

Kielce, 25 sierpnia 2025 r.

Dr hab. Halina Lisowska, prof. UJK
Zakład Biologii Medycznej
Instytut Biologii
ul. Uniwersytecka 7
25-406 Kielce

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Beaty Pszczółkowskiej-Kępy

**pt.: Wpływ egzosomów na promieniowrażliwość komórek nowotworowych gruczołu
krokowego w kontekście efektu sąsiedztwa indukowanego promieniowaniem jonizującym**

Recenzja została wykonana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego, dr hab. Jacka Szczytko, prof. ucz., BRN-XII/531/56/2025 z dnia 18 czerwca 2025 roku.

Rozprawa doktorska mgr Beaty Pszczółkowskiej-Kępy została przygotowana w Zakładzie Fizyki Biomedycznej Instytutu Fizyki Doświadczalnej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, pod kierunkiem dr hab. Beaty Brzozowskiej, prof. UW.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter monografii, liczy 140 stron i została przygotowana w języku polskim. Układ pracy zawiera streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim i angielskim, spis treści, spis rysunków, skróty i akronimy, wprowadzenie (w tym cel pracy), wstęp teoretyczny, materiały i metody, wyniki i dyskusję, podsumowanie i perspektywy, bibliografię oraz protokoły laboratoryjne i materiały uzupełniające. Struktura pracy jest poprawna, typowa dla monograficznych opracowań naukowych. Rozdział „Wprowadzenie” zawiera dobrze i jasno sformułowany cel pracy, opis układu pracy oraz dorobek naukowy Doktorantki, który obejmuje pięć artykułów naukowych, w tym trzy powstałe na podstawie wyników prezentowanych w recenzowanej rozprawie. Z tego rozdziału dowiadujemy się, że pani Beata Pszczółkowska-Kępa podczas prac nad doktoratem była zaangażowana w dwa projekty powiązane tematycznie z rozprawą mając tym samym okazję doskonalenia swojego warsztatu badacza. Kolejny rozdział „Wstęp teoretyczny”

obejmujący 42 strony jest poświęcony charakterystyce promieniowania jonizującego oraz skutkom jego oddziaływania z materią i materiałem biologicznym, opisowi popromiennej odpowiedzi komórkowej i sposobów jej detekcji oraz zjawisku efektu sąsiedztwa i pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Opis doświadczeń w rozdziale „Materiały i metodyka” jest wystarczająco szczegółowy i dobrze zilustrowany, aby można było ocenić stronę doświadczalną. Kolejny rozdział to 30 stron opisu uzyskanych wyników i ich dyskusji. To zestawienie mówi wiele o dużym materiale doświadczalnym i szerokim wachlarzu metod badawczych. Literatura przedmiotu jest dobrze dobrana. Autorka wybrała 236 pozycji, nie ograniczając się do prac najnowszych. Język pracy jest poprawny, a opis przeprowadzonych badań, dyskusja oraz wnioski przedstawione są klarownie. Treść założeń, rozumowań i wniosków jest jednoznaczna. Praca od strony edytorskiej jest starannie przygotowana, a rozplanowanie tekstu i układ graficzny są poprawne.

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy bardzo istotnego problemu związanego z coraz większą liczbą zachorowań na nowotwory złośliwe, zarówno w Polsce jak i na świecie. Jedno z czołowych miejsc w zachorowalności zajmuje rak gruczołu krokowego (rak prostaty). Chociaż naturalny przebieg tego typu nowotworu jest powolny i długotrwały, na świecie około 40% chorych umiera z jego powodu. Stąd istnieje potrzeba poszukiwania nowoczesnych metod terapeutycznych oraz modyfikowania metod obecnie stosowanych. Za podstawowe metody leczenia raka prostaty uznaje się terapię z użyciem promieniowania jonizującego, zarówno radioterapię jak i brachyterapię, w których skuteczność terapeutyczna zależy przede wszystkim od precyzyjnego podania dawki do napromienianego obszaru oraz wrażliwości napromienianych komórek.

