

Warszawa, 2020.11.16

Prof. dr hab. Piotr Szeleszczuk  
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej  
Zakład Chorób Ptaków  
Wydz. Medycyny Weterynaryjnej  
02-786 Warszawa  
ul. Ciszewskiego 8

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Romanik - Chruścielewskiej  
pod tytułem

### **„OTRZYMANIE I CHARAKTERYSTYKA CZĄSTEK WIRUSOPODOBNYCH PARWOWIRUSA KUR ORAZ ICH WYKORZYSTANIE W DIAGNOSTYCE I PROFILAKTYCE CHORÓB DROBIU”**

Oceny dokonano na zlecenie Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach zgodnie z jej uchwałą z dnia 26.10.2016 roku, na podstawie materiałów przekazanych przez Pana prof. dr hab. Dariusza Bednarka przewodniczącego Komisji Doktorskiej (Nr pisma BRN-410/9/20).

#### **Wstęp**

Powszechnie przyjmuje się, że szczepienia są najważniejszym osiągnięciem, jakie kiedykolwiek zostało wdrożone w medycynie i weterynarii.

Szczepionki odgrywają główną rolę w redukowaniu negatywnego oddziaływania dewastujących patogenów, a mimo upływu ponad 130 lat, naukowe zasady wakcynologii, opracowane przez francuskiego geniusza Ludwika Pasteura pozostają nadal aktualne. Szczepionki wciąż stanowią najbardziej pożądaną metodę ograniczania niekorzystnych skutków zakażeń niebezpiecznymi zarazkami. Warto przy tej okazji przypomnieć, że pierwsza opracowana przez Pasteura w 1885 roku szczepionka zabezpieczała ptaki przed zachorowaniem na cholerę (pasterelozę kur). Od tego też czasu trwają poszukiwania „szczepionki idealnej”, które jednak nie zakończyły się pełnym sukcesem mimo wprowadzania na rynek wciąż bardziej doskonałych bioproduktów chroniących przed chorobami zaraźliwymi. Jedną z alternatywnych idei kreowania nowej jakości antygenów szczepionkowych jest technologia tworzenia nanocząstek wirusopodobnych (Viral Like Particles – VLP) stanowiących nową koncepcję o bogatym wachlarzu zastosowań w branży biomedycznej, włączając w to opracowywanie biopreparatów i dostarczanie substancji leczniczych. Oczekuje się, że prowadzone obecnie nad VLP badania w zakresie materiałów i inżynierii powierzchni poszerzą zakres ich stosowania. Cząsteczki wirusopodobne to syntetyczne nanostruktury, które

naśladują konformację wirusów, jednak całkowicie pozbawione są infekcyjności. Opierają one swoje działanie na właściwej wirusowym białkom kapsydowym zdolności do samoorganizacji, oferując elastyczną platformę, która może wnikać do wnętrza komórek i dostarczać do nich określoną zawartość. Potencjalne zastosowania cząsteczek VLP wykraczają bardzo szeroko poza granice biomedycyny, obejmując również poprawę bezpieczeństwa żywnościowego i zdrowia zwierząt.

