

Prof. dr hab. Bożena Moskwa
Zakład Epizootiologii i Patologii
Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego
PAN
00-818 Warszawa
ul. Twarda 51/55

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgr Marcina Grzybowskiego
pt. "Rekombinantowe białka ROP5 i ROP18 *Toxoplasma gondii* jako antygeny
diagnostyczne i szczepionkowe"

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dotyczy niezwykle istotnego problemu: toksoplazmozy wywoływanej przez kosmopolitycznego, wewnątrzkomórkowego pierwotniaka *Toxoplasma gondii*. Dostępne bazy danych wskazują, że nawet 1/3 populacji ludzkiej mogła mieć kontakt z pasożytem, a wysoka seroprewalencja sięgająca 90% wykazuje wysoką korelację min. z płcią, wiekiem, upodobaniami kulinarnymi oraz statusem immunologicznym pacjentów. Pomimo znacznego postępu w badaniach nad biologią pasożyta, antygenami i proteomem tego pierwotniaka, a także odpowiedzią immunologiczną żywicieli, nie udało się jeszcze opracować żadnego skutecznego zabezpieczenia.

Dlatego też w wielu ośrodkach naukowych prowadzone badania są ukierunkowane na opracowanie skutecznej szczepionki przeciw *T. gondii*. Wykorzystywane we wcześniejszych badaniach oczyszczone antygeny natywne nie dały zadawalających wyników w postaci wysokiego stopnia protekcji. Dlatego w dalszym ciągu prowadzone są prace nad opracowywaniem szczepionki z wykorzystaniem rekombinowanych białek pasożyta.

Badania immunogenności natywnych białek wytwarzanych przez pasożyta są niezwykle cenne, ponieważ pozwalają ustanowić podstawy, wytyczyć kierunki dalszych badań. Jednakże niepodważalną ich wadą, czy też ograniczeniem jest znikoma lub bardzo mała ilość produktu jakim dysponuje badacz. Dlatego też coraz częściej wykorzystuje się narzędzia wcześniej niedostępne. Mam tu na myśli klonowanie, sekwencjonowanie, uzyskiwanie rekombinowanych białek w różnych systemach ekspresji, co w końcowym etapie skutkuje uzyskaniem znacznie większej ilości produktu, umożliwiającą przeprowadzenie kompleksowych badań.

W recenzowanej rozprawie doktorskiej, badania zostały ukierunkowane na aktywność dwóch rekombinowanych białek ROP5 i ROP18.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została podzielona na 8 głównych rozdziałów: wstęp, cele pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz spis literatury. W strukturę rozprawy włączono także wykaz skrótów, który jest niezwykle pomocny w analizowaniu wyników oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Właściwą treść Rozprawy poprzedza informacja o źródłach finansowania badań prowadzonych przez Doktoranta.

Rozdział zatytułowany „**Wstęp**” został zawarty na 18 stronach. Doktorant podzielił ten rozdział na 5 części, w których: przedstawił cykl rozwojowy pasożyta, zwracając uwagę na szeroki wachlarz żywicieli, poruszył aspekty immunologiczne zarażenia uwzględniając najważniejsze markery, dokonał charakterystyki białek ROP5 i ROP18 uwzględniając ich udział w mechanizmach obronnych, przedstawił również aktualne trendy diagnostyki i immunoprofilaktyki zarażenia. „Wstęp” recenzowanej rozprawy doktorskiej został przygotowany w sposób bardzo staranny, a zawarte w nim podrozdziały dotyczą najistotniejszych zagadnień związanych z realizowanym doktoratem.

Cele badań sprecyzowane w 5 punktach (str. 26) poprzedzają syntetyczne przedstawione przesłanki do podjęcia badań. Pomimo, że cele zostały bardzo precyzyjnie określone to moim zdaniem punkt 1 nie jest bezpośrednim celem badawczym, a jedynie etapem niezbędnym do wykonania aby właściwe cele zostały osiągnięte.

