

Dr n. fiz. hab. n. med. inż. Kamil Kisielewicz

Kraków, 09.05.2024r.

Zakład Fizyki Medycznej

Narodowy Instytut Onkologii

im. Marii Skłodowskiej – Curie,

Państwowy Instytut Badawczy,

Oddział w Krakowie

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Szczepanek

zatytułowanej:

“3D melanoma model for in vitro BNCT studies:

Effects of neutron radiation on ¹⁰BPA-loaded melanoma spheroids”

Dysertacja doktorska Pani mgr Moniki Szczepanek została przygotowana pod opieką naukową Prof. dr hab. Ewy Stępień oraz dr. Michała Silarskiego – pełniącego funkcję promotora pomocniczego. Praca została napisana w języku angielskim i przedstawiona na 75 stronach maszynopisu, nie uwzględniając załączników.

Na wstępie należy podkreślić, iż Doktorantka posiada bogaty dorobek publikacyjny, związany z tematyką pracy – 9 pozycji. Na podstawie przedstawionej listy publikacji, można zauważyć, że jest dwukrotnie pierwszym oraz dwukrotnie ostatnim autorem artykułów opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, posiadających współczynnik oddziaływania (impact factor). Pani mgr Monika Szczepanek brała udział w 8 międzynarodowych konferencjach naukowych, podczas których przedstawiała wyniki swoich prac. Na konferencji ‘Dynamics of biological systems: from viruses to populations’ w 2020 roku, zdobyła pierwszą nagrodę w kategorii Early Stage Researcher za prezentację „Dynamics of melanoma cells”.

Badania opisane w pracy doktorskiej dotyczą opracowania i zastosowania trójwymiarowego modelu hodowli komórkowych (tzw. sferoidów) w przedklinicznych eksperymentach *in vitro*, bezpośrednio związanych z radioterapią borowo-neutronową (BNCT).

Jako główny cel pracy wskazano zbadanie wpływu promieniowania neutronowego na komórki czerniaka w obecności izotopu boru ^{10}B w modelach komórkowych 2D i 3D.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska składa się z 6 rozdziałów wliczając wstęp i podsumowanie.

We wstępie doktorantka zwięźle zawarła niezbędne informacje potrzebne do zrozumienia właściwej części tekstu. Czytelnik odnajdzie tu podstawy oddziaływania neutronów z materią, opis i zasadę funkcjonowania radioterapii borowo – neutronowej, jak również wprowadzenie do trójwymiarowego modelu hodowli komórkowych, których odpowiedź na promieniowanie jonizujące jest bliższa organizmowi ludzkiemu w porównaniu z hodowlą 2D.

W następnej części doktorantka przedstawia cel pracy: opracowanie trójwymiarowego modelu komórkowego, służącego do badania zależności dawka – efekt podczas terapii BNCT. Powyżej nakreślony cel ogólny, realizowany jest poprzez cele cząstkowe, takie jak:

- przygotowanie modelu trójwymiarowego dla dwóch ludzkich linii komórkowych czerniaka (melanoma);
- rozwój protokołów pomiarowych koncentracji boru w komórkach czerniaka dla hodowli 2D i 3D oraz dla prawidłowych melanocytów w hodowli 2D;
- porównanie efektu biologicznego (przeżywalność) po ekspozycji na wiązkę neutronową, po uprzedniej akumulacji boru, dla komórek melanomy (dla modelu 2D i 3D) oraz melanocytów dostępnych tylko w hodowli 2D.

W badaniach zastosowano dwie linie komórkowe melanomy dostępne komercyjnie: pierwotną (FM55p) oraz przerzutową z węzła chłonnego (WM266-4), jak również jako grupę kontrolną - linię melanocytów prawidłowych (HEMA-LP). Tu nasuwa się pytanie, dlaczego doktorantka nie uwzględniła w eksperymencie melanocytów stanowiących grupę kontrolną, także w hodowli 3D, podobnie jak linie melanomy?

