



Wrocław, 22/11/2018

**Ocena rozprawy doktorskiej Pani Izabeli Szczuki, pt. „Wpływ 3-bromopirogronianu na właściwości katepsyny B w aspekcie potencjału metastatycznego komórek raka jelita grubego”**

Rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze i Zakładzie Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich, pod pieką dr hab. Grzegorza Terleckiego, profesora nadzwyczajnego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej był Pan dr Jerzy Wiśniewski. Cel rozprawy doktorskiej, sformułowany przez kandydatkę brzmi następująco: „...poznanie skutków działania 3-bromopirogronianu na te właściwości komórek nowotworowych wybranych linii raka jelita grubego, które decydują o ich potencjale metastatycznym, a których istotny element stanowi katepsyna B”.

Tak więc praca dotyczy bardzo istotnego współcześnie zagadnienia, z pogranicza dziedziny biologii nowotworów oraz terapii przeciwnowotworowej i jako taka utrzymuje się w głównym trendzie zaleceń Komisji Europejskiej, co do poprawy jakości zdrowia i życia obywateli. Rozprawa doktorska Pani Izabeli Szczuki ogniskuje się wokół głównego zagadnienia, czyli funkcji katepsyny B w rozwoju stanu patogenne różnych chorób. Praca ze szczególnym zainteresowaniem analizuje własności katepsyny B pod kątem jej roli w metastazie nowotworów oraz jako potencjalnego celu terapeutycznego w terapii celowanej nowotworów.

Praca ma tym samym istotne znaczenie dla rozwoju nauk biomedycznych i rozwoju potencjalnych terapii przeciwnowotworowych.

**Formalna ocena pracy:**

Praca liczy 107 stron druku formatu A4, ma typowy, właściwy układ i strukturę podrozdziałów charakterystyczną dla eksperymentalnych rozpraw doktorskich z tej dziedziny.

**Wstęp** liczy 18 stron i zawiera wszystkie, niezbędne dla czytelnika informacje, pozwalające na sprawne zagłębienie się w tematykę pracy doktorskiej. Jest napisany jasno i przejrzysto oraz w oparciu o dobrze dobrane źródła literaturowe. Pewien niedosyt budzi jedynie, moim zdaniem, relatywnie krótka część Wstępu poświęcona katepsynie w chorobach





nowotworowych oraz dotychczasowym próbom stosowania 3-bromopirogronianu (3BP) w ich leczeniu. Ta część pracy wydaje się bowiem najbardziej interesująca i intrygująca naukowo.

**Cel pracy** jest sformułowany precyzyjnie, klarownie i dobrze oddaje merytoryczną zawartość. Dla realizacji Celu Autorka sformułowała cztery zadania badawcze, po których rozwiązaniu mogła postawić końcową tezę pracy. Są to, w dużym uproszczeniu: 1)-ocena potencjału proliferacyjnego, migracyjnego i inwazyjności linii komórek nowotworowych jelita grubego (Caco-2 oraz HCT 116) w obecności 3-bromopirogronianu (3BP); 2)-wpływ 3BP na sekrecję i aktywność Katepsyny B; 3)-wpływ Katepsyny B na ekspozycję enzymu na powierzchni błony badanych komórek; 4)- wpływ 3BP na aktywność enzymu i ocenę jego wrażliwości na 3BP.

Rozdział **Materiały i Metody** zajmuje 15 stron i zawiera wszystkie niezbędne opisy procedur eksperymentalnych, materiałów oraz sposobu przeprowadzenia każdego z eksperymentów do oceny przebiegu badań i analizy uzyskanych wyników. Szkoda, że Autorka, mimo przeprowadzania analiz pozwalających na policzenie komórek martwych, nie podaje tych danych (procentowego udziału) w opisie ilości komórek wysiewanych do eksperymentów oraz w ich trakcie. Nie zauważyłem w tym rozdziale opisu kontrolnych eksperymentów z proliferacją linii komórkowych, w warunkach eksperymentu do oceny migracji (zarastania rysy) i inwazyjności (szczególnie czasy 48h inkubacji) – bardzo proszę Autorkę o informację lub komentarz w tej sprawie. Nie znalazłem szczegółowych informacji na temat: jak praktycznie wyznaczano tzw. "granicę rysy" w testach migracji (granica ciągłości komórek?; powierzchnia wolna?; powierzchnia komórek?). Chciałbym również zwrócić uwagę na nieprawidłowe zastosowanie sformułowania: "...ekspresję Katepsyny B na powierzchni komórek...". Jakkolwiek Autorka w przypisie dodaje wyjaśnienie, jednak dla mnie jako biochemika jest ono nie akceptowalne.

Moje zastrzeżenie budzi także nie do końca precyzyjny opis eksperymentów z zastosowaniem techniki FACS, z którego trudno zorientować się w ilości pomiarów i kontroli, ilości komórek poddanej analizie, ilości powtórzeń i całkowitej liczby analizowanych komórek każdego typu. W rozdziale 3.2.1.5 w opisie testu inwazyjności nie znalazłem informacji o czasie, w którym przeprowadzono sam test migracji (Etap 2 na schemacie).





