



Prof. UAM dr hab. Robert Nawrot

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii, Zakład Wirusologii Molekularnej
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
e-mail: rnawrot@amu.edu.pl
tel. (61) 829-59-31

Poznań, dn. 16.11.2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Rafała Nowaka

pt. „Nowe strategie przeciwwirusowe oparte o hamowanie procesu wnikania wirusów do wnętrza komórki, na przykładzie SARS-CoV-2 i wirusa grypy typu A”
dla Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN

Praca doktorska Pana mgr. inż. Rafała Nowaka pt. „Nowe strategie przeciwwirusowe oparte o hamowanie procesu wnikania wirusów do wnętrza komórki, na przykładzie SARS-CoV-2 i wirusa grypy typu A” została wykonana w Zakładzie Wirusologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Kierzek. Funkcję promotora pomocniczego pełnił dr Paweł Zmora.

Praca dotyczy poszukiwania nowych leków przeciwwirusowych przeciwko wirusom infekującym drogi oddechowe na przykładzie wirusów grypy typu A i SARS-CoV-2, mających stosunkowo wysoką śmiertelność oraz duży potencjał pandemiczny. Skutki związane z pandemią świńskiej grypy A H1N1 w sezonie 2009/2010 oraz COVID-19 w latach 2019-2023 unaocznily, jak ważna jest wiedza dotycząca mechanizmów rozwoju pandemii, a także wirusów je wywołujących. Dlatego badania nad nowymi skutecznymi lekami przeciwwirusowymi są niezwykle ważne w celu przeciwdziałania przyszłym zagrożeniom. Autor skupił się w swoich badaniach na poszukiwaniu nowych związków przeciwwirusowych nakierowanych na komórki gospodarza, niezbędnych do prawidłowego przebiegu cyklu replikacyjnego wirusa. Kandydat przedstawił trzy oryginalne artykuły naukowe, w których wraz ze współautorami omawia trzy odmienne i innowacyjne metody hamowania wnikania wirusów do komórki gospodarza.

Praca doktorska mgr. inż. Rafała Nowaka została przygotowana w postaci zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie trzech artykułów naukowych, których lista znajduje się w załączonym wykazie, a Doktorant omówił je i podsumował w rozdziale pracy pt. „Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej”. Prace te zostały już zrecenzowane i opublikowane, zatem z obowiązku recenzenta przedstawię najbardziej podstawowe dane ich dotyczące. Artykuły te zostały opublikowane w latach 2023 – 2024, w międzynarodowych czasopismach recenzowanych:

- *Pathogens* (MDPI) - czasopismo z drugiego kwartyła (Q2) listy czasopism punktowanych w bazie JCR (74/163 miejsce w kategorii mikrobiologia), $IF_{2024} = 3,3$; pkt MEiN = 100,
- *Virology* (Elsevier) – czasopismo z trzeciego kwartyła (Q3) listy czasopism punktowanych w bazie JCR (23/42 miejsce w kategorii wirusologia), $IF_{2024} = 2,4$; pkt MEiN = 100,
- *Organometallics* (ACS) - czasopismo z drugiego kwartyła (Q2) listy czasopism punktowanych w bazie JCR (17/43 miejsce w kategorii chemia nieorganiczna i jądrowa), $IF_{2024} = 2,9$; pkt MEiN = 100

Rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Rafała Nowaka ma układ typowej dysertacji, której częścią centralną jest omówienie publikacji wchodzących w jej skład. Pracę rozpoczyna ich wykaz, po którym następuje wykaz prac niewchodzących w skład rozprawy, następnie rozdziały zatytułowane: Wprowadzenie, Cel pracy, Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Dyskusja, Wnioski, Wykaz skrótów, Bibliografia oraz Załączniki. W ramach załączników Autor umieścił oświadczenia określające wkład w powstanie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz reprinty tych publikacji. Dodatkowo na początku pracy Autor umieścił streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis treści. Dysertacja nie zawiera wyróżnionego rozdziału opisującego materiały i metody, które są jednak opisane w wystarczający sposób w publikacjach wchodzących w jej skład. Całość dysertacji liczy 112 stron, zawiera 170 pozycji piśmiennictwa, 5 tabel i 9 rycin. Dodatkowo do pracy przynależą reprinty trzech artykułów, liczące razem 38 stron, zatem całość rozprawy wraz z nimi liczy łącznie 150 stron, co jest standardową objętością dla tego typu rozprawy.

46-stronicowe **Wprowadzenie** stanowi bardzo ciekawe i stosunkowo obszerne opracowanie dotyczące epidemiologii wirusów grypy i koronawirusów. Rozdział ten, podzielony na 9 podrozdziałów, jest świetnym opracowaniem porównawczym dotyczącym wirusów infekujących drogi oddechowe mających wysoki potencjał epidemiczny i pandemiczny. W pierwszym podrozdziale Autor omawia przeszłe epidemie i największe pandemie wywołane przez wirusy grypy, łącznie z pandemią grypy „hiszpanki”, która w latach 1918-1919 zebrała żniwo 20-100 mln zgonów na całym świecie, a także epidemie i pandemie wywołane przez koronawirusy, łącznie z ostatnią pandemią COVID-19, która przyniosła 7 mln ofiar. Autor zwraca również uwagę na ogromne skutki społeczno-gospodarcze ostatniej pandemii dla całych społeczeństw, takie jak utrata 33 milionów miejsc pracy, zwiększenie występowania depresji i zaburzeń lękowych o 25% w skali globalnej, czy wzrost liczby prób samobójczych wśród młodzieży o 10-30%. W kolejnych podrozdziałach Autor w sposób metodyczny opisuje poszczególne rodzaje wirusów grypy oraz grupy koronawirusów, zwracając uwagę na wirusy zakażające człowieka, ale także ich rezerwuary zwierzęce, stanowiące punkt wyjścia do wybuchu kolejnych pandemii. Zwraca uwagę bardzo szczegółowa analiza cykli replikacyjnych obu porównywanych grup wirusów. Autor zwraca szczególną uwagę na podobieństwo molekularne w procesie wnikania tych wirusów do komórki: fuzji błon otoczki wirusa z błoną komórkową (SARS-CoV-2) a fuzji otoczki wirusa z błoną endosomu (wirus grypy). Następnie Autor przedstawia szczegółowo budowę wirionów wirusów grypy typu A oraz SARS-CoV-2, co daje podstawę do dokładnego omówienia w dalszej kolejności powierzchniowych białek obu wirusów kluczowych w procesie wnikania wirusa do komórki: hemaglutyniny (HA) wirusa grypy typu A, białka kolca (S) wirusa SARS-CoV-2 oraz komórkowej przezłonowej proteazy serynowej typu 2 (TMPRSS2). To

ostatnie białko jest ważną proteazą komórkową w procesie rozpoznania i wnikania wirusa SARS-CoV-2 do komórki, prowadząc do proteolitycznej aktywacji białka S wirusa po połączeniu z receptorem ACE2. Proteaza TMPRSS2 jest także kluczowym enzymem dokonującym aktywacji prawie wszystkich podtypów hemagglutyniny (HA) wirusa grypy typu A z jednozasadowym miejscem cięcia w przypadku ludzkich i mysich komórek nabłonkowych dróg oddechowych, co odróżnia szczepy łagodniejsze IAV od bardziej zjadliwych wirusów ptasich (AIV) z podtypów H5 lub H7, które charakteryzują się występowaniem wielozasadowego miejsca cięcia HA. W tym przypadku cięcie proteolityczne odbywa się z udziałem furyny występującej w praktycznie wszystkich komórkach organizmu, co czyni te wirusy bardziej zjadliwymi. Autor w ten sposób zwraca uwagę na białka komórki gospodarza jako potencjalne cele terapeutyczne dla terapii przeciwwirusowych, co zostaje rozwinięte w dyskusji. Wprowadzenie kończy podrozdział dotyczący strategii przeciwwirusowych nakierowanych na RNA/DNA w postaci oligonukleotydów antysensowych, małych interferujących cząsteczek RNA (siRNA), mikroRNA oraz omówienia technologii CRISPR/Cas. Przedstawione wprowadzenie jest bardzo dobrze napisane i spełnia swoją rolę przygotowującą czytelnika do zapoznania się ze szczegółowymi wynikami pracy zawartymi w publikacjach. Szkoda tylko, że szczegółowe opisy replikacji wirusów nie zostały zilustrowane odpowiednimi schematami. Wydaje się również, iż omówienie budowy wirionów wirusów IAV i SARS-CoV-2 przed opisami cykli replikacyjnych byłoby zasadniejsze w prowadzeniu odpowiedniej narracji.

W kolejnym rozdziale Autor przedstawił **cel pracy**, którym było opracowanie różnych strategii przeciwwirusowych opartych o hamowanie procesu wnikania wirusów do wnętrza komórki na przykładzie wirusów grypy typu A i SARS-CoV-2. **Cel pracy jest ciekawy i jasno sformułowany.** Poszukiwanie nowych leków przeciwwirusowych przeciwko wirusom układu oddechowego jest niezwykle ważne, szczególnie w obliczu faktu utraty skuteczności przez klasyczne leki przeciwwirusowe, których mechanizm działania nakierowany jest na białka wirusowe. Dlatego niezwykle ważne jest poszukiwanie związków przeciwwirusowych, których mechanizm działania będzie nakierowany na komórki gospodarza ważne dla prawidłowego przebiegu cyklu replikacyjnego wirusa, jednak nie ulegające tak często mutacjom jak białka wirusowe.

Wyniki pracy zostały opublikowane w trzech oryginalnych artykułach naukowych, przedstawiających trzy odmienne i nowatorskie metody hamowania wnikania wirusów do komórki gospodarza. Dlatego w kolejnym rozdziale pracy Doktorant **omówił publikacje wchodzące w skład rozprawy.**

W pierwszej pracy zatytułowanej „*Novel Molecular Consortia of Cannabidiol with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Emerging Coronaviruses' Entry*”, autorstwa: Anna Pawełczyk, Rafał Nowak, Monika Gazecka, Anna Jelińska, Lucjusz Zaprutko, Paweł Zmora, opublikowanej w czasopiśmie „*Pathogens*” w roku 2023, vol. 12, strony 951, Doktorant wraz ze współautorami przygotowali koniugaty molekularne kannabidiolu (CBD) z *Cannabis sativa* i niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) w celu określenia ich właściwości przeciwwirusowych. Aktywność biologiczną trzech koniugatów molekularnych (CBD–ibuprofen, CBD–ketoprofen i CBD–naproksen) oceniono w liniach komórkowych transdukowanych pseudotypami opartymi na wirusie pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV), zawierającymi

białka kolca SARS-CoV-1 lub SARS-CoV-2 lub zakażonych wirusem grypy A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Wyniki pokazały, że niektóre koniugaty molekularne CBD-NLPZ wykazywały wyższą aktywność przeciwwirusową przeciwko SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2, ale nie przeciwko wirusowi grypy A. CBD-ibuprofen i CBD-naproxen mogą potencjalnie stanowić nowe leki przeciwwirusowe. **Może to sugerować potencjalną rolę terapeutyczną tych związków w leczeniu pojawiających się zakażeń koronawirusowych,** wymaga to jednak dalszych badań.

Praca opublikowana jest w języku angielskim. Zawiera 13 ponumerowanych stron, z czego dwie ostatnie zawierają spis literatury składający się z 46 pozycji. Ma typowy układ składający się z rozdziałów: Wprowadzenie (*Introduction*), Materiały i metody (*Materials and methods*), Wyniki (*Results*), Dyskusja (*Discussion*), Konkluzje (*Conclusions*). Praca zawiera 5 rycin oraz 1 schemat. Wkład Doktoranta zgodnie z załączonym do rozprawy oświadczeniem obejmował wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, oraz udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu. Pan mgr inż. Rafał Nowak jest drugim autorem tej pracy. Dodatkowo załączone jest oświadczenie autora korespondencyjnego pracy, dr. Pawła Zmory, potwierdzające w/w wkład Doktoranta.

Drugi artykuł wchodzący w skład rozprawy doktorskiej pt. „*TMPRSS2-specific antisense oligonucleotides inhibit host cell entry of emerging viruses*” autorstwa: Rafał Nowak, Monika Gazecka, Markus Hoffmann, Ryszard Kierzek, Stefan Pöhlmann, Paweł Zmora, opublikowany w czasopiśmie „*Virology*” w roku 2024, vol. 487, strony 19-29. W pracy zbadano strukturę drugorzędową sekwencji kodującej mRNA przezłonowej proteazy typu II (TMPRSS2) i zaprojektowano specyficzne dla niego oligonukleotydy antysensowne (ASO). W badaniach użyto linii komórkowych Calu-3, Caco-2 oraz Vero-TMPRSS2. W badaniach nad wnikaniem koronawirusów wykorzystano pseudotypy wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV), które zawierają białka S SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2. W eksperymentach użyto wirusa grypy typu A szczepu A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Następnie przetestowano wpływ zaprojektowanych dziewięciu TMPRSS2 specyficznych ASO na namnażanie się wirusa grypy typu A w komórkach Vero-TMPRSS2, Caco-2, Calu-3. Siedem z nich doprowadziło do zahamowania namnażania się wirusa IAV w komórkach Vero-TMPRSS2, pięć testowanych ASO spowodowało znaczące 5- do 10-krotne obniżenie się miana wirusa w linii komórkowej Caco-2, a w linii komórkowej Calu-3 wszystkie testowane ASO doprowadziły do istotnego statystycznie zmniejszenia się miana tego wirusa. W przypadku badania wpływu ASO na wnikanie pseudowirusa SARS-CoV-2 do komórek wykazano, że 7 z 10 ASO spowodowało znaczące obniżenie poziomu wnikania do komórek Vero-TMPRSS2, natomiast wszystkie testowane ASO spowodowały znaczące statystycznie obniżenie poziomu wnikania w przypadku linii Caco-2. Dodatkowo badania metodą Real-Time PCR poziomu ekspresji genu TMPRSS2 po zastosowaniu specyficznych ASO wykazały, że wszystkie przetestowane ASO które obniżały miano wirusa, powodowały również obniżenie poziomu ekspresji TMPRSS2. **Uważam, iż wyniki te są znaczącym osiągnięciem pracy, potwierdzając, że zahamowanie ekspresji konkretnego genu gospodarza może mieć szerokie działanie przeciwwirusowe przeciw różnym wirusom, wraz z blokowaniem przez ASO interakcji pomiędzy wirusem a komórką gospodarza.**

