

dr hab. inż. Ewelina Lipiec, prof. UJ
Instytut Fizyki
Zakład Fizyki Nanostruktur i Nanotechnologii
ul. Łojasiewicza 11, 30-348 Kraków
Ewelina.Lipiec@uj.edu.pl
+48 12 664 45 85



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział

Fizyki

Astronomii

i Informatyki

Stosowanej

Kraków, 20 Sierpnia 2025

Recenzja Pracy Doktorskiej

Wpływ egzosomów na promieniowrażliwość komórek nowotworowych gruczołu krokowego w kontekście efektu sąsiedztwa indukowanego promieniowaniem jonizującym

wykonanej przez mgr Beatę Pszczółkowską-Kępę

pod kierunkiem dr hab. Beaty Brzozowskiej, prof. UW

Zakład Fizyki Biomedycznej, Instytut Fizyki Doświadczalnej
Wydział Fizyki Uniwersytet Warszawski

Wszyscy jesteśmy stale narażeni na promieniowanie jonizujące pochodzące ze źródeł naturalnych, takich jak promieniowanie kosmiczne i ziemskie, w tym radon, tor i uran. Promieniowanie znalazło szerokie zastosowanie w leczeniu i diagnostyce nowotworów.

Zrozumienie procesów towarzyszących ekspozycji na promieniowanie na poziomie komórkowym i molekularnym stanowi podstawę pełnej wiedzy o makroskopowym wpływie promieniowania jonizującego na całe organizmy. Jednak obecna wiedza na temat tych procesów jest wciąż niepełna i wymaga dalszych badań. W radiobiologii w kontekście terapii personalizowanej szczególnie interesujące są zagadnienia obejmujące tzw efekty nieliniowe np.: wpływ niskich dawek promieniowania na materię żywą oraz efekt sąsiedztwa indukowany promieniowaniem (RIBE, z ang. Radiation-Induced Bystander Effects), czyli indukcja uszkodzeń radiacyjnych i odpowiedzi komórkowej w komórkach, które nie były bezpośrednio narażone na promieniowanie ale sąsiadowały z napromienianymi.

Rozprawa doktorska Pani mgr Beaty Pszczółkowskiej-Kępy wpisuje się w ten bardzo ważny kierunek badawczy wnikliwie i systematycznie analizując indukcję RIBE za pomocą egzosomów wyizolowanych z komórek poddanych ekspozycji na promieniowanie jonizujące. Przedstawione badania eksperymentalne, są bardzo trudne, czasochłonne i wymagają obszernej wiedzy, systematyczności i specjalistycznego doświadczenia.

ul. prof. Stanisława

Łojasiewicza 11

PL 30-348 Kraków

tel. +48(12) 664-48-90

fax +48(12) 664-49-05

e-mail:

wydzial.fais@uj.edu.pl

W mojej opinii tematyka podjęta w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej jest szczególnie ważna ponieważ dotyczy wszystkich wielokomórkowych organizmów eukariotycznych.

OGÓLNA OCENA ROZPRAWY

Rozprawa doktorska Pani mgr Beaty Pszczółkowskiej-Kępy została podzielona na 5 części, które stanowią spójną całość: i) wprowadzenie, ii) wstęp teoretyczny, iii) materiały i metody iv) wyniki i dyskusja oraz v) podsumowanie i perspektywy.

Rozprawę rozpoczyna wprowadzenie, w którym nakreślono problem naukowy, w pełni uzasadnioną motywację towarzyszącą pracy badawczej oraz znaczenie podjętej tematyki. Osobne podrozdziały w tej części rozprawy opisują cel pracy, jej układ oraz opis osiągnięć naukowych Doktorantki.

Celem rozprawy było zweryfikowanie czy egzosomy są modulatorami promieniowrażliwości komórek nowotworowych gruczołu krokowego w kontekście efektu sąsiedztwa indukowanego promieniowaniem jonizującym. Po zdefiniowaniu celu pracy Autorka przedstawia badania naukowe, które zostały zaplanowane i zrealizowane dla osiągnięcia celu dysertacji.

Wyniki prac badawczych opisanych w rozprawie doktorskiej Pani mgr Beaty Pszczółkowskiej-Kępy zostały zaprezentowane w trzech artykułach opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Polish Journal of Medical Physics and Engineering, Radiation and Environmental Biophysics* oraz *PLOSE One* (artykuł w recenzji). Pani mgr Beata Pszczółkowska-Kępa jest pierwszą autorką dwóch prac, w jednej pracy pełni rolę drugiej autorki. Porównując zawartość publikacji i niniejszej rozprawy wnioskuję, iż Pani mgr Beata Pszczółkowska-Kępa miała wiodący lub znaczny udział w powstaniu tych trzech prac, uczestnicząc we wszystkich najważniejszych etapach powstawania artykułów. Zapewne bez udziału Autorki rozprawy omawiane prace te nie ukazałyby się w obecnej formie. Poza artykułami zawartymi w Jej Pracy Doktorskiej Pani mgr Beata Pszczółkowska-Kępa jest autorką jeszcze 2 artykułów naukowych opublikowanych w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Dodatkowo Pani mgr Pszczółkowska-Kępa uczestniczyła w realizacji dwóch projektów badawczych, z których publikacje, jak pisze Autorka są w przygotowaniu. W mojej opinii jest to adekwatny dorobek naukowy osoby ubiegającej się o tytuł doktora.

Wstęp teoretyczny obejmuje opis oddziaływania promieniowania jonizującego z materią ze szczególnym uwzględnieniem wpływu promieniowania na cząsteczki o istotnym znaczeniu dla zdrowia i życia człowieka. Opisana jest także odpowiedź komórkowa i sposoby jej detekcji, efekt RIBE oraz pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, ich rodzaje i sposoby ich detekcji. W mojej opinii jest to bardzo wartościowa część pracy, stanowiąca kompendium wiedzy, która z powodzeniem mogłaby stanowić część

podręcznika lub skrypt akademicki. Dość zwięzłe ale bardzo staranne i dokładne opisy świadczą o tym, iż Autorka posiada szeroką wiedzę i doświadczenie badawcze oraz o dogłębnym zrozumieniu podjętej tematyki badawczej. Rozdziały wprowadzające zawierają wszystkie informacje niezbędne do zrozumienia dalszych części pracy doktorskiej.

W kolejnym rozdziale „Materiały i metody” Pani mgr Beata Pszczółkowska-Kępa z dużą starannością opisuje wszystkie metody teoretyczne i eksperymentalne, jakie stosowała w swoim projekcie doktorskim. Wnikliwe opisy obejmują stosowane źródła promieniowania oraz podstawy ich dozymetrii za pomocą symulacji MC oraz pomiary eksperymentalne z wykorzystaniem filmów radiochromowych. Następnie przedstawione są linie komórkowe użyte w badaniach oraz opisane są wszystkie procedury laboratoryjne w tym izolacja mikropęcherzyków oraz metody analizy uszkodzeń radiacyjnych i odpowiedzi komórkowej na promieniowanie jonizujące, z dbałością o najmniejsze szczegóły. Starannie przygotowane i przejrzyste schematy ułatwiają czytelnikowi podążanie za złożonością eksperymentów wykonanych przez Autorkę. Bardzo wysoko oceniam tą część rozprawy, a w szczególności opisy metod dozymetrycznych i źródeł promieniowania. Z pełnym przekonaniem doradziłabym wszystkim osobom rozpoczynającym prace eksperymentalne z zakresu fizyki radiacyjnej i radiobiologii lekturę doktoratu Pani mgr Beaty Pszczółkowskiej-Kępy.

Nie mniejszą dbałość o szczegóły widać kolejnej części pracy „Wyniki i dyskusja”. Rozdział rozpoczyna teoretyczna i doświadczalna weryfikacja dawek promieniowania α oraz dozymetria doświadczalna dla promieniowania X. Analizowane są nie tylko wartości dawek pochłoniętych, ale również jednorodność dawki, która ma kluczowe znaczenie w fizyce radiacyjnej i radiobiologii. Geometria układów w jakich napromieniane były komórki została zoptymalizowana tak aby wszystkie komórki były napromieniane w jednakowy sposób (eksperymentalnie zmierzona jednorodność źródła cząstek α wynosiła 97 %).

Kolejnym etapem pracy było zbadanie odpowiedzi komórkowej na promieniowanie na podstawie testu klonogenego. Wyznaczono średnią wydajność klonowania oraz frakcje przeżywalności dla zastosowanych dawek promieniowania α oraz promieniowania X. Wyniki zostały przedstawione w postaci wykresu zależności frakcji przeżywających komórek od dawki promieniowania jonizującego. Na podstawie dopasowania modelu liniowo-kwadratowego do danych zostały wyznaczone równania opisujące odpowiedź komórkową na promieniowanie. Otrzymane wyniki badań potwierdziły wyższą skuteczność biologiczną promieniowania α (o wysokim LET) w indukowaniu uszkodzeń komórkowych niż promieniowania X (niski LET). Analiza danych oraz ich opracowanie statystyczne wykonane zostały poprawnie.

Następnie Autorka opisuje wyniki badania wpływu cząstek α oraz promieniowania X na indukcję apoptozy za pomocą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem barwienia fluorescencyjnego aneksyną V-FITC i jodkiem

propidyny. Dokładnie analizowano ilość komórek wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych i nekrotycznych, 96h po napromienianiu. Kolejny eksperyment wykonany w ramach tej rozprawy obejmował zbadanie cytotoksyczności obydwu stosowanych rodzajów promieniowania jonizującego. Wyniki wszystkich trzech podejść eksperymentalnych są spójne i potwierdzają, że promieniowanie α charakteryzuje się wyższą skutecznością w porównaniu z promieniowaniem X w indukcji śmierci komórek nowotworu prostaty z przerzutów do kości (linia PC3) oraz mózgu (linia Du145). Wykazano również większą radiooporność komórek linii DU145 w porównaniu z komórkami linii PC3. Podobnie jak w poprzedniej części w mojej opinii analiza otrzymanych danych eksperymentalnych została wykonana poprawnie z adekwatnym opracowaniem statystycznym. Mimo, iż promienowrażliwość obu linii komórkowych była badana już wcześniej to wykonanie wyżej opisanych badań (testu klonogenego, cytometrii przepływowej oraz testów cytotoksyczności) było bardzo ważne w kontekście eksperymentów z wykorzystaniem egzosomów. Takie systematyczne podejście odzwierciedla wysoki poziom badań prezentowanych w dysertacji.

Kolejnym krokiem była analiza koncentracji i średnicy egzosomów wyizolowanych 96 godzin po napromienieniu z komórek traktowanych cząstkami α oraz promieniowaniem X. Po traktowaniu fotonami nie wykazano statystycznie istotnych różnic w koncentracji ani w średnicy hydrodynamicznej egzosomów wydzielanych przez komórki PC3 i DU145. Dla promieniowania o wysokim LET - cząstek α zaobserwowano spadek wydzielania egzosomów wraz ze wzrostem dawki promieniowania.

Za pomocą metody Western Blot w komórkach PC-3 kontrolnych i inkubowanych z egzosomami przeprowadzono detekcję obecności typowych biomarkerów egzosomalnych: CD63 i CD81 oraz kalneksyny – białka obecnego na błonach komórkowych.

W celu detekcji efektu RIBE analizowano obecność ognisk γ H2AX w jądrach komórek PC3 uprzednio hodowanych w obecności egzosomów izolowanych z napromienianych komórek PC3 oraz Du145. Zademonstrowano, iż liczba ognisk γ H2AX w jądrach komórek inkubowanych z egzosomami była około czterokrotnie wyższa niż w jądrach komórek kontrolnych PC3. Zaobserwowano więcej ognisk naprawy w komórkach traktowanych egzosomami izolowanymi z komórek PC3 niż Du145. Wyniki tego eksperymentu potwierdziły zatem większą promieniwrażliwość komórek PC3.

W kolejnym, ostatnim etapie badań przedstawionym w dysertacji zastosowano cytometrię przepływową do zliczenia komórek wczesno- i późnoapoptotycznych oraz nekrotycznych w celu weryfikacji efektu RIBE poprzez badanie promienowrażliwości komórek hodowanych w obecności egzosomów wyizolowanych z komórek napromienianych i kontrolnych (dla porównania).

W populacji komórek kontrolnych (nienapromienianych) hodowanych w obecności egzosomów wyizolowanych z komórek kontrolnych było więcej komórek żywych niż w populacji komórek kontrolnych współhodowanych z egzosomami wyizolowanymi z komórek napromienionych. Ilość komórek wczesnoapoptotycznych oraz późnoapoptotycznych była większa w grupie komórek kontrolnych inkubowanych z egzosomami izolowanymi z komórek naświetlanych. Co więcej wykazano, iż egzosomy stymulują promieniowrażliwość komórek nowotworowych gruczołu krokowego, demonstrując mniejszy udział żywych komórek w układzie PC3 + exoPC3 niż w układzie PC3 + exoDU145.

Zarówno rozdziały opisujące badane układy, podstawy teoretyczne metod eksperymentalnych jak i wyniki eksperymentów i ich dyskusja są w mojej opinii bardzo dobrze napisane. Autorka w zrozumiały sposób przedstawia skomplikowane zagadnienia i opisuje złożone procesy. Wszystkie rysunki są bardzo ładne: przejrzyste, czytelne, bardzo starannie przygotowane i wzbogacają lekturę pracy. Czytanie tej dysertacji jest prawdziwą przyjemnością.

SZCZEGÓŁOWE UWAGI DO ROZPRAWY

Podczas czytania rozprawy nasuwają się pewne bardziej szczegółowe pytania oraz zagadnienia:

- Jak wykazano w rozprawie, napromienianie fotonami (prom. X) nie wpłynęło (w sposób istotny statystycznie, z powodu dużej wartości błędu standardowego) na ilość wydzielanych egzosomów ani na ich rozmiar. W przypadku traktowania komórek promieniowaniem α , zaobserwowano spadek ilości egzosomów. Czy ilość egzosomów pochodzących od konkretnych komórek mogłaby być wykorzystana jako parametr/marker diagnostyczny np. skuteczności radioterapii?
- Mimo, iż nie zaobserwowano zmian w średnicy hydrodynamicznej napromienianych egzosomów ich obecność w pożywce indukowała RIBE, zatem zapewne pod wpływem napromieniania zmieniał się skład chemiczny egzosomów. W związku z tym jestem ciekawa zdania Doktorantki odnośnie ładunku molekularnego egzosomów, czyli tych związków chemicznych, które mogą uczestniczyć w RIBE
- Kolejnym, ważnym i bardzo trudnym zagadnieniem jest detekcja substancji indukujących odpowiedź komórek. Jakie można zaproponować eksperymenty, które pozwoliłyby na detekcję

markerów napromieniania w egzosomach oraz przekaźników molekularnych wpływających na komórki?

- Dlaczego detekcję komórek wczesnoapoptotycznych za pomocą cytometrii przepływowej oznaczano 96h po napromienianiu? Dane literaturowe oraz moje doświadczenie w pracy z liniami komórkowymi PC3 oraz Du145 wskazują, iż apoptoza w tych komórkach może mieć szybszy przebieg niż 96h.
- Autorka pisze, iż stężenie IL-6 było istotnie wyższe dla komórek PC3 w porównaniu do komórek DU145, osiągając około 3-krotnie wyższy poziom dla dawek 0 Gy ($p \leq 0,001$) i 6 Gy ($p \leq 0,05$) oraz około 4,5-krotnie wyższy po ekspozycji na dawkę 2 Gy ($p \leq 0,001$). Jako interpretację wyników uzyskanych w eksperymencie znajdujemy: „Obniżenie poziomu sekrecji IL-6 w odpowiedzi na promieniowanie α może być konsekwencją zmniejszonej liczby żywych komórek, które przeżyły ekspozycję na promieniowanie o wysokim LET.” Dlaczego zatem stężenie IL-6 było wyższe dla Komórek PC-3 skoro w tej linii więcej komórek umarło w wyniku ekspozycji na promieniowanie?
- W jaki sposób zmierzono/oszacowano 6 μm grubość warstwy pożywki w układzie do napromieniania komórek?

Drobne uwagi:

- Literówka na str. 5 w zdaniu „Durgi projekty dotyczył oceny ognisk naprawczych γH2AX jako markera dwuniciowych pęknięć DNA w komórkach....”
- Niefortunne sformułowania:

Str. 7: „Cząstki te, dzięki swojemu ładunkowi elektrycznemu, oddziałują w sposób ciągły z elektronami obecnymi w materii, przez którą przechodzą, za sprawą sił kulombowskich”,

Str. 82: „Dane dopasowano do modelu liniowo-kwadratowego”.

Powyższe uwagi/komentarze nie zmieniają mojej wysokiej oceny rozprawy, raczej są sugestią do dyskusji, która może zostać podjęta podczas obrony pracy.

W mojej opinii rozprawa doktorska Pani mgr Beaty Pszczółkowskiej-Kępy wnosi istotny wkład do dziedziny fizyka w szczególności w zakresie fizyki radiacyjnej, biofizyki oraz fizyki medycznej poprzez dokładną dozymetrię - teoretyczną i doświadczalną weryfikację jednorodności dawek jakimi naświetlane były komórki, systematyczne i kompleksowe podejście do pracy eksperymentalnej przeprowadzonej na komórkach oraz wnikliwą analizę statystyczną otrzymanych wyników. Niniejsza rozprawa doktorska łączy dozymetrię z badaniami radiobiologicznymi, ukazując jak parametry fizyczne promieniowania takie jak LET przekładają się na procesy molekularne zachodzące w komórkach, prowadzące do indukcji efektu sąsiedztwa (RIBE). Szczegółowe opracowanie układów dozymetrycznych oraz walidacja rozkładów dawek z użyciem symulacji Monte Carlo i pomiarów eksperymentalnych stanowią cenne osiągnięcie w zakresie fizyki medycznej i radiacyjnej, a ich powiązanie z analizą roli egzosomów w przekazywaniu sygnałów uszkodzeń radiacyjnych otwiera nowe perspektywy w kierunku personalizacji radioterapii. Wkład dysertacji do dziedziny fizyka można określić zarówno jako fundamentalny – pogłębiający wiedzę o oddziaływaniu promieniowania z materią żywą – jak i aplikacyjny, wskazujący możliwości wykorzystania fizycznych parametrów promieniowania w praktyce medycznej.

Podsumowując uważam, że złożona rozprawa doktorska spełnia w pełni wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Niniejszym wnioskuję do Rady Dyscypliny Fizyka Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Beaty Pszczółkowskiej-Kępy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Otrzymane rezultaty znacząco poszerzyły dotychczasową wiedzę pozwalając na pełniejsze zrozumienie roli egzosomów w odpowiedzi komórek nowotworowych na ekspozycję na promieniowanie w zakresie dawek terapeutycznych. Biorąc pod uwagę przede wszystkim nowatorski charakter badań, duże znaczenie otrzymanych wyników oraz podjętej tematyki badawczej, wysoki poziom naukowy prezentowanych badań, bardzo dużą ilość technik eksperymentalnych jakie opanowała i zastosowała Autorka, kompleksowe, dogłębne podejście do analizy danych i interpretacji wyników, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej.

