

PAN - Instytut Immunologii
Wpl. dnia <u>12-05-2026</u>
L.dz. <u>90</u>

Warszawa, 8 maja 2026 r.

Dr hab. Kamil Brzoska, prof. IChTJ
Zakład Naukowy – Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa
e-mail: k.brzoska@ichtj.waw.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Rudawskiej pt. „Nowe strategie ukierunkowanego dostarczania nanocząstek węgla boru do środowiska nowotworowego w terapii borowo-neutronowej”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Rudawskiej została wykonana pod kierunkiem dr hab. Elżbiety Pajtasz-Piaseckiej, prof. PAN (promotor) oraz dr inż. Bożeny Szermer-Olearnik (promotor pomocniczy) w Zakładzie Onkologii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk. Badania będące podstawą rozprawy były realizowane w ramach dwóch projektów finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki. W projekcie OPUS 17 nr 2019/33/B/NZ5/02212 pt. „Synteza i biofunkcjonalizacja nanocząstek o wysokiej zawartości boru; zastosowanie w celowanej terapii borowo-neutronowej” Doktorantka pełniła rolę wykonawcy a w projekcie PRELUDIUM 21 2022/45/N/NZ5/03204 pt. „Komórki fagocytyjające jako nośniki boru w terapii borowo-neutronowej” Doktorantka pełniła funkcję kierownika.

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy terapii borowo-neutronowej (ang. Boron-Neutron Capture Therapy – BNCT) będącej rodzajem celowanej radioterapii. Podstawą tej terapii jest reakcja wychwytu neutronów termicznych przez jądra izotopu ^{10}B . Proces ten prowadzi do rozpadu jądra boru na jądro litu (^7Li) oraz cząstkę α , czemu towarzyszy emisja kwantu promieniowania γ . Uwolnione cząstki charakteryzują się wysokim współczynnikiem liniowego przekazu energii (ang. Linear Energy Transfer – LET), co sprawia, że ich zasięg w tkance biologicznej jest ograniczony do kilku mikrometrów. Dzięki temu depozycja energii następuje w bezpośrednim sąsiedztwie

miejsca reakcji, co pozwala na selektywne niszczenie komórek nowotworowych. Potencjał terapeutyczny opisanej reakcji dostrzeżono wkrótce po jej odkryciu w latach trzydziestych XX wieku. Skuteczność kliniczna terapii BNCT uwarunkowana jest jednoczesnym spełnieniem dwóch kluczowych warunków: selektywną akumulacją izotopu ^{10}B w komórkach nowotworowych w odpowiednim stężeniu oraz ekspozycją na wiązkę neutronów o odpowiedniej energii. Pomimo dekad intensywnych badań, optymalizacja obu tych parametrów w stopniu umożliwiającym wdrożenie BNCT do standardowej praktyki klinicznej pozostaje wyzwaniem. Początkowo głównym źródłem neutronów do BNCT były reaktory jądrowe, jednak ich wykorzystanie w klinice jest mocno ograniczone ze względu na niską dostępność i wysokie koszty utrzymania tego typu infrastruktury. Problem ten jest stopniowo rozwiązywany dzięki postępowi w technologii akceleratorowych źródeł neutronów. Rozwiązania te stają się obecnie dominującym standardem, przyspieszając badania kliniczne dzięki redukcji kosztów oraz możliwości instalacji akceleratorów w ośrodkach onkologicznych.

Obecnie najistotniejszym czynnikiem ograniczającym powszechną implementację BNCT w onkologii klinicznej jest brak nośników boru, które zapewniałyby wysoką selektywność dostarczania izotopu ^{10}B do komórek nowotworowych oraz uzyskanie w nich wymaganego stężenia terapeutycznego. Idealny nośnik powinien charakteryzować się minimalną toksycznością ogólnoustrojową oraz wysokim indeksem selektywności (stosunek stężenia boru w guzie do stężenia w tkankach zdrowych i krwi). Kluczową cechą poszukiwanych związków, szczególnie w kontekście leczenia nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, jest ich zdolność do przekraczania bariery krew-mózg. Dotychczas stosowane związki, takie jak BPA oraz BSH, nie spełniają wszystkich wymienionych kryteriów w satysfakcjonującym stopniu. W związku z tym prowadzone są intensywne badania nad nowymi generacjami nośników boru, które pozwolą na pełne wykorzystanie potencjału terapeutycznego terapii BNCT.

