

dr hab. Małgorzata Przybyło, prof. UJ
e-mail: malgorzata.przybylo@uj.edu.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 7.09.2020 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Anny Sobiepanek**

**pt. „ Application of Label-free Methods
in the Diagnostics and Prognostics of Metastatic Melanoma”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Sobiepanek została wykonana pod opieką Pana dr hab. inż. Tomasza Kobieli, prof. PW, w Laboratorium Badania Oddziaływań Biomolekularnych Katedry Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Promotorem pomocniczym była Pani dr Małgorzata Milner-Krawczyk z tej samej Katedry.

W Laboratorium Badania Oddziaływań Biomolekularnych, którego kierownikiem jest dr hab. inż. Tomasz Kobiela, prof. PW, od wielu lat trwają badania związane z tematyką dotyczącą różnych procesów patologicznych skóry. W badaniach *in vitro* przy użyciu głównie metod bezznacznikowych analizowane są m.in. melanocyty i komórki czerniaka w celu poszukiwania biofizycznych markerów procesu nowotworzenia, ale również analizowany jest wpływ różnych czynników zewnętrznych (biologicznych, chemicznych oraz fizycznych) na poszczególne typy komórek skóry. W Laboratorium ponadto przy użyciu biofizycznych technik badawczych *ex vivo* we współpracy z medycznymi ośrodkami naukowymi poddawane są analizie próbki pochodzące od pacjentów z chorobami skóry (m.in. z łuszczycą czy atopowym zapaleniem skóry). Z kolei we współpracy z przemysłem prowadzone są również badania *in vivo* w celu personalizacji zabiegów kosmetycznych i pielęgnacyjnych. Badania prowadzone w ramach pracy

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fiziologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

doktorskiej przez Panią mgr inż. Annę Sobiepanek wpisują się zatem w profil zainteresowań naukowych Promotora i ściśle łączą się z działalnością naukową Jednostki.

W swojej rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Anna Sobiepanek podjęła się próby weryfikacji dwóch hipotez zakładających, że:

1. profil glikozylacji powierzchniowej komórek czerniaka można wykorzystywać do rozróżniania komórek pochodzących z różnych etapów progresji nowotworu przy użyciu metod bezznacznikowych,
2. metody bezzacznikowe pozwalają na monitorowanie zmian zachodzących w profilu glikozylacji komórek pod wpływem stosowanego leczenia.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Jako szczegółowe cele Doktorantka wskazała (cytuję):

1. opracowanie metod rozróżniania komórek z kolejnych etapów progresji czerniaka na podstawie zmian w ich profilu glikozylacji wykorzystując w tym celu metody bezzacznikowe,
2. sprawdzenie czy opracowana metodyka umożliwi prawidłową klasyfikację komórek wyizolowanych od pacjentów z potwierdzonymi przerzutami czerniaka,
3. badanie zmian w profilu glikozylacji komórek czerniaka pod wpływem wybranego związku biologicznie czynnego (endokannabinoid Anandamid) jako potencjalnego czynnika terapeutycznego.

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

Czerniak złośliwy jest nowotworem wywodzącym się z melanocytów, komórek produkujących melaninę, która nie tylko nadaje kolor skórze, włosom czy tęczówce oka, ale też chroni materiał genetyczny przed szkodliwym działaniem promieniowania ultrafioletowego i powstającymi pod jego wpływem reaktywnymi formami tlenu. Czerniak może rozwijać się wszędzie tam gdzie znajdują się melanocyty – w skórze (w 90% przypadków), błonach śluzowych czy oku. Charakteryzuje się on szybkim tempem wzrostu, cechuje go duża inwazyjność, szybkie dawanie przerzutów i odporność na stosowane terapie. Warto wspomnieć, że chociaż czerniak jest diagnozowany

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

jedynie w przypadku 5-7% nowotworów skóry, to odpowiada aż za 80% zgonów spowodowanych nowotworami skóry. Zachorowalność na czerniaka w skali ogólnoswiatowej na przestrzeni ostatnich 60. lat wzrosła aż 20-krotnie. Biorąc pod uwagę powyższe kwestie, uważam, że wybór tematu pracy doktorskiej był uzasadniony i podyktowany aktualnym stanem wiedzy, a opracowana procedura (użyteczność parametru VI i powinowactwa) może w przyszłości być polecana jako dodatkowa procedura badawcza podczas diagnozowania czy prognozowania rokowań pacjentów z czerniakiem.

