



Prof. dr hab. Lidia B. Brydak, prof. zw.
Kierownik Krajowego Ośrodka ds. Grypy
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny



Krajowy Ośrodek ds. Grypy
Ul. Chocimska 24
00-791 Warszawa

tel./fax (0-22) 542-13-13
tel. (0-22) 542-12-74, 542-12-94
e-mail: nic@pzh.gov.pl, lbrydak@pzh.gov.pl

E-EI-075-4/2015

Warszawa 19 .08.2015r

Ocena pracy doktorskiej mgr Justyny Ciejki

***Polimerowe inhibitory i adsorbenty wirusów
wywołujących choroby układu oddechowego***

Praca doktorska mgr Justyny Ciejki została wykonana w Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów Zakładu Chemii Fizycznej i Elektrochemii, Wydziału Chemii UJ oraz w Zespole Wirusologii Zakładu Mikrobiologii, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Promotorem pracy był dr hab. Krzysztof Szczubińska, prof. UJ a promotorem pomocniczym dr hab. Krzysztof Pyrc z UJ.

Praca ma postać starannie opracowanej rozprawy doktorskiej w układzie typowym dla tego typu prac: obejmuje logicznie uporządkowane rozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, spis rysunków i tabel, cel pracy, wstęp teoretyczny, część doświadczalna, wnioski, podsumowanie, biografia zawierająca 148 cytowanej literatury oraz listę dorobku naukowego Doktorantki. Łącznie 221 stron.

Doktorantka posiada bogaty dorobek naukowy na który składają się 3 publikacje związane z pracą doktorską o zasięgu międzynarodowym o łącznej wartości IF=13,713; 4 ustne prezentacje i 20 prezentacji plakatowych, które były przedstawiane na międzynarodowych konferencjach. Ponadto Doktorantka jest współautorem w 3 zgłoszeniach patentowych związanych z pracą doktorską. Doktorantka uczestniczyła w następujących projektach naukowych, których rozprawa doktorska częściowo była finansowana;

- Kierownik projektu w ramach programu VENTURES Fundacji na rzecz Nauki Polskiej sierpień 2013 – czerwiec 2015r. Tytuł projektu: *Funkcjonalizowane nanocząstki do zastosowań w profilaktyce i leczeniu chorób układu oddechowego wywołanych koronawirusami* (VENTURES/2013-11/1)

- Główny wykonawca projektu w ramach programu Wydziałowego Funduszu Projektów Doktoranckich Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego; styczeń 2013 – grudzień 2013 r. Tytuł projektu: *Przeciwwirusowe formułacje polimerowe* (PSP K/DSC/001476)

-Wykonawca (stanowisko doktoranta) w ramach projektu badawczego TEAM koordynowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej; październik 2011 – luty 2013 r. Tytuł projektu: *Polymeric Functional Materials for Biomedical Applications, POLYMED* (TEAM/2008-2/6/styp21); Kierownik projektu: prof. dr hab. Maria Nowakowska.

Niezależnie od możliwości uczestnictwa w projektach naukowych Doktorantka otrzymywała następujące stypendia naukowe :

- Stypendium doktoranckie z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych na Uniwersytecie Jagiellońskim adresowane do 30% najlepszych doktorantów na danym roku studiów doktoranckich Wydziału Chemii UJ; 01.10.2014 – 30.09.2015r.

- Imienne stypendium naukowe dla doktoranta pełniącego funkcję kierownika projektu *Funkcjonalizowane nanocząstki do zastosowań w profilaktyce i leczeniu chorób układu oddechowego wywołanych koronawirusami* w programie VENTURES Fundacji na rzecz Nauki Polskiej; 01.08.2011 – 30.06.2015 r.

- Imienne stypendium naukowe dla doktoranta i udział w realizacji projektu *Polymeric Functional Materials for Biomedical Applications* (POLYMED) w ramach programu TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej; 01.10.2011 – 28.02.2013 r.

- Stypendium doktoranckie z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych na Uniwersytecie Jagiellońskim adresowane do 30% najlepszych doktorantów na danym roku studiów doktoranckich Wydziału Chemii UJ; 01.01.2012 – 30.09.2012 r.

