Instytut Biochemii i Biofizyki
Polska Akademia Nauk

Pawińskiego 5a; 02-106 Warszawa; Tel.: +48 22 / 592 21 45; Fax: +48 22 / 592 21 90; e-mail: secretariate@ibb.waw.pl; http://www.ibb.waw.pl

Warszawa, 2020-10-06

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Marcina Pyrskiego pt.: „Cząstki kapsydopodobne HBcAg otrzymywane w roślinach jako składnik szczepionek oraz bionanocząstek"

Uwagi wstępne

Rozprawa została wykonana pod kierownictwem prof. dr. hab. Tomasza Pniewskiego w Instytucie Genetyki Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Rozprawa poświęcona jest wytworzeniu za pomocą systemów roślinnych oraz charakterystyce wytworzonych w roślinach cząstek kapsydopodobnych zawierających antygen rdzeniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBcAg). Wyniki przedstawione w rozprawie podzielone są na 3 grupy: (1) Wyniki zawarte w dwóch publikacjach włączonych do Aneksu rozprawy. W skrócie, w pierwszej publikacji scharakteryzowano materiał z uzyskanych wcześniej transgenicznych roślin tytoniu, wykorzystano ten materiał do dwukrotnej domięśniowej immunizacji myszy, oceniono odpowiedź immunologiczną i wykazano stymulację odpowiedzi typu Th1 i Th2. W drugiej publikacji zweryfikowano odpowiedź immunologiczną myszy, którym podano (wg. nowego schematu) antygen HBcAg uzyskany w roślinach. Było to 3-krotne podanie, najpierw w formie jednokrotnej domięśniowej wysokiej dawki uzyskanej dzięki ekspresji przejściowej w tytoniu a następnie dwóch doustnych dawek przypominających, przygotowanych z uzyskanych wcześniej roślin transgenicznej sałaty o znacznie niższym poziomie ekspresji antygenu, (2) Wyniki nieopublikowane. Wyniki te przedstawiono bardzo skrótowo, w postaci jednego wykresu. Dane te porównują pod względem obecności wirusowych antygenów dwa rodzaje chimerycznych cząstek kapsydopodobnych, które zostały wytworzone w roślinach z użyciem dwóch podejść, (a) ekspresji chimerycznego konstruktu kodującego HBcAg z insertem dodatkowego epitopu z antygenu HBsAg oraz (b) koekspresji powyższego konstruktu oraz konstruktu kodującego niezmodyfikowany antygen HBcAg, (3) Wyniki zawarte w publikacji nie włączonej do rozprawy. Nie pokazano tutaj żadnych danych. Ta część zawiera jedynie opis możliwości zastosowania cząstek kapsydopodobnych HBcAg do otoczkowania superparamagnetycznych nanocząstek. Wkład mgr. Pyrskiego do tej publikacji polegał na dostarczeniu wytworzonych w roślinach cząstek HbcAg.

Formalny opis rozprawy

Główna część rozprawy jest 98-stronicowym tekstem podzielonym na 9 ponumerowanych rozdziałów o następujących tytułach: Streszczenie, Summary (czyli streszczenie po angielsku), Wprowadzenie, Cząstki kapsydopodobne HBcAg jako nośnik, Hipotezy badawcze i cele pracy, Najważniejsze Materiały i Metody Użyte w Badaniach, Najważniejsze Wyniki Przeprowadzonych Badań, Podsumowanie Badań i Wnioski oraz Literatura. Końcowa, dziesiąta część rozprawy to Aneks, w skład którego wchodzą dwie publikacje oraz oświadczenia współautorów. Rozprawa poprzedzona jest Spisem treści oraz informacją o zgodności rozprawy z wytycznymi zawartymi w Uchwale Rady Naukowej IGR PAN z dn. 21 lutego 2013 r. Zaznaczyć należy, że rozprawa przygotowana jest w formie mieszanej. Z jednej strony, oparta jest na dwóch wieloautorskich publikacjach, w których mgr Marcin Pyrski jest pierwszym autorem (Vaccine 2017, IF=3,285; Vaccines 2019, IF=4,760). Z drugiej strony, w rozprawie przedstawiono także dodatkowe wyniki, które nie są zawarte w wyżej wymienionych publikacjach. W związku z tym, moim zdaniem, rozprawę trudno określić jako zawierającą typowy układ rozpraw doktorskich.

