

Dr hab. n. med. Dorota Słonina, prof. NIO
Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów
Narodowy Instytut Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie
PIB, Oddział w Gliwicach
dorota.slonina@gliwice.nio.gov.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Wiktorii Krakowiak

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

1. Wartość naukowa rozprawy - trafność podjętej tematyki badawczej i jej oryginalność

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy wykorzystania nanocząstek złota jako promieniowrażliwiacza w terapii borowo-neutronowej (BNCT).

Terapia BNCT jest rodzajem radioterapii, w której wykorzystuje się reakcje neutronów z jądrami izotopu boru ^{10}B , w wyniku których dochodzi do rozbicia jądra boru na jądro litu i helu, czyli cząstkę alfa. Cząstki alfa charakteryzują się bardzo dużą gęstością jonizacji i małym zasięgiem porównywalnym z rozmiarami komórki, co powoduje, że całą energię mogą deponować w komórkach nowotworowych i skutecznie uszkadzać ich DNA. Kluczowym wyzwaniem terapii BNCT jest zaprojektowanie optymalnych nośników dostarczających bor do komórek nowotworowych, czyli takich, aby ich koncentracja w tkankach prawidłowych była jak najmniejsza. Dwa najczęściej stosowane nośniki boru, BPA i BSH, chociaż dopuszczone w badaniach klinicznych, nie są idealne i wciąż poszukiwane są nowe związki. Poszukiwane są także związki dodatkowo uwrażliwiające komórki nowotworowe na terapię BNC. Jednym z takich związków są nanocząstki złota, które w założeniu mogą wzmocnić efekt terapeutyczny BNCT dzięki reakcjom pomiędzy neutronami i atomami złota prowadzącymi do dodatkowej emisji promieniowania gamma.

W Polsce obecnie są dwa ośrodki, które rozwijają terapię borowo-neutronową, mianowicie Narodowe Centrum Badań Jądrowych (NCBJ) w Świerku, gdzie przygotowywane

jest stanowisko do BNCT przy reaktorze badawczym MARIA oraz Centrum Onkologii w Bydgoszczy, gdzie powstaje Ośrodek Badawczo-Kliniczny Terapii Borowo-Neutronowej (OBTBN). Każdy ośrodek, który planuje nowe terapie musi przeprowadzić niezbędne badania radiobiologiczne. Dzięki nim wciąż poznajemy mechanizmy decydujące o odpowiedzi nowotworu i tkanek prawidłowych na leczenie promieniowaniem. Dlatego badania radiobiologiczne Doktorantki, w których wykorzystuje nanocząstki złota w celu uwrażliwienia komórek nowotworowych na BNCT uważam za bardzo oryginalne i potrzebne.

Terapia borowo-neutronowa kojarzy się przede wszystkim z nowotworami mózgu, zwłaszcza z tym najbardziej złośliwym, czyli glejakiem wielopostaciowym, dla którego do dziś nie ma skutecznych metod leczenia. W przypadku czerniaków przełomowa okazała się immunoterapia, czyli zastosowanie inhibitorów punktów kontrolnych anty-PD-1 i anty-CTLA-4. Dzięki niej obecnie wyniki badań klinicznych są na poziomie 40-50% przeżyć pięcioletnich. Terapia BNC raczej nie kojarzy się z rakiem piersi i do tej pory przeprowadzono tylko jedno badanie kliniczne, w którym zastosowano BNCT na wznowy HER-2 dodatniego raka piersi. Od czasu odkrycia, że raki piersi charakteryzują się niskim wsp. α/β , czyli są wrażliwe na wysokie dawki frakcyjne promieniowania, hipofrakcjonowana radioterapia podawana w krótkim czasie jest szeroko stosowana w praktyce klinicznej u kobiet po zabiegach operacyjnych. Zatem wybór do badań nad BNCT dwóch linii raka piersi (HER2-ujemnych) nie jest intuicyjny. Z drugiej strony rak piersi potrójnie ujemny, najgorzej rokujący podtyp raka piersi, mimo stosowanych chemioterapii kojarzonych z immunoterapią nadal jest wyzwaniem. Dlatego badania przeprowadzone na linii MDA-MB-231 reprezentującej raka potrójnie ujemnego są wartościowe.