Rozprawa doktorska została napisana w formie klasycznej, 236-stronnicowej monografii w języku angielskim zawierającej 35 tabel i łącznie 101 rycin i wykresów, dodatkowo opatrzona jest streszczeniem w języku polskim. Na podkreślenie zasługuje bogata bibliografia obejmująca 376 pozycji, z czego jedną trzecią stanowią prace opublikowane w ciągu ostatnich pięciu lat, a w ciągu ostatnich 10 lat – dwie trzecie. Rozprawa doktorska ma standardowy układ z podziałem na następujące rozdziały: Streszczenia w języku polskim i angielskim, *Introduction and aim of the thesis, State of art, Materials and methods, Results and discussion, Conclusions, Future perspectives, References, Supplemental materials*. A ponadto zawiera ona dodatkowe zestawienia: *List of articles included in this Ph.D. thesis, List of the most important conference presentation connected with the Ph.D. thesis, List of abbreviations* oraz *Cell line abbreviations – used in this thesis*. Struktura pracy jest przejrzysta i przemyślana, ale zaskakuje położenie spisu treści w rozprawie doktorskiej. Rolą spisu treści jest bycie podstawowym przewodnikiem po zawartości dokumentu, a zatem ma on ułatwiać nawigowanie i szybkie odnalezienie pożądanych treści w rozprawie doktorskiej. Z tego powodu uważam, że powinien się on znajdować bezpośrednio po dedykacji i podziękowaniach, a dodatkowo powinny w nim być ujęte również oba streszczenia i zestawienia znajdujące się na stronach od 7. do 19. Nie znajduję też specjalnego uzasadnienia dla wyłączenia skrótów dotyczących linii komórkowych z ogólnego spisu stosowanych

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

skrótów oraz umieszczenia informacji o darczyńcach niektórych linii komórkowych na str. 19, a nie w odpowiedniej sekcji Materiałów i metod.

Streszczenia w języku angielskim i języku polskim w sposób jasny i zwięzły oddają treść rozprawy doktorskiej. Zawierają one wszystkie niezbędne elementy: precyzyjne uzasadnienie wyboru tematu, powiązanie problematyki badawczej z aktualnym stanem wiedzy i oczekiwaniami społecznymi, skrótowy opis stosowanych metod badawczych oraz otrzymanych najważniejszych rezultatów, a także wnioski. Do tej części mam dwie uwagi:

1. zabrakło precyzji przy wymienianiu najważniejszego niegenetycznego czynnika ryzyka rozwoju czerniaka złośliwego - jest nim nadmierna ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe (zarówno naturalne, jak i sztuczne), a nie na promieniowanie słoneczne (str. 7 i 11). Problem ten zresztą Doktorantka omawia szczegółowo w rozdziale 2.1.5.
2. w piśmiennictwie polskojęzycznym powinno używać się określenia „przejście epitelialno-mezenchymalne” a nie „tranzycja epitelialno-mezenchymalna”.

Przegląd literatury (*State of art*) to obszerne, 70-stronnicowe zgrabnie napisane kompendium wiedzy na temat czerniaka, modeli wykorzystywanych do jego badania, systemu endokannabinoidowego uznawanego za obiecujący cel terapeutyczny w chorobach nowotworowych ze względu na jego powiązanie z metabolizmem glukozy i lipidów, glikozylacji będącej jedną z najpowszechniejszych modyfikacji nie tylko białek, ale też lipidów, oraz nowatorskich metod stosowanych podczas badania nowotworów. W tej części szczegółowo przedstawiono budowę skóry, charakterystykę melanocytów, krótko wspomniano typy nowotworów skóry, by ostatecznie opisać typy czerniaka, etapy jego progresji, zmiany molekularne zachodzące podczas transformacji nowotworowej i ich skutki dla przekaznictwa sygnałów, zmiany fenotypu ułatwiające tworzenie ognisk wtórnych, epidemiologię, metody

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>

diagnostyczne oraz metody stosowane w leczeniu pacjentów z czerniakiem.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Do tej części mam dwie uwagi:

1. w legendzie do Ryciny. 3 (Fig. 3) dobrze byłoby powtórzyć rozwinięcia skrótów stosowanych dla poszczególnych typów czerniaka, nie byłoby wówczas konieczności odwoływania się do głównego tekstu,
2. wielkość czcionki na Rycinach 5-7 (Fig. 5-7) jest zbyt mała; dodatkowo wybrane kolory (czerwony i zielony) powodują, że test na Rycinie 5 (Fig. 5) jest prawie nieczytelny.

Wydział Biologii

Część poświęcona glikozylacji jest stosunkowo krótka, ale porusza najważniejsze zagadnienia czyli typy glikanów i ich biosyntezę, biologiczne funkcje glikanów w stanach fizjologicznych i patologicznych, możliwości wykorzystania lektyn jako narzędzia umożliwiającego poznanie struktur glikanów wraz ze szczegółową charakterystyką konkanawaliny A, wykorzystywanej w niniejszych badaniach. Na szczególne wyróżnienie zasługuje prezentacja treści i jakość Rycin 29 i 30 (Figs. 29 i 30) schematycznie pokazujących procesy biosyntezy odpowiednio donorów monosacharydów oraz N-oligosacharydów.