Ponadto Doktorantka brała czynny udział w organizacji konferencji naukowych jako członek komitetu organizacyjnego w: Fifth Young European Scientists Workshop YES 2014, Kraków, 7-11.09. 2014r., oraz w przygotowaniu i edytorstwo książki abstraktów XXI International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics oraz International Spring School BES 'Novel Techniques for Nanobiological Sciences', Kraków, luty – maj 2011 r.

Tytuł rozprawy doktorskiej mgr Justyny Ciejki : *Polimerowe inhibitory i adsorbenty wirusów wywołujących choroby układu oddechowego* jest bardzo fascynujący. Jednakże już w streszczeniu czytamy, że tytuł rozprawy nie odpowiada zawartej w niej treści, ponieważ dotyczy to jedynie czterech wirusów wywołujących choroby układu oddechowego,

a mianowicie to wirus grypy, głównego sprawcy wielonarządowych powikłań pogrypowych jak również i zgonów - co jest godne uznania oraz trzy wirusy oddechowe ludzki metapneumowirus, ludzki rinowirus oraz ludzki koronawirus. Należy mieć świadomość, że wirusów oddechowych jest ponad 200 typów. Dla recenzenta pozostaje zagadką jakie względy merytoryczne kierowały Doktorantką, że dokonała takiego wyboru tych trzech innych wirusów oddechowych (hMPV, HRV, HCoV). Jestem przekonana, że dyskusja akademicka podczas obrony rozprawy doktorskiej z Doktorantką wyjaśni te zagadkę.

Celem pracy Doktorantki Justyny Ciejskiej było otrzymanie oraz scharakteryzowanie pod względem fizykochemicznym rozpuszczalnych w wodzie polimerów, które w założeniu mają hamować replikację wybranych wirusów układu oddechowego [wirus grypy typu A podtypu A/H3N2/ (IAV), ludzki metapneumowirusa (hMPV), ludzki rinowirus (HRV) oraz ludzkie koronawirusy NL63 i OC43 (HCoV-NL63, HCoV-OC43)] a w konsekwencji użycia ich do leczenia i profilaktyki chorób spowodowanych tymi wirusami. Badania przeprowadzono również ze zwierzęcym koronawirusem-mysiego zapalenia wątroby (MHV).

Do badań użyto 3 rodzaje polimerów :

- syntetyczne [N-sulfonowe polialliaminy (NSPAH), chlorek 0-2-hydroksypropylo)-3-trimetyloamoniowy poli (alkoholu winylowego) (HTPVA), poli (chlorowodorek alliloaminy)(PAH)];

- na bazie naturalnych polisacharydów: chlorek N-(2-hydroksypropylo)-3-trimetyloamoniowy chityny(HTCC) i jego hydrofobowa pochodna chlorek N-dodecylo-N-(2-hydroksypropylo)-3-trimetyloamoniowy chitozanu (HM-HTCC),

- naturalne : iota-oraz kappa-karagenany.

Aktywność antywirusową polimerów badano *in vitro* i/lub *ex vivo* tradycyjną metodą przy użyciu odpowiednich linii komórkowych dla danego użytego w badaniach patogenu.

W niniejszych badaniach wykazano, że zsyntetyzowane nowe N-sulfonowe polialliaminy (NSPAH) podobnie jak iota-oraz kappa-karagenany są bardzo silnymi inhibitorami replikacji wirusa typu A podtypu A/H3N2/. W badaniach wykazano, że zarówno masa cząsteczkowa polimeru oraz stopień podstawienia grupami sulfonowymi ma wpływ na efektywność replikacji wirusa grypy typu A podtypu A/H3N2/. Cechy te spełniał polimer NSPAH o masie cząsteczkowej około 65 kDa oraz stopnia podstawienia 89% (NSPAH-65-89), ponadto polimer ten wykazywał zdecydowanie lepszy profil fizykochemiczny i nie wykazywał efektu toksycznego nawet przy bardzo wysokich dawkach (po wyżej 5000µg/ml). Polianiony NSPAH podobnie jak karagenany hamują nie tylko replikację wirusa IAV (A/H3N2/), ale

również inne takie wirusy wywołujące choroby układu oddechowego wywoływane przez: hMPV i HRV, natomiast nie hamują replikacji HCoV-NL63.

