



prof. dr hab. Anna Jankowska
Kierownik Pracowni Biologii Molekularnej
ul. Rokietnicka 5D
60-806 Poznań
tel. 61 8547190
e-mail: ajanko@ump.edu.pl

Poznań, dn. 23.06.2021

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Oskara Musidlaka
pt.: „Aktywność składników lateksu z *Chelidonium majus* L. względem ludzkiego
wirusa brodawczaka (HPV)”

Praca doktorska mgr. Oskara Musidlaka została wykonana pod kierunkiem prof. UAM dr. hab. Roberta Nawrota w Zakładzie Wirusologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Promotorem pomocniczym była Pani dr Alicja Warowicka z Zakładu Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma klasyczny układ z wyodrębnionymi podrozdziałami: Wstęp, Cel, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie badań, Wnioski końcowe. Praca napisana jest na 128 stronach maszynopisu oraz dalszych 25 stronach zawierających: spis rycin i tabel, wykaz stosowanych skrótów oraz bibliografia. Dokumentację wyników stanowi: 19 rycin i 4 tabele prezentujące rezultaty przeprowadzonych eksperymentów. W sumie w pracy zamieszczono 35 tabel oraz 48 rycin. Są one dobrym uzupełnieniem i podsumowaniem prezentowanych treści.

Praca rozpoczyna się pięćdziesięciotrzystonowym wstępem, w którym mgr Oskar Musidlak szczegółowo omawia dane literaturowe dotyczące *Chelidonium majus* L., włączając w to opis botaniczny, skład wydzielanego przez roślinę lateksu oraz jego zastosowanie w medycynie. Druga część rozdziału dotyczy ludzkiego brodawczaka (HPV), w którym Autor opisuje zróżnicowanie papillomawirusów, ich cykl replikacyjny i choroby, które wywołują. Przedstawia też budowę kapsydu i genomu HPV, ze



szczególnym uwzględnieniem onkogennych białek E6 i E7. Wstęp kończy podrozdział dotyczący cząstek pseudowirusowych HPV.

Zawarte we wstępie informacje bardzo dobrze wprowadzają czytelnika w temat pracy, są także istotne dla właściwej analizy przedstawionych wyników.

Na wyróżnienie zasługuje wzbogacenie tej części pracy o liczne ryciny, które doskonale obrazują i uzupełniają omawiane zagadnienia.

W następnym rozdziale rozprawy mgr Oskar Musidlak przedstawia założenia i cele badawcze swojej pracy doktorskiej. Głównym celem podjętych badań była weryfikacja hipotezy, że lateks *C. majus* i jego składniki mogą hamować poszczególne etapy cyklu replikacyjnego wirusa HPV.

Aby potwierdzić prawdziwość postawionej hipotezy założono wyprodukowanie cząstek pseudowirusowych PsV-HPV16 oraz sprawdzenia, jak lateks i jego składniki: frakcje białkowa i alkaloidowa wpływają na: (i) stabilność cząstek wirusowych przed ich wnikiem do komórki, (ii) przyłączanie i wnikanie cząstek wirusowych do komórki, (iii) transkrypcję wirusowych onkogenów, (iv) translację i poziom wirusowych białek onkogennych i oddziałujących z nimi białek komórkowych, oraz (v) odpowiedź układu odpornościowego.

Wymienione przez Autora zadania badawcze zostały zrealizowane.

Pewnym nadużyciem wydaje się tu sformułowanie ostatniego zadania badawczego, tj. „zbadanie wpływu lateksu i jego składników na odpowiedź układu odpornościowego”. Przeprowadzone eksperymenty pokazują jedynie reakcję makrofagopodobnej linii komórkowej w postaci produkcji NO, TNF α i IL-6. Stąd zdaniem recenzenta lepsze byłoby sformułowanie: „zbadanie wpływu lateksu i jego składników na wybrane mediatory odpowiedzi immunologicznej”.

Następny rozdział rozprawy szczegółowo opisuje metodykę prowadzonych analiz, poszczególne grupy badawcze oraz używane do tego celu odczynniki.

Materiały i metody opisane są wyjątkowo dokładnie i starannie. Jednak, by na ich podstawie można było bez przeszkód powtórzyć przedstawione eksperymenty, należałoby uzupełnić je o kilka szczegółów.



I tak, w pracy nie podano stężeń przeciwciał stosowanych w celu detekcji badanych białek; nie podano też stężeń /rozcieńczeń wykorzystywanych frakcji lateksu.

W badaniach wykorzystano 4 różne linie komórkowe, które jak deklaruje Doktorant zakupiono od firm zewnętrznych lub otrzymano z laboratoriów współpracujących z Zakładem Wirusologii Molekularnej UAM. Tu należałoby doprecyzować, które linie zostały zakupione komercyjnie, uzupełnić numery katalogowe badanych linii, a w przypadku komórek udostępnionych z innych laboratoriów zamieścić nazwisko i afiliację osób, od których otrzymano komórki.