Zagadnienie poszukiwania innowacyjnych i efektywnych systemów dostarczania boru do komórek nowotworowych na potrzeby BNCT stanowi centralny punkt recenzowanej rozprawy doktorskiej. Na podstawie analizy literaturowej oraz wyników wcześniejszych badań, realizowanych we współpracy z Akademią Górniczo-Hutniczą im. Stanisława Staszica w Krakowie, Autorka wytypowała nanocząstki węgla bora (B_4C) jako obiecujący nośnik do zastosowania w tego typu terapii. Głównym celem podjętych badań było opracowanie strategii

ukierunkowanego dostarczania tych nanocząstek do środowiska nowotworowego, co w perspektywie może znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej BNCT.

Opisana problematyka oraz zdefiniowany cel pracy stanowią niezwykle istotne i aktualne wyzwanie badawcze. Wybór tej tematyki przez Doktorantkę oceniam jako wysoce interesujący i w pełni uzasadniony. Podjęte zagadnienia wpisują się w obecne światowe trendy rozwoju nanotechnologii medycznej oraz nowoczesnej radioterapii celowanej, niosąc ze sobą istotny potencjał aplikacyjny.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl publikacji, w skład którego wchodzi dwa artykuły oryginalne, preprint pracy oryginalnej zdeponowany w repozytorium oraz dwie prace przeglądowe. Publikacje te ukazały się w latach 2021–2025. Część publikacyjną uzupełnia autoreferat, obejmujący wprowadzenie teoretyczne, szczegółowe cele i zadania badawcze, omówienie poszczególnych prac wchodzących w skład cyklu, a także podsumowanie i wnioski. Do rozprawy dołączono oświadczenia wszystkich współautorów, precyzujące ich wkład w powstanie poszczególnych artykułów oraz opis osiągnięć naukowych Doktorantki. Taki układ rozprawy oceniam jako bardzo przejrzysty i dobrze przemyślany. Oświadczenia współautorów jednoznacznie wskazują na dominujący udział Doktorantki w przygotowaniu prac wchodzących w skład dysertacji. Z kolei załączony opis dorobku pozwala na szerszą ocenę aktywności naukowej Autorki, wykraczającą poza ramy badań opisanych w cyklu publikacji. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż Doktorantka brała udział w realizacji ośmiu projektów badawczych, a w jednym z nich pełniła funkcję kierownika. Warto również zauważyć, że poza dorobkiem stanowiącym podstawę rozprawy, mgr Anna Rudawska jest współautorką sześciu innych publikacji w prestiżowych, wysoko punktowanych czasopismach, co stanowi dowód jej wysokiej aktywności i dojrzałości naukowej.

W ramach swojej rozprawy doktorskiej mgr Anna Rudawska testowała dwie strategie ukierunkowanego dostarczania nanocząstek B₄C do środowiska nowotworowego. Pierwsza z nich opiera się na funkcjonalizacji powierzchni nanocząstek przeciwciałami wykazującymi powinowactwo do receptorów ulegających nadekspresji na komórkach nowotworowych. Jako modele takich receptorów wybrano receptor lipoproteiny o niskiej gęstości (ang. Low-Density Lipoprotein Receptor – LDLR) oraz receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR). W ramach drugiej strategii, Doktorantka testowała nowatorskie podejście, polegające na zastosowaniu makrofagów jako komórkowych nośników nanocząstek

B₄C. Strategia ta opiera się na naturalnej zdolności tych komórek do fagocytozy nanocząstek oraz ich aktywnej migracji i akumulacji w obszarze guza nowotworowego.

