



nencki institute  
of experimental biology

POLISH ACADEMY OF SCIENCES

**NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY**

Pasteur 3, 02-093 Warsaw, Poland

Phone: (48-22) 659 85 71; Fax: (48-22) 822 53 42

E-mail: [sekretariat@nencki.gov.pl](mailto:sekretariat@nencki.gov.pl); <http://www.nencki.gov.pl>

**Prof. dr hab. Ewa Sikora**

Pracownia Molekularnych Podstaw Starzenia

Recenzja pracy doktorskiej pani mgr Agnieszki Bojko pt. „**Modulujący wpływ kurkuminy oraz tyrfostinów (AG494 i AG1478) na regulację wzrostu i przeżywania ludzkich komórek nowotworu mózgu LN299**” wykonanej pod kierunkiem pana prof. dr hab. Andrzeja Kleina na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Praca doktorska wykonana przez panią mgr Agnieszkę Bojko dotyczy badania cytotoksycznych i cytostatycznych właściwości inhibitorów kinaz tyrozynowych, tyrofostinów AG494 i AG1478 oraz naturalnego związku, kurkuminy na komórki glejaka LN299 *in vitro*. Glejaki, to rzadkie lecz bardzo agresywne nowotwory w leczeniu których ciągle brak spektakularnych sukcesów. Inhibitory kinaz tyrozynowych stosowane są od dawna w leczeniu różnych typów nowotworów z różnym skutkiem. Cieszy mnie fakt, że do swoich badań doktorantka włączyła kurkuminę, która podobnie jak inne nutraceutyki charakteryzuje się właściwościami przeciwnowotworowymi i od dawna badana jest w laboratoriach naukowych, jak też i przechodzi testy kliniczne w leczeniu wielu chorób, nie tylko nowotworowej. Stanowi ona też kluczowy związek w medycynie Ajurwedyjskiej, która coraz częściej zaczyna być doceniana przez autorytety medycyny Zachodu. No i w końcu, kurkumina, pierwotnie jako inhibitor AP-1, przyciągnęła moją uwagę już prawie 30 lat temu i do dzisiaj mechanizmy molekularne i komórkowe regulowane przez ten związek, stanowią jeden z nurtów naszych badań.

Rozprawa doktorska ma klasyczny układ. Wstęp nie jest za długi i koncentruje się głównie na ścieżkach sygnałowych regulowanych przez epidermalny czynnik wzrostu (EGF) i jego receptor (EGFR), który w komórkach glejaków ulega silnej nadekspresji i może stanowić cel

zarówno tyrfostinów jak i kurkuminy. Wybór materiału do Wstępu jest autorski i nie dyskutuję co w nim tak naprawdę powinno być. Materiały i Metody są opisane dokładnie, a braki które zauważyłam zostaną przedstawione w dalszej części recenzji. Wyniki są obszerne. Pani Bojko opisuje w nich rezultaty swojej pracy, która zawierała testy żywotności/prolifracji, zarastania rysy, cyklu komórkowego, apoptozy, uszkodzeń DNA, poziomu ROS oraz analizy poziomu wybranych białek zaangażowanych w różne ścieżki sygnałowe. Badania zostały przeprowadzone na jednej linii glejaka, LN299 oraz część z nich wykonano na unieśmiertelnionych komórkach ludzkich keratynocytów HaCaT. Jest to bogata rozprawa doktorska zarówno pod względem metodycznym jak i ilości uzyskanych danych. Co jest dość niezwykle i bardzo pozytywne, to niezwykle staranne opracowanie danych proliferacji komórek: ID50 oraz odwracalności efektu cytostatycznego. Ponadto, Doktorantka przeprowadziła staranną analizę statystyczną i zastosowała prawidłowo analizę wariancji ANOVA z dodatkowymi testami, a nie jak jest to powszechne i nieprawidłowe stosowanie testu t-studenta. Godne podziwu jest też graficzne opracowanie wykresów.

Autorka pokazała, że w wyznaczonych przez nią stężeniach IC50 (lub ich wielokrotności) najsilniejszy efekt cytostatyczny ma AG1478, który jako taki nie indukuje apoptozy. Co ciekawe, AG1478 wykazuje zdecydowanie niższą wartość IC50 niż pozostałe związki. Natomiast zarówno AG494 jak i kurkumina aktywują kaspazę 3 i 7. Poziom ROS jest silnie zależny od stężenia stosowanych związków. Tyrfostiny, w odróżnieniu od kurkuminy, nie indukują uszkodzeń DNA mierzonych testem kometkowym. Aktywacja przez badane związki wybranych elementów ścieżek sygnałowych jest dla mnie mało konkluzyjna ze względów niżej opisanych. Podstawowym wnioskiem jaki wypływa z otrzymanych wyników, jest to, że kurkumina wzmacnia cytotoksyczne działanie AG494 na komórki glejaka LN229. Nie chciałabym w mojej recenzji dłużej zatrzymywać się na tym, co zostało w pracy zrobione jak również na tym do czego nie mam zastrzeżeń. Powiem tylko, że wiele wyników, do których doprowadziły użyte w tej dysertacji metody, mogłoby stanowić podstawę do dalszych pogłębionych badań, gdyż spowodowały one, przynajmniej w mojej głowie, rodzenie się kolejnych pytań naukowych co do możliwych mechanizmów powodujących dany efekt. Jeśli pobudzona jest ciekawość badacza, to bardzo przyjemny i dobry objaw w pracy naukowej. Mam nadzieję, że jest on również udziałem Doktorantki. Natomiast pozwolę sobie na bardziej szczegółowe opisanie moich uwag krytycznych, które mam nadzieję przyczynią się do ciekawej dyskusji podczas obrony, jak również być może stanowią będą wskazówki do dalszej pracy eksperymentalnej pani Bojko.

1. W analizie wpływu badanych związków na proliferację komórek zabrakło mi pomiaru wartości indeksu CI (Combination index), który wynosi 1 dla interakcji addytywnych, jest większy od 1 dla działania antagonistycznego lub mniejszy od 1 w przypadku działania synergistycznego. Nie wiem, czy do takiej analizy niezbędne jest specjalne oprogramowanie, czy też możliwe jest zwykłe zastosowanie wzoru Chou i Talalay? Nie jestem w tej mierze ekspertem i chciałabym się dowiedzieć od Doktorantki jak takie analizy można wykonać prawidłowo i czy możliwe jest to w przypadku Jej badań?
2. Cytometryczna analiza cyklu komórkowego wskazuje m.in. na względny wzrost komórek w fazie S kosztem fazy G1 w przypadku traktowania ich mieszaniną AG494 i kurkuminy. Doktorantka interpretuje to jako prawdopodobny wzrost komórek apoptotycznych umierających w fazie G1 i sztuczne zawyżenie frakcji S. Nie zgadzam się z tą interpretacją. Mam nadzieję, że Doktorantka zmieni zdanie, jeśli zastanowi się co tak właściwie mierzy cytometr w tej analizie. A mierzy on ilość DNA. Dla ułatwienia dodam, że podobnie jak Doktorantka uważam iż na ten wynik wpłynęła prawdopodobnie apoptoza komórek. Tylko z której fazy cyklu? A tak przy okazji, to czy wykonano pełny pomiar ilości DNA z uwzględnieniem frakcji sub-G1, którą przy komputerowej analizie cyklu „wycina się”?
3. Rozdział dotyczący analizy poziomu reaktywnych form tlenu nie do końca jest dla mnie zrozumiały. Nie wnosi on nic nowego w zrozumienie działania badanych związków na komórki glejaka. Autorka dokonywała pomiarów w krótkim czasie działania związków (1h). Tego typu pomiary nie mają powiązania z odpowiedzią komórki na badane związki, która może być indukowana nie tyle poprzez bezpośrednie oksydo-redukcyjne właściwości związków, co raczej poprzez ich wpływ na modulację stresu oksydacyjnego, o czym może świadczyć np. transaktywacja genów produkujących enzymy zaangażowane w tę odpowiedź. A to nie jest aż tak szybka odpowiedź.

