

Załącznik 2

Autoreferat

przedstawiający życiorys naukowy wnioskodawcy
oraz osiągnięcie naukowe zgłaszane, jako przedmiot
postępowania habilitacyjnego oraz pozostałe
osiągnięcia naukowe

Dr Joanna Jakubowicz-Gil

Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii

Instytut Biologii i Biochemii

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

jjgil@poczta.umcs.lublin.pl

tel. +48 81 537 59 28

Autoreferat

I. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

1996	Magister biologii Praca magisterska pt.: „Fosforylacja białek rybosomowych przez kinazy kazeinowe I i II drożdży <i>Trichosporon cutaneum</i> ” Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
2003	Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii Rozprawa doktorska pt.: „Wpływ kwercetyny na indukcję białek szoku termicznego oraz indukcję apoptozy w komórkach <i>in vitro</i> ” Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

II. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

01.12.1996 - 30.09.2003	Asystent w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii UMCS
od 01.10.2003 do chwili obecnej	Adiunkt w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii UMCS
12.09.2005 - 12.12 2005	Asystent w Zakładzie Medycyny Molekularnej Akademii Medycznej w Plymouth, Anglia

III. PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Praca magisterska

Jestem absolwentką Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii). Studia wyższe na kierunku biologia (specjalizacja w zakresie mikrobiologii) ukończyłam w 1996 roku. Pracę magisterską wykonałam w Zakładzie Biologii Molekularnej kierowanym przez prof. dr hab. Nikodema Grankowskiego. Tematyka przeprowadzonych przeze mnie badań wpisywała się w problematykę badawczą Zakładu Biologii Molekularnej UMCS, która dotyczyła fosforylacyjnej modyfikacji białek rybosomowych przez kinazy białkowe. Moje badania miały na celu identyfikację białek rybosomowych drożdży *Trichosporon cutaneum*, ulegających fosforylacji *in vivo* i *in vitro*. Podjęłam również próbę oczyszczenia i scharakteryzowania kinaz białkowych zaangażowanych w fosforylacyjną modyfikację tych białek. Uzyskanie oczyszczonych rybosomów, ich dysocjacja na podjednostki, badanie endogennej fosforylacji białek rybosomowych, izolacja kwaśnych białek rybosomowych, otrzymywanie i oczyszczanie kinaz białkowych z cytozolu oraz badanie ich aktywności, umożliwiło stwierdzenie, że w rybosomach *Trichosporon cutaneum* białka o masach cząsteczkowych 13 kDa, 15 kDa, 19 kDa i 38 kDa są fosforylowane przez kinazy ściśle zasocjowane z rybosomami. Białka 13 kDa i 38 kDa zostały zlokalizowane w podjednostce 60S natomiast 15 kDa i 19 kDa w małej podjednostce rybosomowej 40S. Ponadto wykazałam, że w fosforylacji białek 13 kDa, 19 kDa oraz 38 kDa bierze udział kinaza kazeinowa II (CK2, ang. casein kinase 2), natomiast białko o masie 15 kDa modyfikuje kinaza kazeinowa I (CK1, ang. casein kinase 1). Wykazałam również, że kinaza kazeinowa II oprócz ATP, skutecznie wykorzystuje również GTP oraz CTP jako źródło reszt fosforanowych.

Uzyskane wyniki zostały opisane w pracy magisterskiej pt.: „Fosforylacja białek rybosomowych przez kinazy kazeinowe I i II drożdży *Trichosporon cutaneum*”. Pracę magisterską obroniłam 15 maja 1996 roku.

Praca doktorska

Po uzyskaniu tytułu magistra 1 grudnia 1996 roku rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii Instytutu Biologii (obecnie Instytut Biologii i Biochemii) Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, kierowanego przez prof. dr hab. Antoniego Gawrona. Podjęta przeze mnie tematyka badawcza dotyczyła oceny wrażliwości wybranych komórek nowotworowych oraz prawidłowych na indukcję zaprogramowanej śmierci pod wpływem związków pochodzenia naturalnego. Badania, jakie wykonałam w latach 1997 - 2003 dotyczyły wpływu kwercetyny, naturalnego flawonoidu na indukcję apoptozy oraz nekrozy w ludzkich komórkach raka szyjki macicy (linia HeLa), raka płuc (linia A594) i raka krtani (linia Hep2) oraz w komórkach prawidłowych (hodowla pierwotna ludzkich fibroblastów skóry HSF, ang. Human Skin Fibroblasts oraz linia GMK, ang. Green Monkey Kidney cells). Szczególną uwagę zwróciłam na ocenę poziomu białek szoku termicznego Hsp (ang. Heat shock proteins) z rodzin Hsp70 oraz Hsp20 i ich udział w ochronie komórek nowotworowych przed śmiercią. Uzyskane wyniki złożyły się na moją rozprawę doktorską zatytułowaną: „Wpływ kwercetyny na indukcję białek szoku termicznego oraz indukcję apoptozy w komórkach *in vitro*”. Wykazałam w niej, że poziom Hsp w komórkach nowotworowych znacząco przewyższa poziom obserwowany w komórkach prawidłowych. Kwercetyna hamowała ekspresję białek szoku termicznego w komórkach raka szyjki macicy, krtani i płuc, podwyższała zaś w fibroblastach

i GMK. W konsekwencji obserwowałam wzrost ilości komórek apoptotycznych w komórkach nowotworowych, a nie w prawidłowych. Aby bezpośrednio sprawdzić czy obniżenie poziomu białek szoku termicznego zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na indukcję zaprogramowanej śmierci podjęłam próby zablokowania ekspresji Hsp. Do tego celu wykorzystywałam specyficzne, firmowe oligonukleotydy antysensowne anty-Hsp72 oraz anty-Hsp27, które zostały zsyntetyzowane przez firmę Sigma Genosys na podstawie zaprojektowanej przeze mnie sekwencji. Kwercetyna okazała się bardzo skutecznym induktorem apoptozy w komórkach nowotworowych z zablokowaną ekspresją Hsp. Oprócz tego, badania immunocytochemiczne na poziomie mikroskopu świetlnego oraz elektronowego wykazały, że flawonoid blokował translokację białek szoku termicznego z cytoplazmy do jądra komórkowego, co dodatkowo zwiększało wrażliwość komórek nowotworowych na indukcję zaprogramowanej śmierci.

Pracę doktorską obroniłam 7 maja 2003 roku.

W latach 1997 – 2003 uczestniczyłam również w badaniach dotyczących wpływu cisplatyny i etopozydu, onkostatyków standardowo stosowanych w terapii przeciwnowotworowej, na poziom ekspresji białek szoku termicznego i indukcję apoptozy w komórkach prawidłowych i nowotworowych, prowadzonych we współpracy z Zakładem Wirusologii i Immunologii UMCS oraz Zakładem Genetyki Akademii Medycznej (obecnie Uniwersytet Medyczny) w Lublinie. Część wspomnianych badań była finansowana z Grantu Prorektora UMCS ds. Badań Naukowych i Współpracy z Zagranicą (NB-31/2000) pt.: „Badania nad wpływem onkostatyków na ekspresję białek szoku termicznego w ludzkich komórkach nowotworowych i prawidłowych”, w którym byłam wykonawcą.

Przeprowadzone badania opisano w 7 wymienionych poniżej publikacjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym. (Przy każdej pozycji podano *impact factor* oraz punktację MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania, a w nawiasach zgodnie z rokiem 2013.)

