



***Recenzja pracy doktorskiej opracowanej przez mgr. Annę Czarnotę pod tytułem  
"Chimeryczne wirusopodobne cząsteczki HBV-HCV jako potencjalna szczepionka  
przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu C"***

Promotor rozprawy: prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk, promotor pomocniczy dr Katarzyna Grzyb, Zakład biologii Molekularnej Wirusów, Międzyuczelniany Wydział biotechnologii UG i GUMed.

Recenzent: prof. dr. hab. n. med. Miłosz Parczewski, Klinika Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i Nabytych Niedoborów Immunologicznych, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie.

***Wstęp***

Pomimo poprawiającej się dostępności wysoko skutecznych bezpośrednio działających terapii przeciw wirusowym pozwalających na eradykację zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) na świecie wciąż żyje ponad 50 milionów osób z aktywnym zakażeniem tym wirusem. Częstość występowania przewlekłego zapalenia wątroby typu C jest aktualnie najwyższa krajach zlokalizowanych we wschodnich regionach morza śródziemnego i w Europie Wschodniej, niemniej ilość zakażeń jest również wysoka w najludniejszych krajach świata (Chiny, Indie, USA). Szacuje się, że tylko około 20% osób jest zdiagnozowanych a tylko 15% zdiagnozowanych otrzymało leczenie. Sytuacja ta z pewnością będzie się poprawiać w przyszłości. Strategia eliminacji HCV do 2030 roku zakłada, że 90% osób żyjących z HCV zostanie zdiagnozowanych a 80% otrzyma leczenie, o 90% zmniejszy się częstość nowych zakażeń a śmiertelność związana z powikłaniami tego zakażenia spadnie o 65%. Należy jednak zauważyć, że rocznie szacunkowo 1.75 miliona nowych osób ulega zakażeniu co wskazuje na skalę i trudność w realizacji wyżej założonych celów eliminacji.

Zmienia się również epidemiologia HCV - obok klasycznego ryzyka zakażenia związanego na przykład z używaniem dożylnych środków psychoaktywnych, pojawiają się zakażenia na drodze chemseksu będące związkiem pomiędzy ryzykownymi kontaktami seksualnymi a stosowaniem środków psychoaktywnych celem poprawy doznań seksualnych.

Opracowanie szczepienia przeciw HCV stanowi wyzwanie od wielu lat – testowano zarówno modele szczepionek profilaktycznych (redukujących ryzyko transmisji zakażenia) jak terapeutycznych (poprawiających zdolność samoeliminacji aktywnie replikującego wirusa), ale jak do tej pory bez powodzenia. Niemniej badania naukowe nad szczepionką przeciw HCV pozostają jednym z kluczowych nurtów badawczych, a potencjalne wdrożenie szczepionki stanowiłoby olbrzymią korzyść populacyjną w skali światowej. Dlatego sam zakres pracy doktorskiej oceniam bardzo wysoko jako podstawę naukową mogąca poprawić w przyszłości zrozumienie mechanizmów immunostymulacji w zakażeniu HCV a także ucieczki immunologicznej od stymulowanych przeciwciał. Praca doktorska ma charakter nowatorski, jest niezwykle wartościowa, łącząc badania podstawowe z potencjalnym zastosowaniem wdrożeniowym w przyszłości.

Należy również zauważyć, że doktorat powstał w ramach finansowaniu ze środków projektu LIDER NCBR „Nowe rekombinowane glikoproteiny E1E2 oraz cząstki wirusopodobne jako szczepionki przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C, oraz dwóch projektów NCN – Właściwości immunogenne epidotów białka NS3 wirusa zapalenia wątroby typu C w fuzji z małym białkiem powierzchniowym wirusa zapalenia wątroby typu B” pod kierownictwem dr Katarzyny Grzyb oraz „Ocena immunogenności silnie konserwowanych epitopów glikoproteiny E2 wirusa zapalenia wątroby typu C eksponowanych na powierzchni cząsteczek wirusopodobnych opartych na małym białku powierzchniowym wirusa zapalenia wątroby typu B” w ramach projektu Preludium, którego beneficjentem jest doktorantka. Pozyskanie środków na realizację projektu jest dodatkowym atutem pracy doktorskiej i wskazuje na dalsze możliwości pozyskiwania projektów naukowych przez panią magister Annę Czarnotę.

#### *Ocena metodologiczna i merytoryczna pracy*

Praca doktorska liczy 66 stron, które stanowią opis dla opublikowanych trzech prac oryginalnych stanowiących *de facto* podstawę pracy doktorskiej. Wszystkie opublikowane publikacje to prace z pierwszym autorstwem Doktorantki i są to:

*Praca 1: Immunogenicity of Leishmania-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus. Czarnota A, Tyborowska J, Peszyńska-Sularz G, Gromadzka B, Bieńkowska-Szewczyk K, Grzyb K. Microb Cell Fact. 2016 Apr 13;15:62. doi: 10.1186/s12934-016-0460-4.*

*Praca 2: Specific Antibodies Induced by Immunization with Hepatitis B Virus-Like Particles Carrying Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein 2 Epitopes Show Differential Neutralization Efficiency. Czarnota A, Offersgaard A, Pihl AF, Prentoe J, Bukh J, Gottwein JM, Bieńkowska-Szewczyk K, Grzyb K. Vaccines (Basel). 2020 Jun 10;8(2):294. doi: 10.3390/vaccines8020294.*