Układ artykułów tworzących rozprawę doktorską oceniam za bardzo dobrze przemyślany. Cenną jego częścią są dwa artykuły przeglądowe, które stanowią doskonałe wprowadzenie teoretyczne do badań opisanych w pracach oryginalnych. Cykl otwiera praca przeglądowa opublikowana w „Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej” pt. „Nanocząstki o wysokiej zawartości boru jako potencjalne nośniki w terapii borowo-neutronowej”. Autorzy przybliżają w niej podstawy działania BNCT oraz definiują kryteria, jakie powinien spełniać optymalny nośnik boru wykorzystywany w tej terapii. W pracy scharakteryzowano zarówno dotychczas stosowane, jak i projektowane związki boru, kładąc szczególny nacisk na węgiel boru i azotek boru, które dzięki wysokiej zawartości boru są atrakcyjną alternatywą dla klasycznych nośników.

Druga publikacja wchodząca w skład cyklu, zatytułowana „Functionalized boron carbide nanoparticles as active boron delivery agents dedicated to boron neutron capture therapy” ukazała się w czasopiśmie „International Journal of Nanomedicine”. Przedstawiono w niej wyniki badań nad strategią celowanego dostarczania nanocząstek B₄C do komórek nowotworowych poprzez ich funkcjonalizację przeciwciałami wykazującymi powinowactwo do receptorów ulegających nadekspresji na powierzchni komórek docelowych. Uzyskane wyniki potwierdziły, że modyfikacja powierzchni nanomateriału przeciwciałami zwiększa jego internalizację, przy czym intensywność tego procesu jest wprost proporcjonalna do poziomu ekspresji odpowiednich receptorów. Pracę oceniam bardzo wysoko, niemniej mam do niej następujące uwagi o charakterze krytycznym:

1) Na stronie 6638 Autorzy stwierdzają: „Another advantage of BNCT over standard radiotherapy is using a neutron beam that is electrically neutral as it passes through the human body. Only when neutrons encounter the ¹⁰B isotope do electrical interactions occur, resulting in energy generation.” Przyniesiony fragment jest nieprecyzyjny, gdyż sugeruje, że neutrony przechodzące przez tkankę biologiczną oddziałują wyłącznie z jądrami izotopu ¹⁰B. W rzeczywistości dochodzi również do istotnych interakcji neutronów z jądrami innych pierwiastków, takich jak azot (reakcja wychwytu na ¹⁴N) i wodór, co wiąże się z nieuniknioną depozycją pewnej dawki energii niezależnie od reakcji z borem.

2) Na tej samej stronie (s. 6638) Autorzy stwierdzają: „The advantage of B₄C is its large cross-section, making it an effective neutron absorber”. Sformułowanie to wymaga

doprecyzowania, ponieważ wysoki przekrój czynny na wychwyt neutronów termicznych jest cechą charakterystyczną izotopu ^{10}B , a nie związku chemicznego, jakim jest węgiel boru.

3) Na stronie 6644 zamieszczono informację, że zwiększenie stężenia przeciwciał dodawanych do zawiesiny nanocząstek B_4C skutkowało wzrostem potencjału zeta i średnicy hydrodynamicznej nanocząstek. Dla większej przejrzystości i ułatwienia interpretacji danych przez czytelnika, wskazane byłoby zaprezentowanie tych zależności w formie tabelarycznej lub graficznej.

4) W podrozdziale poświęconym internalizacji funkcjonalizowanych nanocząstek przez komórki nowotworowe (s. 6648) brakuje porównania z nanocząstkami niefunkcjonalizowanymi. Porównanie takie byłoby możliwe do przeprowadzenia w oparciu o parametr SSC obrazujący zmianę ziarnistości komórek w wyniku akumulacji nanomateriału.