Generalnie Doktorantka podjęła się ambitnego zadania, ponieważ wymagającego w pierwszej kolejności opracowania protokołu napromieniania w poczcie hydraulicznej reaktora MARIA w NCBJ. Ponadto trudnego logistycznie, ponieważ oprócz napromieniania część testów funkcjonalnych wykonywała w laboratorium Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach co wymagało przewożenia komórek w odpowiednich warunkach. Jestem pod wrażeniem ilości zastosowanych przez doktorantkę metod badawczych i ogromu wykonanej pracy.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

W części wstępnej rozprawy Doktorantka umiejętnie wprowadza czytelnika w dziedzinę badawczą. Dokładnie omawia zasadę działania terapii borowo-neutronowej (BNCT) oraz historię jej zastosowania. Następnie charakteryzuje rodzaje związków zawierających izotop ^{10}B , trzy generacje nośników izotopu ^{10}B skupiając się szczególnie na jednym z nich, czyli na p-borofenyloalaninie (BPA), który to związek wykorzystwała w badaniach będących tematem pracy doktorskiej. W dalszej części Doktorantka skupia się na zagadnieniach fizycznych terapii BNCT, charakteryzuje neutrony i promieniowanie neutronowe oraz rodzaje źródeł promieniowania neutronowego. Jednym z najczęściej wykorzystywanych źródeł do badań eksperymentalnych oraz klinicznych, są reaktory jądrowe. W Polsce mamy jeden czynny reaktor jądrowy MARIA w Narodowym Centrum Badań Jądrowych (NCBJ) w Świerku, który jest również reaktorem badawczym i w swoich badaniach Doktorantka wykorzystwała strumień neutronów produkowany przez ten reaktor. Dlatego dobrze, że we wstępie znalazł się też opis budowy i działania reaktora jądrowego MARIA. W dalszej części wstępu Doktorantka przedstawiła przykłady i wyniki klinicznego zastosowania BNCT w leczeniu glejaków zwłaszcza glejaka wielopostaciowego (GBM), raków regionu głowy i szyi oraz czerniaków. Przegląd przykładowych badań klinicznych zawarła w tabelach. Następnie Doktorantka skupiła się na scharakteryzowaniu raka piersi i jego biologicznych podtypów - luminalnych A i B, HER2-dodatnim nieluminalnym i potrójnie ujemnym. W końcowej części wstępu omówiła właściwości fizykochemiczne i zastosowanie nanocząstek złota (GNP) w radioterapii. Wstęp napisany jest spójnie i czyta się go bardzo dobrze. Cele szczegółowe pracy zostały sformułowane precyzyjnie i konsekwentnie zrealizowane o czym świadczy zawartość dalszej części pracy.

Metodyka badań, została właściwie dobrana do realizacji zamierzonych celów i opisana szczegółowo i zrozumiale. Doktorantka podeszła do tematu bardzo kompleksowo stosując wiele różnych metod badawczych takich jak test MTT, test klonogeny, test mikrojądrowy, test ognisk γH2AX a także test z aneksyną V do oceny indukcji apoptozy oraz cytometryczną ocenę rozkładu komórek w fazach cyklu komórkowego. Przy tak dużej ilości przeprowadzonych eksperymentów z różnymi punktami czasowymi, wielkościami nanocząstek GNP w obecności lub bez BPA i promieniowania świetnym pomysłem było przedstawienie metodyki każdego eksperymentu w postaci kolorowego schematu. To bardzo

ułatwiło podążanie za celem kolejnych etapów pracy. Uwagi do metodyki przedstawiłam w części UWAGI.

Rozdział wyniki jest bardzo obszerny i dokumentuje ogrom pracy, którą wykonała Doktorantka, aby ocenić uwrażliwiający wpływ nanocząstek złota o dwóch rozmiarach, z dwoma czasami inkubacji, w dwóch liniach komórkowych raka piersi. Wszystkie wyniki przedstawiono w sposób logiczny i udokumentowano starannie przygotowanymi 57 kolorowymi wykresami. W celu przeanalizowania wszystkich możliwych zależności, Doktorantka wykonała szereg analiz statystycznych i wszystkie wyniki analiz post-hoc Tuckey'a w postaci tabel zawarła w suplemencie liczącym 15 stron. Uwagi do wyników przedstawiłam w części UWAGI.

