

Łódź, 7 maja 2024 r.

dr hab. Agnieszka B. Olejniczak, prof. IBM PAN
Instytut Biologii Medycznej PAN
ul. Lodowa 106, 93-232 Łódź,
tel. 42-272-36-37
e-mail: aolejniczak@cbm.pan.pl

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Moniki Szczepanek

pt. *"3D melanoma model for in vitro BNCT studies:
effects of neutron radiation on ¹⁰BPA-loaded melanoma spheroids"*

przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Moniki Szczepanek została przygotowana w Zakładzie Fizyki Medycznej Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego. Ze względu na jej wielodyscyplinarny charakter była wykonana w Zakładzie Fizyki Medycznej i Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ, a także w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydział Chemii UJ, L.E.N.A. Laboratorium Stosowanej Energii Jądrowej Uniwersytetu w Pawii oraz Zakładzie Fizyki Biologicznej i Nanospektroskopii Instytutu Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie. Promotorem pracy jest Prof. Ewa Stępień, a promotorem pomocniczym dr Michał Silarski. Pani mgr Monika Szczepanek była doktorantką Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ.

Dysertację przygotowano w sposób tradycyjny, typowy dla prac doświadczalnych, w formie 89-stronicowej rozprawy (wraz z załącznikami), na stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki fizyczne. Przyjęta forma rozprawy została umiejętnie wykorzystana przez Doktorantkę. Rozprawa składa się z następujących głównych rozdziałów: wstępu teoretycznego, metod badawczych, wyników, dyskusji, podsumowania oraz bibliografii. Pracę uzupełniają abstrakty w językach angielskim i polskim, wykaz aktualnego dorobku naukowego Doktorantki (lista publikacji oraz doniesień konferencyjnych), wykaz zastosowanych skrótów jak również informacje o finansowaniu badań opisanych w rozprawie.

Część teoretyczna pracy wprowadza w zagadnienia związane z wpływem promieniowania neutronowego na materię oraz podstawami terapii borowo-neutronowej, BNCT (zasada terapii, nośniki boru i ich rozwój, techniki analityczne wykorzystywane do pomiaru stężenia boru w tkance biologicznej). Terapia BNCT to rodzaj hadronoterapii związanej z wprowadzeniem do organizmu pacjenta leku – związku boru ^{10}B , który lokuje się w komórkach nowotworowych (poprzez zwiększony metabolizm komórek nowotworowych lub wykorzystując specyficzne elementy strukturalne komórki nowotworowej). Następnie komórki nowotworowe poddaje się napromienianiu wiązką neutronów o odpowiedniej energii. W wyniku wychwytu przez jądro ^{10}B , w komórce nowotworowej, dochodzi do reakcji, powodującej emisję cząstki α oraz jonu ^7Li . Procesowi często towarzyszy emisja fotonów γ . W konsekwencji reakcja ta ma doprowadzić do zniszczenia komórek nowotworowych, w których znajdował się bor. Na końcowy sukces terapii BNCT ma wpływ wiele składowych począwszy od nośników boru, selektywnie gromadzących się w komórkach nowotworowych, poprzez źródło i charakterystykę wiązki neutronów, kończąc na wyborze odpowiedniego celu badawczego. Terapia BNCT to terapia nadal eksperymentalna rozwijana w wielu ośrodkach na świecie, w tym również w Polsce.

Pani mgr M. Szczepanek w swojej pracy doktorskiej jako nośnik boru, zastosowała jeden z dwóch najbardziej znanych i najczęściej wykorzystywanych w terapii BNCT, ^{10}BPA . Jako model badawczy zaproponowała trójwymiarowy model hodowli komórkowych 3D (sferoidy) czerniaka. W części teoretycznej Doktorantka uzasadniła wybór takiego modelu w radioterapii, wykazując podobieństwa i różnice w stosunku do komórek nowotworowych 2D. Wstęp teoretyczny został wzbogacony o informacje związane z czerniakiem, etapami powstawania, epidemiologią oraz terapiami stosowanymi do jego leczenia. Ta część pracy, dodatkowo wparta sześcioma poglądowymi rysunkami, została napisana zwięźle i merytorycznie. Świadczy to o szerokiej, rzetelnej i ugruntowanej wiedzy Doktorantki.

1. *W nawiązaniu do informacji przedstawionych przez Autorkę we wstępie teoretycznym pracy proszę o informację czy model 3D hodowli komórek nowotworowych innych niż czerniaka był testowany w kierunku terapii BNCT? Jeśli tak, to jakie najciekawsze wyniki otrzymano?*

Proszę o nawiązanie do tego pytania podczas publicznej obrony pracy doktorskiej.