Rozdział zatytułowany „**Material**” zawarty na 12 stronach pracy zawiera niezwykle szczegółowe zestawienia odczynników, zestawów do izolacji oraz buforów wykorzystywanych w procedurach badawczych. Wszystkie te informacje są niezwykle istotne, jednakże moim zdaniem rozprawa doktorska nie wymaga aż tak szczegółowej prezentacji składów poszczególnych buforów (nie jest to jednak wada opracowania).

Rozdział zatytułowany „**Metody**” zawarty na 17 stronach pracy zawiera szczegółowe opisy procedur badawczych. Dla większej przejrzystości Doktorant wprowadził schematy: przejętej strategii klonowania (Rycina 4.1.), immunizacji zwierząt (Rycina 4.2.), przebiegu analizy fluorocytometrycznej (Rycina 4.3.), analizy cytometrycznej (Rycina 4.4.), zarażenia myszy C57BL/6 (Rycina 4.5.) oraz badań immunoproekcji (Rycina 4.6.). Opis stosowanych procedur badawczych został przygotowany starannie, jednakże oddzielne prezentacja materiałów (odczynników), wymagała od recenzenta wielokrotnego powracania do rozdziału poprzedzającego. W mojej opinii nie zbyt precyzyjnie został przedstawiony schemat badań. Przedstawiony przez Doktoranta schemat doświadczeń sugerował, że szeroki panel badań immunologicznych został przeprowadzony z wykorzystaniem dwóch szczepów myszy immunizowanych białkami ROP5, ROP18 oraz ROP5+ROP18 po ich zarażeniu. Dopiero dokładna analiza schematów oraz wyników pozwoliła ustalić, że badania te wykonano na myszach immunizowanych lecz nie zarażanych. Natomiast zarażenie myszy immunizowanych posłużyło jedynie do oceny stopnia protekcji w fazie ostrej i przewlekłej zarażenia.

W rozdziale „**Metody**” zamieszczono również informacje dotyczący statystycznej analizy wyników (str. 55). Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant wykorzystał wielowariantową analizę uzyskanych wyników, co daje gwarancją prawidłowej analizy i interpretacji wyników. Analizując wyniki przeprowadzonych badań Doktorant posługuje się pojęciem „dane odstające” oraz „dane ekstremalne” (Rycina 5.6. oraz 5.7.). Jakie znaczenie dla interpretacji wyników mają takie dane? Z czego mogą wynikać? Jak należy postępować, aby interpretacja wyników była prawidłowa?

Rozdział „**Wyniki**”, najdłuższy w recenzowanej pracy został przedstawiony na 21 stronach. Zawiera on 20 tabel oraz 25 rycin, w których zamieszczono kompleksowe zestawienie wyników. Mnogość wyników zamieszczonych w recenzowanej rozprawie potwierdza jej pracowitość i złożoność. Podkreślić należy również fakt, że badania zostały zaprojektowane w sposób niezwykle dokładny i konsekwentny. Realizacja jednego zadania implikowała możliwość wykonania następnego etapu.

W mojej opinii wyniki uzyskane przez Doktoranta dotyczą trzech istotnych zagadnień. Pierwsze z nich to analiza przydatności antygenów ROP5 i ROP18 w serodiagnostyce toksoplazmozy. Badania te Doktorant prowadził równolegle wykorzystując surowice z zarażenia kontrolowanego (model myszy) oraz surowice ludzkie. Drugie zagadnienie to ocena właściwości immunogennych antygenów ROP5 i ROP18 względem układu immunologicznego potencjalnego żywiciela. Natomiast trzecie zagadnienie obejmowało ocenę przydatności immunoprotekcyjnej badanych antygenów w ograniczaniu rozwoju fazy ostrej i przewlekłej toksoplazmozy.

Jednak aby takie analizy przeprowadzić Doktorant wykonał ciąg doświadczeń, których wyniki doprowadziły do uzyskania czystych i jednorodnych antygenów rekombinowanych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wyniki uzyskane w tym etapie badań, jak również wyniki wskazujące na przydatność tychże antygenów w diagnozowaniu toksoplazmozy w warunkach modelowych zostały już wcześniej wysoko ocenione przez innych recenzentów. Wyniki te zostały opublikowane w publikacji pt. „*Toxoplasma gondii*: Cloning, expression and immunoreactivity of recombinant ROP5 and ROP18 antigens” autorstwa Grzybowski M.M., Dziadek B., Dziadek J., Gatkowska J., Dzitko K., Długowska H. (*Experimental Parasitology*, 150, 1-6, DOI: 10.1016/j.exppara.2015.01.006).