*Praca 3: Effect of Glycan Shift on Antibodies against Hepatitis C Virus E2 412-425 Epitope Elicited by Chimeric sHBsAg-Based Virus-Like Particles. Czarnota A, Offersgaard A, Owsianka A, Alzua GP, Bukh J, Gottwein JM, Patel AH, Bieńkowska-Szewczyk K, Grzyb K. Microbiol Spectr. 2023 Jan 31;11(2):e0254622. doi: 10.1128/spectrum.02546-22*

Wszystkie opracowania to pełnowartościowe manuskrypty oryginalne, zbieżne tematycznie, zaawansowane metodologicznie z prawidłowo przeprowadzonymi eksperymentami i rzetelnie opisanymi wynikami badań.

Opis w/w prac poprzedza dość obszerny wstęp dotyczący wirusologii HCV, z opisem budowy wirusa, epidemiologii i terapii zakażeń oraz ciekawie i warto opisane zagadnienia opisujące potrzeby i wyzwania w opracowaniu szczepionki przeciw HCV. Recenzent ze szczególnym zainteresowaniem prześledził doskonale opracowany opis odpowiedzi komórkowej i humoralnej a także zagadnienia ucieczki immunologicznej związanej ze zmianą konformacji immunogennych epitopów i poza epitopem, mechanizm przynęty wytracającej przeciwciała czy zmiany glikozylacji w tarczy glikanowej. Doskonały opis, który można w zasadzie w całości opublikować jako pracę pogładową skierowaną zarówno do biologów jak lekarzy.

Cele pracy są spójne i w linii z opublikowanymi pracami naukowymi a wnioski są scharakteryzowane wzorowo. Szczególnie interesujące są dane dotyczące silnej odpowiedzi humoralnej dla opracowanych VLP, reaktywność krzyżowa dla wielu subtypów HCV oraz możliwość potencjalnego opracowania biwalentnej szczepionki przeciw HCV/HBV (praca 1). Bardzo ciekawe wnioski z pracy 2 dotyczą różnic w poziomach neutralizacji przez przeciwciała sHBsAg zawierający epitop 421-425, oraz identyfikacja epitopu I (rejonu 412-423 go E2 HCV) jako najlepszego kandydata do rozwoju szczepionek przeciw HCV. Praca

trzecia jest kontynuacją powyższych badań i opisuje charakterystykę przeciwciał wzbudzonych przez chimeryczne VLP z przesuniętym miejscem glikozylacji – czyli dla mechanizmu potencjalnej ucieczki immunologicznej HCV. Badania te dały podstawę dla wniosku na temat konieczności opracowania takich antygenów szczepionkowych, które będą wzbudzały odpowiedź humoralną przeciwko glikoproteinom HCV zawierającym wiele wariantów glikozylacji białek otoczki.

### *Podsumowanie*

Przedstawiona na podstawie cyklu opublikowanych manuskryptów praca doktorska mgr Anny Czarnoty jest pracą o bardzo wysokiej wartości merytorycznej i wdrożeniowej, na co wskazuje fakt publikacji wyników w czasopismach o wysokiej renomie międzynarodowej. Wartość badawcza może przełożyć się na praktykę kliniczną i potencjalne opracowanie nowych szczepionek przeciw wirusowi o zasięgu globalnym. Oceniam przedstawiony cykl jako **wysoko wartościowy, a prace będące opracowaniami z zakresu nauk podstawowych o możliwym zastosowaniu praktycznym, za co należy się najwyższe uznanie**. W związku z powyższym zwracam się z uprzejmą prośbą do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr. Anny Czarnoty w związku z opracowaniem pracy doktorskiej pod tytułem "*Chimeryczne wirusopodobne cząsteczki HBV-HCV jako potencjalna szczepionka przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu C*" do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnioskuję o nadanie jej najwyższego przewidzianego regulaminem Uczelni wyróżnienia (*summa cum laude*), na które ta praca z pewnością zasługuje.

### **Uzasadnienie wyróżnienia pracy doktorskiej**

Elementy rozprawy stanowiące o jej wyróżniającym charakterze to badania naukowe nad produkcją sHBSAg VLP w modelu *L. tarentolae* (metoda nowatorska), innowacyjne badania dotyczące odpowiedzi immunologicznej dla białek HBsAg zawierających zmodyfikowaną sekwencję aminokwasów glikoproteiny E2 w rejonie 412-425 oraz identyfikacji epitopów o najwyższym potencjale dla dalszego opracowania szczepionek. Dodatkowo wyróżniającymi badaniami są opracowania zmienności odpowiedzi immunologicznej i wiązania surowic w przypadku zmian miejsc glikozylacji glikoprotein E1E2 – wskazujące na konieczność zastosowania zróżnicowanych glikozylacyjnie antygenów w przypadku potencjalnej produkcji szczepionek przeciw HCV.

Rozprawa została również w całości opublikowana w prestiżowych czasopismach naukowych, a Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach.

*Recenzent deklaruje brak konfliktu interesów w związku z ocenianą pracą doktorską.*

Z poważaniem

**Prof. dr hab. n. med.**

**Miłosz Parczewski**

℞  
℞℞℞℞℞