Na rycinach 25, 26 i 27 na osi x zawsze jest przedstawiony poziom RFT we względnych jednostkach fluorescencji (RFU), a nie jak Doktorantka napisała raz indukcja raz zmiatanie ROS. Nie bardzo rozumiem dlaczego poziom wyjściowy RFT (Rys 27) jest taki sam w panelu A i B, skoro panel B pokazuje komórki traktowane nadtlakiem wodoru? Czy nie powinien on być wyższy w tym drugim wariancie? Ciekawa jestem jak Doktorantka może wyjaśnić fakt, że obserwuje się brak zależności poziomu endogennych RFT od stężenia kurkuminy i silną zależność

(spadek wraz wzrastającym stężeniem) w przypadku dostarczenia egzogennych RFT (nadtlenek wodoru)?

Przy okazji chciałam spytać jak Doktorantka przygotowywała roztwór wyjściowy kurkuminy, gdyż w opisie rycin wszędzie jest napisane, że badane związki lub ich mieszanina były rozpuszczane w pożywce.

4. Uszkodzenia DNA badano po 48 godzinach działania związków oraz w krótkim czasie równym 1 godz. Po 48 godzinach traktowania komórek kurkumina jest już bardzo niska ich żywotność. Jak wynika z danych przedstawionych na Rys. 22 po 48 godzinach działania kurkuminy w stężeniu  $2 \times IC_{50}$  wynosi ona zaledwie 40%. Jeśli komórki umierają śmiercią apoptotyczną, a tak wynika z wysokiej aktywności kaspaz już po 24 godzinach, to mierzone uszkodzenia DNA są wtórne i nie bardzo można mówić o właściwościach genotoksycznych kurkuminy. Potwierdzają to wyniki pomiarów uszkodzeń DNA po 1 godz, kiedy tych uszkodzeń nie ma. Podobnie jest w przypadku badań prowadzonych na komórkach HaCaT. Sama Doktorantka w rozdziale Materiały i Metody w opisie testu kometki, pisze że można nim wykrywać wczesną apoptozę. Natomiast zmiana pożywki po 48 godz inkubacji komórek ze związkiem może powodować usunięcie z hodowli pływających martwych komórek i wtedy Doktorantka nie mierzy naprawy DNA, a raczej poziom uszkodzeń w pozostałych przylegających komórkach. Nie wiem czy mam rację, więc proszę o wyjaśnienie.

Ciekawy jest wynik pokazujący, że wyższe stężenie kurkuminy powoduje mniej uszkodzeń DNA niż niższe. Doktoranta interpretuje to jako efekt hormezy. Jest to zapewne słuszne. W tym momencie przypomina mi się moja przygoda z kurkumina. Otóż, w swojej pierwszej pracy z zastosowaniem tego związku wykazałam, że kurkumina w wysokim, bo  $50 \mu M$  stężeniu, zapobiega oligonukleosomalnej degradacji DNA. Wówczas interpretowałam to jako efekt zapobiegania apoptozie. Dzisiaj wiemy, że nie jest to jednoznaczne z zapobieganiem przez kurkuminę śmierci komórkowej, która przebiega bez oligonukleosomalnej degradacji DNA. I oczywiście nie wyklucza to faktu indukcji przez kurkuminę stosowaną w niskich stężeniach uszkodzeń DNA związanych z apoptozą.

Ciekawa jestem dlaczego do badań uszkodzeń DNA Doktorantka zastosowała Paklitaksel, który jest związkiem hamującym depolimeryzującą mikrotubul wrzeciona podziałowego? I jak Doktorantka interpretuje fakt, że tylko ten związek powodował silne uszkodzenia DNA już po godzinie działania na komórki?

Na marginesie, generalna uwaga, dotycząca opisu wyników dysertacji. Zabrakło mi chociażby jednego zdania na początku każdego podrozdziału uzasadniającego podjęcie badań oraz zdania podsumowującego, lub konkludującego, jeśli to możliwe.