1. Rzymowska J., Gawron A., Pawlikowska-Pawłęga B., **Jakubowicz-Gil J.**, Wojcierowski J. (1999) The effect of quercetin on induction of apoptosis. *Folia Histochem. Cytobiol.* 37: 125-126 **IF₁₉₉₉: 0,388, MNiSW₁₉₉₉: 7 (IF₂₀₁₃: 1,101, MNiSW₂₀₁₃: 15)**
2. **Jakubowicz-Gil J.**, Gawron A. (1999) Rozmieszczenie i rola białek szoku termicznego w komórce zwierzęcej. *Post. Biol. Kom.* 26: 267-283 (**MNiSW₂₀₁₃: 15**), *autor korespondencyjny*
3. Pawlikowska-Pawłęga B., **Jakubowicz-Gil J.**, Rzymowska J., Gawron A. (2001) The effect of quercetin on apoptosis and necrosis induction in human colon adenocarcinoma cell line LS180. *Folia Histochem. Cytobiol.* 39: 217-218 **IF₂₀₀₁: 0,594, MNiSW₂₀₀₁: 7 (IF₂₀₁₃: 1,101, MNiSW₂₀₁₃: 15)**
4. **Jakubowicz-Gil J.**, Paduch R., Gawron A., Kandefer-Szerszeń M. (2002) The effect of heat shock, cisplatin, etoposide and quercetin on Hsp27 expression in human normal and tumour cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 40: 31-35 **IF₂₀₀₂: 0,526, MNiSW₂₀₀₂: 7 (IF₂₀₁₃: 1,101, MNiSW₂₀₁₃: 15)**, *autor korespondencyjny*
5. **Jakubowicz-Gil J.**, Paduch R., Gawron A., Kandefer-Szerszeń M. (2002) The effect of cisplatin, etoposide and quercetin on Hsp72 expression. *Pol. J. Pathol.* 53: 133-137 **MNiSW₂₀₀₂: 5 (MNiSW₂₀₁₃: 15)**
6. **Jakubowicz-Gil J.**, Rzymowska J., Paduch R., Gawron A. (2002) The effect of quercetin on the expression of heat shock proteins and apoptosis induction in monkey kidney cell

line GMK. *Folia Histochem. Cytobiol.* 40: 137-138 **IF₂₀₀₂: 0,526**, **MNiSW₂₀₀₂: 7** (**IF₂₀₁₃: 1,101**, **MNiSW₂₀₁₃: 15**), *autor korespondencyjny*

7. **Jakubowicz-Gil J.**, Rzymowska J., Gawron A. (2002) Quercetin, apoptosis, heat shock. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1591-1595 **IF₂₀₀₂: 3,542**, **MNiSW₂₀₀₂: 21** (**IF₂₀₁₃: 4,576**, **MNiSW₂₀₁₃: 40**), *autor korespondencyjny*

Wyniki badań były także zamieszczone w 12 krajowych i międzynarodowych doniesieniach konferencyjnych. Łączny *impact factor* opublikowanych prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **5,576** (zgodnie z rokiem 2013 **IF₂₀₁₃: 8,980**). Suma punktów MNiSW za ww. publikacje zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **54** (zgodnie z rokiem 2013 **MNiSW₂₀₁₃: 130**).

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, od 1.10.2003 zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Anatomii Porównawczej i Antropologii UMCS, w którym pracuję do dzisiaj.

IV. PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje:

- 20 prac eksperymentalnych w tym 14 w czasopismach z listy JCR
- 2 artykuły przeglądowe
- 22 doniesienia zjazdowe w tym 6 na konferencjach międzynarodowych

Łączny *impact factor* opublikowanych po doktoracie prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **29,276** (zgodnie z rokiem 2013 **IF₂₀₁₃: 32,270**). Suma punktów MNiSW za wspomniane publikacje zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **326** (zgodnie z rokiem 2013 **MNiSW₂₀₁₃: 385**).

Spośród artykułów naukowych opublikowanych po doktoracie 8 prac eksperymentalnych i jeden artykuł przeglądowy weszło w skład osiągnięcia naukowego, będącego przedmiotem habilitacji.

Wyniki badań stanowiące

osiągnięcie naukowe realizujące art. 16 ust. 2 ustawy o stopniach naukowych

Tytuł

Skojarzone działanie kwercetyny z wybranymi cytostatykami w aktywacji zaprogramowanej śmierci komórek nowotworowych

Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:

(Przy każdej pozycji podano *impact factor* oraz punktację MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania, a w nawiasach zgodnie z rokiem 2013.)

1. **Jakubowicz-Gil J.**, Paduch R., Piersiak T., Głowniak K., Gawron A., Kandefer-Szerszeń M. (2005) The effect of quercetin on pro-apoptotic activity of cisplatin in HeLa cells. *Biochem. Pharmacol.* 69: 1343-1350, **IF₂₀₀₅: 3,617**, **MNiSW₂₀₀₅: 24** (**IF₂₀₁₃: 4,576**, **MNiSW₂₀₁₃: 40**), *autor korespondencyjny*
2. **Jakubowicz-Gil J.**, Rzeski W., Zdzisińska B., Dobrowolski P., Gawron A. (2008) Cell death and neuronal arborization upon quercetin treatment in rat neurons. *Acta Neurobiol. Exp.* 68: 139-146, **IF₂₀₀₈: 1,091**, **MNiSW₂₀₀₈: 10** (**IF₂₀₁₃: 1,977**, **MNiSW₂₀₁₃: 15**), *autor korespondencyjny*

3. **Jakubowicz-Gil J.**, Rzeski W., Zdzisińska B., Piersiak T., Wejksza K., Głowniak K., Gawron A. (2008) Different sensitivity of neurons and neuroblastoma cells to quercetin treatment. *Acta Neurobiol. Exp.* 68: 463-476, **IF₂₀₀₈: 1,091**, **MNiSW₂₀₀₈: 10** (**IF₂₀₁₃: 1,977**, **MNiSW₂₀₁₃: 15**), *autor korespondencyjny*
4. **Jakubowicz-Gil J.**, Langner E., Wertel I., Piersiak T., Rzeski W. (2010) Temozolomide, quercetin and cell death in the MOGGCCM astrocytoma cell line. *Chem. Biol. Inter.* 188: 190-203, **IF₂₀₁₀: 2,832**, **MNiSW₂₀₁₀: 32** (**IF₂₀₁₃: 2,967**, **MNiSW₂₀₁₃: 30**), *autor korespondencyjny*
5. **Jakubowicz-Gil J.**, Langner E., Rzeski W. (2011) Kinetic studies of the effect of Temodal and quercetin on astrocytoma cells. *Pharmacol. Rep.* 63: 403-416, **IF₂₀₁₁: 2,445**, **MNiSW₂₀₁₁: 25** (**IF₂₀₁₃: 1,965**, **MNiSW₂₀₁₃: 25**), *autor korespondencyjny*
6. **Jakubowicz-Gil J.**, Langner E., Bądziul D., Wertel I., Rzeski W. (2013) Apoptosis induction in human glioblastoma multiforme T98G cells upon temozolomide and quercetin treatment. *Tumor Biol.* 34: 2367-2378, **IF₂₀₁₃: 2,518**, **MNiSW₂₀₁₃: 20**, *autor korespondencyjny*
7. **Jakubowicz-Gil J.**, Langner E., Bądziul D., Wertel I., Rzeski W. (2013) Silencing of Hsp27 and Hsp72 in glioma cells as a tool for programmed cell death induction upon temozolomide and quercetin treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 273: 580-589, **IF₂₀₁₃: 3,975**, **MNiSW₂₀₁₃: 40**, *autor korespondencyjny*
8. **Jakubowicz-Gil J.**, Langner E., Bądziul D., Wertel I., Rzeski W. (2013) Quercetin and sorafenib as novel and effective couple in programmed cell death induction in human gliomas. *Neurotox. Res.* DOI: 10.1007/s12640-013-9452-x, **IF₂₀₁₃: 2,865**, **MNiSW₂₀₁₃: 25**, *autor korespondencyjny*

9. **Jakubowicz-Gil J.** (2012) Kwercetyna w terapii przeciwnowotworowej. *Post. Biol. Kom.* 39: 199-216, **MNiSW₂₀₁₂: 15 (MNiSW₂₀₁₃: 15)**, autor korespondencyjny

Łączny *impact factor* ww. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **20,434** (zgodnie z rokiem 2013 **IF₂₀₁₃: 22,820**).

Suma punktów MNiSW za ww. publikacje zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **201** (zgodnie z rokiem 2013 **MNiSW₂₀₁₃: 210**).

Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników

Wprowadzenie - przedmiot badań

Kwercetyna (3,3',4',5,7-pentahydroksyflawon) jest flawonoidem najczęściej spożywanym przez człowieka w codziennej diecie. Oszacowano, że dobowe spożycie tego związku wynosi około 25-35 mg. Jest obecna w owocach (winogrona, cytrusy, jabłka), warzywach (cebula, kapusta, pomidory, brokuły, soja, szparagi) oraz napojach (zielona i czarna herbata, czerwone wino). Jak wynika z badań eksperymentalnych i epidemiologicznych, kwercetyna ma bardzo pozytywny wpływ na organizm człowieka. Dieta bogata w kwercetynę obniża ryzyko zawału serca, wzmacnia i uszczelnia ściany naczyń krwionośnych, przez co zapobiega powstawaniu miażdżycy i żylaków. Poprawia pamięć, uczenie się oraz kojarzenie. Pobudza neurogenezę. Ma działanie przeciwzapalne, przeciwalergiczne i przeciwwrzodowe. Wzbudza ogromne zainteresowanie, jako potencjalny czynnik przeciwnowotworowy. Jak wynika z licznych badań przeprowadzonych *in vitro*, flawonoid ten hamuje proliferację komórek oraz indukuje zaprogramowaną śmierć w wielu liniach nowotworowych, m.in. piersi, jajnika, płuc, wątroby, jamy ustnej, okrężnicy, szyjki macicy, układu nerwowego, prostaty oraz w komórkach białaczkowych. Podobne rezultaty uzyskano z badań przeprowadzonych

in vivo u myszy z wszczepionymi ludzkimi komórkami raka otrzewnej. Badania kliniczne przeprowadzone na grupie pacjentów z zaawansowanym rakiem wątroby czy jajnika wykazały, że kwercetyna zmniejsza poziom markerów nowotworowych [*Post. Biol. Kom.*, poz. 9].

Istotnym zagadnieniem uwzględnianym w badaniach nad wykorzystaniem kwercetyny w terapii przeciwnowotworowej jest jej selektywność w stosunku do stransformowanych nowotworowo komórek. Badania przeprowadzone na hodowlach fibroblastów skóry (HSF), dziąseł (HGF), mięszi (HPC), więzadeł przyzębia (HPLF) oraz komórkach nerki małpiej GMK nie wykazały cytotoksycznego wpływu tego flawonoidu na komórki prawidłowe. Najczęściej opisywanymi mechanizmami przeciwnowotworowej aktywności kwercetyny jest jej zdolność do blokowania proliferacji oraz indukcji zaprogramowanej śmierci (apoptozy, autofagii) w komórkach nowotworowych. Na poziomie molekularnym wiąże się to z blokowaniem przekazywania wewnątrzkomórkowych sygnałów, warunkujących przeżycie komórek np. Ras/Raf/MEK/ERK (Ras – ang. *Ras protein*, Raf – ang. *Raf kinase*, MEK – ang. *mitogen-activated protein kinase*, ERK – ang. *extracellular signal-regulated kinase*) czy PI3K/Akt/mTOR (PI3K - ang. *phosphoinositide 3-kinase*, Akt/PKB – ang. *protein kinase B*, mTOR – ang. *mammalian target of rapamycin kinase*). Proapoptotyczna aktywność kwercetyny wiąże się też z hamowaniem ekspresji białek szoku termicznego (Hsp, ang. *Heat shock proteins*), w szczególności Hsp72 i 27. Hsp należą do grupy białek opiekuńczych (ang. *molecular chaperones*), które katalizują prawidłową syntezę białek, przywracają prawidłową strukturę źle zwiniętym białkom oraz kontrolują transport polipeptydów przez błony komórkowe. Ich ekspresja jest zaburzona w wielu stanach patologicznych jak niedokrwienie, gorączka, stan zapalny, infekcja. Wzrost poziomu Hsp obserwuje się w prawie wszystkich nowotworach, co prowadzi do zwiększonej oporności na indukcję zaprogramowanej śmierci w trakcie chemioterapii. Inny mechanizm przeciwnowotworowej aktywności kwercetyny wiąże się

ze zdolnością tego związku do indukcji apoptozy, poprzez uruchamianie jej wewnętrznej, mitochondrialnej ścieżki. Działanie flawonoidu prowadzi, bowiem do obniżenia potencjału błony mitochondrialnej, uwolnienia z mitochondrium do cytoplazmy cytochromu c, inicjacji aktywacji kaspaz 3, 7, 9 oraz rozpadu PARP (ang. *poly (ADP-ribose) polymerase*) [*Post. Biol. Kom.*, poz. 9].

Cel badań

Chemioterapia to metoda systemowego leczenia nowotworów za pomocą leków cytostatycznych. W terapii często wykorzystuje się kilka preparatów, które zaaplikowane razem działają skuteczniej. Jest to tzw. terapia kombinowana, inaczej złożona.

Wyniki badań uzyskane w ramach przygotowywania mojej pracy doktorskiej wykazały, że kwercetyna skutecznie inicjowała zaprogramowaną śmierć w różnych liniach nowotworowych. Molekularny mechanizm tego procesu opierał się na obniżaniu poziomu ekspresji białek szoku termicznego. Obiecujące wyniki tych badań oraz doniesienia, że związki pochodzenia naturalnego, poprzez swoją powszechną dostępność i znikome skutki uboczne mogą być skutecznym adiuwantem w terapii przeciwnowotworowej, skłoniło mnie do podjęcia badań nad możliwością wykorzystania kwercetyny w tej roli. Szczególną uwagę zwróciłam na molekularny mechanizm indukcji zaprogramowanej śmierci w komórkach nowotworowych pod wpływem flawonoidu oraz stosowanych w terapii chemioterapeutyków, jak również udział białek szoku termicznego w tym procesie.