5) Rysunek 6 na stronie 6650 wskazuje na znaczną niejednorodność w pobieraniu nanocząstek funkcjonalizowanych przeciwciałem anti-LDLR. W badanej populacji część komórek wykazała wysoką akumulację nanocząstek, podczas gdy u pozostałych była ona znikoma. Odminną zależność zaobserwowano dla nanocząstek modyfikowanych przeciwciałem anti-EGFR, gdzie stopień akumulacji był wysoce homogenny w całej populacji komórek. W pracy brakuje merytorycznego odniesienia się do tych różnic oraz próby ich wyjaśnienia w ramach dyskusji wyników.

Trzecia publikacja, zatytułowana „Macrophages as promising carriers of nanoparticle delivery in anticancer therapy” opublikowana w „International Journal of Nanomedicine” jest pracą przeglądową stanowiącą doskonałe wprowadzenie do kolejnego etapu badań dotyczącego wykorzystania makrofagów jako nośników nanocząstek B_4C . Autorzy przedstawili w niej kompleksową charakterystykę biologii i funkcji makrofagów jako ważnego elementu układu odpornościowego, uwzględniając ich dwoistą rolę w progresji nowotworu oraz potencjał aplikacyjny w dostarczaniu nanomateriałów terapeutycznych. Szczególną uwagę poświęcono zróżnicowaniu fenotypowemu tych komórek oraz wpływowi parametrów fizykochemicznych nanocząstek na efektywność ich internalizacji. Istotnym elementem pracy jest również analiza możliwości zmiany fenotypu makrofagów pod wpływem interakcji z nanocząstkami.

Powyższe aspekty poddano szczegółowej weryfikacji doświadczalnej w kontekście nanocząstek B_4C w trakcie badań opisanych w czwartej z publikacji składających się na rozprawę doktorską. Publikacja ta nosi tytuł „Macrophages as carriers of boron carbide nanoparticles

dedicated to boron neutron capture therapy” i została opublikowana w czasopiśmie “Journal of Nanobiotechnology”. Publikacja zawiera kompleksową analizę potencjału makrofagów jako nośników nanocząstek B_4C – począwszy od oceny cytotoksyczności nanocząstek i ich wchłaniania, aż po analizę wpływu nanomateriału na zdolności migracyjne komórek, co ma kluczowe znaczenie w kontekście ich infiltracji do mikrośrodowiska guza. Przeprowadzone badania potwierdziły, że makrofagi stanowią obiecujący nośnik boru dla potrzeb BNCT. Należy podkreślić, że badania prowadzono z uwzględnieniem zróżnicowania fenotypowego makrofagów, co w mojej ocenie znacząco podnosi wartość merytoryczną publikacji. Moja jedyna uwaga do omawianej publikacji dotyczy sposobu prezentacji wyników analizy zawartości boru w komórkach metodą spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energii (ang. Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy – EDS). Wyniki te nie są szczegółowo omówione w tekście, a figura S1 jest mało czytelna i trudna do interpretacji dla czytelnika nieobeznanego z techniką EDS. Znacznie korzystniejszym rozwiązaniem byłoby zaprezentowanie tych wyników w formie analogicznej do tej, którą zastosowano w figurze 3 w publikacji V.

Ostatnią część rozprawy doktorskiej stanowi preprint pracy oryginalnej pt. „Bone marrow-derived macrophages loaded with boron carbide nanoparticles as selective boron carriers for crossing the blood-brain barrier toward the glioma microenvironment for boron neutron capture therapy”. Manuskrypt został zdeponowany w repozytorium bioRxiv. Brakuje informacji o złożeniu manuskryptu do konkretnego czasopisma oraz o jego aktualnym statusie w procesie redakcyjnym. Badania opisane w preprincie stanowią logiczne rozszerzenie badań opisanych w czwartej publikacji cyklu poprzez wykorzystanie innego modelu komórkowego – makrofagów izolowanych ze szpiku kostnego myszy podzielonych pod względem fenotypu na makrofagi M0, M1 i M2. Szczególnie wartościowym elementem tej pracy jest analiza wpływu nanocząstek na zdolność makrofagów do migracji przez warstwę komórek śródbłonna linii bEnd.3, stanowiącą model *in vitro* bariery krew-mózg. Przeprowadzone badania wykazały, że internalizacja nanocząstek B_4C nie upośledza zdolności makrofagów do pokonywania tej bariery. Jest to wniosek kluczowy w kontekście potencjalnego zastosowania metody BNCT w leczeniu trudno dostępnych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. Na uwagę zasługuje również analiza interakcji między komórkami nowotworowymi a makrofagami w zaawansowanym modelu 3D, wykorzystującym sferoidy utworzone z komórek glejaka GL-261 oraz makrofagów o różnych fenotypach. Moje jedyne zastrzeżenie do omawianej pracy dotyczy obecnego na stronie 18 stwierdzenia, że