Jak dotąd mimo znaczącego postępu w tym zakresie rola parwowirusów występujących u drobiu grzebiącego nie została w pełni wyjaśniona, choć na podstawie uzyskanych wyników można sądzić, iż zarazki te odgrywają istotną rolę w enteropatiach oraz prawdopodobnie działają immunosupresyjne. W Polsce do czasu rozpoczęcia przez Zespoły badawcze z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach ponad 10 lat temu, nie prowadzono pogłębionych badań nad enteropatią drobiu, nie prowadzono również analiz szacujących straty wynikające z występowaniem różnego rodzaju stanów patologicznych przewodu pokarmowego w stadach kur i indyków. Zespół kierowany przez Panią Profesor Domańską - Blicharz zrealizował dwa ważne granty [N308 033 32/2836- *Doskonalenie metod diagnozowania oraz ocena sytuacji epidemiologicznej zakażeń koronawirusami u kur i indyków w Polsce* (2007-2011) oraz N N308 578 040- *Rola zakażeń wirusowych w enteropatiach u drobiu w Polsce* (2011-2014)], które wskazały na znaczenie tego problemu w krajowym drobiarstwie. Warto podkreślić, że zakres badań tego Zespołu objął 4 różne wirusy: astrowirusy, rotawirusy, parwowirusy i koronawirusy. Łącznie Autorzy przebadali ponad 260 stad indyków (styczeń 2008-grudzień 2012) oraz 86 stad kur i kurcząt (czerwiec 2011 – grudzień 2012). Ptaki w stadach, w których pobierano próbki były w dobrej kondycji zdrowotnej lub wykazywały objawy chorobowe charakterystyczne dla enteropatii. Spośród przebadanych 264 stad indyków, astrowirusowe RNA wykrywano w 114 (43,8%) stadach, natomiast sekwencje nukleotydowe charakterystyczne dla koronawirusów w 23 (8,7%) stadach. Z kolei obecność genomu rotawirusów i parwowirusów zidentyfikowano odpowiednio w 63 (23,8%) i 74 (28%) stadach. Na przebadanych łącznie 86 stad kurcząt i kur w 38 (44,1%) stadach zidentyfikowano obecność parwowirusów. W 11 stadach (12,7%) stwierdzono obecność rotawirusów a zaledwie w 2 stadach (2,3%) obecność astrowirusów. Najwięcej, bo 64 stad (74,4%) było zakażonych CoV odpowiedzialnych zakażenie zapalenie oskrzeli. Uzyskane wyniki sugerują, że u indyków najpowszechniejszymi spośród wirusów odpowiedzialnych za enteropatie są zakażenia astrowirusami (43,8%), w mniejszym stopniu parwowirusami (28%) oraz rotawirusami (23,8%), natomiast zakażenia koronawirusami są sporadyczne (8,7%). Z kolei u kurcząt i kur najczęściej identyfikowane były parwowirusy

(44,1%) oraz rotawirusy (12,7%), natomiast zakażenia astrowirusami były wykrywane incydentalnie. Wyniki badań dotyczących parwowirusów zostały opublikowane w pracy: *Domańska-Blicharz K., Jacukowicz A., Lisowska A., Minta Z.: Genetic characterization of parvoviruses circulating in turkey and chicken flocks in Poland. Arch Virol. 2012;157(12):2425-2430.*

Podobne wyniki uzyskali również pracownicy naukowcy PIWet-PIB z Zespołu Pani Profesor Samorek - Salamonowicz (*Tarasiuk K., Woźniakowski G., Samorek-Salamonowicz E. (2012). Occurrence of Chicken Parvovirus Infection in Poland. The open virology journal. 6. 7-11. 10.2174/1874357901206010007*), którzy zbadali próbki pobierane w okresie 2002-2011 od kurcząt brojlerów w wieku od 1 do 6,5 tygodnia oraz od kur niosek w wieku od 14 do 37 tygodni. Materiał badawczy pochodził ze 142 ferm z różnych regionów Polski. Ptaki wykazywały kliniczne objawy zahamowania wzrostu i znacznego wychudzenia. Podsumowując, przeprowadzone badania cytowani autorzy wskazują, że w około 18 % próbek z polskich stad kur występowały parwowirusy, ale ich dokładna rola w enteropatiach i infekcjach bezobjawowych nie została określona.

