



Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz
Katedra Biofizyki Molekularnej
Uniwersytetu Łódzkiego

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Sarny pt.
„Melanin granules modify nanomechanical properties of
melanoma cells and inhibit invasive abilities of the cells”**

Mimo wielu dziesięcioleci badań, ciągle nie rozumiemy wielu aspektów choroby nowotworowej i nie zawsze dysponujemy odpowiednimi narzędziami diagnostycznymi dla wczesnej jej detekcji i prognozy rozwoju. Ogromny postęp na tym polu zawdzięczamy biologii molekularnej i proteomice, jednak zastosowanie metod biofizyki może także dostarczyć cennych danych. Świetnym argumentem na rzecz słuszności tej tezy może być rozprawa doktorska mgr Michała Sarny. Doktorant zastosował w niej technikę mikroskopii sił atomowych dla oceny wpływu zawartości melaniny na nanomechaniczne właściwości komórek czerniaka; drugim celem pracy była ocena wpływu ziaren melaniny na inwazyjność komórek czerniaka w modelu *in vitro*.

Rozprawa doktorska mgr Michała Sarny ma formę zestawu trzech ściśle powiązanych tematycznie publikacji i zwięzłego omówienia wyników w języku angielskim (zaopatrzonego w streszczenie w języku polskim). Publikacje wchodzące w skład rozprawy ukazały się w czasopismach *Pigment Cell & Melanoma Research* (impact factor 5.839) i *Experimental Dermatology* (impact factor 4.115), a trzecia w materiałach pokonferencyjnych *17th Meeting of the Society for Pigment Cell Research* (Genewa, 2012). Załączone oświadczenia współautorów nie zawierają oszacowania procentowego udziału wszystkich współautorów (moim zdaniem będącego zupełnym nieporozumieniem ze względu na arbitralność i brak obiektywnych kryteriów ustalania takiego wkładu), natomiast (zgodnie z zaleceniami Centralnej Komisji ds. Stopni i Tytułów) określają

rzeczowo wkład współautorów w powstanie publikacji. Oświadczenia te nie pozostawiają wątpliwości co do decydującej roli mgr M. Sarny w powstaniu tych publikacji, obejmującej w szczególności opracowanie koncepcji pracy i zaplanowanie doświadczeń, opracowanie modelu komórkowego, opracowanie sposobu szybkiego zbierania krzywych siłowych umożliwiającego zmierzenie wystarczającej liczby żywych komórek, przeprowadzenie pomiarów lub udział w ich przeprowadzeniu, przygotowanie manuskryptu publikacji i ostatecznych odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mgr Michał Sarna jest pierwszym autorem i autorem korespondującym wszystkich publikacji.

Idea pracy jest zdumiewająco prosta i oryginalna. Komórki czerniaka zawierają ziarna melaniny, których – w przeciwieństwie do melanocytów – nie są w stanie przekazywać innym komórkom; gromadzone w nich ziarna melaniny muszą wpływać na właściwości mechaniczne tych komórek. Optymalną techniką pozwalającą zmierzyć ilość melaniny jest technika EPR, zaś znakomitą techniką, która umożliwia pomiar właściwości mechanicznych komórek jest mikroskopia sił atomowych. Obie te techniki, uzupełnione o techniki mikroskopii optycznej i metody biologii komórkowej, były podstawą metodyki badań stosowanych w pracach składających się na rozprawę doktorską mgr M. Sarny.

Dobór komórek do badań nie był łatwy, bowiem komórki większości linii czerniaka tracą melanicę w warunkach hodowli *in vitro*; Doktorant użył w badaniach komórki ludzkiego czerniaka SKMEL-188 i komórki mysiego czerniaka B16F10. Dla porównania badał normalne melanocyty człowieka. Analiza danych uzyskanych techniką mikroskopii siła atomowych nie była prosta, bowiem badany materiał (komórki) nie spełniają założeń modelu Hertza opisującego odkształcenia plastyczne i konieczne było opracowanie specjalistycznego oprogramowania dla analizy krzywych siłowych. Doktorant jest współautorem tego opracowania (*Review of Scientific Instruments 2014*), jednak nie wchodzi ono w skład rozprawy doktorskiej.