Ponadto nie zamieszczono informacji, czy i ile razy powtarzano poszczególne eksperymenty.

Obszerną, sześćdziesięcioczęściową część rozprawy stanowi przedstawienie i omówienie wyników. Wszystkie opisane w pracy doktorskiej obserwacje mają charakter doniesień oryginalnych, a ich dokumentacja nie budzi zastrzeżeń. Wśród wielu ważnych i interesujących wyników przedstawionych w rozprawie moim zdaniem na szczególne podkreślenie zasługują:

- wykazanie, że zarówno surowy lateks *C. majus* jak i frakcja alkaloidowa wykazują silne działanie cytotoksyczne wobec wszystkich testowanych linii komórkowych;
- dowiedzenie, że frakcja białkowa lateksu może indukować w komórkach produkcję mediatorów reakcji zapalnej: NO, TNF α i IL-6;
- pokazanie, że alkaloidy lateksu stabilizują białko p53, które jest głównym regulatorem cyklu komórkowego;
- udowodnienie, że składniki lateksu częściowo hamują wnikanie cząstek PsV-HPV do komórek;
- udokumentowanie, że składniki lateksu: alkaloidy i białka hamują ekspresję wirusowych onkogenów E6 i E7 na poziomie mRNA i białka.

Mimo przedstawienia w pracy wielu interesujących wyników i spostrzeżeń brakuje tu dokładniejszej charakterystyki trzech miejsc aktywnych białka p53, do których dokowano wybrane alkaloidy. Ponadto biorąc pod uwagę interakcję lateksu z białkiem p53 oraz wyniki eksperymentów badających cytotoksyczność lateksu uważam, że rangę uzyskanych wyników podniosłoby przeprowadzenie dodatkowych analiz dotyczących proliferacji i apoptozy badanych komórek.



Wszystkie wyniki opisane przez mgr Oskara Musidlaka zostały poddane konfrontacji z danymi literaturowymi w obszernym rozdziale zatytułowanym Dyskusja. Rozdział ten świadczy o dobrej znajomości tematu oraz dowodzi, że Doktorant z powodzeniem włącza się w nurt badań prowadzonych w kraju i za granicą. Uzyskane przez niego wyniki wnoszą nowe dane do badań dotyczących mechanizmów działania składników lateksu *C. majus*.

Mimo niezwyklej staranności, która wyróżnia przedstawioną do recenzji pracę, nie udało się w niej uniknąć błędów językowych i nieścisłości o charakterze redakcyjnym. Z obowiązku recenzenta poniżej przedstawiam kilka uwag dotyczących tych usterek:

- ani w tekście, ani na rycinach przedstawiających rozdział wzorców wielkości zamieszczonych w rozdziale Materiały i metody nie podano informacji dotyczącej procentowości żeli;
- przy wartościach przyspieszenia z jakim wirowano określone próby użyto litery „G”, która oznacza stałą grawitacji; przyspieszenie oznacza się jako „g”;
- na rycinie 29 nazwy zidentyfikowanych frakcji alkaidowych są w j. angielskim;
- w języku polskim wartości dziesiętne podaje się po przecinku, a nie kropce, jak ma to miejsce w języku angielskim.

Przedstawione powyżej uwagi i spostrzeżenia nie wpływają na końcową wysoką ocenę rozprawy doktorskiej pana mgr. Oskara Musidlaka.

Uzyskane w pracy wyniki mają charakter doniesień oryginalnych i istotnych dla nauki wyników.

Na wyróżnienie zasługuje bogaty warsztat technik wykorzystanych przez Doktoranta oraz fakt, że w pracy analizowano obszerny materiał, oceniając przy tym liczne zmienne. Obok klasycznych technik biologii molekularnej pozwalających min. na wyodrębnienie i weryfikację frakcji lateksu *C. majus*, produkcję cząstek pseudowirusowych czy analizę oddziaływań między składnikami lateksu a białkiem p53, Doktorant z powodzeniem zastosował metody biologii komórki dowodząc cytotoksyczności lateksu i jego wpływu na wnikanie cząsteczek wirusowych do komórek.



Należy podkreślić, że rozprawa dotyczy ważnego problemu związanego z wyjaśnieniem molekularnych mechanizmów antywirusowego działania lateksu *C. majus*. W tym kontekście wyniki Doktoranta wydają się mieć istotne znaczenie nie tylko poznawcze, ale także praktyczne, gdyż w przyszłości mogą być wykorzystane w poszukiwaniu nowych terapii antywirusowych, a uwzględniając onkogenność wirusów HPV także antynowotworowych.

W świetle przedstawionej oceny stwierdzam, że rozprawa mgr. Oskara Musidlaka spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim. Dlatego przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr. Oskara Musidlaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wartość przedstawionych wyników i potencjalną możliwość ich klinicznego zastosowania uważam, że praca zasługuje na wyróżnienie.

Z poważaniem