Biorąc pod uwagę, że parwowirusy występowały/występują powszechnie w stadach kurcząt i kur doktorantka zdecydowała o wykorzystaniu polskiego izolatu ChPV Go64/13 do prowadzenia badań będących przedmiotem jej dysertacji doktorskiej. Osobiście, wybór tematu pracy doktorskiej uważam, za interesujący poznawczo, choć raczej trudno jest w tym przypadku mówić o praktycznym wykorzystaniu przeprowadzonych badań. Niewątpliwie podjęcie tej tematyki było dla doktorantki trudnym zadaniem, co potwierdza dziękując Pani Promotor "za wiarę w podjęty temat".

### **Ocena pracy doktorskiej**

Przedstawiona do oceny praca doktorska „Otrzymanie i charakterystyka cząstek wirusopodobnych parwowirusa kur oraz ich wykorzystanie w diagnostyce i profilaktyce chorób drobiu” została wykonana w Zakładzie Bioinżynierii Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie we współpracy z Zakładem Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego- Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem naukowym dr hab. Katarzyny Domańskiej- Blicharz, prof. instytutu. Odnotować należy, że o wysoki poziom merytoryczny rozprawy dbała także dr Grażyna Płucienniczak promotor pomocniczy. Z obowiązku recenzenta muszę zaznaczyć, że użyte w tytule dysertacji określenie: „*ich* (cząstek wirusopodobnych parwowirusa kur) *wykorzystanie w diagnostyce i profilaktyce chorób drobiu*” nie znajduje pokrycia w wykonanych badaniach które obejmowały przygotowanie testu ELISA wykrywającego specyficzne przeciwciała anty-VP2d-ChPV

(diagnostyka) i ocenę immunogenności otrzymanych VLP na 10 kurczętach SPF (profilaktyka), sugerując zatem zmianę tytułu przy publikacji wyników badań.

Dysertacja posiada układ typowy dla opracowań na stopień naukowy i zawarta jest na 138 stronach uwzględniających 27 rycin oraz podzielona jest na następujące rozdziały: wstęp, cel, materiał i metody, wyniki, podsumowanie i dyskusja, streszczenie, summary, piśmiennictwo oraz aneks w którym autorka podała sekwencje nukleotydowe genu kodującego rekombinowane białko VP2d-ChPV oraz sekwencje aminokwasowe rekombinowanego białka VP2d-ChPV.

Szata edytorska ocenianej rozprawy jest staranna i estetyczna. Jakość zamieszczonych w tekście fotografii dokumentujących wyniki badań jest dobra, są one czytelne, dotyczy to również obrazów żeli. Ogólne wrażenie z lektury dysertacji jest pozytywne i można stwierdzić, że recenzowana praca doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Romanik- Chruścielewskiej napisana jest poprawnym językiem, spełnia wymogi merytoryczne i formalne stawiane opracowaniom na stopień naukowy doktora. Podkreślić należy staranną redakcję tekstu dysertacji. Bardzo bogate i prawidłowo używane w tekście opracowania nazewnictwo fachowe świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. Na korzyść Doktorantki przemawia i to, że stara się podawać dość dokładnie szczegóły stosowanych metodyk inżynierii genetycznej.

Cytowane w pracy doktorskiej, piśmiennictwo zamykające się liczbą 222 publikacji jest przeglądem wyselekcjonowanych pozycji literaturowych poświęconych cząsteczkom wirusopodobnym, oraz zakażeniom parwowirusowym. Dobór piśmiennictwa wskazuje na dojrzałość naukową i umiejętność wyboru dostępnej w tym zakresie literatury źródłowej. Podkreślić należy, że Autorka uwzględniła również pozycje piśmiennictwa krajowego. W tej liczbie także pracę Tarasiuk i wsp. na temat ekspresji genu białka VP3 parwowirusa w komórkach *Escherichia coli* (Tarasiuk K., Woźniakowski G., Holec-Gąsior L.: *Expression of goose parvovirus whole VP3 protein and its epitopes in Escherichia coli cells. Polish Journal of Veterinary Sciences Vol. 18, No. 4 (2015), 879–880 . DOI 10.1515/pjvs-2015-0114.*).