Pierwsza z prac składających się na rozprawę doktorską (*Proc. 17th Meeting Soc. Pigment Cell Res. 2012*) dokumentuje wpływ ziaren

melaniny na morfologię i właściwości nanomechaniczne komórek B16F10. Komórki czerniaka zawierające melaninę cechowały się większą sztywnością (wyższą wartością modułu Younga) niż komórki nieupigmentowane. Kolejna praca (*Pigment Cell Melanoma Res. 2013*) dowodzi, że ziarna melaniny zwiększają sztywność komórek czerniaka człowieka SKMEL-188. Porównanie właściwości komórek SKMEL-188 i normalnych melanocytów człowieka falsyfikuje obiegowy pogląd, w myśl którego komórki nowotworowe są mniej sztywne niż komórki normalne. Jak słusznie zauważa Doktorant w *Dyskusji* tej publikacji, uniemożliwia to prostą nanodiagnostykę komórek czerniaka w oparciu o wyznaczenie modułu Younga, jednak (uwaga recenzenta) wzbogaca wiedzę o właściwościach mechanicznych komórek czerniaka. Stwierdzenie to wydaje się zresztą być ograniczone do komórek czerniaka i niekoniecznie odnosi się do innych komórek nowotworowych, pozbawionych balastu melaniny.

Trzecia praca wchodząca w skład rozprawy doktorskiej mgr Michała Sarny jest w moim przekonaniu najbardziej interesująca. Wykazuje ona, że im większa liczba ziaren melaniny, tym mniejsza jest zdolność komórek SKMEL-188 do migracji przez standardową barierę w teście Transwell. Oczywiście chodzi o test *in vitro*, jednak zależność pomiędzy sztywnością komórek uwarunkowaną zawartością melaniny a ich zdolnością penetracji barier mechanicznych; można oczekiwać, że analogiczna zależność może dotyczyć zdolności do przenikania przez barierę naczyniową i w konsekwencji przerzutowania. To bardzo pouczający przykład, jak właściwości mechaniczne komórek mogą determinować ich zachowanie się i - nawet jeśli ta analiza jest uproszczona - umożliwia zrozumienie istotnych biofizycznych aspektów rozwoju choroby nowotworowej. Uważam, że rozprawa doktorska mgr M. Sarny wnosi nowe oryginalne dane do biofizyki komórek nowotworowych.

Mam drobne uwagi krytyczne w odniesieniu do rozprawy. Na s. 36 Doktorant pisze, że obserwacja o hamowaniu przez melaninę zdolności inwazyjnej komórek czerniaka jest nową obserwacją. Według mojej

wiedzy, postać bezbarwnikowa czerniaka (*melanoma amelanoticum*), nie zawierająca lub zawierająca znikome ilości barwnika, co świadczy o bardzo małym zróżnicowaniu komórek nowotworowych, jest szczególnie ciężką odmianą czerniaka, o większej złośliwości i bardziej niepomyślnym przebiegu. Oczywiście jest to obserwacja optyczna, nie poparta dokładnym oznaczeniem zawartości melaniny, tym niemniej funkcjonująca już powszechnym obiegu informacji. W pierwszej publikacji (*Proc. 17th Meeting Soc. Pigment Cell Res. 2012*), moim zdaniem w rycinie 1 pomyłone są panele B i C.

Omówienie wyników przygotowane jest bardzo starannie pod względem edytorskim; jedyny błąd literowy, jaki zauważyłem to „where published” (zamiast „were published”) na s. 35.

W podsumowaniu, bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr Michała Sarny. Uważam, że rozprawa spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez art. 14 i 15 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Michała Sarny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na oryginalność problemu, wkład pracy Doktoranta i uzyskane cenne wyniki opublikowane w czasopiśmie o wysokiej wartości *impact factor* wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Łódź, dnia 16 lutego 2015


Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz