

prof. Janusz Braziewicz
Instytut Fizyki
Uniwersytet Jana Kochanowskiego
Uniwersytecka 7, 25-406 Kielce

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Beaty Pszczółkowskiej-Kępy
„Wpływ egzosomów na promieniowrażliwość komórek nowotworowych gruczołu
 krokowego w kontekście efektu sąsiedztwa indukowanego promieniowaniem
jonizującym”

Rozprawa doktorska „Wpływ egzosomów na promieniowrażliwość komórek nowotworowych gruczołu krokowego w kontekście efektu sąsiedztwa indukowanego promieniowaniem jonizującym”, której autorem jest pani mgr Beata Pszczółkowska-Kępa, została wykonana w Zakładzie Fizyki Biomedycznej Instytutu Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem dr hab. Beaty Brzozowskiej profesora UW.

Eksperymentalne badania radiobiologiczne stanowią podstawę do poznawania wpływu oddziaływania promieniowania jonizującego na komórki biologiczne. Jest to niezwykle istotne w aspekcie terapii nowotworowych oraz w aspekcie ochrony radiologicznej ludzi. Z uwagi na złożoność zagadnień i procesów niezbędnych do wyjaśnienia, badania te, są i muszą być prowadzone w większych zespołach interdyscyplinarnych, w których specjaliści różnych dziedzin naukowych zapewniają niezbędne podstawy teoretyczne jak i zaplecze sprzętowe do realizacji określonego zadania.

Jednym z głównych „odbiorców” otrzymywanych rezultatów naukowych jest terapia nowotworów z wykorzystaniem promieniowania jonizującego, gdzie określenie wpływu tego promieniowania na komórki nowotworowe i na otaczające je komórki zdrowe jest jednym z głównych parametrów decydujących o skuteczności takiego działania. Zrozumienie odpowiedzi materiału biologicznego poddanego działaniu promieniowania jonizującego jest tutaj kluczowe. Podwójnoniciowe uszkodzenia DNA są szczególnie szkodliwą formą powstających uszkodzeń, których stopień złożoności jest zależny od czynnika je wywołującego. W reakcji na tego typu uszkodzenia komórki inicjują wieloetapowy proces odpowiedzi biologicznej. Badanie różnego rodzaju procesów zachodzących w środowisku komórek biologicznych, ale wpływających bezpośrednio na funkcjonowanie tych komórek, jest niezwykle istotne z uwagi na wymaganą dokładność opisu procesu oddziaływania promieniowania jonizującego na komórki biologiczne. Określenie ewentualnego niebezpieczeństwa związanego z ekspozycją na promieniowanie jonizujące oraz informacji o indukowanych przez promieniowanie uszkodzeniach materiału genetycznego jest ważnym zagadnieniem do właściwego zrozumienia odpowiedzi materiału biologicznego poddanego działaniu różnych rodzajów promieniowania jonizującego.

W odpowiedzi na zasygnalizowane wyżej zagadnienia, celem pracy postawionym przez mgr Beatę Pszczółkowską-Kępę, było zbadanie wpływu egzosomów na promieniowrażliwość komórek nowotworowych gruczołu krokowego oraz sprawdzenie czy efekt sąsiedztwa

indukowany promieniowaniem X może być aktywowany w komórkach za pomocą egzosomów wyizolowanych z napromienionych komórek. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania obejmowały analizę indukcji apoptozy komórek PC3 i DU145, będącej procesem programowanej śmierci komórki. Dodatkowo Autorka dokonała oceny formowania ognisk naprawczych techniką γ H2AX w celu określenia, czy egzosomy indukują uszkodzenia DNA oraz przeprowadziła analizę ich zawartości molekularnej (tzw. „cargo”) z wykorzystaniem techniki Western Blot. Do zbadania odpowiedzi komórkowej na promieniowanie wykorzystwała również klonogeny test przeżywalności oraz testy cytotoksyczności (LDH i IL-6). Wpływ stresu indukowanego promieniowaniem na koncentrację oraz średnicę egzosomów wyizolowanych z komórek PC3 i DU145 sprawdziła z wykorzystaniem techniki analizy śledzenia nanocząstek, tzw. technikiki NTA.

