

Dr hab. Jan Swakoń, prof. IFJ PAN
Instytut Fizyki Jądrowej PAN
Ul. Radzikowskiego 152
31-342 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Szczepanek

pt. „3D melanoma model for in vitro BNCT studies: effects of neutron radiation on ^{10}BPA -loaded melanoma spheroids”

Rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Szczepanek pt. „3D melanoma model for in vitro BNCT studies: effects of neutron radiation on ^{10}BPA -loaded melanoma spheroids” została wykonana na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Ewy Stępień. Promotorem pomocniczym pracy był Pan dr Michał Silarski.

Ocena istotności tematyki rozprawy doktorskiej

Radioterapia borowo-neutronowa z wychwytem neutronów termicznych, zwana też terapią borowo-neutronową, (*BNCT - Boron Neutron Capture Therapy*) jest metodą radioterapii polegającą na napromienianiu komórek nowotworowych selektywnie wzbogaconych w izotop boru wiązką neutronów termicznych. Przed napromienianiem, do komórek nowotworowych wprowadza się izotop boru ^{10}B , który posiada wysoki przekrój czynny na pochłanianie neutronów termicznych. W wyniku reakcji jądrowej wychwytu neutronu termicznego na jądrze atomu ^{10}B , w reakcji $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$, powstaje jon litu oraz emitowana jest cząstka alfa. Zarówno jon litu, jak i cząstka alfa posiadają wysoki LET oraz niewielki zasięg, dzięki czemu deponują energię w pobliżu miejsca, w które dostarczony został atom boru i na którym zaszła reakcja jądrowa wychwytu neutronu termicznego.

Procedura prowadzenia radioterapii BNCT składa się z dwóch następujących po sobie etapów. Pierwszy etap wymaga zastosowania odpowiedniego nośnika boru, czyli cząsteczki zawierającej bor, która umożliwi transport boru do komórki i polega na wprowadzeniu odpowiedniej ilości tego pierwiastka do komórek nowotworowych.

Drugi etap terapii, to napromienienie „wzbogaconych” w izotop ^{10}B komórek wiązką neutronów termicznych. Aby napromienienie przeprowadzić w możliwie krótkim czasie niezbędne są wiązki neutronów termicznych o wysokich strumieniach, przynajmniej na poziomie 10^9 neutronów/($\text{cm}^2\cdot\text{s}$).

Aby móc testować zarówno własności nowych nośników boru jak i efekty napromieniania materiału biologicznego metodą BNCT poszukuje się nowych modeli biologicznych, które umożliwią badania zarówno procesów transportu boru do guza, jak i weryfikację efektów napromieniania. W zagadnienie to wpisuje się tematyka pracy Pani

mgr Moniki Szczepanek. Zaproponowana w rozprawie metoda wykorzystania trójwymiarowego modelu hodowli komórek czerniaka nie była wcześniej wykorzystywana w badaniach nad terapią BNCT.

Autorka wybrała do testów modele komórkowe 2D i 3D. Model 2D oparty na normalnych komórkach skóry, melanocytach linii MEMa-LP stanowił kontrolę dla eksperymentów prowadzonych na liniach czerniaka. Do realizacji zasadniczej części pracy, czyli stworzenia i przetestowania modelu typu 3D wybrane zostały dwie linie komórkowe czerniaka ludzkiego, tj. linia pierwotna FM55p oraz linia przerzutowa WM266-4. Przeprowadzenie eksperymentów na liniach komórkowych czerniaka oceniam jako bardzo dobry wybór, gdyż dotychczasowe badania pokazują przydatność terapii BNCT np. przy leczeniu czerniaka skóry.

Jako nośnik boru zastosowano jeden ze standardowych nośników boru, czyli borofenylalaninę BPA ($C_9H_{12}BNO_4$) zawierającą ^{10}B , stanowiącą jeden z powszechniej używanych nośników drugiej generacji.