Następne etapy badań dotyczyły inhibitorów replikacji koronawirusa nie tylko syntetycznych, ale również otrzymanych na bazie naturalnych polisacharydów. Właściwości zahamowania replikacji koronawirusów wykazywały polikationy takie jak HTCC, HM-HTCC, HTTPVA oraz PAH. Najsilniejsze działanie antykoronawirusowe zarejestrowano w przypadku polimeru HTCC, który hamuje efekt cytopatyczny wywołany zakażeniem wirusem HCoV-NL63 już przy stężeniu 10 µg/ml.

Ponadto dalsze badania wykazały, że polimer HTCC nie hamuje replikacji wirusów należących do innych rodzin tj. IAV czy hMPV.

Metodą spektrofotometryczną potwierdzono, że polimer HTCC oddziałuje z powierzchniowym białkiem *spike* płaszcza koronawirusów, które odpowiedzialne jest za związanie koronawirusa z receptorem na powierzchni komórki, a w konsekwencji prowadzi do wniknięcia wirusa do wnętrza komórki.

W kolejnym etapie badania dotyczyły rozszerzeniu spektrum zastosowania tego polimeru. Otrzymano nano/mikrocząstki metaliczne stabilizowane tym polimerem, polimerowe i hybrydowe polimerowo-krzemionkowe, o potencjalnych właściwościach antykoronawirusowych i /lub mogących służyć jako specyficzne adsorbenty do oczyszczenia i zagęszczenia zawiesiny koronawirusów. W następnym etapie badań Doktorantka podjęła próbę otrzymania funkcjonalizowanych nanocząstek metalicznych o właściwościach antykoronawirusowych. W badaniach tych wykorzystani jeden z naturalnych polisacharydów HTCC, który podczas syntezy nanocząstek złota (AuNPs-HTCC) i srebra (AgNPS-HTCC) posiadał działanie zarówno jako czynnik redukujący, jak stabilizujący nanocząstki.

Przeprowadzono pełną charakterystykę fizykochemiczną funkcjonalizowanych powierzchniowo nanocząstek metalicznych oraz pilotażowe badanie biologiczne mające na celu oznaczenia ich toksyczności oraz potencjalnych antykoronawirusowych właściwości w warunkach *in vitro*. Badania te nie osiągnęły właściwości antykoronawirusowych. Badania te w następnym etapie posłużą do weryfikacji opracowania innych parametrów eksperymentu. Przeprowadzono również badania nad możliwością zastosowania nano/mikrosfer polimerowych do adsorpcji koronawirusów, jak również hybrydowych materiałów polimerowo-krzemionkowych do oczyszczenia koronawirusów. Badania te miały na celu zastosowanie tych technik w powszechnej pracy laboratoryjnej do oczyszczania i zagęszczania wirulentnych cząstek HCoV-NL63. Mam nadzieję, że uzyskane wyniki będą pomocne w dalszych badaniach mających na celu otrzymania substancji antywirusowych, szczególnie

antygrypowych ze względu na bardzo duże prawdopodobieństwo wystąpienia pandemii grypy spełniające od lat ustalone kryteria

Prosiłabym aby Doktorantka podczas obrony pracy doktorskiej odpowiedziała na następujące pytania :

1. Proszę podać nazwy handlowe leków antywirusowych, których substancją czynną są naturalne polisacharydy-karagenany oraz datę rekomendacji przez WHO.
2. Proszę o podanie sezonowej zapadalności w Polsce wirusów użytych w niniejszej rozprawie doktorskiej.
3. Jakie względy merytoryczne kierowały Doktorantką, że badania były prowadzone z użyciem typu A, podtypu wirusa grypy A/H3N2/ i jaki to był sezon epidemiczny?
4. Jakie względy merytoryczne kierowały Doktorantką, do wyboru innych wirusów oddechowych a mianowicie; ludzki metapneumowirus, ludzki rinowirus oraz ludzki koronawirus.