makrofagi załadowane nanocząstkami nie wpływają na żywotność sferoidów, podczas gdy makrofagi kontrolne istotnie zwiększają żywotność komórek nowotworowych tworzących sferoidy. Stwierdzenie to nie znajduje potwierdzenia w wynikach zaprezentowanych na figurze 6B, gdzie różnice w żywotności nie są statystycznie istotne.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Anny Rudawskiej wyróżnia się wysokim stopniem oryginalności oraz dojrzałością naukową. Analiza dwóch komplementarnych strategii dostarczania nanocząstek B₄C do nowotworu – aktywnego celowania molekularnego (poprzez funkcjonalizację przeciwciałami) oraz wykorzystania naturalnych właściwości migracyjnych komórek układu odpornościowego – stanowi istotny wkład w rozwój nowoczesnej terapii BNCT. Interpretacja uzyskanych wyników jest poprawna i osadzona w aktualnym stanie wiedzy. Autorka umiejętnie konfrontuje własne obserwacje z danymi literaturowymi, wskazując zarówno na ich spójność z dotychczasowym stanem wiedzy, jak i na nowe aspekty badanych zjawisk.

Należy podkreślić, iż praca opiera się na szerokim spektrum zaawansowanych technik badawczych. Wykorzystanie metod takich jak analizy żywotności i migracji komórek, spektrometria mas sprzężona z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-MS), holotomografia, cytometria przepływowa, mikroskopia fluorescencyjna i transmisyjna mikroskopia elektronowa pozwoliło na wieloaspektową i wiarygodną weryfikację postawionych hipotez badawczych.

Do najważniejszych zalet rozprawy należy zaliczyć wysoki poziom interdyscyplinarności (łączy biologię, immunologię, radiobiologię i nanotechnologię), dużą spójność tematyczną publikacji wchodzących w skład rozprawy oraz znaczący potencjał aplikacyjny przedstawionych wyników.

Jako pewne ograniczenie pracy można wskazać brak badań na modelach *in vivo* oraz brak bezpośredniego testu skuteczności BNCT tj. eksperymentów radiobiologicznych z wykorzystaniem wiązki neutronów, co byłoby naturalnym dopełnieniem badań. Niemniej jednak, uwagi te nie obniżają wysokiej wartości merytorycznej rozprawy, a jedynie wskazują zasadne kierunki dalszych badań w ramach podjętej tematyki.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska mgr Anny Rudawskiej to wartościowe i nowoczesne opracowanie naukowe, wnoszące istotny wkład w rozwój terapii borowo-neutronowej i nanomedycyny oraz stanowiące podstawę do dalszych badań w kierunku zastosowań klinicznych. Autorka wykazała

się dużą wnikliwością badawczą, biegłością w wykorzystaniu szerokiego spektrum technik eksperymentalnych oraz umiejętnością interpretacji uzyskanych wyników.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) oraz wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ponadto, z uwagi na szeroki zakres przeprowadzonych badań, ich interdyscyplinarny charakter oraz wysoki poziom naukowy i doniosłość podjętej tematyki badawczej, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy.



Dr hab. Kamil Brzośka, prof. IChTJ