Autorka pokazała w pracy w jaki sposób można przygotować hodowle trójwymiarowych układów komórkowych, tzw. sferoid, na potrzeby badań *in vitro*, przeprowadziła systematyczną ocenę parametrów uzyskanych sferoid stosując szereg metod pomiarowych. Przeprowadziła też eksperyment polegający na napromienieniu przygotowanych struktur komórkowych wiązką neutronów termicznych z reaktora TRIGA Mark II pracującego w laboratorium L.E.N.A w Pizie we Włoszech. Dla napromienionych kultur komórkowych przeprowadziła ocenę efektów biologicznych, takich jak ocena parametrów kształtu i wielkości sferoid, wykonała badania żywotności komórek, oraz ocenę zdolności komórek do podziału. Wyniki testów na modelach 3D porównane zostały z wynikami otrzymanymi dla klasycznych układów hodowli komórkowych 2D. Sprawdziła również w jaki sposób absorbowany jest bor w tego typu strukturach i jaki powinien być optymalny czas inkubacji komórek w roztworach zawierających nośnik.

Własności zaproponowanych w pracy hodowli komórkowych w formie sferoid, opartych na liniach czerniaka ludzkiego porównane zostały ze „standardowo” stosowanym modelem hodowli komórkowych 2D. Autorka pokazała, że model 3D wykazuje większą czułość na napromienienie techniką BNCT niż model 2D. Uwzględniając fakt, że hodowle typu 3D prawdopodobnie lepiej odwzorowują strukturę guza, mogą one stanowić nowe narzędzie do badań *in vitro*, które być może pozwoli na lepsze zrozumienie procesów zachodzących w trakcie tego typu radioterapii.

Cel rozprawy doktorskiej

Celem rozprawy doktorskiej było opracowanie trójwymiarowego modelu *in vitro* do badania wpływu napromieniania neutronami komórek czerniaka ludzkiego. Autorka postawiła hipotezę, że napromienianie komórek w obecności izotopu boru ^{10}B skutecznie i selektywnie uszkadza komórki nowotworowe i nie wpływa na wzrost i proliferację komórek prawidłowych.

Zagadnienie zostało podzielone na dwie części. Pierwsza część zagadnienia polegała na przygotowaniu i opracowaniu trójwymiarowego modelu komórek czerniaka oraz przebadaniu własności takiego modelu. W drugiej części Autorka przeprowadziła napromieniania przygotowanego w części pierwszej materiału, mające na celu potwierdzenie postawionej hipotezy badawczej, czyli sprawdzenie skuteczności napromienienia przy pomocy neutronów termicznych komórek z wprowadzonym borem.

Prace podzielone zostały na trzy etapy.

W pierwszym etapie celem było przygotowanie modelu 3D (czyli sferoid) dla dwóch linii komórek czerniaka ludzkiego.

W drugim etapie należało opracować protokół pozwalający na pomiar wychwytu boru przez komórki czerniaka oraz prawidłowych melanocytów dla modeli 2D i 3D.

Trzeci etap prac miał na celu porównanie wpływu napromieniania neutronami modeli komórkowych 2D i 3D czerniaka oraz melanocytów prawidłowych.

Omówienie treści rozprawy doktorskiej

Treść rozprawy została zawarta na 89 stronach i podzielona na 6 rozdziałów. Praca zawiera również bibliografię, w której znajduje się 111 pozycji literaturowych. Ponadto praca zawiera siedem załączników stanowiących uzupełnienie treści rozprawy. W pracy zamieszczono 34 rysunki oraz tabele z wynikami, które głównie stanowią uzupełnienie zamieszczonych rysunków z wynikami. Autorka zamieściła również listę najważniejszych używanych w pracy skrótów wraz z ich objaśnieniami.

W rozdziale pierwszym, stanowiącym wstęp teoretyczny Autorka zamieszcza krótkie opisy dotyczące tematów, z którymi związana jest praca. W pierwszym podrozdziale zebrane zostały informacje dotyczące neutronów i ich własności, źródeł neutronów oraz oddziaływania neutronów z materią oraz wymienia i krótko omawia wybrane zastosowania neutronów w technice, przemyśle i medycynie. Drugi podrozdział zawiera informacje dotyczące radioterapii BNCT. Przedstawione zostały w nim fizyczne podstawy wykorzystania neutronów do radioterapii borowo-neutronowej, informacje o nośnikach boru stosowanych w tej metodzie oraz podstawowych sposobach weryfikacji stężenia boru dostarczanego do komórek. Wskazano też na nowe metody produkcji wiązek neutronowych przy pomocy wiązek protonowych produkowanych przez dedykowane akceleratory protonowe.