Ocena merytoryczna

Rozdział Wprowadzenie składa się pięciu części, które są dobrym wstępem do lektury dalszej części rozprawy. Pierwsza część Wprowadzenia podaje podstawowe informacje dotyczące ssaczego układu immunologicznego i jego roli w szczepieniach. Następna część jest nieco bardziej rozbudowana, autor omawia tutaj podstawowe problemy związane ze szczepieniami doustnym oraz jelitową tkanką limfatyczną GALT. Omówienie to jest przydatne do oceny znaczenia wyników przedstawionych szczególnie w publikacji nr 2. Część trzecia omawia biotechnologiczne podejścia mające na celu uzyskanie szczepionek doustnych. W następnych dwóch częściach omówione zostały kolejno: (a) podstawowe informacje dotyczące antygenu rdzeniowego (HBcAg) wirusa zapalenia wątroby typu B oraz (b) dotychczasowe podejścia zmierzające do wytworzenia tego antygenu w systemach roślinnych. Kolejny rozdział należałoby moim zdaniem zaliczyć także do rozdziału Wprowadzenie. W rozdziale tym został przybliżony problem użycia cząsteczek kapsydopodobnych jako nośników dodatkowych epitopów lub do otoczkowanie nanocząstek. Nie rozumiem idei wyłączenia tej części w oddzielny rozdział, ponieważ zaburza to ciągłość odbioru rozprawy a przedstawiona wiedza jest elementem wprowadzenia do tematyki. Powyższe części rozprawy zawierają trafnie dobrane cytowania literatury, łącznie 174 pozycje, prezentują w sposób logiczny i wystarczający aktualną wiedzę związaną z tematyką rozprawy a jej sposób omówienia świadczy o dojrzałości naukowej autora rozprawy.

Kolejna część rozprawy określa cel pracy polegający na weryfikacji kilku dość oczywistych założeń dla osób wprowadzonych w tematykę. Po pierwsze, założenia wysokiej immunogenności cząstek kapsydopodobnych HBcAg uzyskanych w systemach roślinnych po podaniu domięśniowym oraz doustnym. Po drugie, założenia możliwości uzyskania cząstek kapsydopodobnych HBcAg w systemie roślinnej ekspresji przejściowej. Po trzecie, możliwości zastosowania tych cząstek do otoczkowania nanocząstek chemicznych. Jak wspomniałam, są to założenia nieskomplikowane, jednak porządkujące układ i cele rozprawy.

W następnym rozdziale zawarty jest Opis podstawowego materiału i metod użytych w badaniach. Rozdział ten jest dość krótki ale pomaga rozdzielić wyniki uzyskane w trakcie pracy doktorskiej od wcześniejszych prac zespołu prof. Pniewskiego oraz zrozumieć wkład autora rozprawy w kontynuację tej tematyki. Transgeniczne roślinny tytoniu i sałaty zostały uzyskane w ramach wcześniejszych prac zespołu. Pan mgr Pyrski w trakcie pracy nad doktoratem uzyskał materiał roślinny zawierający wyższą dawkę antygenu, dzięki wykorzystaniu wektora do ekspresji przejściowej zapewniającego wydajny poziom produkcji antygenu w formie cząsteczek kapsydopodobnych. Dodatkowo, nowość podejścia prezentowanego w rozprawie polegała na zastosowaniu odmiennych schematów immunizacji oraz użycia mieszanych dróg podania antygenu. Opis metod wskazuje, że autor rozprawy wykazał się umiejętnością oczyszczania oraz charakterystyki cząstek wirusopodobnych oraz weryfikacji odpowiedzi immunologicznej u zwierząt, którym podano ten materiał.

Kolejna część rozprawy to Omówienie uzyskanych wyników, które podzielono na trzy części. Wyniki opisane w dwóch opublikowanych pracach dołączonych w Aneksie omówiono w części pierwszej. Wyniki pokazane w Publikacji Nr 1 świadczą o indukcji mieszanej odpowiedzi immunologicznej przez częściowo oczyszczony, podany bez dodatkowego adjuwanta, antygen wyprodukowany w materiale roślinnym. Uzyskanie odpowiedzi mieszanej (typu Th1 i Th2) sugeruje, że szczepionki takie mogły być skutecznymi szczepionkami terapeutycznymi (nie tylko protekcyjnymi), co jest szczególnie ważne w leczeniu istniejącego zakażenia wirusem HBV. W Publikacji Nr 2 wykazano, że doustne podanie materiału roślinnego zawierającego niewielkie dawki antygenu HBcAg myszom, które wcześniej dostały domięśniowo jednokrotną porcję materiału roślinnego zawierającego 10-krotnie wyższą dawkę antygenu HcAg skutkuje dodatkowym wzmocnieniem odpowiedzi immunologicznej. Warto zaznaczyć, że antygen podawano w materiale roślinnych bez dodatkowego adjuwanta. Warto podkreślić, że doustne dawki antygenu, szczególnie w przypadku HBV, rozprzestrzeniającego się droga pokarmową, są bardzo pożądaną drogą podania.