5. Wyniki opisane w rozdziale poświęconym analizie wybranych białek sygnałowych w komórkach traktowanych badanymi związkami są dość trudne do śledzenia. Mianowicie Doktorantka pokazuje wybrane bloty, na których często jest dość nierówny poziom białka referencyjnego tubuliny i trudno wnioskować o wzroście lub spadku poziomu danego białka, jak to jest na Rys 34 i 35 przedstawiającym kinetykę poszczególnych związków i odpowiednio ich mieszanin. Poza tym, poziom tubuliny zmienia się w zależności od indeksu proliferacyjnego komórek. Białko to jest przecież istotnym składnikiem wrzeciona podziałowego. Znacznie lepiej jest stosować GAPDH. Autorka przekonuje nas, że coś rośnie, a potem maleje, ale bez danych ilościowych jest to naprawdę dość trudne do śledzenia, ze względu na wspomniany nierówny poziom tubuliny. Jednocześnie różnice w ich poziomie przedstawia w wartościach liczbowych, które prawdopodobnie uzyskane były w analizie densytmetrycznej (ChemiDoc BioRad plus program ImageLab). Dlaczego nie pokazano tych wartości w postaci średniej z trzech wykonanych pomiarów? Ponadto, na podstawie samych wartości poziomu białka, bez próby jego modyfikacji, trudno jednoznacznie uznać bądź nie ich kluczową rolę w przekazywaniu sygnału do śmierci. Są to dane wstępne. Tymczasem w Dyskusji Doktorantka napisała, że ...”Spadek fosforylacji NF- $\kappa$ B oraz Akt na skutek działania kurkuminy jest dostatecznym czynnikiem do zahamowania proliferacji komórek *Glioblastomy*, indukcji apoptozy na skutek aktywacji kaspaz 3/7 oraz stymulacji uszkodzeń DNA”. Jest to stwierdzenie trochę pochopne. Chociaż faktycznie kurkumina jest klasycznym inhibitorem NF- $\kappa$ B, to jednak sama fosforylacja podjednostki p65 lub jej brak nie świadczy o aktywacji lub jej braku tego czynnika. Na przykład nasze własne doświadczenia pokazują, że fosforylacja p65 nie gwarantuje jego translokacji do jądra. Ciekawi mnie też opinia Doktorantki na temat roli NF- $\kappa$ B w indukcji uszkodzeń DNA?

Generalnie, dysertacja napisana jest poprawnym naukowym językiem. Zauważyłam drobne nieścisłości jak np. na Rys.15 przedstawionym w postaci wykresu liniowego w podpisie mówi się o słupkach, lub, jak na Rys. 36, gdzie na osi x zaznaczona jest żywotność, a w

podpisie mówi się o zahamowaniu wzrostu komórek. Domyślam się, że wynika to z faktu iż test MTT, który tak naprawdę określa poziom metabolizmu mitochondriów zwyczajowo nazywa się testem na żywotność, albo proliferację komórek, w zależności od tego co autor chciał powiedzieć. Dobrze jednak ujednolicić opis rysunku.

Nie bardzo podobają mi się Wnioski, które tak naprawdę stanowią mieszaninę podsumowania i wniosków, ale jak zauważyłam prawie każdy doktorant ma z tym kłopot. Nota bene w pierwszym punkcie Doktorantka pisze, że ...."Prawdziwym odwracalnym inhibitorem wzrostu komórek glioblastomy..." Całe to stwierdzenie jest niefortunne jak się zastanowić. Po pierwsze co to znaczy „prawdziwy”, po drugie co to znaczy „odwracalny”? Tak naprawdę, to efekt jest odwracalny, a właściwie przejściowy, gdyż AG1478 działa cytostatycznie a nie cytotoksycznie? W tym miejscu też rodzi się jedno z wielu pytań naukowych, o których pisałam. Czy aby cytostatyczne działanie AG1478 nie polega na indukcji starzenia komórkowego? Chętnie dowiem się jakie doświadczenia zaproponowałaby Doktorantka aby to sprawdzić.

Ostatnia drobna uwaga dotyczy nazewnictwa. Czy rzeczywiście w języku polskim używa się nazwy „glioma” ?

Podsumowując, uważam, że jest to dobry doktorat. Doktorantka włożyła mnóstwo pracy w wykonanie wszystkich analiz i wykazała się umiejętnością stosowania wielu różnych metod. Otrzymała wiele bardzo interesujących wyników, które zapoczątkowują wiele nowych wątków, które można by rozwinąć w dalszej pracy. Jest to niezwykle obszerna dysertacja. Moje uwagi w głównej mierze dotyczą interpretacji otrzymanych wyników. A ta nigdy nie jest prosta i często niejednoznaczna w każdej pracy naukowej.

Wnoszę do Rady wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o wszczęcie dalszych etapów przewodu doktorskiego pani mgr Agnieszki Bojko.

Warszawa, 16.12.2015

Ustawa