

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
INSTYTUT MIKROBIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

Katedra Wirusologii i Immunologii
Akademicka 19, 20-033 Lublin, Fax: (4881) 537 59 59; tel: (4881) 537 59 43

Prof. dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska
Katedra Wirusologii i Immunologii
Instytut Nauk Biologicznych UMCS

Lublin 12.01.2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Kołakowskiej-Kuleszy

**pt.: „Badanie potencjalnych inhibitorów replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C
(HCV) w unikalnym systemie *in vitro*”**

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierownictwem naukowym Pana Profesora dr hab. n. med. Włodzimierza Guta w Zakładzie Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego Państwowego Zakładu Higieny – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie.

Hepatotropowy HCV jest jednym z najpowszechniej występujących wirusów atakujących wątrobę, a jednocześnie jednym z najbardziej niebezpiecznych. Decyduje o tym jego zmienność, a przede wszystkim wywoływanie zakażeń bezobjawowych lub skąpoobjawowych, których przyczyna może nie być zdiagnozowana przez długi czas. Do tej pory nie udało się skonstruować szczepionki przeciwko temu wirusowi i bardzo długo nie było skutecznych leków służących jego eliminacji. Poznanie biologii wirusa, a przede wszystkim natury białek niezbędnych do jego replikacji przyczyniło się do znacznego postępu na tym polu. Innym problemem był brak laboratoryjnego modelu biologicznego do badania wirusa, który został wprowadzony dopiero od 2005 roku. Pomimo istnienia leków przeciwko HCV wciąż poszukuje się nowych w obawie przed uodpornieniem wirusa. Temu zagadnieniu jest poświęcona praca Pani mgr Agnieszki Kołakowskiej-Kuleszy.

Ocena poprawności struktury rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Kołakowskiej-Kuleszy ma typowy układ dla pracy eksperymentalnej i mieści się na 137 stronach zawierających: Wstęp, Cel pracy, opis Materiałów i Metod, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Streszczenia w języku polskim i angielskim, Objąsnienie skrótów oraz Piśmiennictwo. Zachowane zostały odpowiednie proporcje między poszczególnymi rozdziałami pracy.

Ocena merytoryczna rozprawy

Krótki, osiemnastostronicowy **Wstęp** zawiera niezbędne informacje służące wprowadzeniu czytelnika w problematykę pracy. Autorka charakteryzuje wirusa HCV, jego budowę i replikację. Szczegółowo opisuje historię uzyskania modeli *in vitro* do badania wirusa, w tym subgenomowe replikony HCV oraz dwa pełnogenomowe konstrukty JFH-1 i JFH-2. Ten pierwszy został wprowadzony od roku 2005, zaś drugi – 2012. Ponadto, od roku 2009 konstrukt JFH-1 jest wykorzystywany do badań nowych leków przeciwwirusowych.

Mgr Agnieszka Kołakowska-Kulesza szczególną uwagę zwróciła na białka niestrukturalne HCV – proteazę serynową NS3/4A, RdRp, NS5A i helikazę - oraz ich rolę w replikacji wirusa co dało podstawę do omówienia inhibitorów tych białek. W treści Wstępu nie znalazłam odniesienia do Ryciny I (podobnie jak dla Ryciny IV w rozdziale Materiały i metody).

Wstęp napisany jest w miarę poprawnym językiem, stopniowo wprowadzając czytelnika w problematykę i przyczynę podjętych przez Autorkę badań, a zamieszczone w tym rozdziale informacje zostały zaprezentowane w sposób kompetentny, świadczący o dobrym przygotowaniu Doktorantki. Moja uwaga dotyczy prośby o większą dbałość w wykorzystaniu polskiego słownictwa naukowego, razi mnie użycie słowa ‘target’ zamiast słowa ‘cel’ (Wstęp str. 12 oraz Cel pracy str. 29).

Przedstawiony **Cel pracy** zawiera uzasadnienie podjętych badań oraz jasno wyznaczone zadania do wykonania. Jednak biorąc pod uwagę drugi główny cel podjętych badań również tytuł pracy powinien to odzwierciedlać – w mojej ocenie „Badanie potencjalnych inhibitorów replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C” powinno być uściślone do „Badanie potencjalnych inhibitorów helikazy NS3 wirusa zapalenia wątroby typu C”.

Rozdział **Materiały i Metody** został opracowany starannie i zredagowany w sposób umożliwiający powtórzenie każdego doświadczenia. Opis kilku doświadczeń został wzbogacony w bardzo dobre schematy. Warte podkreślenia jest weryfikacja wyników własnych, np. potwierdzenie skuteczności zakażenia konstruktem JFH-1 sublinii Huh7.5 metodą nested PCR.