Praca została opublikowana w języku angielskim. Zawiera 10 ponumerowanych stron, z czego ostatnie trzy zawierają spis literatury. Ma typowy układ składający się z rozdziałów: Wprowadzenie (*Introduction*), Materiały i metody (*Material and methods*), Wyniki (*Results*), Dyskusja (*Discussion*), Podziękowania (*Acknowledgments*). Praca zawiera 1 tabelę oraz 5 rycin, z czego 2 przedstawiają strukturę kodującą mRNA TMPRSS2 z miejscami modyfikacji chemicznych i miejscami przyłączania zaprojektowanych ASO. Wkład Doktoranta do pracy jest znaczący, gdyż jest On pierwszym autorem pracy. Zgodnie z załączonym oświadczeniem Kandydat był odpowiedzialny za wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu, odpowiedzi dla recenzentów oraz ostatecznej wersji manuskryptu. Załączone oświadczenie autora korespondencyjnego pracy, dr. Pawła Zmory, potwierdza wiodący wkład Doktoranta.

Trzecią pracą stanowiącą rozprawę doktorską jest publikacja pt. „*Organometallic–Erlotinib Conjugates Active against Lung Cancer Cells and as Emerging Virus Entry Inhibitors*” autorstwa Przemysław Biegański, Monika Gazecka, Rafał Nowak, Aleksander Górski, Natalia Dutkiewicz, Daniel Fabio Kawano, Paweł Zmora, Konrad Kowalski, opublikowanej w czasopiśmie „*Organometallics*” w roku 2024, vol. 43(1), strony 45-57. Celem badań była synteza szeregu koniugatów erlotynibu z wybranymi ugrupowaniami organometalicznymi, zbadanie ich aktywności przeciwnowotworowej i właściwości przeciwwirusowych przeciwko IAV oraz SARS-CoV-2, oraz identyfikacja potencjalnego mechanizmu aktywności przeciwwirusowej. Erlotinib jest drobnocząsteczkowym inhibitorem kinazy tyrozynowej EGFR zatwierdzonym w leczeniu niektórych nowotworów, np. niedrobnokomórkowego raka płuca. Natomiast receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) jest to przezbłonowy receptorem o aktywności tyrozynowej, który reguluje wiele procesów komórkowych, takich jak proliferacja, różnicowanie, migracja oraz odpowiedź na stres komórkowy, który może też pośrednio wspierać wnikanie wirusa. Erlotinib hamuje aktywację EGFR poprzez wiązanie się z miejscem wiązania ATP w domenie kinazowej, co prowadzi do zablokowania przekazywania sygnałów komórkowych. Erlotinib był również badany jako potencjalny lek przeciwko SARS-CoV-2. W pracy przeprowadzono syntezę metaloorganicznych koniugatów erlotynibu, w tym koniugatów ferrocenyliowych, rutenocenyliowych oraz koniugatów opartych o wykorzystanie renu. W badaniach wykorzystano linie komórkowe HEK293T, MDCK, A549 Calu-3. Zbadano wpływ przeciwwirusowy wybranych związków na proces replikacji wirusa grypy typu A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), a także wpływ związków na hamowanie wnikania SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 do komórek z wykorzystaniem pseudotypów VSV zawierających białka S SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2, podobnie jak w poprzednich pracach. Uzyskane wyniki wykazały, iż koniugat rutenocenyliowy 5 oraz erlotynib spowodowały znaczące obniżenie poziomu miana wirusa grypy typu A w testowanych liniach komórkowych oraz znaczące obniżenie poziomu wnikania koronawirusów SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 do ludzkich komórek 293T z receptorami ACE2 i TMPRSS2. Wynika to z faktu, iż koniugat rutenocenyliowy 5 znacząco ograniczył cięcie białka S niezbędne dla wnikania wirusa do komórki, oddziałując z TMPRSS2 lub wpływając na oddziaływanie białka S z ACE2. Prawdopodobną rolę w tych oddziaływaniach odgrywał receptor EGFR.

Podobnie jak poprzednie, praca opublikowana jest w języku angielskim. Składa się z 14 ponumerowanych stron, z czego 3 ostatnie zawierają spis literatury składający się z 83 pozycji. Praca ma typowy układ składający się z rozdziałów: Wprowadzenie (*Introduction*), Wyniki i Dyskusja

(*Results and Discussion*), Konkluzja (*Conclusion*), Sekcja Eksperymentalna (*Experimental Section*), Podziękowania (*Acknowledgments*). Praca zawiera 8 rycin. Doktorant jest trzecim Autorem pracy, zatem Jego wkład w pracę jest stosunkowo mniejszy niż w dwóch pierwszych publikacjach. Zgodnie z oświadczeniem załączonym do rozprawy, Pan mgr inż. Rafał Nowak był odpowiedzialny za wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu. Zakres ten jest potwierdzony przez autora korespondencyjnego, dr Pawła Zmorę, który w swoim oświadczeniu dodatkowo podkreślił wkład Doktoranta w odpowiedzi dla recenzentów oraz opracowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Przeprowadzona na 17 stronach **Dyskusja** jest bardzo ciekawa i wyczerpująca, w pełni omawiająca uzyskane wyniki z trzech publikacji oraz ich implikacje, szczególnie w kontekście podziału na leki VTAs (ang. *virus-targeting antivirals*) i HTAs (ang. *host-targeting antivirals*). VTAs oddziałują bezpośrednio na cząstkę wirusa lub hamują funkcje biologiczne wirusowych białek, natomiast HTAs oddziałują pośrednio na cykl replikacyjny wirusa, poprzez inhibicję aktywności i funkcji białek komórek gospodarza, a nie bezpośrednio na wirusa. Dyskusja jest także świetnym kompendium dotyczącym nowych leków przeciwwirusowych i peptydomimetyków, stąd wiele jej aspektów mogłoby stanowić osobną pracę przeglądową.

Najważniejszym osiągnięciem pracy jest skupienie się na strategiach terapeutycznych ukierunkowanych na komórki gospodarza (HTAs) i wykazanie ich potencjalnej przydatności w projektowaniu nowych leków przeciwwirusowych. Autor dyskutuje wiele aspektów takiego podejścia, a także ważny problem potencjalnej toksyczności HTAs dla organizmu (tzw. toksyczność zależna od celu, ang. *on-target toxicity*), czyli działań niepożądanych leku, które wynikają z jego mechanizmu działania, która jest głównym problemem podczas projektowania nowych HTAs.

Doktorant dyskutuje kwestię trudności w znalezieniu takich czynników komórkowych, które byłyby niezbędne dla cyklu replikacyjnego wirusa, ale jednocześnie zahamowanie ich aktywności nie wpływałoby negatywnie na metabolizm komórek gospodarza. Tego typu cząsteczkami mogą być przezłonowe proteazy serynowe, jak TMPRSS2. Badania wykazały, że strategia oparta o TMPRSS2 specyficzne ASO hamuje aktywność proteazy, a także hamuje jej syntezę. Jest to zatem strategia niezwykle skuteczna, przy minimalnych skutkach ubocznych dla organizmu.

Dyskusję kończy bardzo obrazowe i pomysłowe podsumowanie cyklu trzech publikacji składających się na rozprawę. Po dyskusji Autor umieścił jednostronicowy rozdział przedstawiający najważniejsze **wnioski** płynące z pracy, ciekawie podsumowujące Jej zawartość. Szkoda jednak, że w części opisowej rozprawy nie znalazł się osobny rozdział zbierający i omawiający materiały i metody wykorzystywane w jej powstaniu. Oczywiście są one obecne w reprintach publikacji, jednak ich omówienie znacznie wzbogaciłoby tę część rozprawy.