Badania obejmowały 4 etapy:

1. Komórki HeLa, jako model eksperymentalny w badaniu apoptozy inicjowanej kwercetyną oraz cisplatiną
2. Kwercetyna a komórki prawidłowe i nowotworowe centralnego układu nerwowego
3. Przeciwnowotworowe działanie kwercetyny i temozolomidu
4. Przeciwnowotworowe działanie kwercetyny i sorafenibu

Omówienie wyników przeprowadzonych badań

Ad. 1. Komórki HeLa, jako model eksperymentalny w badaniu apoptozy inicjowanej kwercetyną oraz cisplatyną

Pierwszy etap badań nad wykorzystaniem kwercetyny w złożonej terapii przeciwnowotworowej stanowił kontynuację mojej pracy doktorskiej. Komórki raka szyjki macicy (linia HeLa) inkubowałam z kwercetyną w połączeniu z cisplatyną (*cis*-dichlorodiammine-platinum (II) CDDP), popularnym lekiem przeciwnowotworowym, szeroko stosowanym w terapii raka jajnika, jąder, płuc i macicy. Molekularny mechanizm działania tego związku polega na wchodzeniu w interakcje z białkami komórkowymi i lipidami, co w konsekwencji prowadzi do powstania adduktów DNA i zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M. Powoduje też destabilizację i uszkodzenie cytoszkieletu. Niestety, często u pacjentów obserwuje się oporność na ten lek. U podstaw tego zjawiska leży uruchamianie wewnątrzkomórkowych mechanizmów chroniących komórki przed śmiercią takie jak: obniżenie ekspresji kaspazy 3, ograniczone uwalnianie cytochromu c z mitochondrium do cytoplazmy, blokowanie rozpadu PARP oraz zwiększoną ekspresję białek szoku termicznego. Brak wrażliwości komórek nowotworowych na indukcję zaprogramowanej śmierci wiąże się też z podwyższoną aktywnością białek oporności wielolekowej (MRP, ang. multidrug resistance proteins). MRP są glikoproteinami, związanymi z błoną komórkową, należącymi do rodziny białek ABC (ang. ATP Binding Cassette). Ich zadaniem jest wyrzucanie cytotoksycznych związków (np. chemioterapeutyków) poza obręb komórki.

Moje badania wykazały, że inkubacja komórek HeLa tylko z cisplatyną lub tylko z kwercetyną inicjowała apoptozę w odpowiednio 11% lub 13% komórek. Po jednoczesnym podaniu obydwu tych leków ilość komórek apoptotycznych zwiększyła się do 25%. Preinkubacja

komórek z kwercetyną, po której podawano cisplatynę inicjowała apoptozę w 35%. Najmniej skuteczna okazała się preinkubacja z cisplatyną (tylko 14%). Wzrost ilości komórek apoptotycznych był skorelowany z aktywacją enzymu markerowego apoptozy – kaspazy 3 oraz obniżeniem poziomu białka MRP. Preinkubacja komórek HeLa z cisplatyną lub kwercetyną spowodowała obniżenie poziomu anty-apoptotycznego białka Hsp72. Z kolei zastosowanie pojedynczych leków lub ich jednoczesne podanie wywołało wzrost poziomu badanego białka.

Z danych literaturowych wiadomo, że nie tylko poziom ekspresji, ale również rozmieszczenie białek szoku termicznego w komórkach odgrywa ważną rolę w ochronie przed zaprogramowaną śmiercią. Cytoplazmatyczne białko Hsp72, pod wpływem stresu migruje do jądra komórkowego, gdzie chroni jego strukturę i kontroluje prawidłowy przebieg transkrypcji. W moich badaniach wykazałam, że kwercetyna blokuje translokację białka z cytoplazmy do jądra, czym można tłumaczyć wysoki poziom apoptozy przy jednoczesnym wzroście poziomu ekspresji Hsp72 w przypadku inkubacji z obydwoma lekami podanymi w tym samym czasie.

Podsumowując powyższe obserwacje, wykazałam, że kwercetyna skutecznie wspomagała cisplatynę w indukcji zaprogramowanej śmierci w komórkach raka szyjki macicy [*Biochem. Pharmacol.*, poz. 1].

Ad. 2. Kwercetyna a komórki prawidłowe i nowotworowe centralnego układu nerwowego

W dalszej części badań, jako model eksperymentalny wykorzystałam komórki nowotworowe centralnego układu nerwowego (CNS, ang. Central Nervous System). Jest to grupa nowotworów bardzo trudna do wyleczenia. Skomplikowana budowa anatomiczna i histologiczna układu, z którego się wywodzą często uniemożliwia całkowite chirurgiczne usunięcie transformowanej tkanki. Charakteryzują się też wysoką opornością na leczenie farmakologiczne. Dodatkowym utrudnieniem w terapii jest konieczność ochrony neuronów przed uszkodzeniem.

Wiadomo, że komórki nerwowe są bardzo wrażliwe na stres oksydacyjny. Kwercetyna, jako silny antyoksydant, może odegrać ważną rolę w ochronie neuronów przed śmiercią w trakcie terapii przeciwnowotworowej. Dlatego też badania nad wykorzystaniem flawonoidu w złożonej terapii nowotworów CNS zostały poprzedzone oceną wpływu tego związku na przeżywalność prawidłowych komórek nerwowych [*Acta Neurobiol. Exp.*, poz. 2, poz. 3].

Modelem badawczym była hodowla pierwotna neuronów wyizolowanych z mózgow 18 dniowych szczurów. Inkubacja z kwercetyną w stężeniu 1 µg/ml przez 24 godziny nie miała znaczącego wpływu na przeżywalność komórek. Po inkubacji z wyższymi dawkami związku obserwowano istotny statystycznie wzrost ilości martwych neuronów. Dawka 50 µg/ml była toksyczna i wszystkie komórki nerwowe ulegały śmierci. Tak wysoka śmiertelność może być związana z brakiem ekspresji białka opiekuńczego Hsp72. Hsp27 ulegało prawidłowej ekspresji i lokalizowało się na terenie jądra komórkowego, niezależnie od obecności kwercetyny w płynie hodowlanym. Inne prawidłowe komórki (fibroblasty skóry HSF, linia GMK) nie były wrażliwe na działanie flawonoidu w badanych stężeniach.

Kwercetyna zmieniała również morfologię komórek nerwowych. Struktura neuronów należy do najbardziej skomplikowanych, a regularny kształt komórek warunkuje prawidłowe przekazywanie impulsów. Jak wykazała analiza fraktalna, neurony po inkubacji z kwercetyną zajmowały mniejszą powierzchnię i posiadały mniejszą ilość dendrytów. Zależność ta była wprost proporcjonalna do stężenia flawonoidu. Przeprowadzone obserwacje sugerują, że wpływ kwercetyny na przeżywalność neuronów zależy od stężenia związku. W niskich dawkach nie miał on wpływu na śmiertelność komórek, natomiast większa ilość związku w środowisku komórek nerwowych może być dla nich toksyczna [*Acta. Neurobiol. Exp.*, poz. 2].