W oparciu o dane literaturowe (wspomniane także we Wstępie) oraz o wyniki pionierskich doświadczeń (czyich?) Autorka przedstawiła listę badanych związków; 32 pochodne antybiotyków antracyklinowych, 10 pochodnych topolonów i tetrazoli oraz 2 oligonukleotydy w wiarygodny sposób uzasadniając ich wykorzystanie do badań.

I bardzo podstawowe pytanie do tego rozdziału – czy ocena obecności białka NS3 jest równoznaczna z oceną jego aktywności? (proszę porównać informacje zawarte na stronie 89-90 oraz 106 – raz jest mowa o produkcji białka, a raz o jego aktywności).

Pani mgr Agnieszka Kołakowska-Kulesza dokumentuje w ocenianym rozdziale pracy znajomość wielu technik; umiejętność pracy z hodowlami komórkowymi, metod immunofluorescencyjnych, badania cytotoksyczności, molekularnych oraz Western Blot. Zaplanowanie badań oraz ich metodyczne zróżnicowanie wskazuje na rzetelność naukową Doktorantki.

Wyniki przedstawione zostały w logicznym porządku; opracowanie modelu badawczego *in vitro* w oparciu o transfekowaną JFH-1 (genotyp 2a HCV) linię Huh 7.5 oraz badania cytotoksyczności i przeciwwirusowej aktywności wybranych związków. Dodatkowo zostały przeprowadzone badania mające na celu potwierdzenie swoistego charakteru oddziaływań wybranych do pracy związków na helikazę wirusową.

W wyniku wykonanej pracy, Pani mgr Agnieszka Kołakowska-Kulesza otrzymała skutecznie transfekowaną JFH-1 linię Huh 7.5, która produkowała HCV na stabilnym poziomie. Stanowiło to podstawę do badania przeciwwirusowej aktywności wybranych do pracy związków. Warto podkreślić, że jest to pierwszy model oparty na transfekcji JFH-2 genotypu 2a HCV komórek linii Huh 7.5. Użyteczność stworzonego modelu do badań przeciwwirusowej aktywności nowych substancji potwierdzono wykorzystując leki o już potwierdzonej takim działaniu – telaprevir, interferon α i ribawirinę. Czy stężenia użytych substancji odpowiadają stężeniom osiąganym w organizmie podczas terapii?

Przed przystąpieniem do badania aktywności przeciwwirusowej określono bezpieczne dla komórek stężenia badanych związków wykonując test cytotoksyczności. Wyniki wskazały na bardzo niską wrażliwość komórek linii Huh 7.5 na zastosowane w pracy stężenia nowych substancji.

Aktywność przeciwwirusową testowanych substancji oceniano podając wartość dawki hamującej replikację wirusa (ED_{50}) oraz indeks terapeutyczny związku (IdT). Na tej podstawie wskazano najbardziej przeciwwirusowo aktywne związki:

- wśród pochodnych antybiotyków antracyklinowych były to; pochodna doksorubicyny DOX-Fpaz, pochodna epidoksorubicyny EDOX-Ahex oraz pochodna epidaunorubicyny EDAU-Fpir

- wśród pochodnych tropolonów i tetrazoli były to odpowiednio; TR13 i TB1.

Dalej, przeprowadzono badania dodatkowe mające ujawnić aktywność badanych substancji względem helikazy wirusowej. Moim zdaniem niesłusznie nazwano to jako badania dodatkowe, gdyż w istocie jest to określenie mechanizmu przeciwwirusowego działania związków wybranych na podstawie wcześniejszych analiz i stanowi ważną część pracy.

Celem tego etapu było określenie wpływu jedynie jednej pochodnej doksorubicyny DOX-Fpaz oraz jednej pochodnej tropolonów i tetrazoli TR2 (dlaczego wybrano akurat tę pochodną a nie TR13?) na powstawanie helikazy. Przy użyciu przeciwciał anti-NS3 metodą ilościową (WB) określono wysokość produkcji tego białka. Jak pokazuje Rycina XXXII nie było statystycznie istotnych różnic w hamowaniu wytwarzania helikazy przez wybrane dwa związki.

W mojej ocenie praca powinna składać się z trzech równorzędnych części – ustalenie modelu biologicznego (zrealizowane), badanie aktywności przeciwwirusowej szerokiego wachlarza nowych związków (zrealizowane) i zbadania najbardziej aktywnych związków względem białek niestrukturalnych HCV - proteazy serynowej NS3/4A, RdRp, NS5A i helikazy (zrealizowane i to tylko częściowo względem helikazy).

Pani mgr Agnieszka Kołakowska-Kulesza **Dyskusję** rozpoczyna od omówienia sytuacji epidemiologicznej na świecie i w Polsce związanej z rozprzestrzenianiem się zakażeń HCV. Zwraca uwagę na problem późnej diagnostyki spowodowanej brakiem objawów choroby

wątroby przez długi czas, co doprowadza w efekcie do identyfikacji już późnych symptomów jak marskość czy rak wątrobowokomórkowy.