Rozdział trzeci to szeroko opisana metodologia przeprowadzonych badań. Począwszy od hodowli komórkowej 2D, poprzez hodowlę sferoidalną, ocenę żywotności komórek,

analizę kształtu i rozmiaru powstałych struktur przestrzennych, do ekspozycji w wiązce neutronowej. Do oceny żywotności hodowli zastosowano cytometrię przepływową. Mikroskopia konfokalna posłużyła do obrazowania żywych i martwych komórek w sferoidzie dla dwóch linii komórkowych czerniaka, a mikrotomografia komputerowa umożliwiła z kolei pozyskanie informacji o strukturze przestrzennej sferoidu (z wyłączeniem linii komórkowej FM55p).

Druga część rozdziału trzeciego poświęcona jest analizie wychwytu boru przez hodowle komórkowe oparte na modelach 2D i 3D in vitro. Zestawiono ze sobą do porównania komórki czerniaka w hodowli 2D i 3D oraz melanocyty 2D. Wszystkie hodowle traktowane były roztworem BPA (4-borono-L-feniloalanina) odpowiadającym stężeniu $50\mu\text{g }^{10}\text{B/ml}$. Pomiar stężenia ^{10}B w komórkach wykonano stosując spektrometrię mas sprzężonej z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-MS) zgodnie z odpowiednią zależnością kalibracyjną.

Trzecia część rozdziału trzeciego skupia się na efektach ekspozycji neutronowej w prezentowanych wcześniej hodowlach komórkowych. Jako źródło neutronów posłużył reaktor badawczy TRIGA drugiej generacji zainstalowany w L.E.N.A Applied Nuclear Energy Laboratory w Pawii we Włoszech. Tam doktorantka w okresie od 6 do 24 marca 2023r. badała wpływ wiązki neutronowej na hodowle komórkowe zawierające izotop boru 10. Reaktor wyposażony jest w specjalną wnękę, służącą do napromieniania próbek w badaniach nad radioterapią borowo – neutronową. Obydwie stosowane linie komórkowe czerniaka w hodowlach 2D i 3D, jak również melanocyty 2D, zostały poddane ekspozycji na wiązkę neutronów termicznych, po uprzedniej inkubacji z BPA. Czas ekspozycji odpowiadał pochłonięciu przez komórki dawki „około” 2 Gy (str. 27). Dodatkowo hodowle melanomy zostały eksponowane przez dłuższy czas, skutkujący pochłonięciem dawki „około 6 Gy. Zestawione do porównania hodowle kontrolne, nie zostały poddane działaniu wiązki neutronowej. Eksperyment związany z ekspozycją neutronową został powtórzony trzykrotnie, w celu minimalizacji niepewności statystycznej. Odnosząc się do ekspozycji komórek w wiązce neutronowej, muszę stwierdzić, iż z perspektywy fizyka medycznego, brakuje mi informacji o dozymetrii bezwzględnej wiązki. Z jaką dokładnością (niepewnością) została określona dawka pochodząca od neutronów w miejscu ekspozycji komórek (tym bardziej iż czas ekspozycji był jednakowy i wynosił 10 minut)? Zdaję sobie sprawę, że nie wpływa to jednak znacząco na wnioski wyciągnięte z otrzymanych wyników, dotyczących zależności dawka – skutek.