Na kolejnych 4 stronach Kandydat umieścił wyczerpujący **Wykaz skrótów**, wyjaśniający najpewniej wszystkie skróty używane w pracy.

W rozdziale **Bibliografia** na 16 stronach umieszczonych jest 170 przypisów, przedstawiających bogatą literaturę przedmiotu – są to referencje niezwykle aktualne, bardzo wiele z cytowanych pozycji zostało opublikowanych w ostatnich kilku latach.

W kolejnym rozdziale Autor zamieścił **oświadczenia określające wkład w powstanie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej**. Są to dwa oświadczenia - oświadczenie Kandydata oraz oświadczenie autora korespondencyjnego dr. Pawła Zmory. Każde z oświadczeń odnosi się do wszystkich trzech publikacji wchodzących w skład rozprawy. Autorem korespondencyjnym każdej z tych prac był promotor pomocniczy dr Paweł Zmora. Brak jest oświadczeń pozostałych współautorów prac na temat ich wkładu, jednak oświadczenie Doktoranta oraz autora korespondencyjnego są wystarczające żeby ocenić wkład Doktoranta.

Dodatkowym oświadczeniem, które załączył Autor, jest „**Oświadczenie dotyczące wykorzystania narzędzi generatywnej sztucznej inteligencji**”. W treści tego oświadczenia Autor przyznaje, iż korzystał z narzędzi SI na etapie opracowywania pracy w sposób pomocniczy, w celu korekty językowej, stylistycznej i edytorskiej wybranych fragmentów tekstu oraz wsparcia w porządkowaniu i ujednolicaniu treści przeglądowych, w tym w zakresie zachowania spójności terminologicznej i klarowności wypowiedzi. Jako Recenzent przyjmuję tę deklarację, a także zapewnienie o oryginalności wszelkich treści merytorycznych zawartych w pracy, niemniej jednak nie jestem przekonany, czy tego typu narzędzia powinny być wykorzystywane w przygotowaniu dysertacji naukowych, szczególnie z tego powodu, że mogą być źródłem wielu błędów, trudnych do wychwycenia.

W tym miejscu zebrałem pewne kwestie merytoryczne i pytania dotyczące pracy, o których wyjaśnienie chciałbym prosić:

1. W każdej z prac stanowiących rozprawę doktorską wykorzystywano hodowle linii komórkowych, np. Caco-2 czy MDCK. Chciałbym zapytać jaki był klucz wyboru poszczególnych linii do badań?
2. W pracy 1 i 3 wykorzystano pseudotypy VSV zawierające białka S SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2. Chciałbym zapytać dlaczego wykorzystano VSV jako platformę do badań? Czy nie rozważano innej platformy?
3. W pracy używane są koniugaty molekularne związków, które zostały już scharakteryzowane i dopuszczone do obrotu, celujące w białka wirusa. Wobec bardzo obiecujących wyników badań chciałbym zapytać o dalsze kroki w ich ewentualnym wykorzystaniu. Jaki jest ich potencjał w badaniach klinicznych?
4. Jak wygląda sytuacja prawna uzyskanych koniugatów CBD-NLPZ? Czy takie koniugaty z definicji stają się nowymi układami które muszą przejść pełną rejestrację w razie zatwierdzenia?
5. Moment podania leku przeciwwirusowego wpływa na jego skuteczność – w przypadku leków przeciwgrypowych jest to początek infekcji, jednak często interwencja lekarska jest spóźniona, co ogranicza skuteczność leku (np. oseltamiwir). Najbardziej obiecującymi układami przeciwwirusowymi spośród badanych w pracy są TMPRSS2-specyficzne ASO. Czy cząsteczki te mogłyby poprawić skuteczność leku związaną również z czasem ich podania pacjentowi, gdyby zostały podane na późniejszym etapie infekcji?

Dysertacja doktorska Pana mgr inż. Rafała Nowaka napisana jest prawidłowo, merytorycznie wnikliwie i dobrze się ją czyta. Zawiera dopracowane rysunki i przejrzyste tabele. Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na kilka kwestii związanych z przedstawionymi rycinami, tabelami oraz spisem literatury:

- Tabele w pracy – opisy do tabel powinny znajdować się nad tabelami w postaci nagłówków, a nie pod nimi.
- str. 18 – jest: „Zjadliwość wirusa rozumiana jako miara zdolności wirusa do zakażenia i wywoływania choroby...” - Szkoda, że podana definicja nie została poparta cytowaniem literaturowym.
- str. 25 – Rycina 1 – bardzo dobry schemat przedstawiający cykle replikacyjne wirusów SARS-CoV-2 i wirusa grypy typu A. Szkoda jednak, że legenda do ryciny nie zawiera poszerzonego opisu procesów uwidoczniionych na schemacie. Zwyczajowo ryciny powinna cechować samoobjaśnialność, której w tym przypadku zabrakło.
- str. 27 – Rycina 2 – Schemat wnikania wirusów do komórki – uwaga j.w.
- str. 29 - Rycina 3; str. 32, Ryc. 5 – nazewnictwo na rysunku powinno zostać przetłumaczone na język polski, jeśli cała praca jest w języku polskim,
- Bibliografia, pozycja 31 „Zahorski, T., & Zendran, I. (2018). Złoty wiek grypy. Krótka historia pandemii.” – brakuje informacji czy jest to książka czy artykuł w czasopiśmie naukowym.
- str. 24, 26, 28, 31 – całe strony zawierające wiele różnorodnych informacji szczegółowych, jednak wszystkie cytowania zebrane są na końcu strony, a według Recenzenta lepiej gdyby każda z informacji była cytowana bezpośrednio po jej podaniu.
- str. 41 – Rozdział 46 zawiera opis budowy hemaglutyniny (HA) wirusa grypy typu A (IAV), jednak brak jakiegokolwiek schematu ją przedstawiającego, który bardzo by się przydał. Na przykład na str. 42 Autor pisze „Dodatkowo domena ta łączy pozostałe domeny.” – trudno jednak zrozumieć, o którą dokładnie domenę chodzi.
- Bibliografia, pozycja 47 „Goździcka-Józefiak A, Barylski J, Broniarczyk J, Durzyńska J, Musidlak O, Nawrot R, et al. Wirusologia. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2019” – nieprawidłowo skonstruowane cytowanie podręcznika. Powinno być: „Goździcka-Józefiak A. (red.) 2019. Wirusologia. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN” i ewentualnie cytowanie konkretnego rozdziału wraz z jego autorami.

Doktorant nie ustrzegł się niestety w pracy innych drobnych błędów – językowych, stylistycznych i interpunkcyjnych. Poniżej zamieszczam przykłady, aby zwrócić uwagę na możliwe uniknięcie tego typu błędów w przyszłości:

- str. 10 – jest: „*Haemophilus influenza*”, „*Klebsiella pneumonie*”, powinno być: „*Haemophilus influenzae*”, „*Klebsiella pneumoniae*”,
- str. 18 – jest: „podtyp H7N9 pojawił w Chinach w 2013 roku”, powinno być: „podtyp H7N9 pojawił się w Chinach w 2013 roku”,
- str. 19 – jest: „wartości HI często wynosiła”, powinno być: „wartość HI często wynosiła”,
- str. 19 – jest: „po pandemii COVID-19 linia B/Yamagata wymarła”, powinno być np.: „po pandemii COVID-19 linia B/Yamagata została wyeliminowana”,
- str. 24 – jest: „zasializowany” jako tłumaczenie angielskiego „sialylated” – lepiej brzmiałoby „sializowany”,

- str. 26 – jest: „ich RNA jest transportowane” – powinno być: „ich RNA jest transportowany” (kwas rybonukleinowy – rodzaj męski),
- str. 29, legenda do Ryc. 3 – jest: „Schemat fuzji membrany wirusa grypy typu A” – słowo „membrana” powinno być zastąpione otoczką lub osłonką wirusową,
- str. 32, legenda do Ryc. 5 – jest: „Schemat fuzji membrany wirusowej SARS-CoV-2” – uwaga j.w.,
- str. 32 – jest: „RNA wirusowe jest transportowane” – powinno być: „RNA wirusowy jest transportowany”, j.w.,
- str. 33 – jest: „Wirusowe mRNA umożliwia następnie...” – powinno być: „Wirusowy mRNA umożliwia następnie...”,
- str. 38 – fragment tekstu: „...kompleksów vRNP Segment 6 koduje informację na temat budowy glikoproteiny neuroaminidazy Segment 7 koduje białko M1,...” nie zawiera kropek w miejscach, gdzie kończą się zdania,
- str. 39 – jest: „Cząsteczkę wirusa budują...” – powinno być: „Cząstkę wirusa budują...”,
- str. 41 – jest: „zamiast kwasu salowego” – powinno być: „zamiast kwasu sialowego”,
- str. 42 – jest: „struktury β i α połączone są połączone są...” – powinno być: „struktury β i α połączone są...”,
- str. 44 – jest: „białka kolca SARS-CoV-1” – powinno być: „białka kolca SARS-CoV-1”,
- str. 44 – jest: „...w postaci homotrimeru, zbudowanym z...” – powinno być: „...w postaci homotrimeru, zbudowanego z...”,
- str. 45 – jest: „Wewnątrz wirionu występuje jeszcze odcinek uczestniczący w procesach wewnątrz wirionu...” – powinno być np. „W wirionie występuje jeszcze odcinek uczestniczący w procesach wewnątrz wirionu...”,
- str. 45 – jest: „Białko kolca jest silnie glikolizowane...” – powinno być: „Białko kolca jest silnie glikozylowane...”,
- str. 52 – jest: „...wiązaniami Waston-Crick.” – powinno być: „...wiązaniami Watson-Crick.”,
- str. 52 – jest: „...obniżenie ekspresji białka docelowego” – powinno być np.: „obniżenie ekspresji genu docelowego”,
- str. 65 – jest: „Prawdopodobną rolę w oddziaływaniu koniugatu 5 oraz receptora ACE-2 może być zaangażowany receptor EGFR...” – powinno być np.: „W oddziaływaniu koniugatu 5 oraz receptora ACE-2 może być prawdopodobnie zaangażowany receptor EGFR...”,
- Str. 67 – jest: „na cząsteczkę wirusa...” – powinno być: „na cząstkę wirusa...”,
- Str. 71 – jest: „wpływ HTAs na organizmsą bardziej...” – powinno być: „wpływ HTAs na organizm są bardziej...”.