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

Do tej części mam następujące uwagi:

1. w tej części pracy brakuje mi informacji dotyczących opisu jakiego typu zmiany w profilu glikozylacji stwierdzane są w komórkach czerniaka i jakie są tego konsekwencje,
2. opisując wpływ glikozylacji na funkcję białek adhezyjnych (tutaj kadheryn, integryn i selektyn) warto było skorzystać z artykułu autorstwa D. Hoja-Łukowicz i in. opublikowanego w *Biochim. Biophys. Acta* (2017) 1861:3237-3257,
3. tytuł rozdziału 2.6.2. jest nieadekwatny do treści; opisywane tam funkcje glikanów dotyczą nie tylko poziomu komórkowego,
4. definicja lektyny przedstawiono na str. 85 jest niepełna; lektyna to faktycznie białko lub glikoproteina pochodzenia

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

nieimmunologicznego, ale charakteryzują ją jeszcze dwie cechy: specyficzne rozpoznawanie określonych struktur cukrowych i brak aktywności katalitycznej stosunku do nich,

5. część informacji przedstawionych na Rycinie 28 (Fig. 28) jest zupełnie nieczytelna, dotyczy to zwłaszcza typów wiązań pomiędzy poszczególnymi monosacharydami.

Szczególnie wartościową część przeglądu literatury (*State of art*) stanowi moim zdaniem opis modeli wykorzystywanych podczas badań nad czerniakiem. Usystematyzowana charakterystyka każdego z nich, dokładne omówienie zalet i ograniczeń każdego z tych modeli może być swoistym przewodnikiem dla początkujących badaczy. W świetle metodologii badań prowadzonych przez mgr inż. Annę Sobiepanek, kolejnym ważnym rozdziałem jest ten przedstawiający technikę izolacji komórek czerniaka z biopsji, wyprowadzania hodowli, a także ocena użyteczności każdego z typów hodowli (monowarstwy *versus* sferoidy). Interesujące są również rozważania Doktorantki na temat użyteczności próbek biologicznych (płynów ustrojowych, komórek i/lub tkanek) jak źródła biomarkerów czy możliwości ich wykorzystania w celach diagnostycznych, jak również dogłębna analiza dotycząca stosowania metod znacznikowych i bezznacznikowych w badaniach nad nowotworami.

Badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały przeprowadzone przy użyciu siedmiu ustalonych linii komórkowych czerniaka oraz pięciu linii komórkowych czerniaka samodzielnie wyprowadzonych przez Doktorantkę z przerzutów do węzłów chłonnych. Co ważne mgr inż. Anna Sobiepanek nie tylko samodzielnie wyprowadziła te linie, ale też dokonała optymalizacji nieenzymatycznej metody izolacji melanocytów z tkanki opracowanej przez dr Anetę Scieżyńska z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego adaptując ją na potrzeby izolacji komórek czerniaka z biopsji. Opis metodyki badań zajął mgr inż. Annie Sobiepanek 27 stron. Poszczególne procedury zostały przedstawione bardzo szczegółowo, a dodatkowym walorem było zamieszczanie zasad tych metod, które w niektórych

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

przypadkach zostały dodatkowo uzupełniane poglądowymi schematami – Ryciny 38-43 (Figs. 38-43). Bioinformatyczna analiza uzyskanych wyników została przeprowadzona wyczerpująco przy użyciu adekwatnych testów statystycznych. Jedyne niedociągnięcie jakie zauważyłam dotyczy podawania liczby obrotów na minutę (rpm) zamiast wartości siły odśrodkowej przy opisie warunków wirowania. Na szczególne podkreślenie i wyróżnienie zasługuje liczba, różnorodność i szeroki zakres metod zastosowanych przez Doktorantkę do realizacji założonych celów. Wskazuje to, że mgr inż. Anna Sobiepanek posiada już nie tylko duże doświadczenie, ale potrafi też planować i prowadzić badania. W tej części rozprawy doktorskiej wymienione zostały Osoby i jednostki naukowe oraz medyczne, z którymi Doktorantka współpracowała prowadząc badania. Realizacja badań prowadzonych przez Doktorantkę w ramach niniejszej pracy doktorskiej została częściowo sfinansowana ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM 14. Dodatkowo mgr inż. Anna Sobiepanek była stypendystką konkursu ETIUDA 6.

