuacjach, po na przykład terapiach antybiotykami takimi jak klindamycyną, cefalosporynami penicyliną lub fluorochinolonami dzięki oporności *Clostridium difficile* na te antybiotyki następuje jej gwałtowne namnożenie, produkcja toksyn a następnie uszkodzenie nabłonka jelit skutkujące biegunką. Leczenie jest trudne i często następuje nawrót choroby.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani magister Agnieszki Razim zatytułowana: „Określenie epitopów białek powierzchniowych *Clostridium difficile* oraz charakterystyka immunochemiczna koniugatu epitopu z nośnikiem i nanoadiuwantu” jest udaną próbą opracowania szczepionki przeciwko białkom powierzchniowym tej oportunistycznej bakterii. Opracowana szczepionka mogłaby być samodzielnie aplikowana przez pacjenta lub pod nadzorem personelu medycznego. Opracowanie nowej szczepionki jest zadaniem trudnym i wymagającym ogromnego doświadczenia, dlatego wyzwanie, którego podjęła się Doktorantka - praktycznie samodzielnie - bo przecież praca doktorska wymaga głównie poświęcenia się jednej osoby mogło wydawać się przedsięwzięciem zbyt ambitnym. Jednakże jak można się przekonać podczas czytania pracy ogrom badań, który został wykonany kończy się sukcesem prowadząc do otrzymania preparatu o pożądanym właściwościach.

Praca rozpoczyna się szerokim „Wstępem” opisującym najważniejsze zagadnienia, którymi zajmuje się w pracy Doktorantka. Są to przede wszystkim immunologia śluzówki, szczepionki, rozdział poświęcony adiuwantom, charakterystyka szczepionki donosowej oraz charakterystyka zakażeń bakterią *Clostridium difficile*. We „Wstępie” opisano również zagadnienia związane z układem immunologicznym i jego funkcjonowaniu w odpowiedzi na zakażenia tą bakterią oraz białkom ekspresjonowanym na powierzchni bakterii. Ta część pracy jest dobrze przygotowana i zredagowana. Jako recenzent odczuwam lekki niedosyt z powodu krótkiego podrozdziału poświęconego adiuwantom, który mógłby być nieco bardziej rozbudowany. Pomijając tę drobną uwagę wstęp rozprawy świadczy o bardzo dobrym poruszaniu się doktorantki w zagadnieniach związanych ze szczepionkami i ich opracowywaniem a także w biologii bakterii na którą szczepionka miała być przygotowana.

Rozdział Materiały i Metody opisuje szczegółowo metody jakie były stosowane podczas pracy nad szczepionką. Ich ilość jest bardzo duża. Doktorantka zajmowała się hodowlą bakterii, pracowała z surowicami, izolowała białka immunoreaktywne, przeprowadziła szczegółową analizę bioinformatyczną białka CWP22, pracowała nad identyfikacją i charakterystyką epitopów a także syntezą peptydów i ich optymalizacją. Jej zadaniem było przygotowanie koniugatu w peptydów z białkiem nośnikowym, preparacja nanoadiuwantów badania ich stabilności, badania oddziaływania nanoadiuwantów z białkami takimi jak owoalbumina i mucyna, hodowle komórkowe, indukcja cytokin, badanie właściwości immunogennych szczepionek oraz badania na zwierzętach. Generalnie wszystkie niezbędne informacje wydają się być podane i można na ich podstawie odtworzyć prowadzone prace. Tabela opisująca szczepy kliniczne pobrane od pacjentów,

pochodzenie krwi pępowinowej i inne dane, które znalazły się w pracy pomagają zorientować się materiały jaki był stosowany. Rozdział jest dobrze opisany i przygotowany zawiera jednak drobne błędy i nieścisłości takie jak azotan sodu zamiast azotan srebra a organizm będący źródłem białka KLH (*Megathura crenulata*) to oczywiście mięczak a nie skorupiak. Podczas przygotowywania nanoadiuwantów nie podano typu, nazwy urządzenia oraz warunków towarzyszących otrzymywaniu nanoadiuwantów. Podczas pomiaru wielkości cząstek nanoadiuwantów należało podać w jakiej funkcji dokonano pomiarów. Czy była to funkcja Volume Number czy Intensity? Ma to duży wpływ na ocenę uzyskanych nośników. Generalnie są to drobne potknięcia i nie zmieniają jednoznacznie pozytywnej oceny tej części rozprawy.