Efekt biologiczny w hodowlach komórkowych, po ekspozycji wiązką neutronową, oceniano poprzez analizę wielkości i kształtu sferoid oraz wykonanie badań żywotności komórek, polegających na barwieniu błękitem tryptofanu. Do oceny uszkodzeń DNA zastosowano test kometowy, a do oceny zdolności komórek do podziału – ekspresję białka Ki67.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń i obserwacji zostały zaprezentowane w rozdziale czwartym. Linia przerzutowa czerniaka (WM266-4) w hodowli 2D nie wykazuje uszkodzeń DNA po ekspozycji wiązką neutronów w obecności ^{10}B w komórkach, podczas gdy w hodowli 3D, podobnie jak w pozostałych liniach komórkowych (melanoma pierwotna i melanocyty), poziom powstałych uszkodzeń DNA jest znacząco wyższy w porównaniu do komórek napromienionych tylko neutronami. Na podstawie przeprowadzonego testu kometowego, można stwierdzić, że sferoidy są bardziej podatne na terapię BNCT w stosunku do hodowli 2D. Zaobserwowano również, że prawidłowa linia komórkowa melanocytów z ^{10}B , wykazuje niższą wrażliwość na wiązkę neutronową w porównaniu z linią pierwotną czerniaka także z ^{10}B , co jest bardzo istotną obserwacją z punktu widzenia powikłań tkanek zdrowych podczas radioterapii. Udało się zaobserwować efekt zależny od dawki zdeponowanej w komórkach. Kolonie, w których zdeponowano dawkę o wartości 6 Gy, charakteryzowały się większymi uszkodzeniami w DNA oraz silniejszym hamowaniem wzrostu komórek w obu liniach czerniaka. Model komórkowy sferoidu jest znacznie bliższy komplikacji tkankowej w ludzkim organizmie w porównaniu z hodowlą 2D. Jego odpowiedzi powinny być zatem bardziej zbliżone do zachowania komórek człowieka *in vivo*. Wyniki uzyskane przez doktorantkę potwierdzają przydatność wykorzystania modelu komórkowego 3D *in vitro* w badaniach i pracach nad terapią borowo – neutronową (BNCT). Doktorantka otrzymała niezgodny ze swoimi przewidywaniami wynik testu kometowego, polegający na większej liczbie uszkodzeń DNA w niektórych próbkach grupy kontrolnej, wskazując jako przyczynę fakt uprzedniego mrożenia komórek, co znajduje uzasadnienie literaturowe. Otrzymane wyniki doktorantka odnosi względem dostępnych danych literaturowych, konkludując, że sferoidy jako model 3D komórek, pomimo większego nakładu kosztów i czasu pracy w stosunku do standardowych hodowli dwuwymiarowych, powinny być stosowane w badaniach *in vitro*, ze względu na większą swoistość odpowiedzi w stosunku do organizmu ludzkiego, co jest szczególnie ważne i istotne w badaniach nad bezpieczną i skuteczną terapią BNCT.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska podejmuje ważny temat odpowiedzi komórkowej na ekspozycje wiązką neutronową w terapii BNCT. Sferoidy nadają się znacznie lepiej do prac nad odpowiednią koncentracją boru w komórkach jak i badaniach nad skutkami ekspozycji neutronowej w kontekście tkanek nowotworowych, jak i zdrowych. Praca napisana jest bardzo poprawnie i zrozumiale. Posiada formę klasycznej rozprawy naukowej. Ryciny wykonane są z bardzo dużą starannością. Autorka wykazała się znajomością i opanowaniem zaawansowanych metod laboratoryjnych, takich jak: hodowle komórkowe, cytometria przepływowa, mikroskopia, mikrotomografia CT, test kometowy – który umożliwia ocenę uszkodzeń popromiennych oraz zdolność komórki do naprawy DNA. Otrzymane wyniki zostały opracowane statystycznie, przy użyciu odpowiedniego do próby narzędzia oraz odpowiednio zinterpretowane. Autorka w pełni zrealizowała postawione w pracy cele, a wymienione w recenzji subtelne uwagi, nie naruszają wyników pracy.

Uważam, że recenzowana rozprawa spełnia wszelkie wymogi formalne i zwyczajowe stawiane dysertacjom na stopień doktora nauk fizycznych, w szczególności kryteria stawiane kandydatom w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki. Przedmiotowa dysertacja stanowi oryginalny i istotny wkład do badań nad radioterapią borowo – neutronową.

Na podstawie powyższego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne przy Wydziale Fizyki Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Moniki Szczepanek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 08.05.2024
Kamil Kesielewicz