Rozdział **Wyniki** zajmuje 23 strony, jest klarowny i zwięzły. Przejrzysty tekst w bardzo przyjazny dla czytelnika sposób opisuje eksperymenty i ich wyniki. Merytoryczna zawartość zostanie przedyskutowana w dalszej części recenzji.

Rozdział **Dyskusja** zawiera 9 stron, a rozdział **Wnioski** to pół strony z sześcioma wypunktowanymi wnioskami. Po nim następuje 1,5 stronicowe **Streszczenie** oraz 1,5 stronicowy **Abstract** oraz **Spis ilustracji** i **Spis Tabel**. Kończącą częścią pracy jest rozdział **Bibliografia** (20 stron; str. 87-107; ok. 20% objętości rozprawy) zawierający spis cytowanych prac w porządku alfabetycznym.

#### **Merytoryczna ocena pracy:**

Celem pracy doktorskiej Autorki było: „...poznanie skutków działania 3-bromopirogronianu na te właściwości komórek nowotworowych wybranych linii raka jelita grubego, które decydują o ich potencjale metastatycznym, a których istotny element stanowi katepsyna B...”

Jest to temat bardzo interesujący zarówno z czysto poznawczego jak i medycznego, potencjalnie terapeutycznego punktu widzenia. Co prawda katepsyna B jest enzymem kojarzonym głównie z lizosomami to jednak dane literaturowe wskazują na jej obecność na powierzchni komórek oraz na możliwość uwalniania tego enzymu (proenzymu) przez komórkę do macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto stwierdzono podwyższoną aktywność katepsyny B w stanach patologicznych związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi (choroba Alzheimera, demencja), w zespole Guillaina-Barrego, zapaleniu stawów, zapaleniu przyzębia, miopatiach sarkoidalnych, czy w chorobie Gauchera. Najwięcej zainteresowania budzi postulowana rola katepsyny B w proliferacji i inwazyjności nowotworów ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów jelita grubego, piersi czy jajnika. Próbowano wykorzystywać aktywność katepsyny B jako czynnik prognostyczny ze względu na jej rolę w rozluźnianiu struktury macierzy zewnątrzkomórkowej oraz ułatwianiu migracji i metastazy komórek nowotworowych. Stąd próby celowania terapii przeciwnowotworowej w katepsynę B, a także próby wykorzystania jej do ukierunkowania leków antynowotworowych najnowszych generacji.

Autorka w swojej pracy skupia się na ocenie wybranych parametrów biologicznych komórek nowotworu jelita grubego modyfikowanych, z udziałem katepsyny, poprzez podawanie 3BP. Wybór 3BP jest związany z jego stosowaniem jako czynnika testowanego jako lek antynowotworowy o działaniu alkilującym i hamującym także aktywność katepsyny B.





Autorka w swoich pierwszych eksperymentach przeprowadziła analizę efektu netto przeżywalności i proliferacji komórek układu modelowego raka jelita grubego linii Caco-2 oraz HCT-116, stwierdzając brak wpływu 3BP na komórki linii Caco-2 oraz na obniżenie w/w parametrów dla komórek HCT-116 w przypadku ich inkubacji przez 24h bez surowicy. W związku z tym mam pytanie do Autorki: jaki jest efekt inkubacji przez 48h? Pytanie jest o tyle zasadne, że w kolejnych eksperymentach np. testy migracji, inkubacje trwały też przez 48h. Ponadto, ze względu na półokres trwania oraz możliwość wyłapywania 3BP przez białka surowicy i obniżenia wolnego, dostępnego dla komórek 3BP wskazana byłaby kontrola lub weryfikacja tego zjawiska.

Autorka dalej wykazała, że 3BP obniża zdolność migracyjną obu linii komórkowych mierzoną testem zarastania rasy. Przy czym wykazano, że linia HCT-116 jest bardziej wrażliwa na 3BP co wydaje się korelować ze zmniejszoną przeżywalnością w warunkach eksperymentu (Ryc. 11.B). 3BP również obniża inwazyjność obu linii komórkowych, ale w różnym stopniu. Komórki Caco-2 są hamowane o około 60%, podczas gdy HCT-116 tylko o ok. 25%, czyli odwrotnie niż w przypadku migracji. W tym miejscu nie do końca się zgodzę ze stwierdzeniem Autorki, co do 10% różnicy w inwazyjności pomiędzy kontrolnymi liniami w kontroli. Uważam, że nie ma Pani przesłanek eksperymentalnych ani wystarczająco mocnych statystycznych danych, aby być uprawnioną do takiej tezy. Proszę Autorkę o komentarz/dyskusję w tej sprawie.