Rozdział „Wyniki” to oczywiście najważniejsza część dysertacji. Czytając tę część rozprawy widać ogrom pracy wykonanej przez doktorantkę. Na początku dokonano izolacji białek powierzchniowych *Clostridium difficile* celu wyszukania takich na które można przygotować szczepionkę. Krytycznym momentem pracy był wybór takich peptydów by nie uzyskać efektu odpowiedzi immunologicznej przeciwko innym dobroczynnym bakteriom jak również własnym białkom gospodarza. Przeprowadzono olbrzymią bioinformatyczną analizę możliwości użycia poszczególnych peptydów w tworzonej szczepionce. W pracy skupiono się na białku CWP22 którego fragmenty stały się podstawą opracowanej szczepionki. Dzięki analizie bioinformatycznej Doktorantka stwierdziła, że gen białka CWP22 jest silnie konserwatywny wśród różnych szczepów *Clostridium difficile* co oznacza, że szczepionka opracowana na bazie fragmentów tego białka wywoła odpowiedź wobec prawdopodobnie wszystkich szczepów bakterii występujących u pacjentów. Kolejnym ważnym krokiem było przewidywanie epitopów dla limfocytów T i B dzięki zastosowaniu programów (TepiTool, BCPred oraz BEPIPred). Dzięki pracy z programami udało się wytypować odpowiednie fragmenty peptydów wobec których przewidywano pojawienie się silnej odpowiedzi immunologicznej. Nałożenie na siebie wytypowanych sekwencji peptydowych białka Cwp22 przez trzy wymienione programy pozwoliły na wyłonienie 20 najbardziej obiecujących peptydów. Wyniki z badań bioinformatycznych zweryfikowano metodą ELISA uzyskując potwierdzenie wysokiej immunoreaktywności dla większości przypadków. Na tym etapie Doktorantka wytypowała 5 peptydów do których uzyskano najsilniejsze wiązanie przeciwciał z osocza zarówno chorych jak i krwi pępowinowej. W wyniku dalszego mapowania wyselekcjonowanych fragmentów oraz zaprojektowaniu szeregu peptydów o zachodzących na siebie sekwencjach z przesunięciem o dwa aminokwasy wybrano trzy peptydy o najsilniejszej immunoreaktywności a następnie

dokonano kolejnej rundy optymalizacji. Wyłoniono 3 peptydy 6-10 aminokwasowe, których sekwencje zostały poddane ocenie w bazie wszystkich dostępnych sekwencji (BLAST). Uzyskane sekwencje nie są obecne z żadnym organizmie zasiedlającym człowieka, ani nie występują w białkach ludzi. Ta część pracy doktorantki powinna być bardzo wysoko oceniona, poświęcono na nią zapewne bardzo dużo czasu dokonując żmudnej analizy bioinformatycznej oraz licznych syntez peptydów.

Badania nad nanoadiuwantem były kolejnym ważnym wyzwaniem. Zdecydowano się wybrać nanoemulsje oparte na oleju silikonowym przygotowane dzięki wykorzystaniu dwóch emulsyfikatorów, z których jeden nadawał emulsji ładunek dodatni. Immunoadiuwanty zwiększają odpowiedź ze strony układu immunologicznego wobec licznych antygenów i haptenu. W tym wypadku opracowano 13 emulsji zawierających różne detergenty kationowe o wielkości cząstek mieszczących się w przedziale 380-620 nm. Po etapie optymalizacji otrzymywania formulacji wykonano dla nich badania stabilności długookresowej. Wyniki przedstawiono w Tabeli 15, która mogłaby być zastąpiona wykresem na którym znacznie łatwiej jest zaobserwować zmiany wielkości w czasie.

W dalszej kolejności przeprowadzono badania oddziaływań z mucyną oraz owoalbuminą. Ponieważ mucyna jest białkiem wyścielającym drogi oddechowe dlatego stabilność nanoadiuwantów w roztworze tego białka była istotna. Zaobserwowano zwiększanie wielkości kropeł emulsji w przypadku niektórych z formulacji. Nie do końca mogę się zgodzić z wyjaśnieniem wzrostu objętości kropeł jako zjawiska „naładowania mucyny do wnętrza kropeł NAC”. Ponieważ mucyna jest silnie uwodnionym białkiem, bardziej prawdopodobne zjawisko to wymieniona przez doktorantkę adhezja ujemnie naładowanej mucyny do dodatnio naładowanych kropeł nanoadiuwantu czy po prostu fuzja czy agregacja kropeł nanoadiuwantu wywołana mucyną. Badania z owoalbuminą, białkiem modelowym używanym w badaniach immunologicznych miały na celu określenie stabilności nanoadiuwantu oraz stopień wiązania się białka do cząstek emulsji. W pracy stosowano naprzemiennie określenie owo jak i owoalbumina. Wydaje się, że poprawnym terminem jest owoalbumina. Nie rozumiem sensu 6-cio miesięcznego badania wpływu emulsji nanoadiuwantów na integralność owoalbuminy zwłaszcza, że szczepionka utrzymuje się na błonach śluzowych zapewne tylko przez kilka lub kilkanaście godzin. Konkluzją tego eksperymentu jest stwierdzenie (zresztą słuszne), że nanoadiuwanty nie degradują zawieszonych w nich białka.