Opiniowaną dysertację rozpoczyna bardzo obszerny liczący, 32 strony, wstęp wprowadzający czytelnika w problematykę będącą przedmiotem badań doktorantki. Autorka podzieliła tę część pracy na dwa podrozdziały. W pierwszym, co jest bardzo potrzebne i ciekawe, przedstawiła szczegółowy przegląd wiedzy w zakresie cząstek wirusopodobnych (Virus Like Particles -VLP). Tematyka cząstek wirusopodobnych w medycynie weterynaryjnej jest wciąż zagadnieniem nowym a większość danych w tym obszarze dotyczy badań nad wirusowymi patogenami człowieka. W zakresie patologii ptaków gospodarskich takich badań jest zdecydowanie mniej, choć możliwości wykorzystania tak skonstruowanych biopreparatów

do ochrony zdrowia stad drobiu wydają się być szczególnie interesujące. Bowiem trudno nie zgodzić się z poglądem Pani magister, że VLP są potencjalnie tańszym i bezpieczniejszym kandydatem na szczepionki stanowiącym alternatywę dla atenuowanych i inaktywowanych wirusów. Mechanizm działania tych nanocząsteczek jest niezwykle skomplikowany, ale generalnie stanowią one unikalny wzorzec molekularny związanym z patogenem (PAMP), wywołując silną reakcję immunologiczną organizmu. Autorka podaje również zasady klasyfikacji cząsteczek VLP stwierdzając, że podobnie, jak wirusy, VLP dzielimy na otoczkowe i bezotoczkowe. W tym podziale ważne jest, iż ze względu na pochodzenie prezentowanych przez VLP antygenów dzielimy je na: natywne- zbudowane z białek wyjściowych wirusa oraz chimeryczne- z dołączonymi epitopami /antygenami innych patogenów. Autorka przytacza, jako przykład jedynej dostępnej na rynku szczepionki typu VLP, produkowaną w bakulowirusowym systemie ekspresji, szczepionkę przeciwko cirkowirusowi świń typu II. Jak wynika z przeglądu dokonanego przez doktorantkę badania nad innymi szczepionkami weterynaryjnymi są dość zaawansowane, natomiast badania dotyczące natywnych VLP wirusów ważnych w patologii drobiu są pojedyncze i dotyczą wirusa zakaźnego zapalenia bursy Fabrycjusza i zakaźnej anemii kurcząt. Warto podkreślić, że w tym przypadku w komórkach owadzych uzyskano różne warianty cząsteczek VLP IBDV zawierające główne białko strukturalne VP2 wirusa choroby Gumboro. Również białka VP1 i VP2 wirusa zakaźnej anemii kurcząt indukowały wysokie poszczepienne miana przeciwciał neutralizujących.

Jak się wydaje natywne VLP nie są obecnie przedmiotem intensywnych badań w światowych ośrodkach naukowych, stąd badania rozpoczęte przez Panią magister Romanik - Chruścielewską, należy uznać za bardzo oryginalne i nowatorskie w skali kraju. Równie mało poznane są możliwości uzyskiwania chimerycznych cząsteczek VLP w odniesieniu do wirusów ważnych u drobiu. Jak cytuje doktorantka cząsteczki wirusopodobne zbudowane z białek wirusa zapalenia wątroby typu B wykorzystano do opracowania szczepionki zawierającej 5 mimotopów wirusa IBDV (Wamp i wsp., 2012). Wykazano, że taki konstrukt zapewnia odporność po zakażeniu zjadliwym wirusem choroby Gumboro. Doktorantka podaje następnie przegląd informacji dotyczących skomplikowanych systemów opracowywania VLP. Ze względu na zakres, prowadzonych w ramach wykonywanej rozprawy doktorskiej badań autorka najwięcej uwagi poświęciła prokariotycznym systemom ekspresji. Przy zastosowaniu takich systemów ekspresyjnych uzyskano między innymi cząsteczki VLP wirusa choroby Newcastle. Z różnych powodów (głównie ekonomicznych) aktualnie najczęściej wykorzystuje się do produkcji cząsteczek VLP eukariotyczny system ekspresji oparty na komórkach