W dyskusji Doktorantka omówiła i podsumowała uzyskane wyniki, co ze względu na wielość czynników i różnorodność wyników nie jest proste, i skonfrontowała je z dostępnymi raportami innych autorów. W mojej opinii, po przeanalizowaniu wyników, badania z zastosowaniem wszystkich testów wykazały, że przede wszystkim to promieniowanie jonizujące (w tym przypadku mieszane gamma i neutronowe w stosunku 50%/50%) odgrywa kluczową cytotoksyczną rolę i tylko w przypadku testu MN wykazano istotny wpływ dodania GNP do BNCT z BPA widoczny jako istotny wzrost liczby MN w komórkach obu linii raka piersi w porównaniu do BNCT z PBA. W przypadku testu klonogenego oprócz jednego wyjątku (GNP 50 nm +BNCT+BPA24h vs BNCT+BPAw linii MDA-MB-231) dodatek GNP do BNCT z PBA nie miał istotnego wpływu na przeżywalność komórek. W teście ognisk γ H2AX i indukcji apoptozy również nie stwierdzono istotnego efektu dodatku GNP do BNCT z PBA.

Doktorantka przedstawiła wnioski w formie rozbudowanego podsumowania. Szkoda, że wnioski z przeprowadzonych badań nie zostały wypunktowane odnosząc się ściśle do tematu pracy doktorskiej. Omówione wnioski odpowiadają jednak na założenia i cele pracy oraz ukazują uzyskane wyniki, które są oryginalnym osiągnięciem badawczym Doktorantki.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska ma formę monografii liczącej 200 stron i zawiera wszystkie wymagane elementy typowe dla oryginalnych prac badawczych. Dodatkowo rozprawa zawiera obszerny (15 stron) suplement z tabelami analiz statystycznych. Zawiera także spis wszystkich rycin (10 stron). Szata graficzna jest bardzo atrakcyjna. Praca zawiera 71 kolorowych rycin i wykresów. Praca została przygotowana starannie i przejrzysto. Piśmiennictwo obejmuje 142 pozycje,

z których połowa została opublikowana w ostatnich 10 latach. Piśmiennictwo stanowi przegląd aktualnej literatury dotyczącej omawianej tematyki. Oprócz dwóch pozycji wszystkie prace opublikowano w języku angielskim. Nie mam zastrzeżeń do strony formalnej pracy.

4. Uwagi

Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniższe uwagi, które nie umniejszają wartości pracy i nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę, ale mogą być przydatne np. przy przygotowaniu publikacji.

Wstęp

1. We wstępie, w pkt. 1.6. Nanocząstki złota Autorka napisała „*Nanocząstki złota mogą wpływać na mikrośrodowisko guza. Doprowadza to do zmian pH lub niedotlenienia guza, co zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na promieniowanie.* Odwrotnie, niedotlenienie guza (hipoksja) zwiększa jego promieniooporność.
2. Na str. 26 Doktorantka napisała „wirus Epsteina-Barra”. Warto pamiętać, że Barr była kobietą (Yvonne Barr), więc powinno być wirus Epsteina-Barr.

Materiał i metody

3. W rozdziale Materiał i metody, w pkt. 3.1. Charakterystyka linii komórkowych MDA-MB-231 i MCF-7, zabrakło mi informacji na temat promieniowrażliwości tych komórek (parametru SF2). Z uwagi na czasami występujące różnice w odpowiedzi na zastosowane w pracy terapię dobrze byłoby odnieść je do indywidualnej promieniowrażliwości.
4. W rozdziale Materiał i metody, w pkt. 3.2.1. Sposób napromieniania komórek w poczcie hydraulicznej reaktora badawczego MARIA szkoda, że nie zamieszczono schematów lub zdjęć pokazujących proces napromieniania np. chociaż zdjęcie zasobnika z próbkami biologicznymi przygotowanymi do umieszczenia w poczcie hydraulicznej. Pomogłoby to wyobrazić sobie sam proces napromieniania komórek, który na pewno był logistycznym wyzwaniem.
5. W rozdziale Materiał i metody, w pkt. 3.2.3 w Tabeli 3 podano dawki promieniowania. W każdym z trzech zasobników dawki były różne. Również różniły się w zależności od daty. Dla każdego z testów wykonano po 3 niezależne eksperymenty. W pracy nie podano, jak wyglądała powtarzalność warunków napromieniania.