Komórki neuroblastomy, nowotworu złośliwego, wywodzącego się z komórek cewy nerwowej, odpowiedzialnego za około 15% zgonów dzieci z powodu nowotworów złośliwych,

okazały się bardziej odporne niż neurony na indukcję zaprogramowanej śmierci pod wpływem kwercetyny [*Acta. Neurobiol. Exp.*, poz. 3]. Typowe dla apoptozy zmiany morfologiczne obserwowano w maksymalnie 6% populacji komórek przy zastosowaniu stężeń od 1 µg/ml do 10 µg/ml oraz w około 12% po użyciu dawki 15 µg/ml. Ilość komórek nekrotycznych była zbliżona lub nawet przewyższała procent komórek umierających na drodze zaprogramowanej śmierci. Mniejsza śmiertelność komórek nowotworowych w porównaniu z neuronami mogła być związana z wysoką ekspresją białka opiekuńczego Hsp72, którego brak ekspresji obserwowano w komórkach nerwowych. Aby uzyskać potwierdzenie tej tezy, wykonano serię doświadczeń, w których zablokowano ekspresję białka szoku Hsp72 w komórkach neuroblastoma, wykorzystując specyficzne oligonukleotydy antysensowne. W konsekwencji odnotowano prawie dwukrotny wzrost indukcji apoptozy pod wpływem kwercetyny. Nie obserwowano natomiast komórek nekrotycznych, co sugeruje, że Hsp72 jest zaangażowane w ochronę przed zaprogramowaną śmiercią. Podobnie jak w przypadku komórek raka szyjki macicy, nie tylko poziom ekspresji białek szoku, ale również rozmieszczenie w komórce może mieć kluczowe znaczenie w oporności komórek nowotworowych. Białko Hsp72 pod wpływem kwercetyny przemieszczało się z cytoplazmy do jądra komórkowego, co dodatkowo tłumaczy niską wrażliwość komórek nowotworowych na indukcję zaprogramowanej śmierci [*Acta Neurobiol. Exp.*, poz. 3].

Glejaki to nowotwory mózgu wywodzące się z astrocytów tkanki glejowej. Do najbardziej złośliwych należy gwiaździak anaplastyczny (łac. *astrocytoma anaplasticum*, AA, III stopień złośliwości wg WHO) oraz glejak wielopostaciowy (łac. *glioblastoma multiforme*, GBM, IV stopień złośliwości wg WHO). Stanowią około 50% wszystkich nowotworów mózgu. Niestety prognozy dla pacjentów z tymi schorzeniami nie są optymistyczne – przeżywalność od momentu zdiagnozowania GBM wynosi około roku oraz 3-5 lat w przypadku AA. Glejaki

są nowotworami rozwijającymi się bardzo powoli i późno dającymi niepokojące objawy. Dodatkowym utrudnieniem w terapii jest zdolność komórek glejaka do rozproszonej migracji pomiędzy zdrowe komórki mózgu, co uniemożliwia całkowite usunięcie tkanki nowotworowej. Glejaki są też bardzo odporne na leczenie farmakologiczne. Dlatego też, poszukuje się nowych, skuteczniejszych terapii, eliminujących komórki nowotworowe na drodze zaprogramowanej śmierci (apoptoza, autofagia) i ograniczających ich migrację.

Kwercetyna okazała się silnym induktorem nekrozy w komórkach gwiazdziaka anaplastycznego (linia MOGGCCM), inicjując apoptozę i autofagię tylko w niewielkiej ilości komórek (ok. 5%) [*Chem. Biol. Inter.*, poz. 4, *Pharmacol. Rep.*, poz. 5]. Na poziomie molekularnym obserwowano wzrost ekspresji markera nekrozy – białka Bcl2L12 oraz wzrost mitochondrialnego potencjału błonowego. Aktywacji ulegały też markery apoptozy mitochondrialnej (wzrost ekspresji kaspazy 3 i cytochromu c, obniżenie poziomu Hsp27 i Hsp72), jednak nie towarzyszył temu wzrost ilości martwych na drodze zaprogramowanej śmierci komórek. Jądrowa lokalizacja białka Hsp72 może tłumaczyć brak typowo apoptotycznych zmian morfologicznych, pomimo aktywacji cytoplazmatycznych markerów. Komórki glejaka wielopostaciowego (linia T98G) okazały się bardziej wrażliwe na indukcję apoptozy pod wpływem kwercetyny niż komórki gwiazdziaka, inicjując proces w około 22% populacji komórek [*Tumor Biol.*, poz. 6]. Po inkubacji z flawonoidem w stężeniu powyżej 50 μM pojawiła się również nekroza. Sygnał apoptotyczny przebiegał drogą wewnętrzną, mitochondrialną, z obniżeniem błonowego potencjału mitochondrialnego, uwolnieniem cytochromu c z mitochondrium do cytoplazmy oraz aktywacją kaspazy 3 i kaspazy 9. Ograniczeniu ulegała również ekspresja Hsp27 i Hsp72. Obydwa białka zlokalizowane były na terenie cytoplazmy zarówno w komórkach kontrolnych jak i po inkubacji z kwercetyną.

W komórkach glejaka nie zaobserwowano więc migracji białka Hsp72 do jądra, co miało miejsce w przypadku komórek gwiazdziaka.

Kwercetyna nie miała wpływu na indukcję autofagii w obydwu badanych liniach nowotworów mózgu [*Chem. Biol. Inter.*, poz. 4, *Pharmacol. Rep.*, poz. 5, *Tumor Biol.*, poz. 6].

Ad. 3. Przeciwnowotworowe działanie kwercetyny i temozolomidu

Nowym i często stosowanym lekiem w chemioterapii gliomów złośliwych jest temozolomid (Temodal, TMZ). Jest to związek alkilujący, którego przeciwnowotworowa aktywność opiera się na formowaniu O⁶-metyloguaniny w nici DNA, która to nieprawidłowo paruje się z tyminą w czasie kolejnego cyklu replikacyjnego. W konsekwencji prowadzi to do zablokowania cyklu w fazie G2/M i śmierci komórek. Jak wykazała analiza morfologiczna, temozolomid w przeciwieństwie do kwercetyny nie był skutecznym induktorem nekrozy w linii MOGGCCM, a apoptozę inicjował na poziomie porównywalnym z flawonoidom [*Chem. Biol. Inter.*, poz. 4, *Pharmacol. Rep.*, poz. 5]. Dominującym typem śmierci była autofagia, co zostało potwierdzone na poziomie molekularnym. Zaobserwowano, bowiem rozpad białka LC3 na izoformy LC3I i LC3II oraz ponad dwukrotny wzrost poziomu LC3II w porównaniu do LC3I. Odmienne proporcje pojawiających się typów śmierci komórek pod wpływem temozolomidu wykazała cytometria przepływowa. W 80% populacji komórek MOGGCCM wykryto symptomy wczesnej apoptozy, a 4% komórek znajdowało się w późnej fazie tego procesu. Wykorzystana do analizy Aneksyna V, jest związkiem fluorescencyjnym, specyficznie wiążącym się z fosfatydyloseryną. W prawidłowych warunkach fosfatydyloseryna zlokalizowana jest na wewnętrznej stronie błony komórkowej. W czasie apoptozy związek ten przemieszcza się na zewnętrzną część błony, gdzie staje się dostępny dla Aneksyny V. Zjawisko to zachodzi w ciągu pierwszych kilku godzin od rozpoczęcia apoptozy i umożliwia rozpoznanie zaprogramowanej śmierci we wczesnej fazie. Omówiona translokacja fosfatydyloseryny zachodzi

również w innych typach śmierci, np. autofagii. Prawdopodobne jest, że w grupie komórek opisanych, jako apoptotyczne, obecne są także komórki autofagalne. Temozolomid nie miał wpływu na indukcję autofagii w linii glejaka wielopostaciowego T98G [*Tumor Biol.*, poz. 6]. Obserwowano natomiast głównie apoptozę, a przy wyższych stężeniach i dłuższym czasie inkubacji również nekrozę. Apoptoza była inicjowana szlakiem wewnętrznym (mitochondrialnym) z obniżeniem mitochondrialnego potencjału błonowego, uwolnieniem cytochromu c do cytoplazmy, aktywacją kaspazy 3 i 9. Temozolomid okazał się również inhibitorem Hsp27 i Hsp72. Oprócz ciałek apoptotycznych, w komórkach T98G obserwowano granularne, pęcherzykowate struktury w obrębie siateczki śródplazmatycznej, otoczone Hsp27. Na poziomie molekularnym odnotowano wzrost ekspresji kaspazy 12, uważanej za marker stresu retikularnego i ten właśnie proces może być bezpośrednią przyczyną apoptozy w komórkach glejaka.