W następnym podrozdziale Autorka szczegółowo opisuje trójwymiarowy model sferoid, który stanowił podstawę materiału badawczego użytego w pracy. Szczegółowo opisana została metodyka tworzenia tego typu struktur oraz analogie budowy struktury sferoidy i struktury guza.

W ostatnim podrozdziale rozdziału pierwszego Autorka wyjaśnia czym są melanocyty, i jakie funkcje pełnią. Opisuje również procesy prowadzące do przemiany melanocytów

w komórki nowotworowe melanomy i zamieszcza informacje epidemiologiczne dotyczące występowania czerniaka oraz klasyfikację klinicznego i patologicznego stopnia zaawansowania nowotworu. Wskazuje też na badania kliniczne z zastosowaniem techniki BNCT w leczeniu tego typu nowotworów.

Rozdział drugi pracy, to sformułowanie celu pracy i informacja o poszczególnych etapach jakie zostały zaplanowane w celu weryfikacji hipotezy roboczej.

Rozdział trzeci zawiera opis metodologii. Podzielony on został na trzy części, zgodnie z etapami wyróżnionymi w rozdziale drugim przedstawiającymi sposób realizacji celu pracy.

W części pierwszej szczegółowo opisane zostały zagadnienia związane z hodowlą komórek oraz hodowlą i formowaniem sferoidów. Przedstawiono również sposób analizy żywotności komórek metodą cytometrii przepływowej oraz metodę analizy kształtu i wielkości sferoid. Do rozróżniania żywych i martwych komórek w sferoidach zastosowano mikroskopię konfokalną i fluorescencyjną oraz odpowiednie wybarwienie komórek, natomiast do trójwymiarowego obrazowania sferoid i określania ich parametrów zastosowano mikro-tomografię rentgenowską (Micro-CT).

Część druga prac eksperymentalnych związana była z analizą absorpcji boru w komórkach. Wcześniej wprowadzając bor do komórek melanocytów i komórek badanych linii komórek czerniaka w układach 2D i 3D, poprzez zamianę na określony czas inkubacji komórek standardowe medium używane do hodowli na medium zawierające BPA z zawartością 50 ug $^{10}\text{B}/\text{ml}$. Koncentrację zabsorbowanego w komórkach boru określano metodą spektrometrii mas sprzężoną z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-MS).

W części trzeciej rozdziału opisano sposób wykonania napromieniania próbek wiązką neutronów w reaktorze TRIGA Mark II oraz sposób postępowania z napromienionymi komórkami w hodowlach 2D i 3D po ekspozycji na promieniowanie, a także sposób przeprowadzania testów proliferacji na sferoidach z badanych linii komórkowych czerniaka.

W rozdziale czwartym przedstawiono uzyskane w trakcie pracy wyniki. W opisie zastosowano podobny podział jak w rozdziale trzecim. W sposób systematyczny przedstawiono opis wyników uzyskanych zgodnie z przedstawioną w rozdziale trzecim metodyką. W części pierwszej rozdziału podano ocenę żywotności sferoid komórek w okresie 14 dni hodowli oraz określano wielkość sferoid i analizowano ich kształt. W trakcie hodowli określano w jaki sposób zachowują się sferoidy z poszczególnych linii komórkowych w trakcie kolejnych dni hodowli. Pozwoliło to na określenie optymalnej wielkości sferoid i liczby komórek w sferoidzie na 2000 komórek oraz określenie optymalnego czasu hodowli po jakim należało wykonać napromieniania wiązką neutronów. Ponadto dla tak określonych wielkości hodowli wykonano obrazowanie przy pomocy mikroskopii konfokalnej oraz metody Mikro-CT, co pozwoliło określić kształt sferoid oraz ich wewnętrzną strukturę.

