



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

dr hab. inż. Barbara Jachimska, prof. IKiFP PAN
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera
Polska Akademia Nauk

Kraków 04.09.2020

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Anny Sobiepanek

pt. „Application of label-free methods in the diagnostics and prognostics of metastatic melanoma”

Przedstawiona praca doktorska mgr inż. **Anny Sobiepanek** pt. „Application of label-free methods in the diagnostics and prognostics of metastatic melanoma” została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem dr hab. inż. Tomasza Kobieli, prof. PW oraz promotora pomocniczego dr Małgorzaty Milner-Krawczyk.

Celem pracy było opracowanie bezznacznikowej metody pozwalającej na rozróżnienie komórek czerniaka z kolejnych etapów jego progresji na podstawie zmian profilu glikozylacji. Weryfikacji opracowanej metodyki poprzez prawidłową klasyfikację komórek wyizolowanych od pacjentów z potwierdzonymi przerzutami czerniaka. Ponadto ocenę zmian profilu glikozylacji komórek czerniaka pod wpływem wybranego związku biologicznie czynnego (endokannabinoid Anandamid).

Czerniak jest jednym z najbardziej agresywnych nowotworów złośliwych skóry. W ocenie choroby stosowane są dwie klasyfikacje patomorfologiczne, z których jedna bazuje na głębokości naciekania poszczególnych warstw skóry (klasyfikacja Clarka), zaś druga na głębokości naciekania skóry w milimetrach (klasyfikacja Breslow). W klasyfikacji klinicznej czerniaka stosowana jest skala TNM. W skali TNM ocenie poddaje się stopień zaawansowania pierwotnego guza (cecha T), występowanie przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (cecha N - nodule) oraz obecność przerzutów odległych (cecha M – metastases). O ile wczesne stadia choroby pozwalają na 97% wyleczenia (poprzez usunięcie czerniaka miejscowego), to czerniak przerzutowy jest najbardziej śmiertelną formą choroby i jest bardzo trudny w leczeniu farmakologicznym. Wciąż dużym wyzwaniem jest opracowanie metodologii pozwalającej na szybką i skuteczną ocenę właściwości komórek prawidłowych, komórek pochodzących z pierwotnych ognisk nowotworu oraz agresywnych komórek z przerzutów. Opracowanie bezznacznikowych markerów zmian chorobowych może być użytecznym narzędziem w diagnostyce klinicznej, monitorowaniu przebiegu choroby czy prowadzeniu terapii.

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska
tel. +4812 639 51 01, +4812 425 19 23
fax +4812 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego
PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004
NIP: 6750001805, REGON: P-000326351



Przedstawiona rozprawa doktorska napisana jest w języku angielskim i ma charakter eksperymentalny. Praca obejmuje łącznie 236 stron i składa się z 6 rozdziałów obejmujących: wprowadzenie dotyczące aktualnego stanu wiedzy na temat czerniaka, w którym autorka przedstawiła wiele istotnych zagadnień (najczęściej używane modele badawcze czerniaka, czynniki ryzyka, diagnostyka oraz przebieg leczenia, stosowane obecnie metody znacznikowe jak i bezznacznikowe, mechanizm procesu glikozylacji oraz działanie układu endokannabinoidowego komórek) (79 stron), opis metod badawczych zastosowanych w pracy (27 stron), opracowanie wyników badań własnych oraz dyskusję (74 strony), podsumowanie (4 strony), perspektywę dalszych badań oraz przegląd literaturowy (376 pozycji). Forma edycyjna pracy przygotowana jest bardzo dobrze. Sumarycznie rozprawa zawiera aż 101 rysunków oraz 35 tabel. W części doświadczalnej autorka przedstawia zarówno sposób przygotowania próbek biologicznych jak i techniki pomiarowe zastosowane na poszczególnych etapach prowadzonych prac eksperymentalnych. Szeroka gama zastosowanych technik pomiarowych pozwoliła autorce wielopłaszczyznowo analizować korelacje pomiędzy właściwościami komórek czerniaka w różnym stadium progresji.

