



CENTRUM MEDYCZYNY REGENERACYJNEJ  
UNIwersytet Medyczny w Białymstoku  
ul. Waszyngtona 15B, 15-269 Białystok

Białystok, 10 lutego 2024 r.

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk biotechnologicznych  
pt. „Development of an in vitro method to assess the immunogenicity of vaccine  
components in the prevention of infectious diseases”

autorstwa

mgr Joanny Baran

realizowanej pod kierunkiem

dr hab. Moniki Staniszewskiej, prof. WUT

oraz promotora pomocniczego

dr Małgorzty Milner-Krawczyk

Przedmiotem niniejszej recenzji jest rozprawa doktorska poświęcona ocenie odpowiedzi immunologicznej na składniki platformy szczepionkowej. Tematyka ta jest niezwykle istotna i aktualna, szczególnie w kontekście globalnych wyzwań związanych z pandemią COVID-19 oraz konieczności doskonalenia strategii immunoprofilaktyki. Praca wpisuje się w szeroki nurt badań nad mechanizmami odporności przeciwwirusowej i ich zastosowaniem w rozwoju nowych narzędzi terapeutycznych oraz diagnostycznych. Opracowanie skutecznych metod oceny odpowiedzi immunologicznej w procesie tworzenia nowych szczepionek stanowi kluczowy element ich walidacji oraz projektowania innowacyjnych rozwiązań terapeutycznych, co podkreśla znaczenie podjętej przez Doktorantkę problematyki. Istotnym atutem rozprawy jest jej interdyscyplinarność, obejmująca zarówno badania podstawowe, jak i aspekty translacyjne. W kontekście dynamicznego rozwoju technologii immunodiagnostycznych oraz nowych strategii szczepień, uzyskane wyniki mogą stanowić istotny wkład w rozwój tej dziedziny.

Rozprawa została przygotowana w języku angielskim i posiada układ charakterystyczny dla dysertacji doktorskiej w formie monografii. Liczy 199 stron i obejmuje dziewięć rozdziałów: wprowadzenie, założenia i cele badawcze, materiały i metody, wyniki, dyskusję, ograniczenia badania, wnioski końcowe, bibliografię oraz załączniki. Całość poprzedzają podziękowania, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz osiągnięć doktorantki, lista skrótów oraz spis treści. Z obowiązku recenzenta muszę zauważyć, że spis treści, pomimo że posiada czytelną strukturę, nie w pełni odzwierciedla podział pracy na poszczególne rozdziały. Praca została wzbogacona 71 rycinami oraz 26 tabelami.

Należy zwrócić uwagę na osiągnięcia Doktorantki, która jest autorem wniosku patentowego oraz pierwszym autorem trzech oryginalnych publikacji naukowych, z których dwie ukazały się w czasopiśmie *BioTechnology* (spoza listy filadelfijskiej), a jedna znajduje się w recenzji w czasopiśmie *Immunologic Research* (IF>3, preprint dostępny w Research Square). Ponadto, Doktorantka jest pierwszym autorem artykułu przeglądowego w *Journal of Current Science and Technology* (również spoza listy filadelfijskiej), współautorem czterech publikacji oryginalnych oraz czterech publikacji przeglądowych, jak również współautorem jednego patentu. Jej dorobek obejmuje udział w jednej konferencji naukowej oraz dwie nagrody naukowe (MedTech-Athon award i Demo Day). Osiągnięcia te świadczą o znaczącym zaangażowaniu Doktorantki w działalność naukową. Niemniej jednak należy zauważyć, że część publikacji została opublikowana w czasopismach o niskich wskaźnikach bibliometrycznych, co warto w przyszłości uwzględnić przy wyborze miejsc publikacji wyników badań.