Temozolomid zmieniał również kształt jąder komórek T98G z okrągłego w charakterystyczny, sierpowato wygięty. Zmianę morfologii jąder po inkubacji z cytostatykiem obserwowano również w linii MOGGCCM, przy czym kształt organelli był odmienny – bardziej owalny, z nieregularnie pofałdowaną powierzchnią. Jak wynika z badań histomorfometrycznych, może mieć to ważne znaczenie diagnostyczne. Czas przeżycia pacjentów, u których w biopsji zaobserwowano owalny kształt jąder po chemioterapii, był krótszy [*Chem. Biol. Inter.*, poz. 4, *Tumor Biol.*, poz. 6].

Jak wspomniano wcześniej, kwercetyna potęgowała pro-apoptotyczną aktywność cisplatyny w komórkach raka szyjki macicy [*Biochem. Pharmacol.*, poz. 1]. Aby sprawdzić, czy flawonoid wykaże podobne właściwości w stosunku do temozolomidu, komórki gwiazdziaka anaplastycznego i glejaka wielopostaciowego inkubowano z obydwoma lekami w 3 wariantach badawczych [*Chem. Biol. Inter.*, poz. 4, *Pharmacol. Rep.*, poz. 5, *Tumor Biol.*, poz. 6]:

- kwercetyna i temozolomid podawane były w tym samym czasie,
- po pre-inkubacji z temozolomidem następowała inkubacja z kwercetyną,
- temozolomid podawano po wcześniejszej pre-inkubacji z kwercetyną.

Jako pierwsza wykazałam, że kwercetyna wraz z temozolomidem efektywniej inicjowała proces zaprogramowanej śmierci w komórkach glejaka niż w przypadku pojedynczej aplikacji. Kombinacja obydwu leków, podanych w tym samym czasie, była najskuteczniejsza. Rodzaj inicjowanej śmierci zależał od linii komórkowej. W komórkach glejaka wielopostaciowego kwercetyna oraz temozolomid indukowały przede wszystkim apoptozę. Śmiertelny sygnał przebiegał drogą mitochondrialną. Podobnie jak w przypadku samego temozolomidu, odnotowano obecność granularnych struktur w obrębie siateczki śródplazmatycznej, czemu towarzyszył wzrost ekspresji kaspazy 12. W komórkach gwiazdziaka anaplastycznego kwercetyna oraz temozolomid inicjowały zarówno apoptozę jak i autofagię, przy czym proporcje obydwu typów śmierci zależały od stężenia użytych związków. Wykorzystując flawonoid w stężeniu 5 μM oraz temozolomid w stężeniu 100 μM , obserwowano przede wszystkim autofagię. Wyższe stężenia kwercetyny efektywniej inicjowały apoptozę i przy stężeniu 30 μM związku ten typ śmierci dominował w analizowanych komórkach. Temozolomid znosił pro-nekrotyczne właściwości kwercetyny. Morfologicznym zmianom, charakterystycznym dla zaprogramowanej śmierci, towarzyszyła aktywacja typowych białek markerowych, świadczących o mitochondrialnym przebiegu ścieżki apoptotycznej oraz obecności LC3II w procesie autofagii. Podobnie jak w przypadku samego temozolomidu, połączenie z kwercetyną powodowało zmianę kształtu jąder komórkowych oraz ograniczenie migracji komórek nowotworowych.

Dotychczas wykazano, że wysoka ekspresja białek szoku odgrywa ważną rolę w oporności komórek raka szyjki macicy i neuroblastomy na inicjowanie zaprogramowanej śmierci. Dlatego też w kolejnej części badań sprawdzono, czy zablokowanie ekspresji genów

HSP72 oraz *HSP27* zwiększy wrażliwość komórek GBM oraz AA na indukcję apoptozy i autofagii pod wpływem kwercetyny i temozolomidu [*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, poz. 7]. Wykorzystując specyficzne siRNA wykazano, że obydwie leki podane razem lub osobno inicjowały apoptozę w prawie 90% populacji stransfekowanych komórek. Nie odnotowano wzrostu ilości komórek nekrotycznych. Co ciekawe, apoptoza była dominującym typem śmierci nawet w linii MOGGCCM, gdzie przed blokowaniem pod wpływem temozolomidu obserwowano przede wszystkim autofagię. Apoptozie towarzyszyło obniżenie błonowego potencjału mitochondrialnego, uwolnienie cytochromu c do cytoplazmy, aktywacja kaspazy 3 i 9. Obniżenie poziomu Hsp27 i Hsp72 oraz późniejsza inkubacja z temozolomidem (z lub bez kwercetyny) spowodowało znaczący wzrost ilości granularnych struktur na terenie cytoplazmy. Obecność samego flawonoidu nie miała wpływu na zmianę morfologii siateczki śródplazmatycznej. Blokowanie ekspresji białek szoku termicznego dodatkowo zmieniało kształt jąder i w obydwu liniach komórkowych organella przyjmowały formę fragmentarycznie podzielonych „rogali”.

Ad. 4. Przeciwnowotworowe działanie kwercetyny i sorafenibu

Moje pionierskie badania wykazały, że kwercetyna była też skuteczna w pobudzaniu pro-apoptotycznych i pro-autofagalnych właściwości innego związku przeciwnowotworowego – sorafenibu (Nexavar), stosowanego w leczeniu raka nerki [*Neurotox. Res.*, poz. 8]. Molekularny mechanizm działania leku opiera się przede wszystkim na hamowaniu aktywności kinazy serynowo-treoninowej Raf, będącej kluczowym elementem wewnątrzkomórkowego szlaku przekazywania sygnałów Ras/Raf/MEK/ERK, co w konsekwencji prowadzi do hamowania proliferacji. Na podstawie dotychczasowych badań klinicznych zaobserwowano, że podanie tego związku pacjentom ze złośliwymi glejakami ogranicza angiogenezę oraz inicjuje apoptozę i autofagię w komórkach nowotworowych. W przypadku gwiazdki anaplastycznego

MOGGCCM skuteczność sorafenibu w eliminowaniu komórek nie była znacząca. Dominowała nekroza, a w mniejszym stopniu apoptoza. Połączenie sorafenibu z kwercetyną znacząco zwiększało wrażliwość komórek MOGGCCM na indukcję apoptozy przebiegającej szlakiem mitochondrialnym oraz znosiło pro-nekrotyczne właściwości związków stosowanych pojedynczo. Sorafenib okazał się natomiast bardzo efektywnym induktorem autofagii w linii glejaka wielopostaciowego, gdzie ilość martwych na tej drodze komórek przekraczała 40%. Towarzyszył temu wzrost ekspresji markerów autofagii – bekliny 1 oraz LC3II. Dodatkowa inkubacja z kwercetyną nie zwiększała ilości martwych komórek. Uruchamiała natomiast dodatkowe szlaki przekazywania śmiertelnego sygnału i obok komórek autofagalnych obserwowano komórki apoptotyczne. Wszystkim typom śmierci towarzyszyło obniżenie poziomu białka Ras i kinazy Raf. Sugeruje to, że zablokowanie przekazywania sygnałów szlakiem Ras/Raf/MEK/ERK odgrywa ważną rolę w zwiększaniu wrażliwości komórek glejaka na indukcję apoptozy i autofagii, lecz nie jest specyficzna dla rodzaju zaprogramowanej śmierci.