Prace doświadczalne zostały podzielone na trzy części. W pierwszej części przeprowadzono charakterystykę komercyjnych linii komórkowych jako układów modelowych. Badania prowadzono dla 7 linii komórkowych różniących się stadium zaawansowania czerniaka (komórki prawidłowe -melanocyty HEMa-LP, komórki z poziomej fazy wzrostu czerniaka -WM35, z pionowej fazy wzrostu czerniaka -WM115, komórki metastatyczne -WM266-4, MeWo, A375-P i G-361). W ramach badań przeanalizowano cechy linii komórkowych takie jak szybkość wzrostu, morfologię oraz właściwości mechaniczne. Do weryfikacji stopnia glikozylacji komórek zastosowano jedną z rodzaju lektyn-Konkanawalinę A (Con A), która wiąże się specyficznie do mannozy i glukozy. Oddziaływanie pomiędzy lektyną a glikanami obecnymi na powierzchni komórek analizowano z zastosowaniem mikrowagi kwarcowej z monitorowaną dyssypacją energii (QCM-D). Mikrowaga kwarcowa (QCM-D) stanowi niewielkie urządzenie służące do pomiaru adsorpcji makromolekuł, białek i nanocząsteczek na granicy faz ciec/ciało stałe. Zasada działania opiera się na obserwacji zmian częstotliwości rezonansowej kryształu kwarcu w skutek przyrostu masy w procesie adsorpcji na jego powierzchni (Δf). Technika QCM-D pozwala, także na monitorowanie dyssypacji energii (ΔD), której wartość skorelowana jest w właściwościami wiskoelastycznymi zaadsorbowanej warstwy. Autorka na podstawie zmian $\Delta D/\Delta f$ zdefiniowała parametr VI (*ang. viscoelastic index*), który bezpośrednio można skorelować ze stadium zaawansowania czerniaka. Pomiaru QCM-D przeprowadzono w dwóch trybach pomiarowych: i) poprzez hodowanie komórek bezpośrednio na sensorze QCM-D (*ang. cell-based sensors*) oraz ii) poprzez podawanie komórek do układu w formie zawiesiny (*ang. suspension cell-based sensors*). Drugi tryb pozwala na skrócenie całego cyklu pomiarowego i jest bardzo efektywny w przypadku prowadzenia badań układów biologicznych. Wyniki otrzymane z zastosowaniem metody QCM-D porównano z testem ELISA z użyciem lektyny, mikrotermoforezą oraz mikroskopią AFM. Wszystkie otrzymane wyniki potwierdziły możliwość identyfikacji komórek czerniaka z różnych faz jego wzrostu, przy wykorzystywaniu do badań zmiany efektywności oddziaływania pomiędzy Konkanawaliną A a glikanami obecnymi na powierzchni badanych komórek.

W drugiej części badania prowadzono na komórkach wyizolowanych od pacjentów ze zdiagnozowanym czerniakiem (pacjentów Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie) o różnym stopniu zaawansowania choroby. Prace prowadzono dla pięciu



linii komórkowych pobranych z węzłów chłonnych (biopsja 1 - komórki M1, M7, M16, M28; biopsja 2 - komórki M9). Wyizolowane komórki scharakteryzowano pod kątem szybkości wzrostu, morfologii oraz właściwości mechanicznych. Potwierdzono występowanie w komórkach markerów typowych dla czerniaka za pomocą barwienia immunohistochemicznego (S-100, HMB-45) oraz analizy qPCR (*MLANA*). Stosując metodę QCM-D określono właściwości viskoelastyczne układu w wyniku oddziaływania lektyny z glikanami obecnymi na powierzchni komórek. Wartość parametru VI skorelowano z poziomem progresji czerniaka oraz dodatkowo potwierdzono poprzez zmodyfikowany test ELISA.