W doktoracie została również oceniona wartość diagnostyczna antygenów rekombinowanych względem surowic pochodzących od pacjentów diagnozowanych w specjalistycznych laboratoriach. Wyniki przedstawione w Tabeli 5.3 (str. 65) wskazują na bardzo wysoką wartość cut-off, wahającą się w granicach od 0,202 do 0,590 dla IgM oraz 0,211 do 0,609 dla IgG. Na wartość tą może wpływać wiele czynników, które Doktorant analizuje w dyskusji. Moim zdaniem należałoby wziąć pod uwagę wpływ bardzo dużych moim zdaniem stężeń białek którymi opłaszczano płytki do testu ELISA. Jeśli antygen ROP18 użyto w stężeniu 20 µg/ml to oznacza, że do każdej studzienki wprowadzono aż 2 µg białka. Duże znaczenie dla wyników testu ELISA ma również rodzaj używanych płytek. Doktorant pisze o zastosowaniu płytek MaxiSorb (Nunc), czy wykorzystywano inne rodzaje płytek? Czy wykonując test z surowicami ludzkimi przeprowadzono dodatkową optymalizację dla rozcieńczenia przeciwciał II-rzędowych? Rozcieńczenie stosowane do badania surowic mysich nie musi być tożsame dla badań surowic ludzkich. Opisując wyniki dotyczące przydatności diagnostycznej (str. 66-67) Doktorant zwraca uwagę na „nieprzydatność” antygenów wskazując na najniższe wartości czułości, specyficzności i dokładności testu. Moim zdaniem należało bardziej podkreślić potencjalną przydatność antygeny ROP18, dla którego uzyskano najwyższe

wartości dokładności czyli prawdopodobieństwa prawidłowej diagnozy zarówno w przypadku oznaczania poziomu IgM jak i IgG (Tabela 5.4).

Oceniając właściwości immunogennych antygenów ROP5 i ROP18 względem układu immunologicznego potencjalnego żywiciela Doktorant analizował zmiany poziomu dwóch istotnych dla funkcjonowania układu immunologicznego cytokin: IF- γ oraz IL-10. Pierwsza z nich jest niejako wyznacznikiem odpowiedzi immunologicznej Th1, a druga Th2. Wyniki wykazały, że zarówno splenocyty wyizolowane z śledzion immunizowanych myszy szczepu BALB/c, jak i szczepu C3H/HeOuj produkowały obie cytokiny po stymulacji antygenami ROP5 i ROP18 pełnej długości, a także ich C-końcowymi fragmentami (ROP5-C i ROP18-C). Wzrost stężenia badanych cytokin był obserwowany względem układu kontrolnego PBS i poli(I:C). Niezwykle interesujący wynik uzyskano w przypadku myszy szczepu C3H/HeOuj immunizowanych ROP5 + ROP18. Stężenia badanych cytokin wydają się być porównywalne dla poszczególnych antygenów wykorzystanych do stymulacji splenocytów (Rycina 5.9., str. 69 oraz Rycina 5.10., str 70.). Ponieważ wynik ten uzyskano w układzie kontrolnym, u zwierząt nie zarażonych *T. gondii* trudno podejmować próbę oceny jego znaczenia dla przebiegu parazytozy. Czy Doktorant podejmie próbę oceny tego wyniku w kontekście jego znaczenia dla hipotetycznego rozwijającej się parazytozy?

Interesujące są wyniki dotyczące ekspresji powierzchniowych receptorów CD69⁺, CD69⁺CD4⁺ oraz CD69⁺CD8⁺. W żadnej z badanych grup myszy immunizacja nie zmieniła w sposób statystycznie znamiennej odsetka limfocytów CD69⁺ oraz CD69⁺CD8⁺. Wykazano natomiast statystycznie istotny wzrost odsetka limfocytów CD69⁺CD4⁺. Jakim zdaniem Doktoranta następstwa może implikować taki wynik dla rozwoju parazytozy?