Zanim praca zostanie przedstawiona do druku należy wykonać szczegółowe merytoryczne poprawki wirusologiczne. Wstęp teoretyczny rozdziały w tym podrozdziały (2.2; 2.2.1 - 2.2.4; np. wirus grypy rzekomej jest określeniem slangowym a nie naukowym, to wirusy parainfluenzy typ 1-4 , nie wszystkie podtypy wirusa grypy typu A są transmitowane na człowieka, grypa jest chorobą sezonową a nie roczną, szczyt zapadalności na grypę przypada w różnych miesiącach w zależności od sezonu epidemicznego, ale między styczniem a marcem, charakterystyki objawów grypy itp. Wyraz pożywka używany jest w badaniach bakteriologicznych a nie w badaniach wirusologicznych.

Zmuszona jestem zauważyć, że Doktorantka nie zadała sobie trudu aby zapoznać się z publikacjami i z badaniami jakie były i są prowadzone w Polsce , zwłaszcza dotyczące wirusa grypy i podstawowych wirusów grypopodobnych. Pozwolę sobie dodać , że to w Polsce znajduje się jeden ze 141 Krajowych Ośrodków ds. Grypy uznawany i wysoko oceniany przez WHO. W bibliotece tego ośrodka znajduje się w paręset publikacji głównie badań dotyczących grypy ale i również wybranych wirusów grypopodobnych. Prace były i są drukowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i cytowane na całym świecie. Gdyby Doktorantka przeczytała chociaż część tych prac - uniknęłaby podstawowych błędów z zakresu wirusologii. Wypada wiedzieć, że Polska uczestniczy w Global Influenza Surveillance and Response System – WHO oraz nadzorze prowadzonym przez European Center for Disease and Control. W polskim piśmiennictwie nie używa się cyt. str. 36 „doprowadzić do śmierci” – jest to nie prawidłowe tłumaczenie z języka angielskiego powinno być doprowadzić do zgonu, które pojawia się w wielokrotnie w pracy. Wirus jaki wywołał

pandemię grypy w sezonie epidemicznym w 2009/2010 został oznakowany jako podtyp A/H1N1/pdm09. Należy wiedzieć, że pandemia została wywołana przez podtyp wirusa A/H1N1/pdm09, a nie jak podano w pracy przez wirus grypy A/H1N1/. Zgodnie z danymi WHO w sezonie epidemicznym 2009/2010 zarejestrowało znacznie mniejszą liczę zgonów w świecie niż podczas innych sezonów epidemicznych, jak również, że w każdym sezonie epidemicznym potwierdza się krążenie nie tylko wirusów grypy typu A, podtypu A/H1N1/, A/H3N2/ i typu B w różnym nasileniu a od sezonu 2009/2010 również podtypu A/H1N1/pdm09 podtyp ten krąży w dalszym ciągu. Doktorantka w wielu fragmentach pracy nie ustrzegła się ogólników i tak np. określenie niedawno - nie jest określeniem precyzyjnym. W przypadku leków dopuszczonych do stosowania w lecznictwie przez WHO powinien być napisany rok w każdym przypadku. I tak np. Goldamaris flu – to nie jest lek, to wyrób medyczny-spray do płukania nosa (na bazie soli morskiej). W części doświadczalnej wirusy grypy typu A szczep H3N2, nieprawidłowa nazwa, powinno być napisane A/H3N2/ oraz z jakiego sezonu epidemiologicznego wirus ten pochodzi.

Nie mogę zgodzić się z opinią Doktorantki do stosowania w przyszłości tych nowych związków do profilaktyki nawet w przypadku infekcji grypowej. Co nie umniejsza celom pracy jakie sobie Doktorantka postawiła. We wszystkich dokumentach, rekomendacjach sezonowych WHO, ECDC leki antygrypowe nowej generacji-inhibitory neuraminidazy (Zanamiwir, Oseltamiwir) są używane do profilaktyki jedynie w bardzo sporadycznych przypadkach natomiast do leczenia – tak, po spełnieniu odpowiednich warunków.

Oceniana praca doktorska spełnia wymagania Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych, które są stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora nauk chemicznych, dyscyplina chemia.

Pomimo moich krytycznych uwag wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Justyny Ciejki do dalszych etapów przewodu doktorskiego,

K I E R O W N I K
Zakładu Badania Wirusów Grypy
Krajowy Ośrodek ds. Grypy
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-PZH

Lidia B. Brydak
Prof. dr hab. Lidia B. Brydak