Ostatnia trzecia część badań dotyczyła modyfikacji profilu glikozylacji komórek czerniaka w wyniku działania potencjalnego leku, w tym przypadku anandamidu (AEA). Zbadano działanie tego związku na komercyjne linie komórkowe czerniaka z zastosowaniem testu MTT, barwienia komórek oraz pomiarów właściwości mechanicznych. Wyniki uzyskane za pomocą metody QCM-D potwierdzają, że traktowanie komórek metastatycznych anandamidem powoduje zmiany w profilu ich glikozylacji. Zweryfikowano również szybkość migracji komórek w wyniku działania AEA oraz analizowano czy traktowanie komórek potencjalnym lekiem może zmieniać ekspresję genów kodujących kluczowe enzymy szlaku biosyntezy glikanów (*GFAT-1* i *DMPI*).

Pracę doktorską kończy zwięzłe podsumowanie otrzymanych wyników pomiarowych oraz perspektywa dalszych badań. Jak przedstawiła autorka w podsumowaniu zastosowanie metody QCM-D pozwoliło na opracowanie metodologii rozróżnienia komórek z różnych faz wzrostu czerniaka (melanocyty, komórki z poziomej i pionowej fazy wzrostu oraz komórki przerzutowe) za pomocą badania oddziaływania lektyny i glikanów zlokalizowanych na powierzchni komórek. Poprawność metodologii badawczej została potwierdzona za pomocą kilku innych metod biochemicznych. Wartość parametru VI może stanowić w przyszłości obiecujący indyktor prognostyczny czerniaka. Weryfikacja metodologii pozwoliła w pełni osiągnąć autorce cel rozprawy dotyczący opracowania bezznacznikowej metodologii oceny progresji stanu komórek czerniaka.

Opracowana przez doktorantkę metodologia badawcza ma dużą wartość poznawczą oraz aplikacyjną. Jednakże chciałabym, aby autorka ustosunkowała się do kilku aspektów, które moim zdaniem mają istotny wpływ na omawiane zagadnienie oraz kierunek dalszych badań.

- i) Do modyfikacji sensora QCM-D zastosowano kationowy polielektrolit polilizynę (PLL), którego konformacja jest bardzo silnie skorelowana zarówno z pH jak i siłą jonową roztworu. Parametry te będą decydować o topografii warstwy adsorpcyjnej, a tym samym adhezji komórek na jej powierzchni.
- ii) W pracy bardzo marginalnie przedstawiona została charakterystyka fizykochemiczna lektyny Con A. Przedstawienie podstawowych właściwości tego białka w kontekście oddziaływania z glikanami rozszerzyłoby aspekt poznawczy zagadnienia.
- iii) Pytanie co jest powodem tak specyficznego zachowania się lektyny Con A na powierzchni wybranych typów sensorów. Zarówno sensor pokryty warstwą krzemu jak i złota posiada w tych warunkach ujemny ładunek, ale obie powierzchnie różnią się stopniem hydrofobowości. Punkt izoelektryczny lektyny Con A występuje w pH 5, więc w pH 7,5 jest ujemnie naładowana.
- iv) Wyniki QCM-D zostały przedstawione dla nadtonu 7. Czy odpowiedź układu dla różnych nadtonów była podobna? Na podstawie zmian dysypacji można



domniemywać że nie, gdyż otrzymane warstwy cechują się dyssypacją $>1 \times 10^{-6}$, czyli są elastyczne. W metodzie QCM-D każdy nadton odzwierciedla informację w stosunku do odległości od powierzchni sensora. Ze względu na to, iż komórki są sporych rozmiarów, grubość tworzonego filmu na powierzchni sensora będzie dość duża. Ponadto w przypadku oddziaływania lektyny z glikanami należy się spodziewać, iż głównie zmieniać się będzie zewnętrzna otoczka komórki, a nie jej całość.

