

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr.

Małgorzata M. Dobrzyńska

Emerytowana Profesor

Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH – PIB

Warszawa, 18.12.2025 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Wiktorii Emilii Krakowiak

**pt.: „Uwrażliwienie opornych komórek nowotworowych piersi za pomocą nanocząstek
złota w terapii borowo-neutronowej (BNCT)”**

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącej Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach Pani dr hab. Joanny Czerwik-Marcinkowskiej, prof. UJK z dnia 21 października 2025 roku w związku z uchwałą nr 67/2025 Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach z dnia 9 października 2025 roku. Formalną podstawę sporządzenia recenzji stanowią zapisy Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z późniejszymi zmianami.

Pani mgr Wiktoria Emilia Krakowiak jest doktorantką Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach. Rozprawa została wykonana w Sekcji Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Promotorem pracy jest Pani dr hab. Halina Lisowska, prof. UJK, a promotorem pomocniczym Pani dr Karolina Wójciuk z Narodowego Centrum Badań Jądrowych w Świerku.

Coraz większe rozpowszechnienie chorób nowotworowych stawia przed współczesną medycyną coraz trudniejsze wyzwania związane z ich leczeniem. Stosowanie tradycyjnych metod terapeutycznych wiąże się z występowaniem wielu skutków ubocznych. Poza tym, liczne komórki nowotworowe wykazują oporność na stosowane leczenie. Toteż szczególnie

istotne jest prowadzenie badań w celu znalezienia nowych i efektywnych związków wspomagających terapię, a także wypracowanie innowacyjnych metod leczenia tych groźnych chorób. Substancje takie powinny cechować aktywność przeciwnowotworowa oraz znaczna skuteczność. Równocześnie, związki takie nie powinny indukować skutków ubocznych ani działania toksycznego stosunku do komórek prawidłowych.

Przedstawiona do recenzji obszerna, licząca 200 stron rozprawa doktorska składa się z typowych dla dysertacji rozdziałów: Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja wyników, Wnioski i Bibliografia. Ponadto, Doktorantka zamieściła Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenia w języku polskim i angielskim, Suplement, Spis rycin oraz Dorobek publikacyjny.

W podrozdziałach Wstępu Autorka szczegółowo opisuje terapię borowo-neutronową, farmakologiczny związek chemiczny zawierający izotop ^{10}B , tj. p-borofenyloalaninę (BPA), fizykę terapii borowo-neutronowej, badania kliniczne i wykorzystanie BNCT w leczeniu nowotworów, nowotwory piersi oraz wpływ nanocząstek złota na zwiększenie efektywności radioterapii. Wstęp stanowi oparte na adekwatnym piśmiennictwie wprowadzenie do części badawczej rozprawy i świadczy o dużej wiedzy teoretycznej Doktorantki.

Terapia borowo-neutronowa (BNCT) jest odmianą hadronoterapii, w której wykorzystuje się wiązkę cząstek o wysokim liniowym przekazie energii (LET). Najczęściej używa się neutronów uzyskanych w reakcji rozszczepienia zachodzącej w reaktorach jądrowych. BNCT jest terapią bimodalną. Pierwszym jej etapem jest podanie pacjentowi farmaceutyku z izotopem ^{10}B w odpowiednim stężeniu. Następnie pacjent poddawany jest działaniu wiązki neutronów termicznych. Selektywna dyfuzja związków boru do komórek nowotworowych zwiększa efektywność rozpadu neutronów.

W BNCT wykorzystuje się ^{10}B ze względu na wychwyt neutronów termicznych. Nośniki izotopu ^{10}B powinny mieć niskie powinowactwo wychwyty w tkance prawidłowej przy wysokim wskaźniku wychwyty w tkance nowotworowej, niską toksyczność oraz utrzymywać stabilne stężenie w obrębie tkanki nowotworowej podczas napromieniania oraz być efektywnie eliminowane z krwioobiegu i tkanek prawidłowych. Doktorantka w swoich badaniach wykorzystała p-borofenyloalaninę (BPA), pochodną aminokwasu fenyloalaniny.

W dalszej części Wstępu Doktorantka opisuje badania kliniczne i wykorzystanie BNCT w leczeniu nowotworów, a następnie przechodzi do opisu nowotworów piersi, wśród których wyróżnia się luminalne, HER-2 dodatnie oraz trójujemne.