owadziach. Rzadziej wykorzystuje się w tym celu drożdżowy system ekspresyjny (uzyskano rekombinowane szczepionki przeciwko wirusowi zakaźnemu, zapaleniu bursy Fabrycjusza) oraz przy zastosowaniu transgenicznym roślin, które mogą być również skutecznie wykorzystane do produkcji cząstek wirusopodobnych. Bez wątplenia najbardziej przydatną metodą produkcji VLP w praktyce są bakteryjne systemy ekspresyjne, które umożliwiają uzyskanie wysokiego poziomu ekspresji rekombinowanego białka, co ważne, koszty hodowli biomasy są niskie a proces jest stosunkowo łatwo wyskalować. Tę część rozdziału pierwszego recenzowanej dysertacji należy ocenić, jako bardzo szczegółowy i wielowątkowy przegląd piśmiennictwa a jego lektura wyraźnie wskazuje, że w praktyce uzyskanie szczepionek typu VLP przeciwko patogenom drobiu będzie możliwe w trudnej do określenia przyszłości.

Druga część wstępu jest natomiast obszernym przeglądem obejmującym biologię parwovirusów występujących u drobiu. Pani magister w pięciu podrozdziałach opisuje taksonomię, budowę, i biologię wirusa (podrozdział 1.2.1), dalej kolejno epidemiologię i transmisję, diagnostykę laboratoryjną oraz zapobieganie, natomiast w podrozdziale 1.2.5. dokonuje obszernego przeglądu szczepionek VLP przeciwko różnym chorobom wywoływanym przez parwovirusy. Autorka pracy stwierdza, że liczne badania wskazują, że zarazki z rodziny *Parvoviridae* są odpowiednią grupą wirusów do generowania szczepionek opartych na chimerycznych cząsteczkach VLP. W ostatnich latach na stosunkowo szeroką skalę prowadzone były badania parwovirusów psów, świń, człowieka, natomiast jak dotychczas nie prowadzono badań nad uzyskaniem cząsteczek VLP kurzego parwovirusa. Jak podkreśla Pani magister Romanik - Chruścielewska pionierskie badania rozpoczęte przez nią w ramach wykonywanej pracy doktorskiej pozwolą na uzyskanie informacji o cząsteczkach VLP aviparwovirusów.

W mojej ocenie wstęp jest obszerną, ale poprawnie skomponowaną częścią pracy, dobrze wprowadzającą czytającego w całość zagadnień będących przedmiotem badań.

Cel pracy (rozdział 2 dysertacji) został sformułowany bardzo ogólnie bowiem doktorantka zaplanowała „uzyskanie funkcjonalnych cząstek wirusopodobnych parwovirusów kur- ChPV i ich wszechstronną charakterystykę”. Tak szeroko sformułowany cel został doprecyzowany poprzez wyznaczenie, w formie zadań, kolejnych etapów pracy. Zadania te to: klonowanie genu kodującego główne białko kapsydowe VP2 ChPV; uzyskanie bakteryjnego szczepu produkującego rekombinowane białko VP2 na wysokim poziomie; opracowanie metody oczyszczania i składania rekombinowanego białka VP2 w cząsteczki wirusopodobne; określenie właściwości fizyko-chemicznych otrzymanego produktu; sprawdzenie aktywności biologicznej uzyskanych cząstek; sprawdzenie właściwości immunogennych otrzymanego

VLP, określenie potencjalnego zastosowania dla uzyskanych cząstek wirusopodobnych.