Założenia i cel pracy zostały przedstawione precyzyjnie i uzasadniają celowość zaplanowanych badań, ich wpływ na rozwój wiedzy związanej z wykorzystaniem modelu 3D komórek czerniaka do przedklinicznych badań *in vitro* w terapii BNCT. Głównym celem badań było opracowanie trójwymiarowego modelu *in vitro* do badania wpływu promieniowania neutronowego (BNCT) na komórki

czerniaka. Hipoteza robocza zakładała, że promieniowanie neutronowe, w obecności ^{10}B , skutecznie i selektywnie uszkodzi komórki nowotworowe i nie wpłynie na wzrost i proliferację komórek prawidłowych. Dlatego też badania realizowane w ramach tej pracy związane były w pierwszej kolejności z przygotowaniem i opracowaniem sferycznych agregatów komórkowych czerniaka, a następnie z eksperymentami związanymi z wpływem promieniowania neutronowego na przygotowany model 3D zawierający izotop ^{10}B .

W kolejnej części pracy zat. Metodologia Doktorantka zawarła szczegółowy opis przeprowadzonych doświadczeń związanych z: I. Badaniami nad rozwojem sferoid (3D) komórek czerniaka FM55p i WM266-4; II. Analizą zawartości boru w modelu komórkowym 2D (komórki czerniaka FM55p i WM266-4 oraz melanocyny WM266-4) oraz 3D czerniaka; III. Badaniami nad wpływem promieniowania neutronowego na komórki modeli 2D i 3D (doświadczenia te zostały wykonane przez Doktorantkę podczas pobytu na Uniwersytecie w Pawii, w okresie 6-24 marca 2023 roku). Wszystkie eksperymenty zostały zaplanowane prawidłowo i wykonane z wykorzystaniem odpowiednich metod i technik badawczych. Ten rozdział został zredagowany dokładnie, starannie i zawiera wszystkie szczegóły niezbędne do odtworzenia opisanych doświadczeń. Dodatkowo został wsparty 7 poglądowymi rysunkami, które dopełniają w sposób wizualny opisane w tym rozdziale badania.

1. Odnośnie do tej części pracy chciałabym zapytać o to w jaki sposób rozwiązyany został transport sferoid do badań we Włoszech?

Rezultaty przeprowadzonych prac doświadczalnych zostały zawarte w rozdziale zat. Wyniki, a ich omówienie w rozdziale zat. Dyskusja.

W pierwszej kolejności Autorka zaprezentowała dane związane z pracą nad rozwojem modeli 3D linii komórek czerniaka ludzkiego, pierwotną FM55p oraz przerzutową WM266-4 oceniając ich żywotność, rozmiar (pomiar średnicy) i kształt, w czasie, stosując odpowiednie techniki opisane w rozdziale 3. Na podstawie zmierzonych parametrów Doktorantka omówiła podobieństwa i różnice między sferoidami komórek pierwotnych i przerzutowych, na określonych etapach ich formowania się. Następnie zaproponowała do dalszych badań sferoidy, które tworzone są z 2000 komórek/dolek w początkowej fazie, po 7 dniach hodowli. Do tej części rozprawy mam uwagi/pytania:

1. W dyskusji brakuje mi głębszego omówienia linii pierwotnej FM55p oraz przerzutowej WM255-4 pod kątem molekularnym, wykazanie podobieństw/różnic, jeśli istnieją, między obiema liniami, co być może ułatwiłoby głębszą interpretację wyników.

2. *Czy są ogólne zalecenie jakimi optymalnymi parametrami (rozmiar, kształt, itd.) powinny charakteryzować się sferoidy komórek nowotworowych?*

W drugiej części zostały przedstawione i omówione rezultaty związane z wnikaniem *in vitro* ^{10}B (^{10}BPA) do komórek 2D (prawidłowych i nowotworowych) oraz otrzymanych sferoid. Doktorantka wykazała, że wnikanie boru jest zróżnicowane w zależności od badanej linii (prawidłowa vs. nowotworowa) jak również typu hodowli (2D vs. 3D). Wysokie stężenie boru zarejestrowano w komórkach prawidłowych (2D) w porównaniu do stężenia boru w komórkach linii FM55p (2D) i porównywalne do stężenia boru w komórkach linii WM266-4 (2D). Kultury 3D charakteryzowały się wyższym stężeniem ^{10}B w porównaniu do kultur 2D tych samych linii. Zarejestrowano wyższe lub porównywalne stężenie ^{10}B w sferoidach w porównaniu do prawidłowej linii komórkowej. W kulturach 3D komórek FM55p stężenie boru było wyższe w porównaniu do sferoid komórek WM266-4, w przeciwieństwie do kultury 2D. Otrzymane wyniki pozwoliły na wyznaczenie optymalnego czasu inkubacji (4 h) badanych kultur 2D, 3D z nośnikiem boru.

W trzeciej części mgr M. Szczepanek kultury 2D i 3D, po wcześniejszej inkubacji z nośnikiem boru lub brakiem boru, poddała ekspozycji na promieniowanie neutronowe (dawka 2 Gy oraz 6 Gy dla sferoidów). Następnie zbadała efekt napromieniania oceniając wielkość i kształt sferoid, żywotność, uszkodzenie DNA i zdolność komórek do podziału. Doktorantka wykazała, że sferoidy zawierające bor są bardziej podatne na promieniowanie, w szczególności wyższa dawka promieniowania powodowała większe uszkodzenia DNA oraz silnej hamowała wzrost komórek nowotworowych.