W ostatniej części Autorka opisuje działanie nanocząstek złota. Nanocząstki te wprowadzone w miejscu guza są wykorzystywane w celu zwiększenia efektywności radioterapii. Wzmacniają one dawkę poprzez absorpcję promieniowania jonizującego i przekształcenie go w strumień elektronów wtórnych, co doprowadza do uszkodzenia DNA komórek nowotworowych, głównie do zwiększenia liczby pęknięć podwójnoniciowych. Wytwarzane są reaktywne formy tlenu, których powstawanie może być katalizowane przez nanocząstki. W konsekwencji dochodzi do uszkodzenia integralności błon komórkowych, zmian pH lub niedotlenienia komórek nowotworowych, co z kolei zwiększa wrażliwość komórek na promieniowanie. Nanocząstki wpływają też na rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, indukują apoptozę i wpływają na metabolizm komórek.

Pani mgr Krakowiak postawiła sobie za cel zbadanie możliwości zwiększenia skuteczności terapii borowo-neutronowej za pomocą nanocząstek złota w komórkach nowotworowych piersi typu trójjemnego MDA-MB-231 oraz luminalnego MCF-7. Jako cele szczegółowe Doktorantka określiła:

- opracowanie protokołu napromieniania komórek w poczcie hydraulicznej reaktora badawczego MARIA w NCBJ,
- ustalenie optymalnych stężeń nanocząstek złota oraz borofenyloalaniny (BPA) poprzez analizę wnikania nanocząstek do badanych komórek nowotworowych oraz analizę ich właściwości cytotoksycznych,
- zbadanie wpływu terapii borowo-neutronowej z zastosowaniem nanocząstek złota na poziom uszkodzeń i naprawy DNA w komórkach MDA-MB-231 i MCF-7,
- analizę wpływu terapii borowo-neutronowej z nanocząsteczkami złota na przeżywalność oraz przebieg cyklu komórkowego w badanych liniach komórkowych,
- analizę porównawczą efektywności terapii borowo-neutronowej w zależności od rozmiaru nanocząstek złota

W mojej ocenie podjęty przez Doktorantkę temat jest aktualny i bardzo ważny ze względów społecznych i medycznych. Zarówno cel główny, jak i cele szczegółowe są uzasadnione i dokładnie sprecyzowane.

Materiały i Metody Doktorantka podzieliła na 12 podrozdziałów, w których dokładnie opisała sposób przeprowadzania doświadczeń. Uważam, że metody zostały dobrane prawidłowo w korelacji z wyznaczonymi celami.

Jako materiał do badań Doktorantka wykorzystwała dwie linie komórkowe ludzkich nowotworów piersi: MCF-7 oraz MDA-MB-231. Źródłem promieniowania mieszanego, tj. 50% promieniowania gamma i 50 % promieniowania neutronowego, był reaktor badawczy MARIA znajdujący się w Narodowym Centrum Badań Jądrowych w Świerku. Kandydatka zastosowała następujące metody badawcze: test cytotoksyczności MTT, cytometryczną analizę poziomu wnikania nanocząstek złota do komórek nowotworowych, analizę wpływu nanocząstek złota i BPA na rozkład oceny przeżywalności komórek nowotworowych, test mikrojądrowy do oceny uszkodzeń chromosomów w komórkach nowotworowych, test γ -H2AX do analizy indukcji podwójnoniciowych pęknięć nici DNA, test z aneksyną V i jodkiem propidyny w celu analizy apoptozy. Do oceny statystycznej wyników wykorzystano test ANOVA oraz test post-hoc Tukey'a.

Wyniki Doktorantka zaprezentowała na 105 stronach. Rozdział ten podzielony został na 7 podrozdziałów pierwszego stopnia, które z kolei podzielono na podrozdziały drugiego stopnia. Oprócz tekstu w skład tego rozdziału wchodzi 4 tabele i 57 rycin. Uzupełniają je tabele analiz statystycznych znajdujące się w Suplemencie.

W pierwszym podrozdziale opisano wyniki testu MTT, wykonanego w celu dobrania odpowiednich stężeń GNPs. Na podstawie wyników badań stwierdzono, że każde stężenie BPA, jak i nanocząstek złota byłoby odpowiednie do badań zwiększając aktywność metaboliczną komórek nowotworowych. Dla obu linii komórkowych wybrano stężenia GNPs $8 \mu\text{l/ml}^{-1}$, a dla BPA 30 mg/ml^{-1} . W drugim podrozdziale wykazano, że nanocząstki złota wnikają do komórek nowotworowych piersi obu badanych linii. Wyniki analizy rozkładu w poszczególnych etapach cyklu komórkowego wykazały, że GNPs 100 nm inkubowane 24 h wraz z BPA najefektywniej wpływają na zmiany rozkładu komórek linii MDA-MB-231 w fazach cyklu komórkowego po napromienieniu i ich zwiększoną ilość w fazie G2, w której komórki zatrzymują się w celu naprawy uszkodzeń. Podobnie, w przypadku komórek linii NCF-7, GNPs inkubowane 24 h z BPA w połączeniu z promieniowaniem najefektywniej wpływa na aktywność terapii borowo-neutronowej zmieniając w istotny sposób rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu. W analizie przeżywalności stwierdzono, że napromienianie najefektywniej obniża przeżywalność komórek nowotworowych. W 5 podrozdziale wyników Autorka analizowała częstość występowania mikrojąder. W linii MDA-MB-231 występowanie MN zwiększało się do 36 h po napromienieniu, traktowaniu BPA lub GNPs, a następnie zmniejszało się, co świadczy o naprawie materiału genetycznego. Zastosowanie skojarzenia promieniowania z BPA i GNPs zwiększa indukcję MN. W przypadku linii komórkowej NCF-7, uzyskano podobne wyniki,