Interesujące wyniki przyniosły testy aktywności katepsyny B w obu liniach komórkowych (Ryc. 16 i 17) wskazujące na brak wpływu 3BP na aktywność wewnątrzkomórkową katepsyny B w komórkach linii HCT-116. Indukuje to wprost automatycznie pytanie o przyczynę tego zjawiska. Szczególnie w świetle kolejnych badań nad inhibicją oczyszczonego enzymu przez 3BP *in vitro*. (Ryc. 22). Natomiast sugestie Autorki przedstawione w Dyskusji (str. 74- 75) o mechanizmach odróżniających odmienną reakcję aktywności katepsyny B na podanie 3BP na obie linie nie do końca tłumaczą potencjalne mechanizmy. Proszę Autorkę o komentarz na ten temat.

Mam zastrzeżenie techniczne co do przeprowadzonego eksperymentu nad ekspozycją (nie ekspresją) katepsyny B na powierzchni komórek. Pomiar tylko jednego tysiąca komórek, w tak zaplanowanym układzie doświadczeń, i tylko w jednym eksperymencie, nie uważam za miarodajny (o ile tak było), a jedynie mogący sugerować pewien trend zachodzący w





komórkach. Ponadto Ryc. 18 i 19, a w szczególności oznaczenie liczbowe na osi liczby komórek może wprowadzić w błąd co do liczby (ułamkowej) komórek z określoną wartością fluorescencji kanału FL6.

Z badań nad aktywnością enzymatyczną katepsyny B w obecności 3BP oraz znanych, silnych środków alkilujących wynika, że 60% hamowania zapewnia 1,5 mM stężenie 3BP, podczas gdy 2-bromo-3-nitrofenon powoduje ponad 90% hamowania już przy stężeniu 0,25mM, a 60% hamowania - przy 0,05 mM. Wskazuje to na inhibicję kompetycyjną, a nie prostą alkilację jako mechanizm działania 3BP, czyli zjawisko zgodne z danymi literaturowymi. Analiza metodą spektroskopii masowej pozwoliła także potwierdzić brak alkilacji katepsyny B przez 3BP w warunkach testu.

W przejrzystej i dobrze napisanej **Dyskusji** Autorka umiejętnie przeprowadza czytelnika przez uzyskane wyniki konfrontując je z wcześniej uzyskanymi danymi eksperymentalnymi przez inne zespoły badawcze w takich samych lub innych warunkach eksperymentu. Moje zastrzeżenie budzi jedynie wspomniane już powyżej określenie „ekspresja błonowa” katepsyny B oraz nadinterpretacja danych pochodzących z eksperymentów z zastosowaniem metody FACS. W moim przekonaniu Autorka dość niezręcznie sformułowała wniosek nr III (str. 79), który powinien raczej dotyczyć obniżenia aktywności katepsyny B, a nie jej ilości (poziomu sekrecji) w medium hodowlanym, ponieważ pomiaru ilości nie prowadzono.

#### **Podsumowanie:**

Za najważniejsze osiągnięcia tej pracy uważam dokonanie oceny potencjału migracyjnego i potencjału inwazyjnego komórek układu modelowego eksponowanych na 3BP. Interesująco wyglądają też dane pokazujące różną wrażliwość obu linii komórek nowotworowych na hamowanie katepsyny B przez 3BP. Istotne znaczenie ma też wykazanie, że 3BP hamuje katepsynę B w sposób odwracalny i niezależny od potencjalnej aktywności alkilującej 3BP.

Wysoko oceniam więc trafność dobranej tematyki, a w szczególności ocenę wpływu 3BP na aktywność i sekrecję katepsyny B w komórkach nowotworowych w kontekście ich potencjału inwazyjnego.





Autorka formułuje w sposób sprawny i przejrzysty swoje hipotezy badawcze. W sposób trafny dokonała doboru narzędzi badawczych i sprawnie oraz bardzo umiejętnie zostały one wykorzystane do prowadzenia pracy eksperymentalnej.

Praca jest napisana poprawnym językiem polskim, jest bardzo starannie przygotowana, bez istotnych naleciałości żargonu laboratoryjnego. Styl jest przejrzysty i łatwy do śledzenia toku rozumowania Autorki. Stronę językowo-stylistyczną oceniam więc jako bardzo dobrą.

Bardzo dobrze oceniam dobór literatury i umiejętność selekcji istotnych publikacji przez Autorkę ponieważ ilość prac w tej tematyce jest dość znaczna. Moim zdaniem, selekcja odnośników literaturowych mogłaby być jeszcze bardziej rygorystyczna, gdyż bibliografia zajmuje aż ok. 1/5 objętości pracy.

Wszystkie w/w uwagi, sugestie i pytania do dyskusji z Autorką są w głównej mierze jedynie przyczynkiem do przedyskutowania interesujących aspektów jej pracy doktorskiej i nie umniejszają jej walorów poznawczych i naukowych.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani Izabeli Szczuki pt. „Wpływ 3-bromopirogronianu na właściwości katepsyny B w aspekcie potencjału metastatycznego komórek raka jelita grubego” spełnia wszystkie warunki określone w art.13, ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr. 65, Poz. 595, z późniejszymi zmianami).

W związku z tym proszę Wysoką Radę o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani Izabeli Szczuki do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

**K I E R O W N I K**Pracownik Biolek Jądrowych  
Wydziału Biotechnologii UWr  
Dr hab. Ryszard Rzepecki