Druga część wyników to krótki opis danych nieopublikowanych wsparty jednym wykresem. Wykryto obecność zarówno epitopu charakterystycznych dla HBcAg użytego jako nośnik oraz epitopu a z antygenu HBsAg, użytego do stworzenia rekombinowanej hybrydowej wersji HBcAg-aSHBs-Ag. Wyniki te sugerują, że możliwe jest uzyskanie mozaikowych cząstek wirusopodobnych na bazie zmodyfikowanego HBcAg. Ta część wyników jest opisana nieco zbyt skrótowo. Na przykład, zabrakło informacji o tym w jakim systemie został uzyskany analizowany materiał.

W trzeciej części wyników autor omówił dane z pracy opublikowanej (Rybka i wsp. 2019, Nanomaterials 9:155), w której jest współautorem. W pracy tej pokazano, że kapsydopodobne cząstki HBcAg wytworzone za pomocą roślinnego systemu ekspresji przejściowej mogą zostać użyte jako otoczki superparamagnetycznych cząstek tlenku żelaza. Wkładem mgr. Marcina Pyrskiego do tej pracy było przygotowanie cząstek kapsydopodobnych użytych do związania magnetycznego rdzenia. Autor nie wyjaśnia z jakiego powodu ta publikacja nie jest włączona do aneksu a omówienie tej części w rozprawie w rozdziale Wyniki nie jest wystarczająco rozbudowane ani udokumentowane.

Rozprawa nie zawiera odrębnego rozdziału Dyskusja. Prawdopodobnie autor zakłada, że omówienie wyników jest w jakiejś formie także ich przedyskutowaniem. Jest to jednak sprawa dyskusyjna z powodu nietypowej mieszanej formy rozprawy.

Uwagi i pytania

Pod względem edytorskim rozprawa przygotowana jest dość starannie. Autor uniknął dużych błędów stylistycznych i literówek. Nie jest to jednak tekst przejrzysty. A zrozumienie znaczenia opisanych osiągnięć badawczych wymaga dużego wkładu pracy ze strony recenzenta, głównie z powodu niekonsekwentnego układu części Wyniki. Moja najważniejsza uwaga krytyczna dotyczy wybranej przez pana mgr. Pyrskiego mieszanej formy rozprawy, która jest mało przejrzysta i trudna do oceny. Jednak, nawet ograniczając ocenę rozprawy jedynie do dwóch opublikowanych prac załączonych w Aneksie uznaję, że osiągnięte wyniki są poszerzeniem wiedzy na temat możliwego wykorzystania wytworzonych w roślinach wirusopodobnych cząsteczek HBcAg w charakterze szczepionki terapeutycznej przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B. Autor rozprawy dostarczył stosunkowo kompletny przegląd stanu wiedzy dotyczący tematyki badawczej potwierdzony odpowiednio wybranymi oraz aktualnymi pozycjami literatury. Z powodu dość niekonwencjonalnego „mieszanego" układu rozprawy zabrakło mi jednak przedyskutowania wyników np. w formie zbiorczego zestawienia z osiągnięciami innych zespołów zajmujących się wytwarzaniem antygenów HBV w systemach roślinnych. Dobrze byłoby, aby takiego zestawienia

nie zabrakło w trakcie publicznej obrony. Poza tym, chciałabym usłyszeć opinię doktoranta na temat możliwości i/lub ewentualnej perspektywy czasowej wprowadzenie szczepionki opartej na uzyskanym materiale roślinnym. Warto podkreślić, że praca ma charakter biotechnologiczny. W zawiązku z tym, moim kolejnym pytaniem jest czy prowadzone są działania prowadzące do wdrożenia wyników uzyskanych w trakcie realizacji tej rozprawy.

Podsumowanie

Pomimo krytycznych komentarzy wyrażonych powyżej uważam, że oceniana rozprawa zawiera szereg wartościowych elementów, które składają się na moją ogólną pozytywną ocenę końcową. Autor rozprawy wykazał się znajomością warsztatu eksperymentalnego z dość rozległej tematyki oraz wiedzą ogólną w dziedzinach związanych z tematyką rozprawy. Pan mgr Marcin Pyrski wykazał się dojrzałością naukową zapewniającą możliwość dalszego niezależnego prowadzenia badań naukowych. Podsumowując, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2OL6r, poz.882). W związku z tym **wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie pana mgr Marcina Pyrskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Prof. dr hab. Agnieszka Sirko