największą częstość występowania mikrojąder odnotowano w komórkach napromienianych z nanocząstkami złota. W następnych podrozdziale opisano wyniki testu ognisk naprawczych γ -H2AX, w którym wzrost poziomu histonu H2AX świadczy o zwiększonym poziomie uszkodzeń DNA. W linii komórkowej MDA-MB-231 najwyższy poziom uszkodzeń DNA otrzymano w komórkach napromienionych z GNPs 50 nm z inkubacją 24h z BPA. Podobne rezultaty uzyskano dla linii komórkowej NCF-7. W podrozdziale 7 Autorka zanalizowała poziom apoptozy w komórkach nowotworu piersi obu badanych linii komórkowych. W linii komórkowej MDA-MK-231 najwyższą liczebność komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych stwierdzono w komórkach nienapromienionych traktowanych GNPs 100 nm z inkubacją 4h i 24 h z BPA, GNPs 50 nm z inkubacją 24 h oraz samym BPA. Dla linii komórkowej NCF-7 najwyższą częstość komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych stwierdzono w grupach nienapromienionych GNPs 100 nm z inkubacją 4h i 24h z BPA, GNPs 50 nm z inkubacją 24 h lub samym BPA. Po napromienieniu w grupach GNPs 100 nm z inkubacją 4 h, GNPs 50 nm z inkubacją 24 h z BPA lub bez BPA stwierdzono zwiększenie liczebności komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych.

Rozdział Wyniki jest bardzo obszerny, widać, że Doktorantka poświęciła dużo pracy i czasu na wykonanie części doświadczalnej i realizację celów szczegółowych. Niestety, jest to najgorzej przygotowany rozdział ocenianej rozprawy doktorskiej. Brak w nim jakiegokolwiek inwencji twórczej. Autorka posługuje się, niekiedy bezmyślnie, metodą „kopiuj, wklej”. Niepotrzebnie powtarzane jest w opisie każdego doświadczenia, że wykonano 3 powtórzenia, jak również, te same objaśnienia pod każdą ryciną, taki sam opis stosowanych metod statystycznych oraz informacja, że szczegółowe wyniki analizy statystycznej znajdują się w Suplemencie. Te informacje są ważne, ale wystarczyło podać je raz. Wielokrotnie powtarzanie tych informacji zaciemnia bieżący przekaz i utrudnia odbiór opisu uzyskanych wyników. Podobnie, nie ułatwia recenzji podawanie w tekście szeregów średnich, odchyłeń standardowych wraz z wartościami p, gdyż wyniki te znajdują się na rycinach i w tabelach Suplementu. Niektóre zdania są bardzo długie, zajmują nawet kilkanaście wersów, co powoduje, że trudno skupić się na ich treści. Ponadto, Doktorantka używa żargonu i skrótów myślowych. Píše na przykład „eksperymenty napromienione są istotne statystycznie”, „z badań napromienionych z samymi nanocząsteczkami złota istotne statystycznie są komórki traktowane”. A przecież analiza statystyczna dotyczy wyników uzyskanych w badaniach, a nie eksperymentów czy komórek. Takich skrótów myślowych jest dużo więcej. Autorka używa

niefortunnego sformułowania „procentowa liczba komórek” zamiast powszechnie używanej formy „odsetek”.

Następny rozdział to 12-stronnicowa Dyskusja. Rozdział ten został przygotowany w sposób staranny i profesjonalny. Doktorantka omówiła uzyskane przez siebie wyniki w kontekście dostępnych danych opublikowanych przez innych autorów. Piśmiennictwo zostało właściwie dobrane, są to głównie artykuły angielskojęzyczne, w większości z ostatniego dwudziestolecia. Dyskusja obejmuje wszystkie zagadnienia, którymi Doktorantka zajęła się w swojej rozprawie doktorskiej. Autorka próbuje wyjaśnić uzyskane wyniki w oparciu dane literaturowe.