Badając właściwości immunoprotekcyjne badanych antygenów w ograniczaniu rozwoju fazy ostrej i przewlekłej toksoplazmozy Doktorant wykazał ich „przydatność”. Jednakże moim zdaniem w przypadku fazy ostrej wyniki te zostały opisane zbyt ogólnikowo (rozdział 5.5.1., str. 75). Z załączonej Ryciny 5.11. wynika, że immunizacja myszy BALB/c z wykorzystaniem ROP18 znacząco wydłużyła ich przeżywalność w odniesieniu do grup kontrolnych i immunizowanych ROP5 lub ROP5 + ROP18 (>80 dni). Natomiast w grupach myszy szczepu C3H/HeOuj tak znaczącego wydłużenia czasu życia nie obserwowano. Przeżywalność wynosiła od 6 do 9 dni.

Wyniki badań nad właściwościami ochronnymi antygenów przed rozwojem fazy przewlekłej wykazały znaczące zmniejszenie liczby cyst w mózgach myszy po immunizacji pojedynczymi antygenami oraz w kombinacji. Poziom protekcji bo tak należy rozumieć zmniejszenie liczby cyst zależał od jakości zastosowanego antygeny, ale również od szczepu zarażanych myszy. Dla obu szczepów badanych myszy najmniejszy poziom protekcji uzyskano po podaniu ROP5, natomiast największy po podaniu ROP5 + ROP18. Poza „ujawnieniem bardzo wyraźnych różnic w podatności na chroniczne zarażenie *T. gondii*” co zasadniczo jest potwierdzeniem wyników dla tak skonstruowanego schematu badań (mam tu na myśli dobór szczepów myszy) uzyskano jeszcze jeden istotny wynik, troszkę zbagatelizowany przez Doktoranta. Mam tu na myśli fakt, że bez względu na jakość zastosowanego do immunizacji białka, zdecydowanie wyższy poziom protekcji uzyskano dla szczepu myszy C3H/HeOuj. W porównaniu z myszami BALB/c jest to szczep bardziej wrażliwy na zarażenie *T. gondii* (str. 27). A zatem dla końcowego efektu ochronnego przed rozwijającym się zarażeniem ma znaczenie nie tylko jakość zastosowanych białek, ale

również szczep myszy użyty w badaniach, co powinno znaleźć odzwierciedlenie we wnioskach wynikających z badań.

Kolejnym rozdziałem recenzowanej rozprawy jest „**Dyskusja**”, zawarta na 12 stronach, która została podzielona na podrozdziały bardzo ściśle związane z zadaniami badawczymi realizowanymi w ramach rozprawy. Na pierwszy „rzut oka” takie wyraźne podzielenie dyskusji mogłoby być zarzutem dla Doktoranta. Jednakże ze względu na fakt, że każde z rozwiązywanych zagadnień było realizowane w innym układzie doświadczalnym, próba łącznej dyskusji wyników nie byłaby poprawna. W dyskusji Doktorant konfrontuje „swoje” wyniki z danymi literaturowymi. Niektóre z nich są zbliżone do wcześniej opublikowanych, jednakże znamienita większość uzyskanych wyników stanowi swoiste novum w literaturze światowej. W takich przypadkach Doktorant staje przed bardzo trudnym zadaniem, ponieważ nie znajduje odniesienia do swoich wyników w dostępnej literaturze i może jedynie „spekulować” ale w dobrym znaczeniu tego słowa.

Kolejnym rozdziałem recenzowanej rozprawy jest spis cytowanej „**Literatury**”, który zawiera 171 pozycji, odzwierciedlających aktualny stan wiedzy w realizowanym zakresie badań. Doktorant wykazał się znajomością wyników badań uzyskanych w oparciu o najnowsze metody i technologie, ale również starszych, dotyczących zagadnień immunologicznych (Bülow i Boothroyd, 1991, czy Buxton i Innes, 1995).

