



Warszawa, dnia 16 listopada 2020r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Zatytułowanej: „Aktywność składników lateksu z *Chelidonium majus* L. względem ludzkiego drożdżaka (HPV)”

Mgr. Oskara Musidlaka

Wykonanej w Zakładzie Wirusologii Molekularnej, Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Roberta Nawrota oraz promotora pomocniczego dr Alicji Warowickiej

Rośliny od tysiącleci stanowiły nie tylko źródło pożywienia dla człowieka ale także były pierwszymi lekarstwami. Ziele glistnika pozyskiwane z rośliny zwanej glistnik jaskółcze ziele (*Chelidonium majus* L.) z rodziny makowatych (Papaveraceae) od wieków jest stosowany jako środek spazmolityczny w stanach skurczowych oraz zapalnych przewodu pokarmowego czy dróg żółciowych. Ponadto, żółto-pomarańczowo zabarwiony, sok mleczny (lateks) wyciśnięty ze świeżego surowca, zgonie z lecnictwem ludowym jest polecany w celu usuwania brodawek (tzw. kurzajek) i kłykcin. Badania naukowe potwierdzają właściwości przeciwwirusowe wyciągu oraz wyciśniętego soku z surowca wobec *herpes simplex* oraz wobec wirusa polio. Autorzy tych badań sugerują, że alkaloidy izochinolinowe, obecne w surowcu, są za tą aktywność odpowiedzialne. Zaiste, dalsze badania wykazały zahamowanie aktywności odwrotnej transkryptazy przez tę grupę związków. Niemniej jednak, badań potwierdzających zasadność ludowego zastosowania soku z glistnika jest nadal bardzo mało. Jeszcze mniej wiadomo na temat molekularnych mechanizmów tej aktywności, daleko jest też do rozwikłania kwestii, które związki są za to działanie odpowiedzialne. Znaczenia naukowe przedstawionej dysertacji można rozważać na dwóch płaszczyznach: 1) potwierdzenie/ udokumentowanie zasadności tradycyjnego zastosowania soku z glistnika w usuwaniu brodawek; 2) próba



wskazania na nowe substancje o potencjalnym zastosowaniu w terapii zakażenia wirusem brodawczaka (HPV).

Ponadto, skupienie się Doktoranta, nie tylko na związkach niskocząsteczkowych (głównie alkaloidach) ale i na składnikach wielkocząsteczkowych jakimi są białka wnosi dużo szersze spojrzenie na problem badawczy. Zanalizowanie wpływu surowego lateksu i pozyskanych z niego frakcji (alkaloidowej i białkowej) na stabilność cząstek pseudowirusowych HPV, przyłączanie tych cząstek do komórek keratynocytów (HaCaT), ocena infekcyjności wirusa oraz ocena wpływu na ekspresję wirusowych onkogenów E6 i E7, i białek komórkowych p53 i pRB jest absolutnie zasadny. Wykorzystując metody Griessa i ELISA Doktorant zbadał także wpływ surowego lateksu oraz jego frakcji na stymulowanie wydzielania mediatorów reakcji zapalnej (NO, TNF α , IL-6) przez komórki makrofagów RAW 264.7.

W tym miejscu warto podkreślić, iż badania etnofarmakologiczne są obecnie dość prężnie rozwijającą się gałęzią badań, w ramach nauk biologiczno-chemicznych (z podłożem historyczno- społeczno- ekonomicznym), w których biorą udział naukowcy specjalizujący się w farmakologii, farmacji, biologii, toksykologii czy botaniki. W tym świetle, tak skrupulatnie zaplanowane badania wnoszą rzeczywistą wiedzę na temat działania lateksu z ziela glistnika. Ponadto, co jest godne podkreślenia, badania były finansowane w ramach grantu NCN-Preludium. I wierzę, iż zostaną opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie naukowym.

Doktorant postawił sobie hipotezę iż lateks z ziela glistnika i jego składniki mogą hamować poszczególne etapy cyklu replikacyjnego wirusa HPV, a także indukować reakcję zapalną układu odpornościowego gospodarza. W celu weryfikacji hipotezy Autor wyprodukował cząstkę pseudowirusowych PsV-HPV16 oraz sprawdził, jak lateks i jego frakcje (białkowa, alkaloidowa) wpływają na:

- a) stabilność cząstek wirusowych przed ich wniknięciem do komórki,
- b) przyłączanie i wnikanie cząstek wirusowych do komórki,
- c) transkrypcję wirusowych onkogenów,



d) translację i poziom wirusowych białek onkogennych i oddziałujących z nimi białek komórkowych,

e) odpowiedź prozapalną komórek układu odpornościowego.

Poszczególne cele zostały uszeregowane w spójny i logiczny ciąg doświadczeń.

Zaplanowane przez Doktoranta cele badawcze zostały wykonane i zinterpretowane prawidłowo i do głównych osiągnięć Doktoranta należy zaliczyć 1) właściwe przygotowanie modelu badawczego: zarówno frakcji lateksu jak i wyprodukowane stabilnej cząstki PsV-HPV w komórkach linii HEK 293TT; 2) wykazanie iż infekcyjność PsV-HPV w komórkach HaCaT była obniżona przez roztwór lateksu oraz przez jego frakcje alkaloidową i białkową; 3) wykazanie wpływu roztworu lateksu, ale nie frakcji, na spadek ekspresji genów *E6*, *E7* i *p53* na poziomie białka, co sugeruje działanie synergistyczne białek glistnika z alkaloidami.