Badania molekularne wykazały, że sorafenib nie był skutecznym inhibitorem ekspresji białek szoku termicznego. Dopiero połączenie z flawonoidom obniżyło poziom Hsp27 oraz Hsp72. Zablokowanie ekspresji białek szoku, wykorzystując specyficzne siRNA, znacząco zwiększyło wrażliwość komórek MOGGCCM na indukcję apoptozy. Co ciekawe, apoptoza była również dominującym typem śmierci w komórkach glejaka wielopostaciowego, natomiast autofagię obserwowano tylko w niewielkim procencie. Apoptoza przebiegała szlakiem mitochondrialnym w obydwu liniach komórkowych.

Podsumowując, wykazałam, że kwercetyna w połączeniu z badanymi cytostykami (cisplatyna, sorafenib, temozolomid) skuteczniej inicjuje zaprogramowaną śmierć w komórkach nowotworowych niż związki w pojedynczej aplikacji. Obniżenie poziomu białek opiekuńczych Hsp72 oraz Hsp27 dodatkowo zwiększa wrażliwość transformowanych komórek na indukcję

apoptozy. Uzyskane wyniki mogą mieć znaczenie aplikacyjne w projektowaniu nowych terapii przeciwnowotworowych.

Plany przyszłych badań

W najbliższej przyszłości zamierzam kontynuować badania dotyczące przeciwnowotworowych właściwości związków pochodzenia naturalnego, stosowanych osobno jak i w połączeniu z wykorzystywanymi w chemioterapii cytostatykami. Doświadczenia będą przeprowadzone na hodowlach pierwotnych ludzkich komórek glejaka wielopostaciowego oraz gwiaździka anaplastycznego, wyprowadzonych z chirurgicznie usuniętych guzów pacjentów ze zdiagnozowanymi nowotworami. Swoją pracę naukową zamierzam również poszerzyć o badania *in vivo*, w których modelem eksperymentalnym będą gryzonie z wszczepionymi komórkami nowotworowymi.

Najważniejsze wyniki badań związane z opisanym powyżej nurtem badawczym zawarte w monotematycznym cyklu 8 oryginalnych prac eksperymentalnych

- Kwercetyna synergistycznie wspomaga cisplatynę, temozolomid, sorafenib w eliminowaniu komórek nowotworowych (rak szyjki macicy, glejak wielopostaciowy, gwiaździk anaplastyczny, neuroblastoma) na drodze zaprogramowanej śmierci.
- Rodzaj śmierci inicjowany kwercetyną oraz cytostatykami zależał od linii komórkowej, rodzaju i stężenia podawanych związków. W linii T98G, kwercetyna oraz temozolomid, podane pojedynczo lub w kombinacjach, pobudzały przede wszystkim apoptozę, sorafenib autofagię, a w połączeniu z kwercetyną dodatkowo apoptozę. W linii MOGGCCM po inkubacji z kwercetyną lub z sorafenibem obserwowano nekrozę,

a w wyniku połączenia obydwu leków komórki umierały na drodze apoptozy. Temozolomid inicjował autofagię, a w towarzystwie kwercetyny dodatkowo apoptozę.

- Kwercetyna działa protekcyjnie na prawidłowe fibroblasty skóry HSF, komórki nerki małpiej GMK. Wyjątek stanowią neurony, dla których flawonoid w wyższych stężeniach był cytotoksyczny.
- Komórki nowotworowe charakteryzują się nadekspresją białek opiekuńczych Hsp27 oraz Hsp72, warunkujących przeżycie w niekorzystnych warunkach. Brak ekspresji Hsp72 w neuronach tłumaczy wysoką śmiertelność komórek pod wpływem kwercetyny.
- Kwercetyna wraz z temozolomidem, sorafenibem lub cisplatyną skutecznie obniżała poziom Hsp27 oraz Hsp72, co wiązało się ze wzrostem ilości martwych komórek na drodze zaprogramowanej śmierci.
- Hamowanie przez kwercetynę translokacji cytoplazmatycznego białka Hsp72 do jądra komórkowego dodatkowo zwiększało wrażliwość komórek nowotworowych na indukcję zaprogramowanej śmierci.
- Blokowanie ekspresji Hsp27 oraz Hsp72 efektywnie zwiększało wrażliwość komórek nowotworowych na indukcję apoptozy, nie miało natomiast wpływu na wzrost ilości komórek autofagalnych i nekrotycznych.
- Sygnał apoptotyczny, inicjowany badanymi związkami, przebiegał drogą wewnętrzną, mitochondrialną, czemu towarzyszyło obniżenie mitochondrialnego potencjału błonowego, uwolnienie cytochromu c z mitochondrium do cytoplazmy oraz aktywacja kaspazy 3 i 9.
- Apoptozę indukowaną temozolomidem w linii glejaka wielopostaciowego poprzedzał stres retikularny.

- Inkubacja komórek glejaka wielopostaciowego oraz gwiazdziaka anaplastycznego z temozolomidem (w połączeniu z kwercetyną lub bez) powodowała zmianę kształtu jąder komórkowych z owalnych, o gładkiej powierzchni, w nieregularne o pofałdowanej błonie jądrowej (MOGGCCM) lub sierpowato wygięte (T98G). Po zablokowaniu ekspresji białek Hsp27 oraz Hsp72 morfologia tych organeli w obydwu liniach była identyczna i przypominała fragmentarycznie podzielone rogale.
- Zablokowanie przekazywania wewnątrzkomórkowego sygnału poprzez szlak Ras/Raf/MEK/ERK odgrywa ważną rolę w zwiększaniu wrażliwości komórek glejaka na indukcję zarówno apoptozy jak i autofagii, lecz nie jest specyficzne dla określonego rodzaju zaprogramowanej śmierci.

V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Równoległe do badań nad przeciwnowotworowymi właściwościami kwercetyny, które stanowiły podstawę prezentowanego osiągnięcia, uczestniczyłam w pracach nad podobnym wykorzystaniem innych związków pochodzenia naturalnego – bergaptenu, peucedaniny i imperatoryny. Wszystkie substancje należą do furanokumaryn, grupy wtórnych metabolitów szeroko rozpowszechnionych w świecie roślin. Posiadają właściwości przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe, przeciwbólowe i fotouczulające, często wykorzystywane w leczeniu schorzeń skórnych. Istnieją również doniesienia o przeciwnowotworowym działaniu furanokumaryn. Obserwowano, bowiem hamowanie syntezy DNA w mysim raku skóry i guzach Ehrlicha, blokowanie cyklu komórkowego w fazie G2/M oraz indukcję apoptozy w ludzkich komórkach raka wątroby. Wykorzystując ludzkie komórki raka szyjki macicy (linia HeLa) wykazano, że bergapten (5-metoksypsoralen, 5-MOP), izolowany z owoców *Peucedanum tauricum* Bieb. (gorysz krymski) posiadał znikome właściwości przeciwnowotworowe.