Dalej Autorka szczegółowo omawia historię powstania/wykorzystania modeli biologicznych służących do badania replikacji HCV *in vitro* zwracając uwagę na wieloletnie trudności w pozyskaniu takiego modelu. Tym bardziej należy docenić stabilny układ, który zaproponowała Pani Agnieszka Kołakowska-Kulesza do badań aktywności przeciwwirusowej wobec HCV i który był przedmiotem publikacji “HCV replication in Huh-7.5 cell line” w Medycynie Doświadczalnej i Mikrobiologii (rok 2012) współautorstwa Doktorantki. Również Pihl A.F. i współpr. wykorzystali sublinię Huh 7.5 i konstrukt JFH-1 do badania aktywności związków przeciwwirusowych, z tym, że w tym przypadku konstrukt był oparty na genotypie 5a HCV. (praca “High density Huh7.5 cell hollow fiber bioreactor culture for high-yield production of hepatitis C virus and studies of antivirals” 2018, Scientific Reports).

Kolejno Autorka opisuje przeszłe i obecnie stosowane leki hamujące replikację HCV, podkreślając jednak potrzebę odkrycia nowych ze względu na ryzyko wytworzenia przez HCV oporności na związki dotychczas stosowane. Aktualnie zarejestrowane są leki hamujące aktywność niestukturalnych białek HCV, jak proteaza serynowa NS3-4A, polimeraza NS5B i kompleks replikacyjny NS5A. Spora część Dyskusji jest poświęcona jeszcze jednemu białku niestukturalnemu HCV jakim jest helikaza wirusowa. Jest ona bardzo dobrym, potencjalnym celem działania leków gdyż ogrywa istotną rolę w replikacji genomu. Grupą związków o aktywności skierowanej przeciwko temu białku są antybiotyki antracyklinowe – stąd zamysł Autorki, aby sprawdzić działanie ich nowych pochodnych względem helikazy (w istocie zbadano tylko jedną pochodną). Inne grupy naukowców badały zdolność amidynowych pochodnych antybiotyków antracyklinowych oraz pochodnych tropolonów i tetrazoli do hamowania aktywności helikazy – dlaczego w prezentowanej pracy badano tylko poziom produkowanego białka, a nie jego aktywność?

Ogólnie oceniam sposób poprowadzenia dyskusji jako poprawny i wyczerpujący wszystkie zagadnienia poruszone w części doświadczalnej dysertacji.

Wnioski odpowiadają na wyznaczone cele pracy. Mam tylko uwagę co do wniosku opisującego wpływ wybranych związków na replikację HCV poprzez hamowanie aktywności helikaz komórkowych – część doświadczalna nie dowodzi takiego badania.

Bibliografia obejmuje 208 pozycji, w przeważającej części prac anglojęzycznych z ostatnich 5 lat. Nie mam żadnych zastrzeżeń i uwag dotyczących doboru cytowanych w dysertacji pozycji literatury światowej.

Na końcu pracy umieszczony jest Spis rycin i tabel oraz objaśnienie skrótów używanych w pracy. Dodatkowo Autorka przedstawiła źródła finansowania prac eksperymentalnych stanowiący trzon dysertacji oraz dwie publikacje, których jest współautorką, a których wyniki również zostały wykorzystane w przygotowaniu niniejszej rozprawy.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Cała rozprawa została napisana poprawnym językiem polskim, z jedną uwagą dotyczącą słowa 'target', o którym wspomniałam przy okazji omawiania Wstępu. Doktorantka dołożyła starań, aby wzbogacić tekst, zwłaszcza rozdział opisujący metodykę, interesującymi rycinami i schematami. Podział pracy na rozdziały i podrozdziały jest jasny i czytelny.

Podsumowanie recenzji

Przedstawiona mi do recenzji praca stanowi **oryginalne** opracowanie dotyczące poszukiwania nowych leków przeciwko wirusowi HCV. Przedstawiono też nowy model biologiczny służący osiągnięciu tego celu. Pragnę zauważyć, iż prezentowane wyniki zostały już częściowo opublikowane w dwóch publikacjach polskojęzycznych – obie zawarte są w czasopiśmie Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia.

Przedstawione w recenzji uwagi nie podważają w istotny sposób merytorycznej wartości pracy, są jedynie sugestią, którą może wykorzystać Autorka rozprawy podczas przygotowywania kolejnych publikacji.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona przez Panią mgr Agnieszkę Kołakowską-Kuleszę rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14.03.2003 roku (t.j. Dz.U. 2017, poz. 1789) i wnoszę o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra
Wirusologii i Immunologii UMCS

prof. dr hab. Agnieszka Szuster-Ciesielska