

**Beata Brzozowska**  
Uniwersytet Warszawski  
Wydział Fizyki  
Instytut Fizyki Doświadczalnej  
Zakład Fizyki Biomedycznej



---

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR WIKTORII EMILII KRAKOWIAK  
PT. "UWRAŻLIWIANIE OPORNÝCH KOMÓREK NOWOTWOROWYCH PIERSI ZA POMOCĄ  
NANOCZĄSTEK ZŁOTA W TERAPII BOROWO-NEUTRONOWEJ (BNCT)"

---

Projekt rozprawy doktorskiej mgr Wiktorii Emilii Krakowiak pt. „Uwrażliwianie opornych komórek nowotworowych piersi za pomocą nanocząstek złota w terapii borowo-neutronowej (BNCT)” został zrealizowany w Instytucie Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego (UJK) w Kielcach pod kierunkiem dr hab. Haliny Lisowskiej, prof. UJK, we współpracy z Narodowym Centrum Badań Jądrowych (NCBJ) w Świerku przy współudziale promotorki pomocniczej dr Karoliny Wójciuk z tej jednostki.

Rozprawa doktorska opiera się na wynikach badań eksperymentalnych przeprowadzonych na dwóch liniach komórek nowotworowych piersi, realizowanych w kontekście terapii borowo-neutronowej (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT). W badaniach wykorzystano nanocząstki złota o dwóch różnych rozmiarach oraz p-boronofenyloalaninę. Zakres prac eksperymentalnych obejmował również napromienianie komórek, przeprowadzone reaktorze MARIA w Narodowym Centrum Badań Jądrowych. Przedstawione w rozprawie wyniki nie były dotychczas publikowane. Doktorantka jest natomiast współautorką pracy przeglądowej dotyczącej medycznych zastosowań terapii borowo-neutronowej, opublikowanej w czasopiśmie *Medical Studies / Studia Medyczne* (ISSN: 1899-1874).

Niniejsza recenzja została przygotowana na zlecenie Rady Naukowej Instytutu Biologii UJK w Kielcach w ramach postępowania doktorskiego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych.

## 1 Wartość naukowa pracy

Rozprawa doktorska mgr Wiktorii Emilii Krakowiak koncentruje się na badaniu możliwości zwiększenia efektywności terapii borowo-neutronowej z zastosowaniem nanocząstek złota oraz związku borowego — p-boronofenyloalaniny (BPA). Prace eksperymentalne zostały przeprowadzone na dwóch liniach komórek nowotworowych piersi: trójjemnej oraz luminalnej. W ramach badań został opracowany protokół napromieniania wiązką neutronową w poczcie hydraulicznej reaktora MARIA w NCBJ oraz dobrano optymalne stężenia nanocząstek złota i BPA, a także oceniono ich wnikanie do komórek.

Analizy, przeprowadzone przez doktorantkę, obejmowały różne układy eksperymentalne: komórki inkubowane z nanocząstkami złota, z BPA, z kombinacją obu

czynników oraz warunki z napromienianiem i bez napromieniania. W badaniach oceniano populacje komórkowe w różnych fazach cyklu komórkowego, przeżywalność komórek, indukcję mikrojąder, powstawanie ognisk naprawczych DNA oraz procesy apoptozy i nekrozy. Celem pracy było określenie potencjału uwrażliwiania komórek nowotworowych na promieniowanie neutronowe poprzez synergistyczne oddziaływanie nanocząstek złota i BPA, a także weryfikacja skuteczności i bezpieczeństwa zaproponowanych protokołów napromieniania.

Rozprawa rozpoczyna się od części teoretycznej, która obejmuje kompleksowy opis BNCT, w tym charakterystykę nośników izotopu boru-10, ze szczególnym uwzględnieniem p-boronofenyloalaniny. W pracy przedstawiono również właściwości wiązki neutronowej produkowanej w reaktorze MARIA oraz omówiono dotychczasowe zastosowania BNCT w badaniach klinicznych u pacjentów onkologicznych. Część teoretyczna obejmuje ponadto charakterystykę typów nowotworów piersi, ze szczególnym uwzględnieniem linii komórkowych luminalnych i trójjemnych. Dodatkowo przedstawiono właściwości zastosowanych nanocząstek złota oraz ich potencjalne oddziaływanie z neutronami, co stanowi podstawę dla opracowanych eksperymentów i analiz w pracy.

