

dr hab. Ewelina Król, prof. UG
Zakład Szczepionek Rekombinowanych
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk, 14.09.2021 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Pachoty zatytułowanej „Nowe polielektrolity jako inhibitory wejścia wirusa opryszczki”

Niniejsza recenzja rozprawy doktorskiej została przygotowana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, prof. dr hab. Andrzeja Kozika z dnia 05.07.2021 roku. Praca doktorska mgr Magdaleny Pachoty stanowi bardzo ważny element tematyki badawczej prowadzonej w Pracowni Wirusologii Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego i tematyki Zakładu Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Przedstawiona praca została przygotowana pod opieką naukową prof. dr hab. Krzysztofa Pyrcia oraz prof. dr hab. Marii Nowakowskiej.

Charakterystyka ogólna rozprawy:

Oceniana rozprawa doktorska została przygotowana w postaci polskojęzycznego manuskryptu w układzie typowym dla prac doświadczalnych. Rozprawa obejmuje łącznie 108 stron i zawiera następujące rozdziały: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Znaczenie i cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski końcowe oraz Bibliografia obejmująca łącznie 265 pozycji literaturowych. Ponadto, do pracy dołączono Wykaz stosowanych skrótów oraz aparatury. Rozprawa zawiera 21 samodzielnie przygotowanych rycin oraz 6 tabel. Wyniki będące przedmiotem niniejszej rozprawy zostały opublikowane w dwóch pracach oryginalnych w prestiżowych czasopismach znajdujących się na liście

Journal Citation Reports: *Journal of Medicinal Chemistry* i *ACS Applied Materials & Interfaces*.

Ocena merytoryczna:

Tematyka rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Pachoty dotyczy poszukiwania nowych związków antywirusowych mających potencjalne zastosowanie w infekcjach powodowanych przez wirusy opryszczki typu 1 i 2 (HSV-1 i HSV-2) należące do najbardziej rozpowszechnionych patogenów infekujących człowieka. Choć objawy zakażenia herpeswirusami mimo, że są nieprzyjemne, są zazwyczaj niegroźne, to w u niektórych osób mogą powodować poważne schorzenia. Mechanizm działania aktualnie stosowanych w terapii leków, w tym acyklowiru, opiera się na hamowaniu aktywności wirusowej polimeraza DNA, co prowadzi do powstawania mutantów lekoopornych. Podstawowym celem pracy doktorskiej mgr Pachoty była charakterystyka mechanizmu aktywności antywirusowej zaprojektowanych i zsyntetyzowanych nowych polielektrolitów wobec wirusów HSV-1 i HSV-2. W swoich badaniach mgr Pachota skoncentrowała się na dwóch grupach związków: kationowych pochodnych dekstranu oraz kationowych kopolimerach blokowych. Podczas realizacji badań autorka wykazała znaczącą aktywność antywirusową kilku wyselekcjonowanych związków nie tylko w modelu *in vitro*, ale również *in vivo* w modelu skórnoego zakażenia HSV-1. Wyniki realizacji projektu doktorskiego mgr Pachoty stanowią istotny wkład w badania nad nowymi związkami antywirusowymi, które obok wartości naukowej i poznawczej mają duży potencjał aplikacyjny, ponieważ wyselekcjonowane związki posiadają odmienny mechanizm działania od obecnie stosowanych w terapii leków antywirusowych m.in. acyklowiru. Polielektrolity hamując wczesne etapy infekcji herpeswirusowych (m.in. adsorpcję i internalizację wirusa do komórek) mogłyby zostać wykorzystane nie tylko w leczeniu i prewencji zakażeń, ale również w leczeniu lekoopornych na acyklowir szczepów wirusowych. Uzyskane wyniki mają zatem duże znaczenie w opracowywaniu nowych strategii profilaktycznych i terapeutycznych.

Rozprawa doktorska zawiera obszerny wstęp, gdzie w pierwszej części w sposób wyczerpujący autorka omawia charakterystykę członków rodziny *Herpesviridae*, w tym zastosowanych w badaniach wirusów HSV-1 i HSV-2. Autorka opisuje występowanie herpeswirusów, ich budowę, proces wejścia HSV do komórki skupiając się na charakterystyce receptorów komórkowych zaangażowanych w ten

proces, a także cykl replikacyjny. Kolejny podrozdział dotyczący charakterystyki zakażeń wywołanych przez wirusy HSV został opisany w sposób bardzo szczegółowy. Scharakteryzowano zarówno infekcję pierwotną jak i różne postacie opryszczki. W dalszej części wstępu szeroko omówione są metody leczenia zakażeń herpeswirusowych. Autorka przedstawia aktualny stan wiedzy na temat terapii zakażeń opisując dostępne leki antywirusowe oraz te będące w różnych fazach badań. Kolejne podrozdziały opisują m.in. przeciwciała, peptydy, oligonukleotydy, nanocząstki. W ostatnich częściach wstępu Autorka przedstawia obszerny stan wiedzy na temat polimerów jako potencjalnych inhibitorów infekcji herpeswirusowych. Mam bardzo niewiele krytycznych uwag dotyczących początkowych części rozprawy. Są to przeważnie drobne niedociągnięcia językowe lub błędy edytorskie, które przedstawię w Ocenie edytorskiej rozprawy.

Cel pracy został jasno zdefiniowany jako analiza aktywności przeciwwirusowej zaprojektowanych i zsyntetyzowanych nowych polimerów jonowych (polielektrolitów) wobec wirusów HSV-1 i HSV-2. Praca realizowana była w ramach większego projektu naukowego, w ścisłej współpracy z chemikami, co umożliwiała bieżące projektowanie i modyfikacje strukturalne związków w zależności od wyników badań biologicznych. Kilka najważniejszych zadań jakie doktorantka postawiła sobie w ramach realizowanego projektu doktorskiego to: analiza toksyczności związków wobec komórek, analiza potencjału przeciwwirusowego związków w badaniach *in vitro* w modelach komórkowych, określenie mechanizmu działania wybranych związków wykazujących najkorzystniejsze działanie antywirusowe, a w reszcie określenie potencjalnej aktywności przeciwwirusowej w modelu *in vivo*.

Kolejne rozdziały zawierają opisy Materiałów i Metod stosowanych do realizacji zaplanowanych celów badawczych. Metody są napisane poprawnie, logicznie, w większości w sposób na tyle szczegółowy, umożliwiający powtórzenie przeprowadzonych eksperymentów, ale mam niewielkie zastrzeżenia do niektórych procedur:

- 8.8. Dlaczego w badaniu aktywności przeciwwirusowej polimerów (test replikacji) wykonywano PCR w czasie rzeczywistym tylko z pożywki hodowlanej, a nie również z zakażonych komórek?
- To samo pytanie dotyczy procedur 8.9.1, 8.9.2, 8.9.3, 8.9.4.

- 8.9.1. W opisie testu inaktywacji podano, że stosowano stężenie polimeru wykazujące aktywność przeciwwirusową, ale nie podano jaką metodą wstępną określano te stężenia.

Rozdział Wyniki stanowi najobszerniejszą część rozprawy doktorskiej, w której w sposób czytelny opisano wszystkie dane uzyskane w czasie przygotowania pracy. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w postaci właściwie przygotowanych rycin. Rozdział rozpoczyna się od badań cytotoksyczności kationowych pochodnych dekstranu oraz kationowych kopolimerów blokowych. W prezentowanych wynikach badań brakuje wyznaczenia wartości CC_{50} , czyli stężenia związków, przy których proliferacja/żywołność komórek zostaje zahamowana w 50%, w odniesieniu do kontroli. Wartości te nie zostały przedstawione w pracy, ale zostały wykorzystane do wyznaczenia wartości współczynnika selektywności (SI) w kolejnych podrozdziałach. Drobnym mankamentem jest również inne przedstawienie graficzne wyników cytotoksyczności uzyskanych dla kationowych pochodnych dekstranu i kationowych kopolimerów blokowych, co w niewielkim stopniu utrudnia porównanie wyników. Wykres A na Rycinie 6 byłby także bardziej czytelny, gdyby został przedstawiony w kolorze.

W kolejnym podrozdziale opisano wpływ związków na replikację herpeswirusów. W przedstawionych badaniach Mgr Pachota wyselekcjonowała związki o silnej aktywności przeciwwirusowej. Dla związków należących do kationowych pochodnych dekstranu wyznaczono wartości IC_{50} oraz SI dla HSV-1 oraz HSV-2. Zadziwiający jest fakt, że w przypadku obu wirusów wartości współczynnika selektywności SI wyznaczone dwoma metodami (metodą Reeda i Muencha oraz PCR w czasie rzeczywistym) są bardzo rozbieżne. Dla jednego wirusa wartość SI wyznaczona jedną metodą jest większa niż drugą, a w przypadku HSV-2 jest dokładnie odwrotnie. Bardzo proszę o wyjaśnienie.

W dalszej części pracy autorka skupia się na wyjaśnieniu dokładnego mechanizmu aktywności przeciwwirusowej wyselekcjonowanych związków. Cykl doświadczeń został zaplanowany w taki sposób, aby możliwe było sprawdzenia aktywności związków na wielu etapach cyklu życiowego wirusa. Doktorantka wykazała, że mechanizm aktywności kationowej pochodnej dekstranu opiera się na hamowaniu adsorpcji wirusa do komórek, podczas gdy kationowe kopolimery blokowe blokują proces internalizacji wirusa do komórki. Zastosowanie

doświadczenia z wykorzystaniem siarczanu heparanu, który stanowi receptor adhezyjny HSV-1, umożliwiło potwierdzenie aktywności kationowej pochodnej dekstranu polegającej na hamowaniu interakcji wirusa z jego receptorem. Dane te zostały poparte eksperymentami, w których poziom zakażenia HSV-1 w komórkach traktowanych przed infekcją analizowano za pomocą mikroskopii konfokalnej oraz cytometrii przepływowej. Obserwacje zostały również potwierdzone badaniami wewnątrzkomórkowej lokalizacji tego związku w komórkach, która wykazała wyłącznie jego powierzchniową lokalizację. W przypadku kopolimerów blokowych wyniki przeprowadzonych eksperymentów nie były jednoznaczne zarówno w testach funkcjonalnych jak i wewnątrzkomórkowej lokalizacji, co jednak nie umniejsza ich silnej aktywności antywirusowej. Mam kilka pytań i uwag dotyczących tej części pracy:

- 10.3.1 i 10.3.2 – Jakie stężenie związków zastosowano w badaniach?
- 10.3.2 – Dlaczego, jeśli w badaniach zastosowano dwa związki znacząco różnice się aktywnością przeciwwirusową w poprzednich eksperymentach, to w testach funkcjonalnych aktywność ta była porównywalna?
- 10.3.2 – Dlaczego nie wykonano analizy PCR w czasie rzeczywistym z zakażonych komórek traktowanych badanymi związkami?
- 10.4 – Brak opisu eksperymentu w rozdziale Metody.
- 10.5.1 – Po jakim czasie od zakażenia utrwalano komórki w celu przeprowadzenia mikroskopii konfokalnej i cytometrii przepływowej?
- 10.5.2 – Autorka wysuwa konkluzję, że „zahamowanie infekcji zaobserwowano tylko po traktowaniu komórek polimerem o silniejszej aktywności przeciwwirusowej, PEG₄₅-b-PMAPTAC₅₂, tymczasem efekt działania kopolimeru o dłuższym bloku PMAPTAC okazał się trudny do jednoznacznej oceny”, podczas gdy na Rycinie 15B te same wyniki przedstawione w postaci wykresu wydają się być jednoznaczne.

W kolejnym etapie badań mgr M. Pachota podjęła się porównania aktywności przeciwwirusowej kationowej pochodnej dekstranu oraz acyklowiru. Chociaż autorka pozwala sobie na wniosek, że testowany związek wykazuje porównywalny do acyklowiru stopień zahamowania replikacji, należy nadmienić, że zakresy testowanych stężeń dla obu związków są zdecydowanie różne. Aktywność

kationowych kopolimerów blokowych została natomiast przetestowana wobec klinicznych szczepów HSV-1 opornych na acyklowir, co potwierdza możliwość szerokiego zastosowania tych związków w terapii zakażeń wirusami opryszczki, a ze względu na ich mechanizm działania również w profilaktyce zakażeń. Warto podkreślić, że wyniki aktywności przeciwwirusowej kationowych kopolimerów blokowych uzyskane w modelu komórkowym zostały również potwierdzone w badaniach *in vivo* w modelu skórno-zakażenia HSV-1. Nasuwa się pytanie, dlaczego w pracy nie zawarto podobnych wyników z zastosowaniem kationowej pochodnej dekstranu? Czy te same doświadczenia nie zostały wykonane, czy związek ten nie wykazał wystarczającej aktywności?