W kolejnej części rozdziału omówiono wyniki analiz absorpcji boru w komórkach hodowli 2D i 3D dla komórek badanych linii komórkowych czerniaka oraz komórek zdrowych

(melanocytów). Pozwoliło to na wybór czasu inkubacji komórek w roztworze zawierającym nośnik BPA. Przy wyborze czasu inkubacji komórek w roztworze BPA przed napromienianiami Autorka posiłkowała się również danymi literaturowymi oraz uwzględniła ograniczenia czasowe związane z możliwością przeprowadzenia napromieniania materiału biologicznego w reaktorze.

Kolejna część czwartego rozdziału zawiera szczegółowe wyniki uzyskane po napromienianiu komórek neutronami. Przedstawione zostały wyniki żywotności dla poszczególnych linii komórkowych w hodowlach 3D i 2D. Dla komórek hodowanych w formie struktur 3D wykonana została analiza wielkości i kształtu sferoid. Stosowane były takie same metody jakich użyto na etapie przygotowania materiału biologicznego do napromieniania.

W celu sprawdzenia, czy i w jaki sposób napromieniania neutronami powodują uszkodzenia DNA, zastosowano metodę kometową (*Comet assay*), pozwalającą zobrazować fragmentację DNA poprzez elektroforezę i rozdział fragmentów DNA z jąder komórek. Jako odniesienie zastosowano komórki kontroli.

W celu sprawdzenia zdolności podziału komórek czerniaka w hodowlach 3D napromienionych neutronami zastosowano test proliferacji (*Proliferation Assay*) z wykorzystaniem białka Ki67. Badania te wykonano zarówno dla hodowli z borem jak i bez boru. Określano poziomy i zmienność w czasie zawartości białka Ki67 dla badanych konfiguracji badanych układów biologicznych.

Rozdział piąty zawiera szczegółową dyskusję uzyskanych wyników poczynając od budowy modelu, metod weryfikacji sferoid i ich struktury i optymalizacji sferoid, które zostały wykorzystane w dalszej części badań, poprzez szczegółową dyskusję absorpcji boru dostarczanego do komórek i uzasadnienie wyboru warunków hodowli z odpowiednią zawartością ^{10}BPA , kończąc na szczegółowej dyskusji wyników uzyskanych przy pomocy stosowanych metod dla napromienianych neutronami próbek.

Ostatni szósty rozdział zawiera wnioski wynikające z przeprowadzonych badań. Autorka stwierdza, że zaproponowany model komórkowy w postaci trójwymiarowych sferoid może być z powodzeniem stosowany w badaniach nad radioterapią czerniaka przy pomocy BNCT, co zostało potwierdzone dla dwóch linii komórkowych czerniaka, a wyniki przedstawione w pracy potwierdzają przydatność takiego modelu w badaniach nad BNCT.

Uwagi o charakterze krytycznym i polemicznym.

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Moniki Szczepanek zawiera bardzo szczegółowe opisy metodyki laboratoryjnej oraz analizę wyników otrzymanych z zastosowanych metod pomiarowych. Zaproponowany do badań nad terapią BNCT model biologiczny w postaci komórek formowanych w sferoidy jest bardzo interesujący, gdyż sama struktura sferoidy może lepiej odwzorowywać model guza, ze względu na to, że komórki tworzą spójną strukturę. Z drugiej strony faktem jest, że metodyka pracy z takim modelem jest znacznie bardziej wymagająca i złożona.

W pracy Autorka szczegółowo opisała tworzenie hodowli sferoid, metody określania ich parametrów, metodykę dostarczania boru oraz weryfikacji ilości tego pierwiastka w modelowej strukturze oraz testy jakie zostały wykonane po napromienieniu neutronami termicznymi.

Niestety część dotycząca samego napromieniania materiału biologicznego neutronami została opisana w sposób dość oszczędny, a jest to w mojej opinii bardzo ważny element pracy.