Punktem wyjścia do badań Autorki były doniesienia literaturowe wskazujące że skutki promieniowania jonizującego obejmują nie tylko komórki napromienione, ale także sąsiednie nienapromienione komórki. Przyjęto, że efekt ten, zwany efektem sąsiedztwa jest wynikiem komunikacji międzykomórkowej, w której między innymi biorą udział pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zwane egzosomami.

W związku z powyższym Doktorantka postanowiła zbadać czy egzosomy są modulatorami promieniowrażliwości komórek nowotworowych gruczołu krokowego w aspekcie efektu sąsiedztwa wywołanego promieniowaniem jonizującym.

Autorka postawiła sobie trzy cele szczegółowe:

- zbadanie wpływu promieniowania jonizującego na charakterystykę promieniowrażliwości komórek nowotworowych gruczołu krokowego PC3 i DU145 oraz egzosomów przez nie wydzielanych,
- sprawdzenie, czy egzosomy wydzielane przez komórki nowotworowe PC3 wnikają do komórek PC3 i czy wpływają na ich promieniowrażliwość,
- zbadanie, czy egzosomy wyizolowane z komórek nowotworowych DU145 wnikają do komórek PC3 i czy modulują ich promieniowrażliwość.

Materiał do badań stanowiły dwie linie komórek nowotworowych gruczołu krokowego, PC3 i DU145. W tym miejscu chciałabym zapytać na jakiej zasadzie zostały wybrane linie komórkowe. Obraz morfologiczny badanych komórek, zamieszczony w tej części pracy, jest doskonałą ilustracją, jednak byłoby lepiej gdyby zamieszczono własne zdjęcia z naniesioną podziałką lub informacją o powiększeniu. Do przeprowadzenia badań wykorzystano źródło ^{241}Am oraz lampę rentgenowską. Doktorantka oszacowała moc dawki promieniowania α w oparciu o symulacje komputerowe z użyciem metod Monte Carlo oraz zmierzyła moc promieniowania X przy użyciu filmów radiochromowych. W celu charakterystyki promieniowrażliwości zastosowanych linii komórkowych Autorka posłużyła się klonogennym testem przeżywalności, testem apoptozy oraz pomiarami aktywności dehydrogenazy mleczanowej (test LDH) i stężenia interleukiny 6 (IL-6). Natomiast do zbadania wpływu egzosomów na promieniowrażliwość komórek nowotworowych PC3 wykorzystowała metodę Western Blot w celu potwierdzenia wniknięcia „carga” egzosomowego do badanych komórek oraz test apoptozy, aby ocenić ich wrażliwość na promieniowanie. W badaniach dotyczących modyfikowania promieniowrażliwości komórek PC3 za pomocą egzosomów DU145 wykorzystowała metodę Western Blot oraz test γH2AX i test apoptozy.

Zastosowane w doświadczeniach materiały oraz metody badawcze zostały dobrane w sposób adekwatny do postawionych celów badań i starannie opisane. Jednakże, mam wątpliwość co do precyzji opisu wysiewania komórek (np. str. 59). Czy możliwym jest wysianie komórek na szklane szkiełka nakrywkowe, które następnie umieszczano w płytkach 6-dołkowych? Wartym podkreślenia jest, że Autorka przygotowała schematy do wszystkich układów i oznaczeń eksperymentalnych, co jest znacznym ułatwieniem dla Czytelnika.

Dodatkowo, na końcu pracy umieściła szczegółowe protokoły laboratoryjne z hodowli komórek i izolacji egzosomów.

Podsumowując ten niezwykle istotny rozdział pracy, zgodnie z założeniem dysertacji naukowych, że materiał i metody powinny być przedstawione w sposób umożliwiający precyzyjne powtórzenie doświadczenia, w mojej ocenie spełnia ten warunek.