Niezwykle istotnym rozdziałem każdej rozprawy doktorskiej są „**Wnioski**”. W recenzowanej rozprawie wnioski zostały wplecione w rozdział „**Podsumowanie i wnioski**”. Moim zdaniem Doktorant sformułował jedynie dwa wnioski: punkty (1) oraz (4b). Pozostałe punkty to wyniki i ich omówienie. W mojej opinii wyniki uzyskane w recenzowanej rozprawie doktorskiej dają podstawy do wyciągnięcia znacznie większej liczby wniosków ważnych z naukowego i praktycznego punktu widzenia. Myślę, że przygotowując publikację Doktorant je ustanowi.

Praca mgr Marcina Grzybowskiego jest bardzo starannie zredagowana, z zachowaniem jednego kolorytu rycin i schematów. Została napisana z użyciem wielu niekonwencjonalnych zwrotów (np. „Swoj sukces rozrodczy pasożyt ten zawdzięcza...” (str. 8); „cykl rozwojowy, w którym uczestniczą trzy stadia rozwojowe (str. 8); działanie cytokiny w kooperacji (str. 11), zdumiewająca zdolność tego pasożyta do zarażania praktycznie każdego stałocieplnego organizmu (str. 77), co w konsekwencji przełożyło się na lekkość jej czytania. Są jednak pewne zwroty moim zdaniem niepoprawne. Mam tu na myśli częste używanie spolszczonej rzeczownikowej nazwy gatunkowej pasożyta jak: liczba toksoplazm, przeciw toksoplazmom, zabijania toksoplazm, komórki toksoplazm itd. Doktorant używa także określenia „białka rekombinantowe”, które wydaje się być bezpośrednim tłumaczeniem z języka angielskiego, zamiast zaakceptowanej w języku polskim formy: „białko rekombinowane”. W pracy znajduje się kilka drobnych uchybień technicznych.

Dla przykładu:

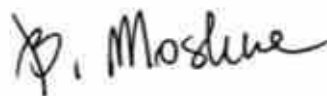
- str. 54: „Szczegółowy opis ustanowionych grup doświadczalnych zamieszczono w podrozdziale 4.26.”. Tymczasem podrozdział 4.26 (str. 50) zawiera opis stymulacji *in vitro* splenocytów antygenami *T. gondii*;
- na Rycinach 5.6 (str. 61) oraz 5.7 (str. 63) zaznaczono dwukrotnie anty-ROP18, zabrakło oznaczeni dla anty-ROP18-C;
- dwukrotnie zastosowano tą samą numerację rycin (str.70 i 74 oraz str. 69 i 72);
- stosunek komórek CD4⁺ do CD8⁺ (Rycina 5.9.) czy stosunek miana IgG1 do IgG2 (Rycina 5.10.) powinien być konkretną liczbą, tymczasem na wykresach zawarto szczegółowe wyniki dotyczące omawianych parametrów immunologicznych,

Jednakże uchybienia te nawet w najmniejszym stopniu nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, a uzyskane przez Doktoranta wyniki stanowią Jego oryginalne osiągnięcie i w tym zakresie poszerzają naszą wiedzę w zakresie badań nad uzyskaniem skutecznej szczepionki przeciw *T. gondii*.

Poksumowanie:

Stwierdzam, że przekazana mi do recenzji rozprawa doktorska **mgr Marcina Grzybowskiego pt. "Rekombinantowe białka ROP5 i ROP18 *Toxoplasma gondii* jako antygeny diagnostyczne i szczepionkowe"** odpowiada warunkom rozprawy doktorskiej i wobec powyższego przedkładam Radzie Naukowej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ wniosek o dopuszczenie mgr Marcina Grzybowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze nowatorstwo metod badawczych i uzyskanych wyników, oraz opublikowanie ich części w renomowanym czasopiśmie wnoszę również o wyróżnienie dla niniejszej rozprawy.



Warszawa, dn. 20.08.2015 r.

Prof. dr hab. Bożena Moskwa