W rozdziale 3 dysertacji, opisującym materiały i metody zastosowane przez Doktorantkę w dwóch odrębnych podrozdziałach, przedstawiła ona szczegółowy spis aparatury i materiałów (odczynników), buforów, podłoży hodowlanych, szczepów i plazmidów, starterów, oraz matryc zastosowanych w badaniach. Należy zwrócić uwagę na fakt, że badania wykonano przy zastosowaniu specjalistycznego warsztatu badawczego, w którego posiadaniu są niezbyt liczne laboratoria krajowe. W rozdziale 3.2 autorka przedstawiła krok po kroku zastosowane protokoły badań. Są to dane bardzo techniczne, ale dokładnie opisują sposób postępowania Doktorantki w procesie utrzymywania cząsteczek VLP parwowirusa kurzego. Autorka szczegółowo opisała także protokół oceny immunogenności otrzymanych cząsteczek VLP w badaniach eksperymentalnych *in vivo* na kurczętach SPF. Tę część badań wykonano w PIWet-PIB, w specjalistycznym wiwarium posiadającym status bezpieczeństwa klasy ACL3. Na wykonanie badań autorka uzyskała zgodę lokalnej komisji etycznej i wykonała je przy zachowaniu wymogów prawnych obowiązujących w tym zakresie. W badaniach użyto 20 kurcząt z których 10 podano uzyskane przez Panią magister VLP ChPV zmieszane z adiuwantem, natomiast ptakom grupy kontrolnej podano tylko adiuwant. Obecność specyficznych przeciwciał VLP w surowicy oceniono przy zastosowaniu pośredniego testu ELISA opracowanego przez Doktorantkę.

Rozdział „Wyniki” jest obszernym fragmentem ocenianej pracy liczącym 26 stron i poprawnie prezentuje dokonania Doktorantki. Zgodnie z protokołem zaplanowanych badań autorka opisuje w kolejnych podrozdziałach uzyskanie plazmidu pUCVP2k, analizę sekwencji białka VP2 polskiego szczepu ChPVG 064/13 oraz uzyskanie plazmidu pIGCmT7VP2. W podrozdziale 4.4 Doktorantka opisuje z kolei proces transformowania kompetentnych komórek *E. coli* plazmidem ekspresyjnym pIGCmT7VP2 w celu uzyskania ekspresji białka VP2d-ChPV, które to komórki bakteryjne hodowano w celu uzyskania ciał inkluzyjnych. W optymalizowanej produkcji izolację tych struktur prowadzono bezpośrednio po hodowli produkcyjnej, ze względu na wyższą czystość uzyskiwanego w ten sposób produktu końcowego. W dalszej kolejności autorka opracowała metodę skutecznej, wydajnej i stosunkowo taniej metody utrzymywania struktur wirusopodobnych. Z optymalizowanej przez Doktorantkę metody wyizolowane ciała inkluzyjne po ich denaturacji oczyszczano na kolumnie wypełnionej złożem DEAE Sepharose Fast Flow. Schemat zamieszczony na rycinie 15 opisuje w poglądowy sposób protokół utrzymywania VP2d-ChP VLP.

Jest ważne, że przy zastosowaniu kilku metod analitycznych Doktorantka dokonała charakterystyki białka VP2ChPV i tworzonych przez niego cząstek wirusopodobnych. Były to

analiza *in silico* i spektrometria mas, natomiast ocenę wielkości uzyskanych cząsteczek przeprowadzono metodą dynamicznego rozpraszania światła DLS. W pracy autorka przedstawiła również obraz morfologii struktur uzyskanych VLP w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Zdjęcia wykonane w szwedzkim laboratorium Viranova wskazują na obecność zdefiniowanych struktur o średnicy ok. 20 nm z wyraźnymi granicami zewnętrznymi. Dodatkowym potwierdzeniem, że uzyskany produkt posiada właściwości charakterystyczne dla cząsteczek VLP była ocena ich zdolności wysalania w niskich stężeniach soli metalu lekkiego. Autorka stwierdza, że we wszystkich otrzymanych seriach VP2dChP VLP uzyskane białko w 100% uległo wytrąceniu 5-10% roztworze siarczanu amonu. W końcowej części rozdziału 4 (podrozdział 7.4.8) Doktorantka przedstawiła wyniki próby *in vivo* i wykazała, że otrzymane struktury mają bardzo dobre właściwości immunogenne. Jednorazowe podskórne podanie 7 dniowym pisklętom SPF indukowało wysokie poziomy specyficznych przeciwciał anti-VP2dChPVLP w surowicach pobranych w trzecim tygodniu po szczepieniu.