W pracy wykorzystwała źródło ^{241}Am i lampę RTG dostępne w Zakładzie Fizyki Biomedycznej na Wydziale Fizyki oraz w Środowiskowym Laboratorium Ciężkich Jonów. Moc dawki promieniowania α emitowanego z wykorzystanego źródła została oszacowana w oparciu o symulacje komputerowe z użyciem metod Monte Carlo w środowisku Geant4-DNA a moc dawki stosowanego promieniowania X zmierzyła przy pomocy filmów radiochromowych.

Treść rozprawy

Praca została podzielona przez autorkę na 5 niezależnych rozdziałów, a spis tematycznej literatury przedstawiony na 20 stronach stanowi o niebywalej erudycji pani mgr Beaty Pszczółkowskiej-Kępy i jest potwierdzeniem znajomości tematu. Całość pracy została wzbogacona wieloma rysunkami oraz tabelami z wynikami badań. Dodatkowo, Autorka zamieściła Załączniki z danymi ułatwiające weryfikację otrzymywanych wyników.

W pierwszym rozdziale rozprawy „*Wprowadzenie*” pani mgr Beata Pszczółkowska-Kępa przedstawiła niezbędne dla czytającego podstawowe wiadomości wprowadzające w zagadnienia wpływu promieniowania jonizującego na funkcjonowanie komórek biologicznych. W sposób skondensowany przedstawiła zagadnienia związane z występowaniem chorób nowotworowych, sposoby terapii pacjentów i konieczność jak najdokładniejszego poznania wszystkich parametrów niezbędnych do przeprowadzenia procesu terapii. W rozdziale tym zdefiniowała również cel swojej pracy i wynikające z tego zagadnienia do rozwiązania oraz omówiła układ pracy. Przedstawiła tu również dane bibliograficzne do 3 publikacji w wysoko punktowanych, recenzowanych czasopismach naukowych stanowiących podstawę pracy doktorskiej oraz do 2 innych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, których jest autorką lub współautorką.

W rozdziale 2 „*Wstęp teoretyczny*” Doktorantka przedstawiła teoretyczne podstawy związane z fizycznymi i radiobiologicznymi zagadnieniami oddziaływania promieniowania jonizującego z materią ze szczególnym naciskiem na materię biologiczną i różne etapy oddziaływania promieniowania pierwotnego i wtórnego.

W zakresie czysto fizycznych aspektów zagadnienia przedstawiła krótki, lecz wystarczający, opis podstawowych typów oddziaływania promieniowania

elektromagnetycznego i korpuskularnego z materią oraz podstawowe wielkości fizyczne, dozymetryczne i radiobiologiczne niezbędne do kwantyfikacji rezultatów oddziaływania.

W rozdziale tym znajdujemy również opis struktury DNA i jej środowiska jakim jest komórka oraz szczegółowy opis uszkodzeń materiału biologicznego na poziomie DNA indukowanych promieniowaniem.

Dla rozumienia części eksperymentalnej niezwykle istotny jest rozdział 2.3 „Odpowiedź komórkowa i sposoby jej detekcji”. Znajdujemy tutaj opis zagadnień dotyczących badań na poziomie komórkowym, chromosomalnym oraz na poziomie DNA. Zagadnienia te dotyczą podstaw teoretycznych oraz sposobów przygotowywania materiału biologicznego do różnorodnych eksperymentów jak i opis wyposażenia technicznego niezbędnego do osiągnięcia odpowiedzi na postawione pytanie.

W końcowej części tego rozdziału znajdujemy podstawy teoretyczne dotyczące tzw. ‘efektu sąsiedztwa’ wraz z opisem sposobów jego pomiaru w ramach tzw. ‘modelu kontaktowego’ i ‘modelu bez kontaktu fizycznego’. Znajdziemy tutaj dokładny opis struktur zwanych ‘pęcherzyki zewnątrzkomórkowe’, z których te najmniejsze, tzw. egzosomy stanowią podstawę prowadzonych przez Doktorantkę badań naukowych pod kątem ich wpływu na przekaz informacji międzykomórkowej indukowanej promieniowaniem jonizującym.

Kolejny 3 rozdział pracy zatytułowany „Materiały i metody”, to kompendium wiedzy nt. wykorzystanych metod i zastosowanych narzędzi w przeprowadzonych badaniach stanowiących podstawę pracy.

Pomiar dawki promieniowania odgrywa kluczową rolę w precyzyjnej ocenie oczekiwanych efektów biologicznych. W swojej pracy Autorka zdecydowała się na wykonywanie badań eksperymentalnych z wykorzystaniem cząstek α oraz promieniowania X. Wybór tych dwóch rodzajów promieniowania został podyktowany ich odmiennymi mechanizmami oddziaływania z materią, co skutkuje różnicami w indukcji uszkodzeń materiału genetycznego w komórkach. Do oszacowania mocy dawki promieniowania α źródła promieniotwórczego AM1AP1 0053U Autorka wykorzystwała symulacje oparte na metodach Monte Carlo w oparciu o fizyczny pomiar rozkładu energetycznego jego widma zmierzony przy pomocy krzemowego detektora półprzewodnikowego. Do oceny jednorodności rozkładu dawki tego źródła wykonała dozymetrię z wykorzystaniem filmów radiochromowych Gafchromic EBT3-Unlaminated.

Dalsza część rozdziału to dokładna charakterystyka materiału biologicznego wykorzystywanego w pracy oraz szczegółowy opis procedur eksperymentalnych przeprowadzanych przez Autorkę, tj.:

- badanie wpływu rodzaju promieniowania jonizującego na odpowiedź komórek nowotworowych gruczołu krokowego o różnej promieniowrażliwości oraz na charakterystykę produkowanych z nich egzosomów,
- schemat przebiegu oznaczeń białek CD63, CD81 i kalneksyny metodą Western Blot dla badania wpływu egzosomów (exoPC3) na promieniowrażliwość komórek PC3,
- schemat przebiegu oznaczeń apoptozy w badaniach wpływu egzosomów (exoPC3) na promieniowrażliwość komórek PC3 (PC3 + exoPC3),

- schemat przebiegu oznaczeń ekspresji białek metodą Western Blot dla zbadania roli egzosomów (exoDU145) w modyfikowaniu promieniowrażliwości komórek PC3 (PC3 + exoDU145) podanych działaniu promieniowania X,
- schemat przebiegu oznaczeń γ H2AX w eksperymentach badających rolę egzosomów (exoDU145) w modyfikowaniu promieniowrażliwości komórek PC3 (PC3 + exoDU145) poddanych działaniu promieniowania fotonowego,
- schemat przebiegu oznaczeń apoptozy w eksperymentach badających rolę egzosomów (exoDU145) w modyfikowaniu promieniowrażliwości komórek PC3 (PC3 + exoDU145) poddanych działaniu promieniowania fotonowego.

Podrozdział 3.5 przybliży w sposób skondensowany, lecz wystarczająco zastosowane procedury analizy statystycznej uzyskanych danych. W przypadku danych uzyskanych z pomiarów dozymetrycznych niepewności otrzymanych wartości dawek zostały wyznaczone metodą propagacji małych błędów, uwzględniając zarówno niepewności intensywności piksela, jak i niepewności parametrów dopasowania krzywych kalibracyjnych w celu oszacowania mocy dawki. Jednorodność źródeł została obliczona na podstawie średnich wartości intensywności pikseli oraz ich odchyłeń standardowych.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów i ich dyskusja zostały przedstawione w rozdziale 4 pracy „Wyniki i dyskusja”, w którym kolejno je przedstawia, tj.:

1. Na podstawie klonogenego testu przeżywalności oraz oznaczeń apoptozy Autorka potwierdza, że promieniowanie α charakteryzuje się większą skutecznością w niszczeniu komórek nowotworowych gruczołu krokowego niż promieniowanie X.
2. Wykazuje, że egzosomy są uwalniane zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Na podstawie wyników analizy NTA (analiza śledzenia nanocząstek) nie stwierdziła zależności wielkości wydzielanych nanopęcherzyków od dostarczonej do komórek dawki.
3. Wskazała na istotną rolę egzosomów w tzw. efekcie sąsiedztwa indukowanym promieniowaniem jonizującym w komórkach nowotworowych gruczołu krokowego. Ta komunikacja międzykomórkowa za pośrednictwem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące ma znaczenie w kontekście skuteczności terapii przeciwnowotworowej i stanowi kluczowy mechanizm dla zrozumienia głównych regulatorów radiooporności. Rezultat ten może przyczynić się do poprawy bezpieczeństwa klinicznego i efektywności radioterapii.

Komentarze i uwagi krytyczne

Całość pracy wykonanej przez panią mgr Beatę Pszczółkowską-Kępę oceniam wysoko tak za jakość jak i ilość przeprowadzonych pomiarów i symulacji komputerowych oraz za wnikliwą analizę uzyskanych wyników.

Korzystając zarówno z przywilejów jak i obowiązku recenzenta, w trakcie recenzji nasunęło się kilka pytań (wynikających z mojego nie tak dużego doświadczenia w prowadzeniu eksperymentów radiobiologicznych), które z oczywistych względów są z natury czysto

fizycznej, gdyż wszelkie procedury radiobiologiczne dotyczące przygotowywania i prowadzenia testów zakładam, że były prowadzone w sposób standardowy

1. Jaka jest zależność odpowiedzi wykorzystywanych filmów radiochromowych Gafchromic™ EBT4 od energii rejestrowanego promieniowania, gdyż były one wykorzystane dla niskoenergetycznego promieniowania lampy rtg podczas gdy ich kalibracja była przeprowadzona z wykorzystaniem wysokoenergetycznego promieniowania z akceleratora medycznego Electa Synergy.
2. Pomiar dawki promieniowania odgrywa kluczową rolę w precyzyjnej ocenie oczekiwanych efektów biologicznych. W przypadku badania oddziaływania promieniowania alfa Autorka wykorzystwała dostępne płaskie źródło ^{241}Am AM1AP1 0053U firmy Eckert&Ziegler. Wyniki dozymetrii tego źródła są podane w rozdziale 4.1 dysertacji i jak podaje doktorantka pomiary dozymetryczne zostały opisane w pracy Filipek et al. 2024, w której wynik eksperymentalny dla tego źródła (bez jakiegokolwiek absorbentu na drodze źródło-detektor) to dawka 1.27 ± 0.14 Gy dla czasu ekspozycji 133 sekund co daje moc dawki wynoszącą 0.58 Gy/min. Natomiast w swojej dysertacji, Doktorantka na stronie 77 podaje „*W celu określenia mocy dawki dla płaskiego źródła ^{241}Am zostały wykonane symulacje oparte na metodach MC z wykorzystaniem narzędzia Geant4-DNA z uwzględnieniem geometrii napromieniania komórek zastosowanej w doświadczeniach realizowanych w ramach niniejszej pracy. Obliczona na podstawie symulacji moc dawki promieniowania α emitowanego ze źródła ^{241}Am wynosiła $(0,6000 \pm 0,0050)$ Gy/min.*”, tj. wartość mocy dawki wyższą niż została wyznaczona dla tego źródła w cytowanej pracy. Natomiast jeśli weźmiemy pod uwagę „*wykonane symulacje ... z uwzględnieniem geometrii napromieniania komórek zastosowanej w doświadczeniach realizowanych w ramach niniejszej pracy*”, to zarówno stosowana folia Mylarowa o grubości 3 μm jak i warstwa pożywki 4 μm winny zredukować tę moc dawki (analogicznie jak szacowano w cytowanej pracy) do około 0.450 Gy/min. Przy podanych przez Doktorantkę w recenzowanej pracy czasach napromieniania zredukuje to dawkę deponowaną w napromienianych komórkach, podczas gdy Doktorantka na stronie 77 podaje, że „*Oznacza to, że dawka 1 Gy była deponowana w monowarstwie komórek w czasie 1 minuty i 40 sekund.*”. Natomiast na stronie 81 Doktorantka podaje, że „*W dozymetrii kluczowe znaczenia mają zarówno teoretyczna, jak i doświadczalna weryfikacja dawek promieniowania (Filipek et al., 2024; Czub et al., 2020; Van et al., 2023). Eksperymenty i symulacje MC wzajemnie się uzupełniają. Dane eksperymentalne stanowią podstawę do weryfikacji i kalibracji modeli teoretycznych, podczas gdy symulacje MC wspierają planowanie oraz optymalizację przebiegu eksperymentów. Takie komplementarne podejście przyczynia się do doskonalenia metod dozymetrycznych.*”. Wydaje się, że ta rozbieżność winna być wyjaśniona.
3. Na stronie 10 dysertacji Autorka w trakcie omawiania rozpadu izotopu ^{241}Am wspomina o towarzyszącym rozpadowi niskoenergetycznym promieniowaniu gamma nie wspominając o towarzyszącym promieniowaniu X lub Augera. Czy te typy dodatkowego promieniowania mogą mieć wpływ na procesy radiobiologiczne zachodzące w badanych komórkach i jaki byłby ich udział?

4. Na stronie 13 Autorka podaje, że „*Pomiędzy katodę a anodę przyłożone jest jednak wysokie napięcie (nawet do 150 kV)*”. Ponieważ w tej części pracy omawiana była tylko ogólna zasada działania lampy rtg to zakres około 40-150kV jest wykorzystywany w lampach mających zastosowanie w medycynie natomiast w lampach przemysłowych górna granica podawanego napięcia dochodzi do około 450kV.
5. Na stronie 44 (i w kilku innych miejscach dysertacji) niefortunnie użyto określenia „*gęstość optyczna*” do podania gęstości struktur biologicznych. Gęstość optyczna jest wielkością bezwymiarową natomiast gęstość materiałów podajemy np. w g/cm^3 .

Wnioski końcowe

Rozprawa została napisana poprawnym językiem i nie mam zastrzeżeń do stosowanej terminologii. Dysertacja została zilustrowana przejrzystymi rysunkami a wyniki w postaci liczbowej są przedstawiane w tabelarycznych zestawieniach.

Pomimo wymienionych w mojej recenzji drobnych uwag wysoko oceniam wartość przedstawionej rozprawy doktorskiej i uważam, że:

- recenzowana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego przez panią mgr Beatę Pszczółkowską Kępę problemu naukowego, wnosi istotny wkład w zakresie rozumienia technik oddziaływania promieniowania jonizującego z materią biologiczną na poziomie subkomórkowym. Postawione przez panią mgr Beatę Pszczółkowską-Kępę cele naukowe zostały osiągnięte, a przedstawione w końcowym rozdziale pracy plany na przyszłość dają gwarancję dalszego rozwoju naukowego.
- **recenzowana praca doktorska spełnia wszelkie kryteria stawiane dysertacjom na stopień doktora nauk fizycznych, tj. oryginalność postawionego problemu naukowego i spójność tematyczną zbioru artykułów związanych merytorycznie z tematem rozprawy. Dlatego też wnioskuję o dopuszczenie panią mgr Beatę Pszczółkowską-Kępę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Kielce, 11 sierpnia 2025 r.