Otrzymane wyniki i ich dyskusja zostały umieszczone w jednym rozdziale, co było bardzo dobrą koncepcją, a podział tego rozdziału na trzy sekcje jest spójny z założonymi celami badań. Wyniki są dobrze udokumentowane i przedstawione łącznie na 57 wykresach i rycinach oraz dodatkowo w 22 tabelach, przejrzystych i opatrzonych informatywną legendą. Na podkreślenie zasługuje wysoka jakość zdjęć mikroskopowych. W przypadku Rycin 44 i 77 (Figs. 44 i 77) sugerowałabym jednak użycie czcionki koloru czarnego, analogicznie jak ma to miejsce w przypadku Rycin 73 i 76 (Figs. 73 i 76), wówczas skala byłaby lepiej widoczna. Opis uzyskanych wyników jest bardzo szczegółowy i przejrzysty, pozwala prześledzić tok i zasadność obranej procedury badawczej. Dyskusja wyników jest dogłębna i wieloaspektowa, świadczy o dobrej znajomości literatury przedmiotowej i umiejętnościach analitycznych. Szczególnie cenna jest weryfikacja uzyskanych przez mgr inż. Annę Sobiepanek pod kątem spójności z danymi literaturowymi. Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

pozwoły na opracowanie dwóch procedur pomiarowych, które wykorzystując oddziaływanie konkanawaliny A z komórkami czerniaka wysianymi na sensorach oraz komórkami czerniaka w zawieszynie pozwoliły na rozróżnienie komórek pochodzących z różnych faz wzrostu nowotworu (komórki prawidłowe, komórki czerniaka z fazy horyzontalnej, wertykalnej lub przerzutowej), a przydatność tego modelu została następnie zweryfikowana z wykorzystaniem komórek pochodzących od pacjentów z czerniakiem przerzutowym. W mojej opinii przeprowadzone badania pozwoliły na zrealizowanie wszystkich założonych celów.

Wydział Biologii

Do tej części mam następujące uwagi:

1. melanocyty, a zatem też komórki czerniaka są komórkami pochodzenia neuroektodermalnego; zatem pisząc o komórka czerniaka powinno się używać terminu komórki nowotworowe (ang. tumor cells) a nie komórki rakowe (ang. cancer cells),
2. na str. 124 napisano (cytuję): The highest expression (of the *CDH2* gene) was in the WM793 cell line from the VGP site...; Czy ta informacja nie dotyczy raczej linii WM115? Linia WM793 nie była wykorzystywana w niniejszych badaniach.

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

Część wyników prezentowanych w rozprawie doktorskiej została opublikowana w prestiżowym anglojęzycznym czasopiśmie Biosensors & Bioelectronics (liczba punktów MNiSW – 200; IF z roku opublikowania – 8,173, obecny IF czasopisma – 10,257). W tym artykule pierwszym autorem jest mgr inż. Anna Sobiepanek, co wyraźnie wskazuje na wiodący wkład Doktorantki w powstanie tej pracy. Dodatkowo, teoretyczne aspekty dotyczące zagadnień omawianych w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w postaci czterech artykułów przeglądowych lub rozdziałów w monografiach (trzech anglojęzycznych i jednej polskojęzycznej). W tych pracach Doktorantka jest również pierwszym autorem i dodatkowo jest też autorem korespondencyjnym. Wyniki badań prezentowanych w rozprawie doktorskiej były przedstawiane podczas pięciu międzynarodowych i trzech krajowych konferencjach naukowych. Jakość, nowatorstwo badań i sposób

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

prezentacji wyników przez Panią mgr inż. Anna Sobiepanek zostały docenione

- Doktorantka została trzykrotnie nagrodzona podczas Ogólnopolskiej Konferencji „Postępy w Badaniach Biomedycznych” (w latach 2016, 2017 i 2019) za najlepszą prezentację ustną oraz wyróżniona nagrodą publiczności za najlepszy plakat prezentowany podczas międzynarodowej konferencji „Science: Polish Perspectives” Meetup w Berlinie w 2017 roku.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr inż. Anny Sobiepanek pod tytułem „Application of Label-free Methods in the Diagnostics and Prognostics of Metastatic Melanoma” jest oryginalna i ma nowatorski charakter, a przedstawione w niej wyniki własnych badań wnoszą istotny wkład w rozwój dyscypliny. Uwzględniając wszystkie elementy przeprowadzonej oceny, z całą pewnością stwierdzam, że rozprawa spełnia w pełni wszystkie ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Sobiepanek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Jednocześnie mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny rozprawy doktorskiej i jakość jej przygotowania, interdyscyplinarny charakter badań, aktualność podjętej tematyki badań, złożoność warsztatu metodycznego i wagę uzyskanych wyników własnych, które już częściowo zostały opublikowane w renomowanych, wysoko punktowanych czasopismach i niewątpliwie wpłyną na rozwój dyscypliny, wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Sobiepanek stosowną nagrodą.

Małgorzata Fajkus

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Biochemii

Glikokoniugatów

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: 12 664 64 62

fax: 12 664 51 01

<http://www.uj.edu.pl/web/instytut-zoologii/jednostka/struktura/zaklad-biochemii-glikokoniugatow>