Ze względu na fakt, że praca miała na celu przygotowanie autorskiego protokołu otrzymania i charakterystyki VLP parwowirusa kur, Autorka nie sformułowała klasycznych wniosków ze swoich badań a otrzymane rezultaty opisała w obszernym rozdziale „Podsumowanie i dyskusja”. Rozdział ten konfrontuje wyniki badań własnych doktorantki z danymi źródłowymi. Autorka podkreśla, że zainteresowanie VLP, jakie obserwuje się w ostatnich latach, wynika głównie z przewagi, jaką struktury te posiadają w porównaniu z klasycznymi antygenami szczepionkowymi. Ich zastosowanie pozwala na uniknięcie ryzyka powikłań poszczepiennych spowodowanych błędami podczas przygotowywania atenuowanych czy inaktywowanych patogenów co może prowadzić do rozwoju infekcji u zaszczepionych osobników. Zatem trudno nie zgodzić się z Doktorantką, że stworzenie bezpiecznych i skutecznych szczepionek nowej generacji stanowi również kluczowe wyzwanie dla rozwoju wakcynologii weterynaryjnej. Brak patogenności, możliwość zastosowania strategii DIVA i co istotne duży potencjał rynkowy, wpływa na zainteresowania nowymi rozwiązaniami w wakcynologii weterynaryjnej gigantów przemysłu farmaceutycznego. Jak wspomniano wcześniej jako potwierdzenie, że cząsteczki VLP mogą być praktycznie zastosowane w profilaktyce chorób zwierząt Autorka podaje przykład szczepionki stosowanej w profilaktyce zakażeń cirkowirusem świń typu II. Doktorantka stwierdza, że aktualnie nie ma publikacji opisujących tworzenie cząstek wirusopodobnych parwowirusów kur, uważa jednak że dostępność takich struktur mogłaby się przyczynić do postępu w badaniach nad patologiami (enteropatiami) wywoływanymi przez te patogeny. W dziewięciu szczegółowych punktach Autorka podsumowuje swoje osiągnięcia w tworzeniu protokołu uzyskiwania i charakterystyki