Muszę podkreślić, że wstęp teoretyczny pracy jest bardzo dobrze napisany. Rozdział dotyczący ziela glistnika był bardzo ciekawy i czytałam go z przyjemnością. Może trochę brakowało informacji o statusie ziela glistnika w nowoczesnej fitoterapii (monografia w Farmakopei, raport EMA, badania kliniczne itp.) oraz omówienia kwestii potencjalnej toksyczności surowca. Szereg zdjęć, rycin i tabel w części teoretycznej dysertacji dobrze ilustruje opisywane zagadnienia i pozwalają lepiej zrozumieć przedstawiony problem.

Poniżej chciałabym wyszczególnić zalety pracy:

- Bardzo dobry dobór doświadczeń do potwierdzenia hipotezy oraz szeroki wachlarz badań.
- Schemat izolacji poszczególnych frakcji (rycina 23) pozwala dobrze zrozumieć tok postępowania.
- Podanie dokładnego miejsca (współrzędne) i czasu zbioru (brakuje tylko roku) lateksu. Jest to bardzo ważne przy publikowaniu wyników badań. Ponadto Doktorant podał dokładną metodykę zbioru i przechowywania soku z glistnika.
- Bardzo dobrze jest wyjaśniony dobór komórek do badań oraz sam opis badań komórkowych, który pozwala na odtworzenie przeprowadzonych eksperymentów.
- Bardzo dobrze przeprowadzona dyskusja, nie tylko odnosząca się do wyników innych grup badawczych ale próbująca wyjaśnić mechanizm działania oraz wskazać na związki czynne.



Ponadto, rycina własna nr 48 świetnie podsumowuje wnioski wyciągnięte z uzyskanych wyników.

Spostrzeżenia, pytania i uwagi krytyczne:

Metodyka:

- Tabela odczynników zamieszczona na stronie 55 powinna zawierać też ich stopień czystości.
- Nie jest jasne czy metoda rozcieńczanie i zawieszania lateksu w buforze z dodatkiem 10% glicerolu bazowała na własnych doświadczeniach, czy była zapożyczona z piśmiennictwa i dlaczego wybrano taką metodę. Nie podany został także stosunek lateksu do buforu, a ma to znaczenie w interpretacji wyników badań dla „surowego lateksu”. Ponadto nie podano stosunku frakcji białkowej do buforu PBS.
- Kolejną kwestia jest stężenie związków czynnych we frakcjach. Doktorant oszacował zawartość białka we frakcji białkowej na poziomie 0,8 µg/µl. Nie wiadomo ile białka jest w „surowym lateksie”, chociaż Doktorant zachowuje objętości wyjściowego „surowego lateksu”, żeby móc porównywać aktywność biologiczną. Jednak brak oszacowania stężenia sumy alkaloidów we frakcji „alkaloidowej” jest już mankamentem. Autor jedynie jak w przypadku frakcji „białkowej” zachował wyjściowe objętości.
- Czy frakcje przygotowywano każdorazowo, czy były przechowywane? Jeśli tak, to czy frakcja białkowa była stabilna?
- Brak jest rozdziału opisującego użyte metody statystyczne do opracowywania wyników. Poproszę zatem o dodatkowe informacje.

Wyniki:

- Identyfikacja alkaloidów w lateksie jest ważna poznawczo ale brakuje danych ilościowych, które ułatwiły by interpretacje badań biologicznych. Zdaje sobie jednak sprawę, iż zakres badań i tak był bardzo szeroki. Niemniej jednak, w przyszłości byłoby wskazane zanalizować skład frakcji metodami sprzężonymi jak np. HPLC-DAD-MS.
 - Badania cytotoksyczności w stosunku do komórek są bardzo wartościową częścią pracy, ale brak analizy statystycznej wydaje się być mankamentem i utrudnia ocenienie czy różnice między frakcjami są statystycznie znamienne. Ponadto podawanie stężenia w formie
-



rozcieńczeń nie pozwala się odnieść do wyjściowego stężenia lateksu i frakcji. Chociaż to nie przeszkadza porównaniom, i wytypowaniu optymalnych rozcieńczeń do dalszych badań. Autor nie podaje, które rozcieńczenie wykorzystał w którym badaniu. Widać to w badaniach na komórkach RAW 264.7, gdzie rozcieńczenia są różne i trudno je ze sobą porównać.

Ponadto brakuje kontroli pozytywnej.

- Brak analizy statystycznej jest też odczuwalny w badaniu wnikania (infekcyjności) cząstek PsV-HPV do komórek HaCaT. Z wykresu wynika, że „surowy” lateks działa silniej (ale czy statystycznie znamienne?) od frakcji. Mankamentem jest brak kontroli pozytywnej. Podobna sytuacja dotyczy ekspresji wirusowych genów *E6* i *E7* oraz *p53* w komórkach HeLa na poziomie białka.

- Badania dokowania wybranych alkaloidów, są niewątpliwie ciekawym uzupełnieniem badań doświadczalnych, ale z jednej strony nie jest jasne dlaczego akurat te związki wybrano, a z drugiej badania *in silico* warto by było poprzeć badaniami *in vitro*.

- Szkoda, że w badaniach z użyciem komórek RAW 264.7 nie użyto za każdym razem kontroli pozytywnej czyli LPS-u. Niemniej jednak widać, że ryzyko działania prozapalnego rozcieńzonego lateksu i jego frakcji jest niewielkie. Ale jak zinterpretować powyższe wyniki do sytuacji gdy stosowany jest nierozcieńczony lateks prosto na skórę zmienioną stanem chorobowym?

Oczywiście powyższe uwagi nie umniejszają mojej bardzo pozytywnej oceny pracy.

Reasumując, jednoznacznie stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja mgr. Oskara Musidlaka całkowicie spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę tym samym do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr. farm. Oskara Musidlaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. farm. Anna K. Kiss