Rozdział „Wyniki i dyskusja” Autorka podzieliła logicznie na cztery podrozdziały: 1) dozymetria, 2) odpowiedź komórkowa na napromienianie, 3) charakterystyka egzosomów i 4) efekt sąsiedztwa indukowany przez egzosomy. Każdy z nich zakończony jest dyskusją i wnioskami. Wyniki zaprezentowano w formie wykresów i zdjęć oraz opisano w sposób bardzo szczegółowy. W mojej opinii jednak mało precyzyjnie zostały opisane wykresy dotyczące analizy poziomu apoptozy w komórkach traktowanych promieniowaniem. Z opisu można wnioskować, że na działanie promieniowania eksponowano trzy subpopulacje komórek.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę, dotyczące odpowiedzi komórkowej na napromienianie analizowanej klonogenenym testem przeżywalności pozwoliły na potwierdzenie wyższej skuteczności biologicznej promieniowania α w indukowaniu uszkodzeń komórkowych. Wykazały także wyższą promieniowrażliwość komórek PC3 w porównaniu do komórek DU145, co potwierdzono testem apoptozy. Jako nowatorski wynik badania Autorka wskazała analizę poziomu uwolnienia LDH w zależności od dawki promieniowania α dostarczonej do komórek nowotworowych gruczołu krokowego, co może być punktem wyjścia do badań możliwych mechanizmów radiooporności specyficznych dla danego nowotworu.

Kolejne wyniki uzyskane przez Doktorantkę, dotyczące określenia wpływu stresu indukowanego promieniowaniem jonizującym na koncentrację oraz średnicę egzosomów wydzielanych przez komórki nowotworowe gruczołu krokowego wykazały istotne statystycznie różnice w koncentracji egzosomów pomiędzy badanymi liniami komórkowymi dla zastosowanych dawek, ale wyłącznie dla promieniowania α . Zaobserwowano spadek koncentracji wydzielanych egzosomów wraz ze wzrostem dawki promieniowania. Autorka nie stwierdziła różnic w średnicy wydzielanych egzosomów.

Kolejnym, w mojej opinii bardzo ciekawym aspektem pracy było zbadanie efektu sąsiedztwa indukowanego przez egzosomy. Wyniki badań Kandydatki pokazały, że lizaty

komórkowe charakteryzowały się niższym poziomem tetraspanin CD63 i CD81 (analiza Western Blot) w porównaniu z próbkami komórek inkubowanych z egzosomami. Dodatkowo, Autorka zaobserwowała obecność ognisk naprawczych γ H2AX w komórkach kontrolnych PC3 współhodowanych z egzosomami wyizolowanymi z napromienionych komórek PC3 i DU145, co potwierdziło wystąpienie efektu sąsiedztwa. Co więcej, wyniki uzyskane przez Doktorantkę wskazały, że egzosomy wyizolowane z mniej promieniowrażliwych komórek DU145 mogą osłabiać wpływ promieniowania na komórki PC3 cechujące się wyższą promieniowrażliwością. Ważnym rezultatem tej części pracy badawczej jest wykazanie, że efekt sąsiedztwa indukowany promieniowaniem jonizującym w komórkach nowotworowych gruczołu krokowego może być inicjowany za pośrednictwem egzosomów.

Przedłożona praca dokumentuje ogromny wysiłek wykonawczy. Prowadzenie badań *in vitro* wymaga zaangażowania i umiejętności związanych z przeprowadzeniem czynności doświadczalnych. Ważnym jest, że na podstawie wyników Autorki powstały 3 prace opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych (PLOS One, Polish Journal of Medical Physics and Engineering, Radiation and Environmental Biophysics).

Oceniając całość recenzowanej rozprawy należy uznać, że jest ona świadectwem ogromnej pracowitości Doktorantki i bardzo dobrej znajomości literatury. Wyniki pracy wzbudzają wysoki stopień zaufania czytelnika. Wymienione przeze mnie usterki i niedociągnięcia nie wpływają na moją wysoką ocenę pracy i stwierdzam, że pani mgr Beata Pszczółkowska-Kępa prezentuje wysoki poziom wiedzy w dyscyplinie nauk fizycznych i posiada umiejętności samodzielnego prowadzenia działalności naukowej. Oceniam także jednoznacznie, że prezentowane badania stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a tym samym wnoszą cenny wkład do osiągnięć naukowych w Polsce i na świecie.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Beaty Pszczółkowskiej-Kępy „Wpływ egzosomów na promieniowrażliwość komórek nowotworowych gruczołu krokowego w kontekście efektu sąsiedztwa indukowanego promieniowaniem jonizującym” spełnia ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki

Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Beaty Pszczółkowskiej-Kępy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki fizyczne.

Halima Dżowke