



Dr hab. Dorota Nowak
Zakład Patologii Komórki
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski

Wrocław, 7 grudnia 2015

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Bojko pt. „Modulujący wpływ kurkuminy oraz tyrfostinów (AG494 i AG1478) na regulację wzrostu i przeżywania ludzkich komórek nowotworu mózgu LN229”

Glejak wielopostaciowy (Glioblastoma multiforme) jest nowotworem mózgu, charakteryzującym się wzrostem naciekającym, intensywną migracją i szybkim rozprzestrzenianiem w obrębie otaczającej tkanki nerwowej. Ten typ wzrostu guza utrudnia całkowitą chirurgiczną resekcję glejaka, stąd często obserwowane wznowy. Jest to nowotwór źle rokujący. Pięcioletnie przeżycie po stosowanej obecnie terapii, obejmującej resekcję guza, radioterapię i chemioterapię, z zastosowaniem temozolomidu, bewacyzumabu czy karmustyny, dotyczy jedynie kilku procent pacjentów. Przeciętny czas życia liczony od diagnozy to okres jednego roku, a leczenie ma głównie charakter paliatywny, tzn. skupia się na przedłużeniu i poprawie jakości życia pacjenta. Dlatego też niezwykle istotnym jest zarówno udoskonalenie terapii, jak i poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych.

Czynniki wzrostowe zaangażowane są w regulację wzrostu, proliferacji i różnicowania komórek. Uczestniczą również w procesie przerzutowania. Komórki nowotworowe są zdolne do syntezy i odpowiedzi na szereg takich czynników, jak na przykład naskórkowy czynnik wzrostu (EGF). Ze względu na stymulujący wpływ szlaków kontrolowanych przez EGF na proces inwazji komórek nowotworowych uznaje się, że jego receptor (EGFR) stanowi dobry cel terapii antynowotworowej. Ponadto gen *EGFR* często ulega nadekspresji lub mutacji w komórkach nowotworowych. W ostatnich latach pojawiło się kilka związków o charakterze inhibitorów EGFR. Hamują one zdolność tego receptora do fosforylacji, poprzez bezpośrednią interakcję z miejscem wiązania ATP w domenie posiadającej aktywność kinazy tyrozynowej. Prowadzi to do blokady dalszej części drogi przekazywania sygnału z udziałem EGFR.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Agnieszki Bojko dotyczy poszukiwań nowych wariantów terapeutycznych w leczeniu ludzkiego nowotworu mózgu. W tym celu

Doktorantka zastosowała kurkuminę w połączeniu z tyrfostinami AG494 i AG1478, traktując nimi w różnych konfiguracjach komórki glejaka linii LN229. Wszystkie wymienione związki są selektywnymi inhibitorami receptora EGF. Mechanizm ich działania jest podobny, konkurują bowiem z ATP o miejsce wiązania z enzymem, przy czym AG494 i kurkumina w sposób odwracalny hamują autofosforylację tyrozyny, zaś AG1478 działa w sposób nieodwracalny. Doktorantka uzasadnia wybór linii komórkowej ludzkiego glejaka LN229 do realizacji postawionych celów, faktem zwiększonej produkcji naskórkowego czynnika wzrostu przez te komórki, jak również podwyższoną ekspresją genu dla jego receptora. W celu ustalenia wpływu badanych substancji i ich mieszanin na komórki prawidłowe Pani mgr Bojko zastosowała linię ludzkich keratynocytów – HaCaT.

Oceniana przeze mnie rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Biochemii Ogólnej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Prof. dr hab. Andrzeja Kleina. Praca została przygotowana w Zespole, w którym od lat prowadzone są badania nad udziałem czynników wzrostowych i ich inhibitorów w procesie nowotworzenia.

Praca doktorska Pani mgr Agnieszki Bojko liczy 115 stron, w tekście zamieszczono 37 rycin, 9 tabel i cytowano 236 pozycji literaturowych. Rozprawa ma układ typowy dla tego typu opracowań. W 16 stronicowym „Wstępie” Autorka przedstawiła informacje przybliżające temat i ułatwiające czytelnikowi zrozumienie całości pracy. W rozdziale tym Doktorantka zamieszcza dane dotyczące przedmiotu swoich badań – glejaka wielopostaciowego oraz rodziny naskórkowego czynnika wzrostu oraz jego receptorów. Koncentruje się również na przedstawieniu dróg przekazywania sygnału z udziałem EGFR oraz omówieniu stosowanych w pracy inhibitorów tego receptora, takich jak AG494, AG1478 oraz kurkumina.