Wprowadzenie jest syntetyczne i obejmuje 27 stron, wzbogaconych o 12 rycin i 4 tabele. W pierwszym podrozdziale Doktorantka opisuje mechanizmy odpowiedzi przeciwwirusowej układu immunologicznego. Wskazane byłoby jego uzupełnienie o: (1) rolę bariery nabłonkowej dróg oddechowych, (2) charakterystykę hematopoetycznych komponentów odpowiedzi nieswoistej, ze szczególnym uwzględnieniem komórek prezentujących antygen, (3) opis czynników transkrypcyjnych regulujących funkcje limfocytów T pomocniczych oraz ich heterogenność, (4) mechanizmy kontrolujące odpowiedź limfocytów B i plazmocytów, w tym produkcję przeciwciał różnych klas w odpowiedzi przeciwwirusowej. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka charakteryzuje wirusa SARS-CoV-2, omawia odpowiedź cytokinową wywołaną infekcją, stosowane terapie i metody profilaktyki zakażeń oraz przedkliniczne metody badania szczepionek.

W rozdziale drugim Doktorantka prezentuje założenia pracy oraz cel przeprowadzonych analiz. Celem pracy było opracowanie nowych testów do oceny odpowiedzi immunologicznej na składniki „platformy” szczepionkowej. W rozdziale tym Pani magister Baran opisuje również w 9 punktach sposób w jakim cel został osiągnięty.

Rozdział dotyczący materiałów i metod zawiera 35 stronicowy, szczegółowy opis zastosowanych technik badawczych. Na szczególne uznanie zasługuje szeroki wachlarz metod obejmujących hodowle komórkowe (klasyczne oraz na pograniczu fazy ciekłej i gazowej), izolację i stymulację *in vitro* komórek jednojądrzastych krwi obwodowej, metody obrazowe, testy enzymatyczne, cytometrię przepływową, testy FlexSet, ilościowy PCR, sekwencjonowanie RNA oraz wykorzystanie modelu *in vivo*. Świadczy to o wysokich kompetencjach Doktorantki w zakresie metodologii eksperymentalnej. Wątpliwości budzi jednak brak informacji dotyczącej zgody Komisji Bioetycznej na wykorzystanie materiału biologicznego od dawców krwi. Ponadto, na rycinie 18 przedstawiającej strategię bramkowania cytogram CD95/CD197 jest częściowo przysłonięty, co utrudnia jego interpretację. Dobrą praktyką stosowaną w publikacjach naukowych jest zamieszczenie wykresów kontrolnych w celu lepszego zobrazowania strategii bramkowania wykorzystywanego podczas analizy danych cytometrycznych. Przedstawione opisy wykorzystanych materiałów i użytych metod nie budzą wątpliwości, są szczegółowe i umożliwiają ich odtworzenie w razie potrzeby.

Rozdział czwarty niniejszej dysertacji stanowi podsumowanie wyników badań, w którym Doktorantka szczegółowo omawia przeprowadzone analizy. Struktura rozdziału obejmuje 14 podrozdziałów, każdy z nich koncentruje się na odrębnym aspekcie badawczym. W podrozdziale 1 przedstawiono wyniki optymalizacji modelu z wykorzystaniem jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC). Rycina 24 przedstawia reprezentatywne cytogramy analizy Annexyna-V/PI, jednak brakuje podsumowania wyników uwzględniającego analizę statystyczną. W treści Doktorantka wskazuje, że optymalizacja protokołu siedmiodniowej hodowli przyczyniła się do wzrostu żywotności komórek o około 40%. Wnioski te wymagają jednak potwierdzenia na podstawie wyników pochodzących z co najmniej kilku niezależnych eksperymentów. Ponadto, nie jest jednoznacznie określone, czy analiza apoptozy obejmowała całkowitą populację PBMC, czy ograniczała się jedynie do limfocytów. Na rycinie 21 (materiały i metody) przedstawiono przykładowe bramkowanie stosowane podczas analizy apoptozy, wskazujące, że analizowane były głównie komórki o średniej wielkości (FSC<sup>med</sup>) i niskiej ziarnistości (SSC<sup>low</sup>). Z praktycznego punktu widzenia

należy podkreślić, że monocyty wykazują większą wrażliwość na kriokonserwację, często podlegając wzmożonej apoptozie po rozmrażaniu. Ich obecność w zastosowanym modelu jest istotna, ponieważ jako komórki prezentujące antygen odgrywają kluczową rolę w eksperymentach funkcjonalnych oceniających fenotyp limfocytów. Proszę o odniesienie się do tej kwestii.