W tym miejscu chciałbym jeszcze zauważyć, iż wartości IF_{2023} / IF_{2024} czasopism wchodzących w skład rozprawy doktorskiej zweryfikowane w bazie Thomson Reuters JCR, na dzień 13.11.2025 r., różnią się od tych podanych w wykazie (str. 4) przez Autora.

Przedstawione powyżej krytyczne uwagi i spostrzeżenia nie wpływają na końcową wysoką ocenę pracy. Przedstawiona praca doktorska świadczy o tym, że Pan mgr inż. Rafał Nowak sprawnie porusza się w wykorzystaniu szerokiej gamy technik wirusologii, biologii molekularnej, hodowli komórkowych, bioinformatycznych, a także posiada wiedzę i umiejętność samodzielnego planowania i krytycznej analizy wyników badań, co jest świetnym prognostykiem dla dalszej pracy naukowej. Świadczy o tym także bogaty dorobek niewchodzący w skład rozprawy doktorskiej (wykaz str. 5), gdzie Kandydat jest drugim Autorem w aż sześciu pracach oryginalnych w czasopismach recenzowanych, opublikowanych w latach 2021-2025.

Podsumowując, praca doktorska Pana mgr. inż. Rafała Nowaka przedstawia nowatorskie i innowacyjne badania dotyczące możliwości rozwoju nowej gałęzi leków przeciwwirusowych nakierowanych na białka komórki gospodarza (HTAs). Najważniejszym osiągnięciem pracy jest wykazanie, że ASO charakteryzowały się najwyższą aktywnością biologiczną w porównaniu z inhibitorami oddziałującymi na białko kolca, natomiast najniższą skutecznością wykazały się związki erlotynibu. Bardzo dużą zaletą ASO jest także możliwość ich szybkiego projektowania przy wykorzystaniu informacji genomowej wirusa lub sekwencji nukleotydowej genomu człowieka. Pozwala to na skrócenie czasu przygotowania nowego terapeutyku z okresu kilkuletniego do kilkutygodniowego, podobnie jak w przypadku technologii mRNA wykorzystywanej coraz częściej w produkcji szczepionek. Dodatkowo możliwe jest połączenie strategii nakierowanych na komórki gospodarza z innymi lekami przeciwwirusowymi, dzięki czemu powstaje efekt synergii przynoszący najlepsze efekty w walce z wirusami, zmniejszając jednocześnie prawdopodobieństwo powstania oporności na oba leki. Wiedza ta ma ogromne znaczenie dla naszego przygotowania przed kolejnymi pandemiemi wirusów układu oddechowego i nie tylko. **Dlatego biorąc pod uwagę dużą wartość poznawczą przedstawionych wyników i możliwość ich praktycznego wykorzystania uważam, iż praca doktorska mgr inż. Rafała Nowaka zasługuje na wyróżnienie.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 40/2025/Internet/RN_140 z dnia 18 marca 2025 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o **dopuszczenie mgr inż. Rafała Nowaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.**

Signed by /
Podpisano przez:

Robert Nawrot

Date / Data:
2025-11-16
19:15