W obszernym rozdziale „Materiały i metody” Autorka zawarła wyczerpujące informacje dotyczące stosowanych w pracy linii komórkowych, metod eksperymentalnych oraz analiz statystycznych. Do oceny cytostatycznego działania badanych związków wybrała test MTT, zaś migrację komórkową analizuje testem „zarastania rysy”. Ponadto Doktorantka bada wpływ tyrfostinów i kurkuminy na przebieg cyklu komórkowego, stosując cytometrię przepływową. Ich efekt cytotoksyczny na badane komórki analizuje, stosując mikroskopię fluorescencyjną i barwienie różnicowe oraz dokonuje luminescencyjnego pomiaru aktywności kaspaz 3 i 7. Odrębnymi zadaniami podjętym w ocenianej przeze mnie pracy doktorskiej jest analiza właściwości oksydacyjnych testowanych substancji oraz ich wpływ na rozmiar uszkodzeń DNA w badanych komórkach określany za pomocą testu kometkowego. Wreszcie, dociekając mechanizmów działania inhibitorów AG494, AG1478 i kurkuminy, Doktorantka bada aktywność

wybranych białek sygnalizacyjnych, takich jak ERK 1/2, Akt czy NF- κ B, stosując metodę Western Blotting i przeciwciała wykazujące obecność aktywnych, ufosforylowanych form tych białek.

W rozdziale „Wyniki” Autorka przedstawia główne osiągnięcia swoich badań nad możliwością zastosowania tyrfostinów AG494, AG1478 i kurkuminy oraz ich mieszanin jako potencjalnych leków stosowanych w terapii glejaka. Doktorantka stwierdza, że najsilniejszym, odwracalnym inhibitorem wzrostu komórek glioblastomy jest AG1478. Jednocześnie zauważa, że stosowanie mieszanin związków nasila efekt antyproliferacyjny. Wyniki zawarte w tej części pracy zostały poddane wnikliwej analizie statystycznej, jednakże ich prezentacja w postaci zestawień tabelarycznych (Tabele 1-3), a dopiero w dalszej kolejności w formie uproszczonych wykresów utrudnia analizę wyników. Wydaje się, że mnogość tych zestawień była również uciążliwa dla Doktorantki, gdyż na stronie 53 powołuje się na rysunek 9C, którego nie ma w całej pracy, zaś opisy niektórych tabel zawierają nieścisłości, np. nie zgadzają się przedziały ufności -p (Tabela 5 i 6).

Kolejnym celem realizowanym w pracy doktorskiej było ustalenie hamującego wpływu badanych związków na migrację komórek LN229. Doktorantka przedstawia jednak tylko wyniki dla tyrfostinu AG494 i kurkuminy, niezależnie i w połączeniu. Nie zauważyłam natomiast informacji dotyczących AG1478, jak również doświadczeń dotyczących wpływu testowanych związków na migrację stosowanych w pracy komórek kontrolnych – keratynocytów ludzkich HaCaT. Ponadto wydają mi się, że dobrze byłoby zastosować w tej części pracy oprócz testu „zarastania rysy” prowadzonego w naczyniu hodowlanym na podłożu polistyrenowym, analizy z zastosowaniem filtrów typu Transwell, pokrytych Matrigelem imitującym macierz pozakomórkową, co w pewnym stopniu przybliżyłoby sytuację mającą miejsce *in vivo*.

Badając wpływ tyrfostinów i kurkuminy na cykl komórkowy komórek LN229 Doktorantka stwierdza, że czynnik AG1478 powoduje zatrzymanie cyklu w fazie G1/G0 na skutek inhibicji przekazu sygnału spowodowanej obniżeniem poziomu fosforylacji kinaz Akt oraz ERK. AG494 oraz kurkumina nie wywołują takich efektów. Z kolei wszystkie trzy związki, a zwłaszcza kurkumina, działają cytotoksycznie i proapoptotycznie, przy czym efekt ten nasila się w przypadku stosowania mieszanin kurkumina – tyrfostin. Moje zastrzeżenie budzi jednak barwienie różnicowe służące do analizy wymienionych efektów. Wybarwione komórki są oglądane pod mikroskopem fluorescencyjnym, fotografowane, a następnie ilość żywych, apoptotycznych i martwych komórek jest zliczana przy pomocy programu ImageJ. Jako żywe są uznane komórki, których jądra są wybarwione barwnikiem Hoechst na kolor ciemnoniebieski, jako apoptotyczne intensywnie świecące na jasnoblękitno z nieregularnymi jądrami, zaś martwe są wybarwione jodkiem propidyny na czerwono. Wydaje mi się jednak, że identyfikacja apoptozy opierająca się głównie na świeceniu barwnika Hoechst może być obciążona sporym błędem. Wskazane byłoby zatem

dodanie barwienia potwierdzającego działanie apoptotyczne badanych związków, jak na przykład barwienie z aneksyną V, wskazujące na zewnętrzną lokalizację fosfatydyloseryny, towarzyszącą wczesnym etapom apoptozy.