Informacje dotyczące reaktora TRIGA Mark II działającego w laboratorium L.E.N.A w PAVII we Włoszech zostały podane w bardzo ograniczonym zakresie. Warto byłoby poznać bardziej szczegółowe informacje, zwłaszcza o parametrach pracy tego reaktora. Z punktu widzenia prowadzonego eksperymentu istotne jest tu widmo energetyczne, strumień neutronów termicznych i ewentualnie epitermicznych w kanale, w którym wykonano napromieniania. Dobrym uzupełnieniem mógłby być schemat reaktora z zaznaczonym miejscem umieszczenia próbek w czasie napromieniania.

W eksperymentach radiobiologicznych, w których wykorzystuje się promieniowanie jonizujące istotnym elementem opisującym eksperyment jest dozymetria wiązki. Zagadnienie to jest szczególnie istotne w przypadku napromieniania wykonywanych przy pomocy wiązek neutronowych, a zwłaszcza w przypadku wiązek reaktorowych. Dawka „terapeutyczna” stanowi tu sumę składowych dawki pochodzących od różnych rodzajów promieniowania, które występują w takiej wiązce. Na całkowitą dawkę składa się kilka głównych składowych, takich jak dawka związana z produktami reakcji wychwytu neutronów termicznych na borze, dawka od reakcji neutronów z jądrami azotu, dawka od reakcji neutronów epitermicznych i prędkich z jądrami wodoru, dawka od promieniowania gamma generowanego na atomach wodoru w wyniku reakcji neutron gamma w tkance.

Interesujące byłyby też informacje na temat kalibracji takiej wiązki, jakimi metodami mierzone były lub wyznaczane poszczególne składowe. Czy stosowano się do rekomendacji dotyczących dozymetrii dla BNCT, np. zawartych w dokumencie IAEA TECDOC 1223?

W podrozdziale 3.5.2 Autorka zamieszcza informacje o dawkach, jakimi zostały napromienione poszczególne linie komórkowe. Podaje, że komórki zostały napromienione dawkami około 2 Gy oraz około 6 Gy.

Jaką dawkę Autorka miała na myśli, czy chodziło o dawkę fizyczną? Można by przyjąć, że jest to całkowita dawka dostarczona do napromienianych próbek, ale należałoby też podać, jakie składowe dawki zostały uwzględnione.

Ponadto, użycie sformułowania „około” w kontekście dawki podanej w grejach nie jest precyzyjne. Należy podać jaka dawka została podana oraz przynajmniej oszacować niepewności.

W podrozdziale 3.5.2 Autorka podaje czasy napromieniania poszczególnych kultur komórkowych oraz moc reaktora, przy której wykonano poszczególne napromieniania. Wartości te decydują o fluencji neutronów i dawce, którą napromieniono próbki. Nie

koniecznym jest to prosta zależność pomiędzy mocą reaktora i czasem napromieniania, a fluencją.

W jaki sposób wykonana była kalibracja układu napromieniania? Jakie metody pomiaru dawki i/lub dawek składowych były stosowane w reaktorze TRIGA Mark II w laboratorium w Pawii do kalibracji dozymetrycznej układu napromieniania?

W pracy powinny zostać umieszczone pełniejsze informacje o warunkach napromieniania, np. takie jak, wartości strumienia neutronów oraz fluencje neutronów dostarczone w kolejnych napromienieniach.

W rozdziale czwartym na rysunkach o numerach od 20 do 31 przedstawiających wyniki różnych analiz umieszczone zostały obok siebie dane dotyczące napromieniania hodowli, do których przed napromienianiem wprowadzono bor oraz takich do których boru nie wprowadzano. W podpisach rysunków umieszczono informację, że zarówno hodowle zawierające bor jak i te do których nie wprowadzono boru zostały napromienione takimi samymi dawkami, np. 2 Gy lub 6 Gy. Nie jest to informacja prawdziwa. W rzeczywistości próbki mogły zostać napromienione taką samą fluencją neutronów, ale o ile dawki w próbkach zawierających bor były na poziomie 2 Gy lub 6 Gy, to dawki zdeponowane w próbkach zawierających boru były znacznie niższe, gdyż w takim przypadku nie było składowej dawki powstającej w wyniku reakcji wychwytu neutronów na borze.