Rozdział Dyskusja przedstawia uzyskane dane w kontekście istniejącej wiedzy. Dobór bibliografii świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnień przez autorkę. W rozdziale tym brakuje jednak odnośników do uzyskanych wyników. Ponadto w rozdziale tym cytowane są wyniki doświadczeń, które nie zostały umieszczone w rozdziale Wyniki. Na przykład na stronie 80 autorka wysuwa wniosek, że kopolimery blokowe nie hamują infekcji HSV-2, co może być związane z interakcją inhibitora z 3-OS-HS, ale wyniki te nie są prezentowane w poprzednim rozdziale. Podobny wniosek zawarty jest w Tabeli 6 oraz wnioskach końcowych w rozdziale 12.

Ocena edytorska rozprawy:

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana z dużą starannością. Ryciny zostały przygotowane samodzielnie przez autorkę, co jest dużą wartością dodaną rozprawy. Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej niektóre błędy edytorskie i językowe. Podane poniżej przykłady stanowią tylko drobne uchybienia, które nie wpływają na ogólną wysoką ocenę przedstawionej mi do oceny pracy:

Str. 16 – podwójne zastosowanie słowa „stanowiły”

Str. 19 – brak wyjaśnienia skrótu „HSPG”

Str. 20 – powinno być „Rycinie 2” zamiast „Rycina 2”

Str. 22 – zamiast „błonę jądrową” użyto „błoną jądrową”

Str. 25 – „wąg sromowych” zamiast „warg sromowych”

Str. 27 – „zapalenie mózgu” zamiast „zapalenia mózgu”

Str. 29 – „zważywszy na mechanizm” brakuje „na”

5.3.3 – zastosowano angielskie nazwy leków

Str. 37 – brak „o” w słowie „poliakrylamidowy”

Str. 49 – „inaktywowanej płodowej surowicy bydlęcej, penicyliny (100 U/ml), streptomycyny (100 µg/ml) oraz 1% metylocelulozy ...” zamiast „inaktywowaną płodową surowicę bydlęcą, penicylinę (100 U/ml), streptomycynę (100 µg/ml) oraz 1% metylocelulozę ...”.

Str. 67 – „heparanu” zamiast „heapanu”

Str. 77 – „skutkować do trwałym” zamiast „skutkować trwałym”

Str. 80 – „skutkiem z innego” zamiast „skutkiem innego”

Str. 80 – „związki ten” zamiast „związki te”

Podsumowanie i wnioski końcowe:

Podsumowując, mgr Magdalena Pachota w swojej pracy doktorskiej wykazała, że polielektrolity stanowią aktywne inhibitory zakażenia herpeswirusowego o znacznym potencjale terapeutycznym. Związki te, o mechanizmie działania odmiennym niż obecnie stosowany lek acyklowir, stanowić mogą alternatywę nie tylko w leczeniu, ale także w prewencji zakażeń herpeswirusowych. Stwierdzam, że doktorantka opanowała wiele technik badania aktywności antywirusowej związków w stopniu pozwalającym na samodzielną pracę w tej dziedzinie, a uzyskane wyniki są ważne dla poszukiwania nowych, może jeszcze bardziej aktywnych pochodnych badanych związków w przyszłości.

Po zapoznaniu się z pracą doktorską mgr Magdaleny Pachoty stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595, wraz z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Magdaleny Pachoty do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Z uwagi na publikację uzyskanych wyników w dwóch renomowanych czasopismach naukowych, wnioskuję do wysokiej Rady również o wyróżnienie pracy.

Zakład Szczepionek Rekombinowanych
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
UG i GUMed


dr hab. Ewelina Król, prof. UG