W podrozdziale 2 omówiono efekt cytopatyczny wywołany przez użyty szczep koronawirusa oraz adenowirusa, ilustrowany obrazami z mikroskopu świetlnego. Podrozdział 3 zawiera wyniki analiz cytotoksyczności, z których wynika, że badane czynniki nie miały istotnego wpływu na żywotność komórek podczas 24-godzinnej stymulacji, z wyjątkiem najwyższej dawki rRBD stosowanej wobec komórek VERO E6.

Podrozdział 4 dotyczy analiz przeprowadzonych przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej, umożliwiających ocenę wielkości wybranego szczepu koronawirusa oraz pseudo-SARS-CoV-2. Kolejny, piąty podrozdział zawiera wyniki analiz mikroskopii konfokalnej, przedstawiających internalizację pseudo-SARS-CoV-2 przez komórki VERO E6.

W podrozdziale 6 przedstawiono wyniki analiz ekspresji genu kodującego receptor CD40 w komórkach VERO E6. Wykazano, że ekspresja tego genu istotnie wzrastała po stymulacji określonymi czynnikami, jednak na rycinie 36 nie naniesiono oznaczeń istotności statystycznej. Czy analiza statystyczna była prowadzona? Wyniki sugerują, że ekspresja CD40 była podwyższona po zastosowaniu pseudo-SARS-CoV-2 w obecności przeciwciał anti-Spike (pseudo-SARS-CoV-2 + Ab), podczas gdy sam pseudo-SARS-CoV-2 nie wywoływał tego efektu. Podobny wzrost ekspresji CD40 obserwowano po zastosowaniu rRBD, a dodatek przeciwciał (rRBD + Ab) zdawał się potęgować ten efekt. Nie określono jednak, czy analizowano ekspresję CD40 w komórkach traktowanych wyłącznie przeciwciałem anti-Spike. Powstaje zatem pytanie, czy przeciwciało mogło bezpośrednio wpływać na komórki VERO E6, prowadzić do wzrostu ekspresji CD40 oraz jakie mogłoby mieć to konsekwencje dla wyników innych analiz. Proszę o odniesienie się do tej kwestii.

W podrozdziale 7 przedstawiono wyniki analiz fenotypu limfocytów T (CD4+ i CD8+) po 24 godzinnej stymulacji PBMC. Na rycinach 37, 38, 41, 42 i 44 brakuje oznaczeń błędów (wąsów) na niektórych wykresach słupkowych. W podrozdziale 8 zawarto opis wyników analiz fenotypowych limfocytów B po 24 godzinnej stymulacji PBMC, a podrozdział 9 obejmuje wyniki uzyskane po siedmiu dniach stymulacji.

W podrozdziale 10 Doktorantka przedstawiła dowody na powstawanie mikroosmków Calu-3 w hodowli prowadzonej na granicy fazy ciekłej i gazowej (air-liquid interface).

Nie wyjaśniono jednak czy komórki wykazywały również inne cechy charakterystyczne dla nabłonka dolnych dróg oddechowych takie jak produkcja mucyn, pseudostratyfikacja oraz ekspresja białek ścisłych połączeń komórkowych (ang. tight junction)?

Podrozdział 11 stanowi podsumowanie analiz transkryptomicznych opartych na sekwencjonowaniu RNA. W kontekście tego rozdziału (strona 121) należy zwrócić uwagę na użycie przez Autorkę sformułowania „genome sequencing”, które w odniesieniu do przeprowadzonych badań jest niepoprawne, gdyż w pracy nie przeprowadzono sekwencjonowania genomowego. Ze względu na walory poznawcze uważam, że analiza profilu transkrypcyjnego, szczególnie w odniesieniu do warunku stymulacji AdV1 + rRBD, powinna zostać uzupełniona o analizy funkcjonalne, które można przeprowadzić z wykorzystaniem dostępnego oprogramowania typu Open Source. Takie podejście pozwoliłoby na bardziej kompleksowe zrozumienie wpływu zastosowanej stymulacji na PBMC. W opisie wyników (sekcja 4.11.1, strona 122) Autorka zasugerowała, że znaczna liczba genów podlegających różnicowej ekspresji w warunku stymulacji AdV1 + rRBD może wynikać z potencjalnego zanieczyszczenia rRBD endotoksyną. Należy podkreślić, że weryfikacja czystości rRBD pod kątem obecności lipopolisacharydu (LPS) nie została przeprowadzona, mimo że dostępne są proste i powszechnie stosowane testy pozwalające na jego detekcję. Wysokie stężenia endotoksyny mogą istotnie wpływać na uzyskiwane wyniki, prowadząc do wzmożonej odpowiedzi zapalnej zarówno wśród komórek wrodzonej odporności (głównie monocytów), jak i do aktywacji limfocytów B.