6. W rozdziale Materiał i metody, w pkt. 3.9 dotyczącym metodyki testu MN, komórki w różnym czasie po napromienianiu zbierano, utrwalano i przygotowywano preparaty nakrapiając komórki na szkiełka mikroskopowe. O wiele prostszą i mniej inwazyjną metodą byłoby utrwalanie, barwienie i liczenie MN w komórkach bezpośrednio na szalkach, w których były inkubowane.

Wyniki

7. Generalnie uważam, że zastosowano trochę za dużo zmiennych eksperymentalnych przez co trudno czasami wyciągnąć wnioski. Zwłaszcza w przypadku testu MN, gdzie zastosowano 3 różne punkty czasowe po napromienianiu (30, 36 i 42h), można było wcześniej dla każdej linii ocenić czas z maksymalną liczbą komórek dwujądrowych (w każdym przypadku było to 36 h) i prowadzić eksperymenty tylko z jednym czasem. Także po wstępnych badaniach dotyczących wnikania GNP do komórek w zależności od czasu inkubacji (4h i 24h), w których wykazano brak istotnych różnic w efektywności wnikania dla tych dwóch czasów, w dalszych badaniach można było wykorzystać tylko jeden z nich 24h.
8. Mój główny zarzut dotyczy jednak omówienia wyników. Doktorantka skupiła się przede wszystkim na porównaniu wyników w komórkach eksponowanych na różne czynniki do kontroli ujemnej i dodatniej i wszystkich względem wszystkich (stąd tyle tabel z analizami statystycznymi), zamiast w pierwszej kolejności odnieść się do tematu swojej pracy i porównać efektywność terapii borowo-neutronowej (której częścią jest BPA) z dodatkiem i bez dodatku nanocząstek złota. Informacje na ten temat pojawiają się jako ostatnie zdanie w przypadku omawiania wyników danego testu. Uważam, że na wykresach powinny być pokazane te zależności statystyczne.
W wielu przypadkach podana jest informacja, że wynik jest statystycznie istotny, ale nie wiadomo, czy większy, czy mniejszy i w porównaniu do czego.
9. W rozdziale Wyniki, a także w Dyskusji, w odniesieniu do wyników testu MN, Doktorantka napisała *„Zauważono, że częstość występowania MN wzrasta do 36 h po napromienianiu czy traktowaniu komórek GNP i BPA, a następnie zaczyna spadać, co świadczy o naprawie komórek”*.
Nie zgadzam się z tym twierdzeniem. Obecność mikrojader (MN) w cytoplazmie oznacza, że doszło do utraty materiału genetycznego zatem do uszkodzenia letalnego, które nie może się naprawić (zwłaszcza po działaniu promieniowania o wysokim LET jak

neutrony). Spadek liczby MN wynika z faktu, że w dłuższym czasie po napromienianiu więcej komórek ulegnie kariokinezie i wzrośnie liczba komórek dwujadrzastych (BN), z których nie wszystkie zawierają MN. W pracy nie podano jaki uzyskano procent komórek BN w różnych czasach po ekspozycji na zastosowane czynniki.

10. W trakcie omawiania wyników Doktorantka wielokrotnie stosuje niefortunne skróty myślowe i sformułowania typu:

„z komórek napromienionych żadna nie jest statystycznie istotna” lub „istotne statystycznie są komórki traktowane GNP” lub „eksperymenty napromienione”, „badania napromienione”

Statystycznie istotne mogą być tylko różnice, nie komórki.

W badaniach napromieniano komórki, a nie badania czy eksperymenty.

W pracy pojawia się (niestety częsty też w poważnych opracowaniach naukowych) pleonazm: *leczenie radioterapią, leczenie chemioterapią*, oznaczający leczenie leczeniem.

5. Ocena końcowa

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Wiktorii Krakowiak stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, a jej zawartość merytoryczna i sposób przedstawienia wyników świadczą o ogólnej wiedzy Doktorantki oraz o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i dojrzałości naukowej. Rozprawa doktorska Pani mgr Wiktorii Krakowiak spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z powyższym rekomenduję Radzie Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie mgr Wiktorii Krakowiak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.