Peucedanina uzyskiwana z tych samych owoców była skuteczniejsza w indukcji zaprogramowanej śmierci. Po wybarwieniu komórek Aneksyną V, symptomy wczesnej apoptozy obserwowano w około 11% komórek. Dodatkowa ocena morfologiczna wykazała obecność pęcherzykowatych, przypominających ciała autofagalne, struktur na terenie cytoplazmy. Pamiętając, że Aneksyna V może wykrywać również ten typ zaprogramowanej śmierci, jest prawdopodobne, że peucedanina oprócz apoptozy inicjuje również autofagię w komórkach raka szyjki macicy.

Autofagia była dominującym typem śmierci obserwowanym w linii HeLa pod wpływem imperatoryny (8-isopentenyloksypsoralen), izolowanej z korzenia *Angelica officinalis* (dzięgiel litwor). Na poziomie molekularnym odnotowano obecność izoformy białka LC3: LC3II, będącego markerem autofagii. Towarzystwo temu obniżenie ekspresji Hsp27 oraz Hsp72. Podobny efekt obserwowano po połączeniu imperatoryny z cisplatyną, jednak procent martwych na drodze autofagii komórek był mniejszy w porównaniu z działaniem samej furanokumaryny. Bardziej obiecujące wyniki uzyskano z połączenia imperatoryny z kwercetyną. Obydwa związki znacznie skuteczniej inicjowały zaprogramowaną śmierć w ludzkich komórkach raka szyjki macicy HeLa i raka krtani Hep2 w porównaniu z pojedynczą aplikacją. Komórki umierały przede wszystkim na drodze apoptozy, czemu na poziomie molekularnym towarzyszyła aktywacja kaspaz oraz obniżenie poziomu Hsp27 i Hsp72. Tylko niewielki procent komórek wykazywał typowe dla autofagii cechy morfologiczne, co potwierdził niski poziom markera bekliny 1. Dodatkowe zablokowanie ekspresji Hsp27 oraz Hsp72 specyficznymi siRNA nie zwiększyło wrażliwości komórek HeLa i Hep2 na indukcję apoptozy czy autofagii.

Jednoczesne podanie kwercetyny i imperatoryny okazało się bardzo skuteczne w indukcji apoptozy w komórkach glejaka wielopostaciowego T98G. Śmiertelny sygnał przebiegał drogą wewnętrzną – mitochondrialną z aktywacją kaspazy 3 i 9. Obserwowano również obniżenie

poziomu białek opiekuńczych Hsp72 i Hsp27. Transfekcja komórek glejaka specyficznymi siRNA, blokującymi ekspresję białek szoku termicznego, dodatkowo zwiększyła wrażliwość badanych komórek na indukcję apoptozy.

Otrzymane rezultaty opublikowano w czasopismach o zasięgu krajowym i międzynarodowym: (Przy każdej pozycji podano *impact factor* oraz punktację MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania, a w nawiasach zgodnie z rokiem 2013.)

- **Jakubowicz-Gil J.**, Paduch R., Ulz Z., Bądziul D., Głowniak K., Gawron A. (2012) Cell death in HeLa cells upon imperatorin and cisplatin treatment. *Folia Histochem. Cytobiol.* 50: 381-391, **IF₂₀₁₂: 1,101, MNiSW₂₀₁₀: 15 (IF₂₀₁₃: 1,101, MNiSW₂₀₁₃: 15)**, *autor korespondencyjny*
- Bądziul D., **Jakubowicz-Gil J.**, Langner E., Rzeski W., Głowniak K., Gawron A. (2014) The effect of quercetin and imperatorin on programmed cell death induction in T98G cells *in vitro*. *Pharmacol. Rep.* 66: 292-300, **IF₂₀₁₃: 1,965, MNiSW₂₀₁₃: 25**
- Bądziul D., **Jakubowicz-Gil J.**, Paduch R., Głowniak K., Gawron A. (2014) Combined treatment with quercetin and imperatorin as a potent strategy for killing HeLa and Hep-2 cells. *Mol. Cell. Biochem.* DOI: 10.1007/s11010-014-2032-4, **IF₂₀₁₃: 2,329, MNiSW₂₀₁₃: 20**
- Bartnik M., Głowniak K., **Jakubowicz-Gil J.**, Pawlikowska-Pawłęga B., Gawron A. (2006) Effect of peucedanin and bergapten (5-MOP), furanocoumarins isolated from *Peucedanum tauricum* Bieb. (*Apiaceae*) fruits, on apoptosis induction and heat-shock protein expression in HeLa cells. *Herba Polonica* 52: 71-78, **MNiSW₂₀₀₆: 0 (MNiSW₂₀₁₃: 8)**

Uczestniczyłam również w badaniach dotyczących ekspresji białek szoku termicznego i oporności wielolekowej MRP w ko-kulturach sferoidów raka okrężnicy, w różnych etapach inwazyjności, z prawidłowymi komórkami nabłonka, miofibroblastów i komórek śródbłonka okrężnicy traktowanymi kamptotecyną (CPT-11) w połączeniu z rekombinowanym transformującym czynnikiem wzrostu $\beta 1$ (rhTGF- $\beta 1$) lub interleukiną-1 β (IL-1 β). Technika immunoblotingu połączona z densytometrią wykazała wzrost ekspresji badanych białek w ko-kulturach komórek nowotworowych z miofibroblastami pod wpływem rhTGF- $\beta 1$ z lub bez CPT-11. W komórkach nabłonka obserwowano obniżony poziom Hsp27, Hsp72 oraz MRP, natomiast brak ekspresji Hsp72 był charakterystyczny dla śródbłonka. Niski poziom ekspresji białek szoku odnotowano w badanych ko-kulturach komórek po inkubacji z IL-1 β oraz CPT-11. Omówione wyniki zostały opublikowane w 2 pracach o zasięgu międzynarodowym:

(Przy każdej pozycji podano *impact factor* oraz punktację MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania, a w nawiasach zgodnie z rokiem 2013.)

- Paduch R., **Jakubowicz-Gil J.**, Kandefer-Szerszeń M. (2009) Expression of HSP27, HSP72 and MRP proteins in *in vitro* co-culture of colon tumor cell spheroids with normal cells after incubation with rhTGF- $\beta 1$ and/or CPT-11. *J. Biosci.* 34: 927-940, **IF₂₀₀₉: 1,956, MNiSW₂₀₀₉: 20 (IF₂₀₁₃: 1,759, MNiSW₂₀₁₃: 30)**
- Paduch R., **Jakubowicz-Gil J.**, Niedziela P. (2010) Hepatocyte growth factor (HGF), heat shock proteins (Hsps) and multidrug resistance protein (MRP) expression in co-culture of colon tumor spheroids with normal cells after incubation with interleukin-1 β (IL-1 β) and/or camptothecin (CPT-11). *Ind. J. Exp. Biol.* 48: 354-364, **IF₂₀₁₀: 0,702, MNiSW₂₀₁₀: 20 (IF₂₀₁₃: 1,195, MNiSW₂₀₁₃: 20)**

J. Jakubowicz-Gil