cząstek wirusopodobnych parwowirusa kur. Protokół ten jest merytorycznie spójny i dobrze charakteryzuje nowatorską technologię przygotowaną przez Doktorantkę. Mając na względzie aspekty ekonomiczne przy wprowadzaniu na rynek szczepionek VLP, Autorka pracy wybrała prokariotyczny system ekspresyjny, jako najbardziej opłacalny przy analizie kosztów produkcji takich preparatów. Wykorzystanie własnego (opracowanego w Zakładzie Bioinżynierii Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie w oparciu o plazmid pIGDM1) systemu ekspresyjnego zastosowanego przez Doktorantkę, może jej zdaniem ułatwić ewentualną komercjalizację uzyskanego produktu, co wydaje się jednak mało realne bo większość produktów nowej generacji rozwijanych w obszarze szczepionek weterynaryjnych jest nadal w fazie badań podstawowych. Enteropatie wywołane przez parwowirusy mimo, że ważne w patologii kur i indyków nie stanowią zagrożenia dla zdrowia publicznego i jakości produktów drobiowych. W moim przekonaniu ewentualna decyzja o podjęciu produkcji komercyjnej szczepionki VLP dla zapobiegania zakażeniom parwowirusowym na tym etapie rozwoju tej technologii biomedycznej nie byłaby uzasadniona ekonomicznie. Oczywiście dostępność cząstek VLP będzie użyteczna w diagnostyce zakażeń parwowirusowych. O dużym nakładzie pracy i wysiłku jaki włożyła Doktorantka w przygotowanie protokołu tworzenia cząstek VLP parwowirusa kury świadczy fakt, że był on opracowany metodą prób i błędów, ponieważ nie były dostępne szczegółowe dane piśmiennictwa w tym zakresie. Dokonując charakterystyki uzyskanych cząstek VLP autorka potwierdziła, że otrzymane cząsteczki mają morfologię zbliżoną do kurzych parwowirusów, również wielkości uzyskanych cząsteczek odpowiadały wirionom ChPV, należy zatem przypuszczać, że uzyskane struktury posiadały prawidłową konformację przestrzenną. Przywołując najnowsze wyniki badań nad szczepionkami VLP Autorka potwierdza, że zastosowanie w jej badaniach adiuwantu Montanide ISA 71 VG (Seppic) pozwoliło na uzyskanie produktu, który okazał się skuteczny po jednokrotnym podaniu. W dalszej części podsumowania i dyskusji Autorka przedstawiła stan wiedzy w zakresie wykorzystania rekombinowanego białka VP2 parwowirusów uzyskanego w *E. coli* w formie ciał inkluzyjnych. W kilku pracach wymienionych przez Doktorantkę, autorzy zwracają uwagę, że potencjał cząsteczek VLP parwowirusów, jako platformy do prezentacji heterologicznych białek lub peptydów jest bardzo wysoki. Zdaniem mgr inż. Agnieszki Romanik - Chruścielewskiej otrzymane w ramach opracowanego protokołu nanocząsteczki mają potencjał antygeny szczepionkowego oraz platformy do prezentacji heterologicznych antygenów w rozwoju szczepionek w profilaktyce chorób infekcyjnych drobiu. Podkreśla również, że możliwe jest zastosowanie rekombinowanego białka VP2, jako antygeny do monitorowania przeciwciał anty parwowirusom w komercyjnych stadach drobiu. Kończąc

przeгляд doktoranta wskazuje, iż konieczne byłoby opracowanie technologii przygotowania hodowli bakterii komórek produkujących rekombinowane białko VP2d-ChPV z kolb na bioreaktor i określenie optymalnych warunków dla hodowli o wysokiej gęstości. Podkreślając, że wykonane badania wskazały nowe kierunki do przeprowadzenia ciekawych eksperymentów, które pozwoliłyby na dalsze charakterystykę uzyskanych cząsteczek VLP w zakresie ich stabilności i efektywności. Szczególnie ciekawe byłoby uzyskanie zjadliwego parwowirusa kur w celu wykonania eksperymentu zakażenia kontrolnego, który potwierdziłby czy uzyskany poziom przeciwciał wyindukowany szczepieniem, rzeczywiście zapewnia skuteczną ochronę przeciwwirusową. Jak się wydaje spełnienie tego warunku jest bezwzględny wymogiem, bowiem bez takiej wiedzy, dalsze badania nad komercyjną szczepionką VLP przeciwko zakażeniom parwowirusom drobiowym są bezcelowe.

Po krytycznej analizie opracowania, stwierdzam, iż Pani mgr inż. Agnieszka Romanik - Chruścielewska wykazała w pracy doktorskiej dobre przygotowanie merytoryczne do rozwiązywania postawionych celów badawczych.

Recenzowana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz w pełni potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki, a tym samym spełnia wymagania stawiane tego typu opracowaniom określone w art.13 ust.1. Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365).

**Po całościowym rozważeniu wartości poznawczej recenzowanej dysertacji zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie Pani mgr inż. Agnieszki Romanik - Chruścielewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**