Do tej części rozprawy mam pytania:

1. *Czy rzeczywiście można jednoznacznie stwierdzić, że liczba żywych komórek w próbkach napromieniowanych w obecności boru jest znacznie niższa niż w próbkach kontrolnych (z borem) dla wszystkich linii komórkowych, jak również dla sferoid?*
2. *Jak może być przyczyna wzrostu średnicy hodowli 3D FM55p w czasie 24-48 h po napromienieniu, w obecności boru (Rysunek 23)? W dyskusji jest tylko uzasadnienie w odniesieniu do kształtu sferoid hodowli FM55p oraz ekspresji białka Ki67.*

Rozdziały Wyniki, Dyskusja, zostały przygotowane skrupulatnie. Świadczy to o dobrym przygotowaniu warsztatowym i przede wszystkim rzetelności naukowej Doktorantki.

Wykonane doświadczenia oraz ich rezultaty doprowadził do realizacji celów jednostkowych, aczkolwiek robocza hipoteza badawcza nie została jednoznacznie potwierdzona. Otrzymane jednak

najważniejsze wyniki, celnie ujęte w podsumowaniu, pozwalają na planowanie nowych eksperymentów i związanych z nimi nowymi projektami.

Bibliografia cytowana w pracy obejmuje 111 pozycji literaturowych, w tym 2 pozycje w języku polskim, natomiast pozostałe to prace anglojęzyczne, które ukazały się w latach 1936-2023 (cytowana praca z 1936 roku jest jedyną taką pozycją, natomiast 45% stanowią prace opublikowane w latach 2020-2023). Doktorantka przyjęła zasadę pełnego opisanie testu źródłowego podając nazwisko i inicjał imienia/imion autora/autorów, tytułu artykułu, nazwy czasopisma, roku wydania, numeru woluminu, pierwszej i ostatniej strony pracy lub numeru artykułu. Wszystkie publikacje zostały prawidłowo dobrane i zacytowane. W uwagach krytycznych chciałabym zwrócić uwagę, że niektóre publikacje nie posiadają właściwego skrótu nazwy czasopisma, np. pozycja 11, 24, 28, 30, 34, 59.

Wykorzystane w pracy skróty zostały zebrane w Wykazie skrótów, w porządku alfabetycznym.

Uzupełnieniem rozprawy są załączniki zawierające m.in. parametry robocze wykorzystanych do badań urządzeń, skład buforów do zastosowanych testów, zdjęcie sferoid z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego, dane z testów żywotności komórek i inne.

Do rozprawy załączony został aktualny dorobek naukowy mgr M. Szczepanek. Sumarycznie jest to 9 publikacji, które ukazały się w latach 2020-2023; 8 publikacji w języku angielskim i 1 publikacja w języku polskim. W 2 pracach mgr M. Szczepanek jest pierwszym autorem. Na uwagę zasługuje współautorstwo w publikacji *Science Advances* - IF 13,6 (2022). Pozostały dorobek naukowy obejmuje również 8 doniesień konferencyjnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, w latach 2019-2022. Ważnym elementem aktywności naukowej Doktorantki było pozyskiwanie funduszy na prowadzenie badań naukowych co przełożyło się na realizację projektu NAWA Ster i związany z tym projektem pobyt na Uniwersytecie w Pawii oraz granty U1U/P05/NW/03.23 i U1U/P05/NO/03.47, RSM/31/SM z Priorytetowych Obszarów Badawczych SciMat i DigiWorld, w ramach Programu Strategicznego Inicjatywa Doskonałości UJ. Biorąc pod uwagę powyższe dane wymieniony dorobek naukowy Doktorantki oceniam wysoko.

Recenzowana rozprawa doktorska przygotowana została ze starannością zarówno pod względem językowym, stylistycznym, jak i edytorskim. Doktorantka nie uniknęła jednak drobnych błędów literowych, pomyłek w cytowaniu odpowiednich rysunków w tekście (np. strona 57) czy też mylących podpisów pod niektórymi rysunkami (np. Rysunek 29a, 31a). Wymienione niedoskonałości nie mają jednak wpływu na moją całkowitą wysoką ocenę tej pracy.

Podsumowanie

Wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej mgr Moniki Szczepanek zat. *3D melanoma model for in vitro BNCT studies: effects of neutron radiation on ¹⁰BPA-loaded melanoma spheroids* wnoszą wiele nowych informacji o potencjalnym zastosowaniu hodowli 3D w badaniach związanych z terapią borowo-neutronową. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, który inspiruje do stawiania kolejnych wyzwań badawczych. Dowodzi posiadania przez Doktorantkę szerokiej wiedzy z zakresu biologii (hodowle komórkowe), chemii (związki boru) oraz fizyki (fizyka medyczna, promieniowanie neutronowe). Wykazała ona również, że Doktorantka posiada umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych oraz krytycznego podejścia do uzyskanych wyników.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia kryteria stawiane kandydatom w Ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne UJ w Krakowie o dopuszczenie mgr Moniki Szczepanek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Signature Not Verified

Dokument podpisany przez
 Agnieszka Olejniczak
 Data: 2024.05.08 12:39:01 CEST