

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

Gdańsk, 21.07.2023 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Pawła Botwiny zatytułowanej „Nowe inhibitory ludzkich ortomyksowirusów, paramyksowirusów oraz flawiwirusów”.

Niniejsza recenzja rozprawy doktorskiej została przygotowana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, prof. dr hab. Marii Rapała-Kozik z dnia 20.06.2023 roku. Praca doktorska mgr Pawła Botwiny stanowi bardzo ważny element tematyki badawczej prowadzonej w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz w Laboratorium Virogenetics Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Przedstawiona praca została przygotowana pod opieką naukową prof. dr hab. Krzysztofa Pyrcia.

Wstęp:

Projekt doktorski Pana Pawła Botwiny dotyczył opracowania nowych inhibitorów w hamowaniu zakażeń wirusowym. Zakażenia wirusowe są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów wśród ludzi. Niemal co roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wydaje oświadczenia o nowych patogenach wirusowych stanowiących zagrożenie dla zdrowia publicznego. Pojawiające się epidemie sprawiają, że konieczne jest opracowanie efektywnych metod zwalczania i zapobiegania infekcjom wirusowym. Jednym z najważniejszych elementów zwalczania chorób zakaźnych jest

immunoprofilaktyka swoista przy użyciu szczepień. Istnieją jednak wirusy, dla których wciąż nie ma na rynku skutecznych szczepionek. Wówczas stosowanie leków antywirusowych jest jedyną możliwą drogą zwalczania infekcji oraz przeciwdziałania epidemii. Niestety wysokie koszty badań, niski procent sukcesu potencjalnych preparatów w badaniach klinicznych jak i duża zmienność genetyczna wirusów oraz związana z tym lekooporność powodują, że zapotrzebowanie na leki o szerokim spektrum działania jest bardzo duże. Ponadto pojawianie się nowych gatunków wirusów wymusza powstawanie kierunków badań skupiających się wokół poszukiwania nowych metod leczenia infekcji wirusowych. Mając to na uwadze należy wysoko ocenić zasadność wyboru tematyki badań projektu doktorskiego Pana mgr Botwiny. Modelami badawczymi zastosowanymi w pracy były: ludzki metapneumowirus, wirus Zika oraz wirus grypy. Wszystkie te wirusy stanowią ważne i groźne patogeny zagrażające człowiekowi. Opracowanie skutecznych leków przeciwko tym patogenom stanowi wyzwanie od wielu lat. Przeprowadzone badania dostarczyły wiedzy, która może zostać wykorzystana do zaprojektowania nowych, potencjalnie bardziej aktywnych związków przeciwwirusowych w przyszłości. Potencjalne wdrożenie stanowiłoby olbrzymią korzyść w skali światowej. Należy również zauważyć, że praca doktorska powstała w ramach finansowania ze środków kilku projektów naukowych zarówno polskich jak i międzynarodowych m.in. OPUS NCN, Sonata NCN, Ventures FNP, POWER czy COST MNIŚW. Ponadto realizacja projektu doktorskiego odbywała się przy ścisłej współpracy z chemikami z Wydziału Chemii UJ.

Ocena merytoryczna:

Oceniana rozprawa doktorska mgr Pawła Botwiny została przygotowana w formie zbioru czterech oryginalnych prac opublikowanych w czasopismach naukowych z listy JCR. Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich pracach, a jego wkład w powstanie prac był wiodący. Udział dotyczył m.in. wykonywania części eksperymentalnych, opracowania i interpretacji wyników, przygotowania manuskryptów. Prace ukazały się w:

1. Ciejka, J., Botwina, P., Nowakowska, M., Szczubiałka, K., & Pyrc, K. (2019). Synthetic sulfonated derivatives of poly(allylamine hydrochloride) as inhibitors of human metapneumovirus. *PLoS one*, 14(3), e0214646.

2. Botwina P., Obłozza M, Szczepański A., Szczubiałka K., Nowakowska M., Pyrc K. In Vitro Inhibition of Zika Virus Replication with Poly(Sodium 4-Styrenesulfonate). *Viruses*. 2020 Aug 23;12(9):926. doi: 10.3390/v12090926.

3. Botwina P., Obłozza M., Zatorska-Płachta M., Kamiński K., Mizusaki M., Yusa S.-I., Szczubiałka K., Pyrc K., Nowakowska M. Self-Organized Nanoparticles of Random and Block Copolymers of Sodium 2-(Acrylamido)-2-methyl-1-propanesulfonate and Sodium 11-(Acrylamido)undecanoate as Safe and Effective Zika Virus Inhibitors. *Pharmaceutics*. 2022; 14(2):309

4. Botwina P., Owczarek K., Rajfur Z., Ochman M., Urlik M., Nowakowska M., Szczubiałka K., Pyrc K. 2020. Berberine Hampers Influenza A Replication through Inhibition of MAPK/ERK Pathway. *Viruses* 12, no. 3: 344.

Wszystkie cztery prace to oryginalne manuskrypty zawierające zaawansowane metody wirusologiczne z prawidłowo przeprowadzonymi eksperymentami i rzetelnie opisanymi wynikami badań.

Napisane w języku polskim opracowanie ma poprawny układ i zawiera następujące rozdziały: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp teoretyczny, Część badawczą, Cele badań, Wykaz publikacji, Wykaz patentów, Bibliografię. Ponadto, do pracy dołączono pełne wersje opublikowanych prac jak i oświadczenia współautorów publikacji, określające ich indywidualny wkład w powstanie prac. Zastanawia tylko umieszczenie celu badań zdefiniowanego jako „opracowanie nowych inhibitorów zakażenia wirusowego i identyfikacja nowych celów molekularnych” po zamiast przed opisem części badawczej. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana z dużą starannością pod względem merytorycznym jak i edytorskim. Zawiera tylko nieliczne literówki oraz błędy edytorskie.

Opis prac poprzedza wstęp, gdzie w pierwszej części w sposób wyczerpujący autor omawia wirusy jako cele terapeutyczne oraz dostępne na rynku leki przeciwwirusowe. W ciekawy sposób przedstawione są również zagadnienia opisujące potrzeby i wyzwania przy opracowywaniu nowych

terapeutyków. Prace źródłowe cytowane w tej części pracy zostały dobrze dobrane, co świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym doktoranta. Wprowadzenie teoretyczne wzbogacone jest dwoma starannie i samodzielnie przygotowanymi przez autora rycinami. Mam bardzo niewiele krytycznych uwag dotyczących tej części. Są to przeważnie drobne niedociągnięcia językowe lub błędy edytorskie.

Liczący 15 stron rozdział opisujący część badawczą zawiera syntetyczny opis wyników badań umieszczonych w każdym z manuskryptów wraz z klarownymi wnioskami. Wszystkie prace związane są z tematyką poszukiwania nowych inhibitorów zakażeń wirusowych, ale nie są ze sobą ściśle związane tematycznie, gdyż wszystkie ani nie dotyczą tej samej grupy związków, ani tego samego wirusa czy nawet rodziny wirusów, co znajduje odzwierciedlenie w dość ogólnym tytule pracy. Nasuwa się więc pytanie czy doktorant ma w planach analizę związków wobec wszystkich stosowanych modeli wirusowych, aby wykazać szerokie spektrum działania testowanych związków? Kilka najważniejszych zadań jakie doktorant postawił 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 związków wykazujących najkorzystniejsze działanie antywirusowe.

Pierwsza praca „*Synthetic sulfonated derivatives of poly(allylamine hydrochloride) as inhibitors of human metapneumovirus*” dotyczyła oceny skuteczności N-sulfonowanych polialilamin w zakażeniach wywołanych ludzkim metapneumowirusem (hMPV). Na początku tego rozdziału zabrakło mi kilku podstawowych informacji o wirusie, jak zostało to opisane w przypadku wirusa Zika oraz wirusa grypy w kolejnych podrozdziałach 2.2 i 2.3. W swoich badaniach mgr Botwina skoncentrował się na badaniu aktywności dwóch polimerów sulfonowych. Nie tylko określił toksyczność związków wobec komórek nabłonkowych małpiej nerki, ich aktywność wobec hMPV, ale również określił potencjalny mechanizm działania testowanych związków, który polega na blokowaniu pączkowania wirusa z błony komórkowej. W trakcie badań doktorant zastosował również inne modele wirusowe m.in. niskopatogennego ludzkiego koronawirusa NL63. Porównał też aktywność zsyntetyzowanych związków w stosunku do ich naturalnych odpowiedników jakimi są

karogeny i wykazał, że zsyntetyzowane polimery na bazie sulfonowanej poli(alliloaminy) wykazują lepsze właściwości fizykochemiczne.

Celem dwóch kolejnych prac zatytułowanych „*In Vitro Inhibition of Zika Virus Replication with Poly(Sodium 4-Styrenesulfonate)*” i „*Self-Organized Nanoparticles of Random and Block Copolymers of Sodium 2-(Acrylamido)-2-methyl-1-propanesulfonate and Sodium 11-(Acrylamido)undecanoate as Safe and Effective Zika Virus Inhibitors*” była analiza aktywności antywirusowej polimerowych inhibitorów w stosunku do wirusa Zika. Podczas realizacji badań doktorant wykazał znaczącą aktywność badanych związków w modelu *in vitro* stosując różnorodne techniki z zakresu wirusologii co świadczy o dużych umiejętnościach praktycznych doktoranta. Pierwsza praca (Viruses, 2020) została poświęcona badaniu aktywności związków należących do poli(4-styrenosulfonaniu sodu) (PSSNa) wobec wirusa Zika w modelu *in vitro* w dwóch liniach komórkowych (Vero i U251). Uzyskane wyniki wykazały, że aktywność związków zależy od długości łańcucha polimerowego. Dla wyselekcjonowanych związków określono dawki IC_{50} oraz zbadano aktywność związków wobec różnych szczepów ZIKV. W dalszej części pracy autor skupił się na wyjaśnieniu dokładnego mechanizmu aktywności przeciwwirusowej wyselekcjonowanych związków. Cykl doświadczeń z użyciem wielu różnych metod eksperymentalnych został zaplanowany w taki sposób, aby możliwe było sprawdzenia aktywności związków na wielu etapach cyklu życiowego wirusa. Doktorant wykazał, że mechanizm aktywności związany jest z hamowaniem zdolności wirusa do adsorpcji na powierzchni komórki.

W kolejnej pracy (Pharmaceutics, 2022) mgr Paweł Botwina podjął się badaniu aktywności antywirusowej serii polimerów 2-akrylamido-2-metylopropanosulfonaniu sodu (PAMPS) i 11-akryloamidoundekanianu sodu (PAaU) wobec wirusa Zika. Badania związków zsyntetyzowanych przez chemików z Wydziału Chemii UJ wykazały, że związki te posiadają silne działanie hamujące namnażanie ZIKV w komórkach, a mechanizm aktywności wyselekcjonowanych kopolimerów związany jest z zahamowaniem wejściem wirusa do komórki gospodarza.

W pracy „*Berberine Hampers Influenza A Replication through Inhibition of MAPK/ERK Pathway*” badano aktywność berberyny (BBR) wobec wirusa grypy w różnych liniach komórkowych. Badania wykazały, że zarówno wartości TC_{50} jak i IC_{50} BBR różnią się w zależności od

zastosowanego modelu komórkowego zakażenia grypowego. Wykonane testy eksperymentalne wykazały aktywność BBR na etapie replikacji wirusa, a dalsza dogłębna analiza oparta na danych literaturowych aktywności berberyny wobec innych modeli wirusowych, potwierdziła hamowanie szlaku MAPK/ERK1 wymaganego do produkcji wirionów potomnych wirusa grypy.

Na zakończenie muszę nadmienić, że w przygotowanym opracowaniu zabrakło podsumowania i wniosków końcowych wszystkich uzyskanych wyników. Taki podrozdział z całą pewnością pokazywałby zasadność wyboru wyselekcjonowanych publikacji do cyklu publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. W wykazie publikacji brakuje jednej pozycji, która wchodzi w skład cyklu publikacji (Pharmaceutics, 2022), a pozycja Viruses, 2020 wymieniona jest dwukrotnie.

Podsumowanie i wnioski końcowe:

Przedstawiona na podstawie cyklu opublikowanych manuskryptów praca doktorska mgr Pawła Botwiny jest pracą o dużej wartości merytorycznej, na co wskazuje fakt publikacji wyników w czasopismach o renomie międzynarodowej. Ponadto wyniki realizacji projektu doktorskiego mgr Botwiny stanowią istotny wkład w badania nad nowymi związkami antywirusowymi, które obok wartości naukowej i poznawczej mają duży potencjał aplikacyjny. mgr Paweł Botwina wykazał, że testowane przez niego związki posiadają aktywność przeciwwirusową wobec testowanych modeli wirusowych i po modyfikacjach mogą posiadać znaczący potencjał terapeutyczny. Stwierdzam, że doktorant opanował 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. Na zakończenie chciałabym również zwrócić uwagę, że doktorant jest współautorem 7 innych prac opublikowanych w latach 2019-2023 oraz współtwórcą 5 patentów zarówno polskich jak i międzynarodowych.

Po zapoznaniu się z pracą doktorską mgr Pawła Botwiny stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa zatytułowana „Nowe inhibitory ludzkich ortomyksowirusów, paramyksowirusów oraz flawiwirusów” spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim na stopień doktora. W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Pawła Botwiny 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 czterech 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