W dalszej części rozprawy szczegółowo opisano materiały i metody wykorzystane w badaniach. Przedstawiono charakterystykę linii komórkowych MDA-MB-231 oraz MCF-7, opisano zastosowaną p-boronofenyloalaninę oraz źródło neutronów. Ponadto zaprezentowano schematy eksperymentów obejmujące ocenę aktywności metabolicznej komórek, wnikania nanocząstek złota, przeżywalności komórek, testu mikrojądrowego, testu  $\gamma$ -H2AX oraz badania apoptozy. Rozdział zawiera również krótki podrozdział dotyczący zastosowanych metod analizy statystycznej, które umożliwiły interpretację uzyskanych wyników.

Na podstawie wyników testu MTT wybrano stężenia nanocząstek złota (8  $\mu$ l/ml) oraz BPA (30 mg/ml), które zostały zastosowane we wszystkich eksperymentach przeprowadzonych dla obu linii komórkowych (MDA-MB-231 i MCF-7) oraz dwóch czasów inkubacji (4 h i 24 h). Wyniki badań wpływu promieniowania mieszanego (50 % promieniowania neutronowego i 50 % promieniowania gamma) na obie linie komórkowe, uzyskane za pomocą różnych testów stosowanych przez doktorantkę, były zróżnicowane w zależności od metody pomiaru. We wszystkich przypadkach jednak zaobserwowano, że napromienianie komórek w obecności nanocząstek złota oraz BPA wiązało się z większą redukcją przeżywalności komórek oraz zwiększoną liczbą uszkodzeń DNA. Efekty te w niektórych eksperymentach były statystycznie istotne, natomiast w innych ujawniały wyraźny trend wskazujący na zwiększoną efektywność terapii w badanych warunkach.

Tego rodzaju badania mają istotne znaczenie dla rozwoju terapii borowo-neutronowej w leczeniu nowotworu piersi. Uzyskane wyniki dostarczają szczegółowych informacji dotyczących wnikania nanocząstek do komórek, ich oddziaływania na przeżywalność komórek, indukcję uszkodzeń DNA oraz procesy apoptotyczne i nekrotyczne. Takie dane są kluczowe dla optymalizacji parametrów BNCT, w tym doboru stężeń nośników boru, czasu inkubacji oraz kombinacji czynników terapeutycznych, co może przyczynić się do zwiększenia efektywności leczenia nowotworów opornych na konwencjonalne metody radioterapii. Ponadto praca wnosi istotny wkład w poznanie interakcji nanocząstek złota z promieniowaniem neutronowym, co stanowi podstawę do projektowania nowych strategii terapii celowanej i precyzyjnej modulacji odpowiedzi komórkowej na napromienianie.

## 2 Poprawność redakcyjna rozprawy

Struktura rozprawy została zorganizowana w sposób logiczny i przejrzysty. Praca obejmuje spis treści oraz wykaz symboli, po których następuje siedem głównych części: (1) wstęp, (2) cel pracy, (3) materiały i metody, (4) wyniki, (5) dyskusja, (6) wnioski oraz (7) bibliografia (która nie powinna być traktowana jako rozdział). Na końcu pracy znajdują się streszczenia w języku polskim i angielskim, materiały dodatkowe, spis rysunków oraz dorobek publikacyjny doktorantki. Treści pracy zostały prawidłowo rozmieszczone, tworząc spójną całość. Materiał badawczy przedstawiono w formie rysunków, co umożliwia klarowną prezentację wyników i ułatwia ich interpretację w kontekście prowadzonych analiz.