W podrozdziale 12 Doktorantka przedstawiła wyniki analiz przeprowadzonych w modelu kohodowli komórek Calu-3 z PBMC. Zastanawiające jest brak istotnych różnic w odsetkach analizowanych populacji komórkowych.

Podrozdział 13 obejmuje analizę stężenia cytokin ocenianych przy użyciu metody multiplex. Zakres detekcji zastosowanych testów Flex Set, zgodnie z informacjami producenta, wynosił 10 – 2 500 pg/ml. Warto jednak zauważyć, że oznaczone stężenia IL-17A były znacząco poniżej najniższego standardu, natomiast poziomy IL-6, IL-2, IL-12p70, IL-8 oraz IL-1b przekraczały najwyższy standard. W związku z tym zwracam się z prośbą o odniesienie się do tej kwestii oraz o wyjaśnienie obserwowanego stosunkowo wysokiego stężenia TNF, IL-2 oraz IL-1β w próbkach niestymulowanych. Dodatkowo proszę o wskazanie przyczyn, dla których przeprowadzone analizy nie zostały poddane analizie statystycznej.

Ostatni podrozdział przedstawia wyniki badań *in vivo* z wykorzystaniem modelu mysiego, w których oceniano przeżywalność zwierząt po podaniu adenowirusowej platformy

szczepionkowej. Uważam, że istotnym uzupełnieniem tych badań byłaby również analiza poziomu przeciwciał przeciwko zastosowanej platformie. Ponadto proszę o wyjaśnienie kryteriów doboru stężeń poszczególnych platform adenowirusowych.

Przedstawione w dysertacji wyniki są interesujące, a wymienione powyżej kwestie edycyjne i merytoryczne wymagają doprecyzowania i nie umniejszają wartości przeprowadzonych eksperymentów. Z obowiązku recenzenta, zwracam również uwagę na brak informacji dotyczących liczby niezależnych powtórzeń eksperymentów *in vitro* w całym rozdziale 4. Wskazane jest, aby w legendach do rycin przedstawiających wyniki jasno określono liczbę niezależnych eksperymentów oraz sposób prezentacji danych. Prezentacja danych powinna umożliwiać ocenę ich rozrzutu.

Przedstawione wyniki zostały szczegółowo omówione w krytycznej dyskusji, opartej na aktualnym i dobrze dobranym piśmiennictwie. Ponadto, w rozdziale piątym Autorka dokonała analizy ograniczeń przeprowadzonych badań. Przeprowadzona dyskusja świadczy o szerokiej wiedzy merytorycznej Doktorantki oraz jej krytycznym podejściu do uzyskanych wyników.

Podsumowanie rozprawy zawiera sześć wniosków, które odnoszą się do założonego celu badawczego. Należy jednak zauważyć, że niektóre z nich są sformułowane w sposób zbyt ogólny lub wykraczający poza zakres zaprezentowanych wyników:

- 1) Pierwszy wniosek jest zbyt ogólnikowy i wymaga doprecyzowania. Należy podkreślić, że przeprowadzone analizy nie pozwalają na pełną charakterystykę odpowiedzi immunologicznej na infekcje wirusowe co zostało zasugerowane we wniosku. Autorka skupiła się na ocenie odsetka głównych populacji limfocytów, nie uwzględniając aspektów czynnościowych tych komórek. Ponadto, nie opisano bezpośrednich interakcji pomiędzy limfocytami, a komórkami mimikującymi nabłonek. Zalecałbym zatem przeredagowanie tego wniosku tak, aby odnosił się ściśle do uzyskanych wyników.
- 2) Drugi wniosek również nie wynika bezpośrednio z przeprowadzonych badań. W rzeczywistości Autorka nie oceniała aktywacji limfocytów T, lecz jedynie wpływ stymulacji na skład głównych subpopulacji tych komórek. Ponadto, nie badano wpływu analizowanej platformy na rozwój pamięci immunologicznej. Doktorantka oceniła wyłącznie kompozycję poszczególnych populacji limfocytów, nie analizując liczby antygenowo swoistych komórek ani odpowiedzi proliferacyjnej po stymulacji. Nieznana jest przyczyna zaobserwowanych zmian w kompozycji analizowanych

komórek. W związku z tym, na podstawie uzyskanych wyników nie można jednoznacznie stwierdzić, że testowana platforma szczepionkowa wpływa na różne subpopulacje limfocytów T pamięci, jak również na rozwój i różnicowanie limfocytów B.

- 3) W piątym wniosku Autorka podkreśla znaczenie badań *in vitro* i *ex vivo* dla rozwoju immunoterapii, co jest twierdzeniem zasadnym. Nie jest jednak jasne, dlaczego odniesienie to dotyczy immunoterapii, a nie bezpośrednio badań nad szczepionkami i odpornością przeciwwirusową, co stanowi główny kontekst rozprawy.
- 4) W szóstym wniosku Doktorantka stwierdza, że w badaniach *in vivo* przeprowadziła ocenę biodystrybucji oraz bezpieczeństwa platformy szczepionkowej. Jednakże, zakres przeprowadzonych badań nie uzasadnia tak szerokiej konkluzji, co wymaga doprecyzowania.

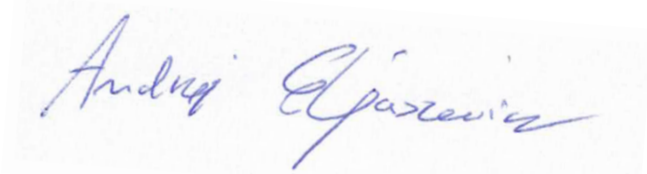
Korzystając z prawa przysługującego recenzentowi i kierując się ciekawością nauką chciałbym poprosić o odpowiedź na kilka pytań związanych bezpośrednio z tematyką rozprawy:

1. Planując stworzenie modelu *in vitro* wykorzystującego jednojądrzaste komórki krwi obwodowej zdrowych dawców oraz komórki podobne do epitelialnych, Autorka zdecydowała się na zastosowanie linii nowotworowych m.in. Calu-3. Obecnie dostępne są linie powstałe z unieśmiertelnionego nabłonka oddechowego zdrowych dawców (np. BEAS-2B), które funkcjonalnie naśladują pierwotne komórki epitelialne dolnych dróg oddechowych. Jakie korzyści lub ograniczenia, Pani zdaniem, wiązałyby się z zastosowaniem takich komórek w opracowanym modelu badawczym?
2. Jakie potencjalne znaczenie dla rozwoju szczepionek przeciwwirusowych może mieć zaproponowany przez Panią model *in vitro*?
3. Czy Pani zdaniem rozwój technologii takich jak organoidy czy organy na chipie są w stanie zastąpić modele zwierzęce w rozwoju szczepień? Czy w związku z dalszym rozwojem w/w technologii klasyczne hodowle komórkowe będą miały zastosowanie jako modele referencyjne?
4. Jakie są dalsze Pani plany badawcze dotyczące opisanej platformy i modelu?

Podsumowując, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi wartościowe, aktualne i oryginalne opracowanie naukowe. Wskazane w recenzji uwagi wymagają doprecyzowania i poprawy, jednak nie podważają one merytorycznej wartości pracy.

Niniejszym stwierdzam, iż przygotowana przez Panią magister rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2020 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2022 poz. 574). Wnoszę więc do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Panią Magister do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Andrzej Eljaszewicz

A handwritten signature in blue ink, reading "Andrzej Eljaszewicz". The signature is written in a cursive style and is centered on a light-colored rectangular background.

Zastępca Dyrektora

Centrum Medycyny Regeneracyjnej  
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 10.02.2024 r.