Mam też generalną uwagę dotyczącą pomiarów potencjału zeta a także wielkości cząstek w roztworach białek. Musimy pamiętać, że dodatek białka do zawiesiny zmienia jej

lepkość co przekłada się na zmianę współczynnika dyfuzji. Może to dawać mylne wyniki podczas badania takim instrumentem jak NanoSizer bazującym na ruchu Browna lub ruchu cząstek w polu elektrycznym (pomiar potencjału Zeta).

Testy sterylizacji cieplnej pozwoliły odpowiedzieć na pytanie czy taki sposób pozbycia się potencjalnych mikroorganizmów i ich zarodników nie spowoduje rozpadu formulacji. Wynik był satysfakcjonujący toteż wykonano kolejne ważne badania jak ich zachowanie w warunkach jamy nosowej (wysoka siła jonowa oraz badania toksyczności na komórkach nabłonkowych oraz układu odpornościowego. Szkoda, że te ostatnie badania wykonano na pustym nośniku. Możemy się spodziewać, że przyłączenie skonstruowanych peptydów mogłoby zmienić wynik tego eksperymentu. Badania z modelowym antygenem potwierdziły zdolność opracowanych i wybranych trzech nanoadiuwantów do prezentacji antygenów oraz wywoływania odpowiedzi immunologicznej wobec komórek dendrytycznych linii JAWSII oraz komórek nabłonka oddechowego (TC-1). W wyniku przeprowadzonych badań toksyczności nad wybranymi trzema immunoadiuwantami Doktorantka stwierdza brak ich toksyczności po podaniu donosowym i domięśniowym (dystres, opuchlizna). W pracy zabrakło eksperymentu w którym mierzono by wielkość cząstek wybranych nanonośników (NAC3, NAC7 oraz NAC13) po zmieszaniu ich z peptydami K1, K2 i K3. Czy następowała agregacja cząstek nanoemulsji w kontakcie z tymi peptydami?

Ukoronowaniem pracy były testy przygotowanej szczepionki na myszach. Szczepionki podane donosowo jak i domięśniowo (kontrola) udowodniły swoją aktywność. Doktorantka zaobserwowała, że poziom przeciwciał IgG w surowicy myszy szczepionych donosowo szczepionką na bazie nanoemulsji NAC3 i NAC13 i podanej donosowo jest porównywalny do tego uzyskanego po podaniu domięśniowym, wliczając w to postać zawierająca alum. W przypadku szczepionki na Bazie NAC7 i podania donosowego poziom przeciwciał IgG był statystycznie niższy niż dla grupy której podano bufor PBS. Dużo lepsze wyniki uzyskano w indukcji przeciwciał IgA dla szczepionek donosowych. Finalnie autorka pracy stwierdza, że stworzona szczepionka na bazie immunoadiuwantów NAC3, NAC7 i NAC13 jest immunogenna zarówno po podaniu donosowym jak i dożylnym.

Najsilniejszy efekt adiuwantowy uzyskano dla protoszczepionki NAC13, co wskazuje, że przygotowanie 13 różnych wersji nośnika miało sens, gdyż mimo pozornie podobnej budowy znacznie się one różniły w generowaniu odpowiedzi immunologicznej.

Dyskusja napisana na 16 stron maszynopisu świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Widać z niej, że eksperymenty były przemyślane, uzyskiwane w trakcie pracy

wyniki stanowiły podstawę do dalszych prac i Doktorantka rozumie co robi. Mam tu drobną uwagę na temat zamiennego stosowania terminu cząstka i cząsteczka. Sądzę, również, że określenie dokładnego stosunku liczby skoniugowanych epitopów do cząsteczki KLH powinno być stosunkowo proste i chciałbym się dowiedzieć dlaczego Doktorantka w Dyskusji nie wyjaśnia dlaczego uważa to za niemożliwe do wykonania.

Podsumowując, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska p. mgr Agnieszki Razim jest według mojej oceny pracą bardzo wartościową, ciekawą oraz starannie przygotowaną. Doktorantka zastosowała szereg metod, którymi biegle się posługiwała. Praca jest bardzo obszerna i kończy się praktycznym wynikiem prowadzonych badań. Pani mgr Agnieszka Razim jest współautorką sześciu publikacji o sumarycznym współczynniku oddziaływania 25,79 oraz 13 innych doniesień konferencyjnych, zarówno krajowych jak i zagranicznych, w tym 8 wystąpień ustnych. Dodatkowo uzyskane wyniki zostały objęte ochroną 2 polskimi i 1 międzynarodowym zgłoszeniu patentowym.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wszelkie wymogi ustawowe określone w Rozporządzeniu MNiSZW z dnia 30 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018 r, poz. 261) oraz w świetle przepisów wprowadzających ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r., poz. 1669), dlatego wnioskuję do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Razim do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę nowatorski charakter pracy, bardzo rozbudowaną część metodologiczną i ogrom wykonanych badań a także publikacje i wyróżnienia uzyskane przez doktorantkę wnioskuję do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.