W pracy wykorzystano szeroki zakres testów biologicznych, w tym m.in. test MTT, oznaczanie przeżywalności komórek, test mikrojądrowy oraz analizę ognisk  $\gamma$ -H2AX, przeprowadzonych na dwóch liniach komórkowych: MDA-MB-231 oraz MCF-7. Badania obejmowały kilka układów eksperymentalnych, w tym komórki z dodanymi nanocząstkami złota, komórki z dodanym BPA, kombinację obu czynników, a także warianty z napromienianiem i bez napromieniania. Z jednej strony świadczy to o bogactwie materiału badawczego i systematycznym podejściu do analizy różnych warunków eksperymentalnych. Z drugiej strony trudne jest uniknięcie powtarzania treści w przedstawianiu wyników. W związku z tym można rozważyć inną strukturę rozdziału „Wyniki” — zamiast dzielić go na podrozdziały według zastosowanych testów i linii komórkowych, wyniki mogą być uporządkowane według badanych zjawisk. W mojej ocenie, można byłoby rozpocząć od porównania wybranych linii komórkowych na podstawie aktywności metabolicznej (co dobrze obrazuje różnice między liniami oraz uzasadnia wybór konkretnych linii, a także umożliwia określenie optymalnego stężenia nanocząstek złota i BPA) w oparciu o test MTT, uwzględniając przy tym dwa różne czasy inkubacji. Następnie można osobno przedstawić porównanie wnikanía nanocząstek w obu liniach komórkowych, a następnie porównanie przeżywalności komórek w różnych warunkach: a) podanie tylko BPA, b) podanie tylko nanocząstek złota, c) kombinacja obu czynników. Taki układ pozwoliłby na bardziej przejrzystą i spójną prezentację danych oraz ułatwiłby interpretację wyników w kontekście analizowanych zjawisk biologicznych.

Rysunki i tabele w pracy zostały właściwie opisane, co ułatwia analizę przedstawionych danych. Zauważyć można jednak, że reakcje oraz wiele rysunków, szczególnie w rozdziale „Wstęp”, nie są przywołane w treści pracy, co utrudnia pełne ich powiązanie z opisem przedstawianych zagadnień. W pracy występuje również kilka tabel, do których doktorantka odwołuje się w tekście określeniem „w tabeli poniżej”, zamiast posługiwać się przypisaną numeracją. Stosowanie numeracji pozwala na jednoznaczne odniesienia i ułatwia orientację w tekście.

W dyskusji wyniki zostały porównane z danymi opublikowanymi przez inne grupy badawcze, a jednocześnie przedstawiono możliwe mechanizmy biologiczne, które mogą wyjaśniać obserwowane efekty w komórkach. Wnioski sformułowano w sposób adekwatny, z uwzględnieniem niepewności związanych z interpretacją danych. Całość rozprawy została napisana językiem naukowym, a przedstawione zagadnienia są zrozumiałe i sformułowane w sposób rzeczowy. Bibliografia obejmuje 142 pozycje, w tym liczne aktualne publikacje z ostatnich lat, co świadczy o gruntownym opanowaniu tematu, uwzględnianiu bieżących osiągnięć naukowych oraz aktualnych trendów w dziedzinie BNCT i badań z użyciem nanocząstek.

W pracy występują nieliczne błędy edytorskie, których wychwycenie jest naturalnym zadaniem recenzenta. Zostały one szczegółowo omówione w kolejnym rozdziale

i nie mają wpływu na wartość naukową rozprawy.

### 3 Uwagi krytyczne

Rozprawa została odpowiednio zredagowana, jednak zauważyłam kilka drobnych kwestii edytorskich oraz pytań, które przedstawiłam poniżej dla zachowania przejrzystości.

1. Zasadne jest wprowadzanie podrozdziałów w sytuacji, gdy występuje ich więcej niż jeden. W rozdziale pierwszym pojawiają się pojedyncze podrozdziały (np. 1.2.1, 1.4.1, 1.6.1), które można wyraźniej zaznaczyć poprzez pogrubienie tytułów lub, alternatywnie, rozważyć wprowadzenie dwóch podrozdziałów w danym miejscu.
2. Wysokoenergetyczne cząstki nie są synonimem promieniowania o wysokim LET (strona 9). O klasyfikacji promieniowania decyduje sposób jego oddziaływania z atomami ośrodka, a nie wyłącznie energia cząstek. Promieniowanie o wysokim LET charakteryzuje się gęstą jonizacją ośrodka.
3. W tekście występują literówki i drobne błędy interpunkcyjne, np.: „wiążki” (str. 14), „badawczymch” (str. 18) oraz „tróujemne” (wielokrotnie). Łącznie można zidentyfikować kilkanaście podobnych literówek w całym tekście.
4. W pracy pojawiają się przykłady nieprecyzyjnego żargonu oraz sformułowań niezgodnych z konwencjami naukowymi. Na stronie 9 stwierdzenie „Rozpad jądra boru-10 prowadzi do wytworzenia cząstek alfa” powinno brzmieć „Rozpad jądra boru-10 prowadzi do emisji cząstek alfa”. Sformułowanie „komórki były traktowane” również ma charakter żargonowy i warto je zastąpić bardziej precyzyjnym opisem procedury. Ponadto Narodowe Centrum Badań Jądrowych ma siedzibę w Świerku, a nie w Otwocku; informacja o lokalizacji w Otwocku pojawia się przy afiliacji promotorki pomocniczej oraz jako tytuł podrozdziału 1.3.4. Poprawa tych sformułowań zwiększa zgodność z naukową terminologią i poprawia czytelność tekstu.
5. Nagłówki w tabelach 1 i 2 (czarne litery na niebieskim tle) są słabo widoczne, co utrudnia ich odczyt.
6. Na rysunku 5 (strona 31) przedstawiono podział nowotworów piersi, jednak treści zawarte na rysunku nie zostały omówione ani przywołane w tekście pracy. W szczególności brak jest odniesienia do rysunku (kwestię tę poruszam również w rozdziale 2 recenzji) oraz opisu nowotworów pierwotnych i naciekających.
7. W kilku miejscach w pracy, również na rysunkach, zastosowano kropki jako separatory dziesiętne zamiast przecinków (np. przy zapisie energii neutronów na stronie 18 oraz wartości dawek w schematach eksperymentów). Zgodnie z polską konwencją zapisu liczbowego właściwe jest stosowanie przecinków jako separatorów dziesiętnych.
8. Większość skrótów została rozwinięta przy pierwszym użyciu, wyjątkiem jest skrót TLD (Thermoluminescent Dosimeter), który pojawia się po raz pierwszy na stronie 40 bez podania wyjaśnienia.

9. Zapis wykładniczy wartości energii neutronów na stronie 40 oraz stężenia nanocząstek w zawieszynie na stronie 41 jest trudny do odczytania i wymaga poprawy w celu zwiększenia czytelności przedstawionych danych.
10. W pracy zauważono nieprawidłowości w zapisie wartości z niepewnościami. Zgodnie z przyjętymi zasadami, niepewności powinny być podawane z dwoma cyframi znaczącymi, a liczba miejsc po przecinku w wartości średniej powinna być dostosowana do dokładności niepewności. W pracy doktorantka podaje wartości z nawet czterema cyframi znaczącymi, np. na stronach 59 i 64.

Dodatkowo przedstawiam poniżej kilka uwag, prosząc doktorantkę o ich skomentowanie:

1. Poproszę o szczegółowe wyjaśnienie, w jaki sposób oszacowano dawki promieniowania za pomocą termoluminescencyjnych detektorów (TLD)? Jakie czynniki mogą tłumaczyć rozbieżności wartości dawki pochłoniętej zmierzonych w różnych dniach, w jaki sposób obliczono dawkę efektywną i w jakich jednostkach jest ona podawana? Dodatkowo, w jaki sposób oszacowano niepewności związane z dawką i jak uwzględniono w tych szacunkach niepewność wynikającą z faktu, że komórki znajdowały się w różnych fazach cyklu komórkowego (rozdział 4.3.2)?
2. W pracy pojawia się informacja, że test ognisk naprawczych, polegający na zliczaniu ognisk pod mikroskopem fluorescencyjnym, jest jedynie metodą jakościową, a nie ilościową, w przeciwieństwie do pomiaru poziomu fluorescencji. Jakiego są tego powody? Dodatkowo, w pracy doktorantka stwierdza, że przeprowadzono analizę powstawania i zanikania ognisk naprawczych (strona 140) — czy rzeczywiście wykonano taką analizę?
3. Poproszę o doprecyzowanie, czy w przypadku eksperymentów wykorzystujących test przeżywalności oraz test mikrojądrowy każdy z trzech niezależnie przeprowadzonych eksperymentów obejmował również replikanty techniczne? Jeśli tak, to ile replikantów zastosowano w każdym eksperymencie oraz w jaki sposób wyliczono niepewności – jako odchylenie standardowe populacji czy odchylenie standardowe średniej?
4. Dlaczego do eksperymentów opisanych w pracy doktorantka wybrała stężenie *p*-boronofenyloalaniny (BPA) na poziomie 30 mg/mL, zamiast niższego stężenia 15 mg/mL, przy którym w teście MTT obserwowano już istotne różnice statystyczne? Proszę o uzasadnienie tej decyzji w kontekście zarówno obserwowanych efektów biologicznych, jak i bezpieczeństwa czy możliwego wpływu na wyniki terapii borowo-neutronowej.
5. Jakiego dodatkowe badania potwierdziłyby i pogłębiły wiedzę na temat procesów biologicznych wpływających na efektywność terapii borowo-neutronowej w połączeniu z nanocząstkami złota? Prośba o wskazanie możliwych kierunków badań, potencjalnych metod eksperymentalnych oraz parametrów, które warto byłoby uwzględnić w dalszych analizach.

## 4 Ocena końcowa

Osiągnięciem doktorantki jest przeprowadzenie kompleksowych eksperymentów radiobiologicznych, które umożliwiły odpowiedź na pytanie dotyczące wpływu nano-

cząstek złota na uwrażliwianie komórek nowotworowych. Badania obejmowały analizę odpowiedzi komórkowej zarówno na poziomie całej komórki – obejmując przeżywalność, apoptozę i nekrozę – jak i na poziomie uszkodzeń DNA, poprzez ocenę powstawania ognisk naprawczych oraz mikrojąder. Tak zebrany przez doktorantkę materiał badawczy stanowi wkład naukowy i spełnia warunek przyznania stopnia doktora. Wyniki badań przedstawione w rozprawie jednoznacznie wskazują na zdolność doktorantki do samodzielnej pracy naukowej oraz na jej rozumienie metodologii projektowania eksperymentów i analizy danych pomiarowych.

Osiągnięcia mgr Wiktorii Emilii Krakowiak odzwierciedlają jej umiejętności eksperymentalne w realizacji badań komórkowych z wykorzystaniem wiązki neutronowej w NCBJ. Jej dorobek publikacyjny, obejmujący cztery prace wynikające nie tylko z zagadnień z obszaru tematu rozprawy, lecz także z aktywnego udziału we wspólnych badaniach, wskazuje zarówno na zaangażowanie naukowe, jak i zdolność do efektywnej pracy w zespole badawczym.

Ja, niżej podpisana, potwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Wiktorii Emilii Krakowiak pt. „Uwrażliwianie opornych komórek nowotworowych piersi za pomocą nanocząstek złota w terapii borowo-neutronowej (BNCT)” spełnia wymagania określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. "Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce"(tj. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, o dopuszczenie mgr Wiktorii Emilii Krakowiak do kolejnych etapów postępowania doktorskiego oraz do publicznej obrony.

Z poważaniem,

Beata Brzowska