- v) Badania z zastosowaniem metody QCM-D pozwoliły na obserwację zmian właściwości wiskoelastycznych komórek w wyniku oddziaływania z lektyną Con A. Sugeruję zastosowanie powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR), który umożliwi analizę ilościową oddziaływania lektyny z glikanami oraz określenie stopienia hydratacji warstw.
- vi) Należy zwrócić uwagę, że krzywe adsorpcji lektyny na powierzchni komórek można podzielić na dwa etapy, liniowy dla krótkich czasów adsorpcji oraz eksponentylny dla długich. Właśnie na podstawie liniowej zależności autorka wyznaczała wartość parametru VI.
- vii) Efektywność oddziaływania lektyny z wybranymi komórkami zmienia się wraz ze stężeniem. W jaki sposób dobrano warunki eksperymentalne dla serii pomiarowej przedstawionej na rys.82 oraz Tab.28? W przypadku wyższych stężeń lektyny Con A obserwuje się znacznie większe różnice w odpowiedzi komórkowej niż przy niskich stężeniach.
- viii) Autorka zaobserwowała wpływ rodzaju rozpuszczalnika na wartość dyssypacji układu. Największy wpływ zaobserwowano w przypadku zastosowania etanolu. Z danych literaturowych wiadomo, iż etanol ma istotny wpływ na zmianę struktury białek. Przy wysokich stężeniach powoduje ich agregację lub nieodwracalną denaturację układu.

Praca generalnie napisana jest w sposób zrozumiały dla czytelnika, jednak w tekście zdarzają się nieliczne omyłki. Powyższe uwagi nie zmieniają mojej pozytywnej opinii na temat recenzowanej pracy doktorskiej. Autorka wykazała, że umie sformułować cele badawcze i zaplanować eksperymenty w celu ich osiągnięcia. Autorka posługuje się również doskonale współczesną literaturą naukową w uprawianej dziedzinie, o czym świadczą wyczerpujące cytowania najważniejszych publikacji w tym zakresie. Wybór szerokiej gamy metod eksperymentalnych dowodzi, iż mgr inż. Anna Sobiepanek jest dojrzałym naukowcem zasługującym na stopień naukowy doktora nauk chemicznych.

Dorobek mgr inż. Anny Sobiepanek obejmuje 6 publikacji. Wszystkie prace są anglojęzyczne i opublikowane w renomowanych czasopiśmie naukowych o zasięgu międzynarodowym o IF od 0,452 do 9,518 (łącznie IF = 24,794). Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż w czterech publikacjach mgr inż. Anna Sobiepanek jest głównym autorem, a w jednej autorem korespondencyjnym. Posiada również spory dorobek konferencyjny. W trakcie realizacji pracy doktorskiej uczestniczyła łącznie w 15 konferencjach międzynarodowych oraz 23 krajowych. Otrzymała liczne nagrody i wyróżnienia za działalność naukową. Brała udział w realizacji 5 grantów w tym była kierownikiem grantu Preludium. Za swoją działalność naukową otrzymała kilkakrotnie stypendium dla najlepszych doktorantów przyznawane przez Rektora Politechniki Warszawskiej.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca doktorska przedstawia istotną wartość pod względem poznawczym i aplikacyjnym, a tym samym posiada elementy nowości w zakresie dziedziny nauk chemicznych. W związku z tym stwierdzam, że rozprawa



Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera
Polskiej Akademii Nauk



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

doktorska mgr inż. Anny Sobiepanek pt. „Application of label-free methods in the diagnostics and prognostics of metastatic melanoma” spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65/2003 poz. 595). Wobec powyższego wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Anny Sobiepanek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Przygotowanie rozprawy doktorskiej wymagało od Pani Anny Sobiepanek opanowania wielu technik doświadczalnych i wykonania szeregu pracochłonnych pomiarów biochemicznych. Odpowiednio dobrane techniki pomiarowe pozwoliły autorce wielopłaszczyznowo analizować korelacje pomiędzy właściwościami komórek czerniaka w różnym stadium progresji. Istotnym narzędziem do obserwacji tego procesu była mikrowaga kwarcowa z pomiarem dyssypacji energii (QCM-D). Uznając nowatorskie osiągnięcia w opracowaniu bezznacznikowej metody służącej do diagnostyki czerniaka oraz ze względu na wysoki potencjał aplikacyjny przeprowadzonych badań wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Sobiepanek.

dr hab. inż. Barbara Jachimska, prof. IKiFP PAN