Kolejny rozdział to Wnioski. Jednak zamiast zwięzłych i jasnych konkluzji Autorka na 2,5 stronach przedstawia podsumowanie uzyskanych wyników. Wydaje się, że ten rozdział stanowi wersję roboczą, z której Autorka zapomniała wyprowadzić właściwe wnioski. Po dokładnej analizie tego osobliwego tekstu można wyłonić następujące wnioski:

- Potwierdzono, że GNPS zwiększają efektywność terapii BNCT.
- Promieniowrażliwość komórek linii MDA-MB-231 na BNCT efektywniej zwiększały nanocząstki złota o rozmiarze 100 nm, podczas gdy w przypadku komórek linii MCF-7 były to GNPs o rozmiarze 50 nm.
- Największą genotoksyczność oraz śmiertelność komórek nowotworowych piersi indukowało skojarzenie nanocząstek złota z BPA i z promieniowaniem.
- Odpowiedź komórkowa w teście γ -H2AX oraz analiza indukcji apoptozy wymagają dalszych badań.

Rozdział 7 rozprawy to Bibliografia, która obejmuje 142 pozycje. Jak już wspominałam przy omawianiu dyskusji, piśmiennictwo zostało prawidłowo dobrane. Są to głównie artykuły angielskojęzyczne, w większości z XXI wieku, chociaż najstarsza z publikacji pochodzi z 1935 roku, co świadczy o wnikliwym zapoznaniu się z piśmiennictwem przez Doktorantkę.

Oba streszczenia, zarówno w języku polskim, jak i angielskim, zostały przygotowane poprawnie, zgodnie z ogólnymi wymaganiami stawianymi rozprawom doktorskim.

Dorobek publikacyjny Doktorantki jest ponadprzeciętny, obejmuje 3 prace opublikowane w czasopismach międzynarodowych o łącznym IF = 7,97 i jedną złożoną w redakcji.

Po analizie przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej stwierdzam, że została przygotowana w formie pisemnej, zawiera oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka wykazała się ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Spełnia zatem wymagania art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Podjęcie tematyki, która dotyczy bieżącego problemu badawczego, było celowe oraz przydatne praktycznie. Rozprawa prezentuje wysoki poziom merytoryczny. Doktorantka wykorzystwała szeroki zakres metod badawczych i skrupulatnie opisała wszystkie procedury oraz krytycznie przedyskutowała wyniki, które mają wysoką wartość naukową i poznawczą. Świadczy to, że jest dobrze przygotowana do dalszej pracy naukowej.

Z obowiązku recenzenta, muszę również przedstawić uwagi krytyczne. Oprócz uwag, które zawarłam w opisie poszczególnych rozdziałów rozprawy, chciałabym prosić Doktorantkę o odpowiedź na kilka pytań oraz wyjaśnienie wątpliwości.

1. Z opisu metodyki wynika, że zastosowane dawki promieniowania były bardzo zróżnicowane od 0,4 Gy do 2,8 Gy. Czy próbowano ustalić dokładne dawki dla każdego doświadczenie? Czy można uogólniać wyniki w przypadku tak zróżnicowanych dawek?
2. Dlaczego nanocząstki złota o rozmiarze 50 nm stabilizowano w 0,1 mM roztworze PBS (buforze fosforanowym) a o rozmiarze 100 nm w buforze cytrynianowym? Czy różnice te nie miały wpływu na wyniki badań?
3. Z tytułu podrozdziału 3.10 wynika, że indukcję podwójnoniciowtch pęknięć DNA badano tylko w komórkach linii MDA-MB-231.
4. Z podpisów pod rycinami 44, 45, 46, 47 wynika, że stosowano wyłącznie promieniowane neutronowe. W tekście Doktorantka pisze zwykle o promieniowaniu mieszanym, a czasem tylko o neutronowym. Z kolei, z opisu rycin 52-53 wynika, że komórki poddano działaniu promieniowania neutronowego, podczas gdy tytuły rycin informują, że było to promieniowanie mieszane.
5. W Dyskusji, autorom Lan i wsp. (str. 148), błędnie przypisane publikacje 106, 130. Podobnie, zespołowi Muszelak i wsp.. błędnie przypisane publikacje 114, 122 i 123 (str. 150).
6. Rycina 6 jest bardzo niewyraźna, praktycznie nie do odczytania.
7. Ponadto, zauważyłam drobne błędy gramatyczne i literowe.

Przedstawione przeze mnie uwagi krytyczne nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy, którą oceniam wysoko.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska mgr Wiktorii Krakowiak pt „Uwrażliwienie opornych komórek nowotworowych piersi za pomocą nanocząstek złota w terapii borowo-neutronowej (BNCT)” spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z wymaganiami określonymi art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Z pełnym przekonaniem, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie Pani mgr Wiktorii Emilii Krakowiak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Prof. dr. hab. n. med. i n. o zdr. Małgorzata Dobrzyńska