W kolejnej części pracy Doktorantka wykazuje, że kurkumina i tyrfostiny stymulują tworzenie reaktywnych form tlenu w komórkach glioblastomy. Ponadto AG494, mieszanina obu tyrfostinów oraz ich połączenie z kurkuminą powoduje „wymiatanie” reaktywnych form tlenu. W przypadku kurkuminy działanie to jest zależne od jej stężenia. Ponadto Autorka wykazuje, że czynniki AG494 i AG1478 nie indukują uszkodzeń DNA, podczas gdy dodanie kurkuminy powoduje jego degradację w sposób zależny od stężenia. Do badania genotoksycznych właściwości wymienionych związków w ocenianej pracy doktorskiej został użyty test kometkowy. Wydaje mi się, że informacje dotyczące rozmiaru degradacji DNA byłyby pełniejsze po zastosowaniu metod elektroforetycznych. Stosując prostą technikę elektroforezy w żelu agarozowym można wykazać internukleosomalną degradację DNA, zaś elektroforeza pulsacyjna w zmiennym polu elektrycznym wskazuje na powstawanie jego mniejszych fragmentów, będących wynikiem degradacji. Podsumowując dane doświadczalne zawarte w pracy doktorskiej, Pani mgr Agnieszka Bojko stwierdza, że największe nadzieje na uzyskanie pozytywnego efektu terapeutycznego w leczeniu glejaka daje połączenie kurkuminy z tyrfostinem AG494. Traktowanie komórek linii LN229 tą mieszaniną wzmacnia efekt cytostatyczny (w porównaniu do stosowania odrębnego), znosi zdolności migracyjne komórek, obniża ich żywotność poprzez wywołanie zależnej od kaspaz apoptozy. Efekt działania tych czynników jest prawdopodobnie efektem nieodwracanego hamowania kinazy ERK.

Ostatnim rozdziałem ocenianej przez mnie pracy jest obszerna, 16 stronicowa „Dyskusja”. Rozdział ten przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Autorka bardzo krytycznie i ostrożnie ocenia własne wyniki. Stara się je bardzo rzetelnie przedstawić na tle dostępnych danych literaturowych. W tej części pracy Doktorantka porusza problem pewnych trudności z zastosowaniem kurkuminy w terapii glejaka. Jest to bowiem związek o niskiej stabilności i rozpuszczalności. Ponadto badania nad terapeutycznym zastosowaniem kurkuminy prowadzone na liniach komórkowych opisują działanie wyższych stężeń niż te, które można osiągnąć w warunkach fizjologicznych. Sporo problemów może też nastroczyć w terapii pacjentów z tym typem nowotworu pokonywanie przez kurkuminę bariery krew-mózg. Doktorantka bardzo rzeczowo dyskutuje na temat wszystkich tych wątpliwości i mam nadzieję, że będzie mogła przedstawić swoje stanowisko w tej kwestii w trakcie publicznej obrony.

Oceniana przeze mnie praca została starannie opracowana pod względem edytorskim. Autorka nie ustrzegła się jednak paru zapożyczeń z języka angielskiego, które jestem zmuszona wytknąć. Tak więc, zamiast terminu „monolayer” użyłabym słowa „monowarstwa”. Przeszkadza mi też w odbiorze pracy dość często pojawiające się słowo „downstream”, które w języku polskim

nie ma wprawdzie dosłownego odpowiednika, ale z tekstu wynika, że chodzi o kaskadowy przekaz sygnału wiodący od błony komórkowej do wnętrza komórki. Uchybienia te nie mają jednak większego znaczenia w ocenie pracy. Podkreślić należy, że wyniki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej, to pierwsze informacje dotyczące zastosowania tyrfostinów AG494, AG1478 i kurkuminy w eliminacji komórek ludzkiego glejaka *in vitro*. Ponadto zastosowanie przez Autorkę szeregu metod z zakresu biochemii i biologii komórki pozwoliło na scharakteryzowanie właściwości testowanych związków oraz zaproponowanie przypuszczalnego mechanizmu ich działania. Wyniki zawarte w pracy doktorskiej zostały opublikowane w czasopiśmie *Nutrition & Cancer* o współczynniku oddziaływania wynoszącym 2.33. W artykule tym Doktorantka jest pierwszym autorem.

Reasumując, rozprawę doktorską mgr Agnieszki Bojko oceniam pozytywnie. W moim przekonaniu Autorka uzyskała interesujące wyniki, które mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad nowymi strategiami terapeutycznymi w leczeniu nowotworów. Przedstawiona do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i odpowiada warunkom Ustawy z dnia 18.03.2011 o stopniach i tytule naukowym, tym samym uzasadnia nadanie stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Wnoszę zatem o dopuszczenie pani mgr Agnieszki Bojko przez Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Patologii Komórki
Wydziału Biotechnologii UWr
dr hab. Dorota Nowak