Podobna uwaga dotyczy opisu tabel w Załącznikach F oraz G.

Uwagi edytorskie, językowe, redakcyjne i inne.

Układ pracy jak i stronę edytorską pracy oceniam jako właściwą. Na szczególne podkreślenie zasługuje załączenie rysunków wykonanych przy użyciu narzędzia BioRender.com. Wykonane tym narzędziem schematy przeprowadzania eksperymentów w znaczącym stopniu ułatwiają zrozumienie zastosowanych technik i metod laboratoryjnych.

Moim zdaniem w spisie treści powinny znaleźć się również tytuły części: PART I, PART II oraz PART III, które Autorka wyróżniła w rozdziałach trzecimi czwartym.

Niestety Autorka nie uniknęła również pewnych drobnych błędów edytorskich. Dotyczy to w szczególności odwołań w tekście do zamieszczonych załączników. Do niektórych załączników autorka umieściła w tekście pracy odniesienia, do innych nie umieściła.

Brak jest też pełnej konsekwencji w zastosowanej notacji liczb. W niektórych rysunkach Autorka stosuje przecinek jako separator dziesiętny zamiast używanej w języku angielskim kropki.

Praca wyglądałaby też lepiej graficznie, gdyby przyjąć zestandaryzowaną wielkość fontów na rysunkach zawierających podobne informacje, dotyczy to między innymi rysunków 20, 21 22.

Podsumowując

W ramach przygotowania rozprawy doktorskiej Autorka opracowała trójwymiarowy model hodowli komórkowych, który miał posłużyć do badań *in vitro* w terapii BNCT. Zaproponowany model w formie sferoid powinien pozwolić na lepsze odwzorowanie warunków fizjologicznych niż powszechnie używane dwuwymiarowe modele komórkowe. Badania prowadzono na materiale dwóch linii czerniaka ludzkiego oraz jednej linii melanocytów – zdrowych komórek skóry ludzkiej. W pracy Autorka przeprowadziła szczegółowe pomiary różnych istotnych parametrów określających komórki jak i całe hodowle (sferoidy) stosując szereg zaawansowanych metod laboratoryjnych, co pozwoliło na określenie parametrów przygotowanych modeli komórkowych. Następnie przeprowadziła badania wychwyty boru dostarczanego przez standardowo stosowany w terapii BNCT nośnik ¹⁰BPA.

Ostatnim etapem były testy związane z odpowiedzią układów komórkowych na napromienianie wiązkami neutronów termicznych z reaktora TRIGA Mark II. Uzyskane wyniki pokazały zróżnicowanie odpowiedzi dla różnych linii komórkowych oraz wskazały na wyższą czułość układów 3D na napromieniania niż standardowych układów komórkowych.

Reasumując, Autorka wykonała pracę, która doprowadziła do zaproponowania nowego modelu komórkowego i wykazała jego przydatność w badaniach związanych z terapią BNCT. Pomimo pewnych braków związanych z zagadnieniami napromieniania próbek neutronami oraz z dozymetrią w BNCT wysoko oceniam wykonaną pracę. Postawione cele zostały osiągnięte, a zaproponowany model komórkowy został przetestowany na najważniejszych etapach jego budowy (testy parametrów sferoid, absorpcja boru, wpływ napromieniania neutronami). Zaproponowany model może stanowić ciekawą alternatywę dla obecnie stosowanych modeli komórkowych w badaniach na każdym etapie procedury BNCT, od badania własności nowych nośników boru, po testy związane z badaniem efektów radiobiologicznych wiązek neutronowych. Co więcej przedstawione w pracy wyniki wskazują, że model taki może lepiej opisywać zachowania zachodzące w strukturach napromienianego w terapii BNCT guza. Wymaga to jednak dalszych badań.

W mojej opinii przedstawiona przez Panią mgr Monikę Szczepanek rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) stawiane rozprawom doktorskim. **Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Moniki Szczepanek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Kraków 9.05.2024

